

Base de Agar Campylobacter Exento de Sangre (CCDA) ISO

Cat. 1129

Medio selectivo para el aislamiento de Campylobacter spp.

Información práctica

Aplicaciones	Categorías
Recuento selectivo	Campylobacter
Aislamiento selectivo	Campylobacter

Industria: Aguas de consumo / Alimentación

Regulaciones: ISO 10272 / ISO 11133

Principios y usos

La Base de Agar Campylobacter Exento de Sangre (CCDA) sigue la fórmula modificada descrita por Bolton et al., que reemplaza la sangre por carbón, piruvato sódico y sulfato ferroso. Este medio apoya el crecimiento de la mayoría de los Campylobacter entéricos y se recomienda para el aislamiento selectivo de Campylobacter jejuni, Campylobacter coli y Campylobacter termófilas, en alimentos y en muestras clínicas y no clínicas. Está recomendado por la norma ISO 10272.

Campylobacter se considera la principal causa de enfermedades entéricas. Campylobacter spp. puede causar diarrea de leve a grave, con deposiciones sueltas y acuosas seguidas frecuentemente por diarrea con sangre. Estos patógenos son muy infecciosos y se transmiten por alimentos o agua contaminados.

El medio contiene sulfato ferroso, piruvato de sodio y carbón para promover el crecimiento de especies de Campylobacter, ya que atrapan las formas tóxicas de oxígeno (peróxido de hidrógeno) aumentando la aerotolerancia y permitiendo aislar fácilmente las cepas sensibles al oxígeno. El desoxicolato de sodio inhibe parcial o completamente organismos Gram positivos, coliformes y Proteus. El digerido enzimático del tejido animal, el digerido enzimático de caseína, y el extracto de carne, proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El agar bacteriológico es el agente solidificante. La cefoperazona aumenta la selectividad e inhibe el crecimiento de bacilos entéricos Gram negativos y algunas especies Gram positivas, mientras que la anfotericina B suprime levaduras y hongos. El incremento de la temperatura ha mostrado un aumento en la selectividad.

Fórmula en g/L

Digerido enzimático de caseína	3	Carbón activado	4
Agar bacteriológico	12	Sulfato ferroso	0,25
Extracto de carne	10	Cloruro sódico	5
Desoxicolato de sodio	1	Piruvato sódico	0,25
Digerido enzimático de tejido animal	10		

Preparación

Suspender 22,75 gramos del medio en 500 ml de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 44-47°C y agregar asepticamente un vial de Suplemento CCDA (Campylobacter Exento de Sangre) (Cat. 6053), previamente reconstituido en 5 ml de agua destilada estéril. Homogenizar suavemente y dispensar en placas de Petri.

Instrucciones de uso

Para la detección y enumeración de Campylobacter spp. de acuerdo a la norma ISO 10272:

Para muestras con bajo número de campylobacters y bajo nivel de microflora acompañante y/o campylobacters estresados:

- Inocular 10 g o 10 ml de la porción de muestra en 90 ml del medio de enriquecimiento Caldo Bolton (Cat. 1441), para obtener una dilución de 1 en 10.
- Incubar en una atmósfera microaerobia a 37 °C durante 4 a 6 horas, luego a 41,5 °C durante 44 ± 4 horas.
- Usando el cultivo obtenido del caldo de enriquecimiento (Caldo Bolton), inocular el medio CCDA y otro medio selectivo de Campylobacter con un asa estéril.
- Incubar las placas CCDA a 41,5 °C en atmósfera microaerobia durante 44±4 horas.

- Confirmar las colonias sospechosas.

Para muestras con bajo número de campylobacters y alto nivel de microflora acompañante:

- Inocular 10 g o 10 ml de la porción de muestra en 90 ml del medio de enriquecimiento Caldo Preston (Cat. 2166), para obtener una dilución de 1 en 10.
- Incubar en una atmósfera microaerobia a 41,5 °C durante 14 ± 2 horas.
- Usando el cultivo obtenido del caldo de enriquecimiento (Caldo Preston), inocular el medio CCDA con un asa estéril.
- Incubar las placas CCDA a 41,5 °C en atmósfera microaerobia durante 44 ± 4 horas.
- Confirmar las colonias sospechosas.

Para muestras con un alto número de campylobacters:

- Inocular la porción de muestra si el producto es líquido o la suspensión inicial en caso de otros productos (plaqueo directo) en placas CCDA.
- Incubar las placas a 41,5 °C en atmósfera microaerobia durante 44 ± 4 horas.
- Confirmar las colonias sospechosas.
- El método de plaqueo directo es el procedimiento adecuado para contar las colonias de Campylobacter.

Si hay poca información disponible sobre las muestras de prueba, usar uno de los dos métodos de enriquecimiento en paralelo con el método de plaqueo directo.

Las colonias típicas son grisáceas, a menudo con un brillo metálico, y son planas y húmedas, con tendencia a extenderse.

Para confirmar las colonias sospechosas examinar las colonias de Campylobacter para determinar su morfología y movilidad con un microscopio, subcultivadas en un agar sangre no selectivo. Confirmar mediante la detección de la actividad oxidasa y una prueba de crecimiento aeróbico a 25 °C.

Control de calidad

Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25°C)
Sin restos	Polvo fino	Negro	Negro	7,4±0,2

Test microbiológico

De acuerdo a ISO 10273:

Condiciones de incubación: (41,5±1 °C, atmósfera microaeróbica /44±4 h).

Condiciones de inoculación: Productividad cuantitativa (100±20. Min.50 CFU) / Productividad cualitativa (10³-10⁴ CFU) / Selectividad (10⁴-10⁶ CFU).

Medio de referencia: Blood Agar.

Microrganismos	Especificación	Reacción característica
Escherichia coli ATCC 25922	Inhibición total o parcial (0-1)	
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Inhibición total (0)	
Campylobacter jejuni ATCC 29428	Buen crecimiento (2) >50%	Grisáceas, planas y húmedas, a veces con brillo metálico
Campylobacter coli ATCC 43478	Buen crecimiento (2) >50%	Grisáceas, planas y húmedas, a veces con brillo metálico

Almacenamiento

Temp. Min.: 2 °C
Temp. Max.: 25 °C

Bibliografía

Bolton F.J. Hutchinson D.N. y Cioste D. (1984) clin. Microbiol. 19,169-171 Bolton E.J., Roberstson L. (1982) J. Clin Parth 35, 462-67

ISO 10272-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. – Part 1: Detection method