



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII,
MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AGENȚIA NAȚIONALĂ
PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ



DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL *CAMPYLOBACTER* ÎN PROBE UMANE ȘI PRODUSE ALIMENTARE

Indicații metodice

Chișinău, 2019

Indicații metodice

**DIAGNOSTICUL DE LABORATOR
AL *CAMPYLOBACTER*
ÎN PROBE UMANE ȘI
PRODUSE ALIMENTARE**

Chișinău, 2019

Aprobat la ședința Consiliului de Experti al Ministerului Sănătății, Muncii și Protecției Sociale al Republicii Moldova din 24.01.2019 proces-verbal nr. 1

Indicațiile metodice prezintă un act normativ destinat specialiștilor care activează în domeniul diagnosticului microbiologic de laborator și stabilesc principiile, metodele și procedeele de organizare și realizare a activităților privind diagnosticul de laborator al *Campylobacter*.

Indicațiile metodice au fost elaborate de către grupul de lucru:

Colectiv de autori:

Halacu Ala,	director adjunct, Centrul Național de Sănătate Publică
Burduniuc Olga,	medic microbiolog, conferențiar cercetător, dr. șt. med. Centrul Național de Sănătate Publică
Prudnicionoc Svetlana,	medic microbiolog Centrul Național de Sănătate Publică
Bălan Greta,	conferențiar universitar, dr. șt. med. Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
Vorojbit Valentina,	conferențiar universitar, dr. șt. med. Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
Coteț Olga,	medic microbiolog Centrul Național de Sănătate Publică

Recenzenți:

Rudic Valeriu	doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician, Om emerit al R.Moldova
Bortă Vasile	doctor în științe medicale, conferențiar universitar

Scopul

Indicațiile metodice prezente au ca scop perfecționarea diagnosticului de laborator al infecției asociate cu *Campylobacter* spp. în laboratoarele microbiologice prin stabilirea procedurilor de monitorizare și metodelor de detectare a bacteriilor din genul *Campylobacter* – agenți patogeni în intoxicațiile alimentare și boli diareice acute, stabilirea diagnosticului etiologic și efectuarea supravegherii epidemiologice, precum și investigarea de laborator a focarelor cu intoxicații și infecții alimentare.

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții

Diagnosticul de laborator al *Campylobacter* în probe umane și produse alimentare: Indicații metodice / col. de aut.: Halacu Ala, Burduniuc Olga, Prudnicionoc Svetlana [et al.]. – Chișinău : S. n., 2019 (Î.S. F.E.-P. „Tipografia Centrală”). – 44 p.

Referințe bibliogr.: p. 41 (15 tit.). – 200 ex.

ISBN 978-9975-3375-7-1

CUPRINS

INTRODUCERE.....	4
1. TAXONOMIE ȘI CLASIFICARE.....	5
2. PROPRIETĂȚI MORFOLOGICE, CULTURALE, BIOCHIMICE ȘI ANTIGENICE	6
3. FACTORII ȘI CĂILE DE TRANSMITERE.....	9
4. PATOGENEZA INFECȚIILOR CU CAMPYLOBACTER.....	10
5. CLINICA CAMPILOBACTERIOZEI	11
6. IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA BACTERIILOR DIN GENUL CAMPYLOBACTER DIN PRELEVATE DE LA PACIENT.....	12
7. TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE.....	19
8. METODA SEROLOGICĂ DE DIAGNOSTIC.....	20
9. IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA BACTERIILOR DIN GENUL CAMPYLOBACTER ÎN PRODUSELE ALIMENTARE.....	21
10. PROCEDURA DE ANALIZĂ	25
Anexe	
Anexa 1 Caracterele de diferențiere pentru Campylobacter, Arcobacter și Helicobacter pylori (adaptat după Penner1)	28
Anexa 2 Crearea condițiilor de microaerobioză de cultivare	29
Anexa 3 Metode de detectare a Campylobacter spp. în probe umane.....	30
Anexa 4 Metode de detectare a Campylobacter spp. în produse alimentare.....	30
Anexa 5 Metode de numărare a Campylobacter spp. în produse alimentare.....	31
Anexa 6 Exemple de interpretare a testelor de identificare, confirmare, diferențiere a Campylobacter	31
Anexa 7 Compoziția și prepararea mediilor de cultură și reactivilor.....	32
Referințe bibliografice	41

INTRODUCERE

Bolile diareice reprezintă cea mai frecventă patologie care rezultă din consumarea alimentelor nesigure. Conform datelor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), bolile diareice apar în întreaga lume în rândul a 550 de milioane de oameni anual, dintre care 220 de milioane sunt copii cu vârsta sub 5 ani. În cazul celor din urmă se întâlnesc forme grave de toxinfecții alimentare și boli diareice.

Pentru prima dată campilobacteriile au fost depistate la om în anul 1947, iar în 1972 s-a stabilit că ele pot provoca bacteriemie și diaree la copiii mici.

Infecția cu *Campylobacter* spp. este considerată a fi cea mai frecventă cauză bacteriană de gastroenterită din lume. *Campylobacter jejuni* și *Campylobacter coli* sunt recunoscute ca fiind printre principalele cauze ale bolilor diareice bacteriene în multe țări dezvoltate. Datele OMS arată că manifestările clinice în enteritele determinate de *Campylobacter* nu se deosebesc de cele cauzate de alți agenți etiologici ai bolii diareice acute, ca *Salmonella* și *Shigella*. *Campylobacter fetus* determină avorturi spontane la bovine și ovine, dar este și un agent patogen oportunist la om.

Incidența crescută a diareei cauzate de *Campylobacter* spp., precum și durata și posibilele complicații, o face importantă din punct de vedere socio-economic. Mai cu seamă în țările în curs de dezvoltare, unde infecțiile cu *Campylobacter* spp. sunt deosebit de frecvente în rândul copiilor cu vârsta sub 2 ani, uneori ajungându-se la deces. În plus, o persoană din zece suferă de toxinfecție alimentară, iar 33 de milioane de ani de viață sănătoasă sunt pierduți din cauza bolii.

Aceste bacterii sunt larg raspandite în natură, fiind prezente în intestinul a numeroase specii de mamifere (porci, vaci, capre, oi, caini, pisici, rozatoare) și păsări (pui, curcani), precum și în apa contaminată cu materii fecale. *Campylobacter fetus* poate fi de asemenea găsit în tractul genital al acestor animale, placenta și conținutul gastric al avortonilor. Potrivit OMS specii de *Campylobacter* au mai fost găsite și în crustacee.

În Republica Moldova nivelul scăzut al identificării campilobacteriilor se explică prin subaprecierea rolului lor în etiologia infecțiilor intestinale acute, dificultățile de izolare și identificare, condiționate de necesitatea utilizării mediilor de cultură speciale și creării condițiilor de microaerofilie și termofilie, de creșterea lentă a campilobacteriilor, etc. Din aceste motive diagnosticul de laborator al infecției cu *Campylobacter* necesită să fie perfecționat și unificat.

Capitolul I

TAXONOMIE ȘI CLASIFICARE

Familia *Campylobacteriaceae* include genurile *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* și al. Genul *Campylobacter* a fost constituit în anul 1963, iar taxonomia genului *Campylobacter* a fost mult discutată și revizuită în ultima decadă. La început în acest gen erau incluse doar două specii: *Campylobacter fetus* și *Campylobacter bubulus* (acum *Campylobacter sputorum*). În prezent genul *Campylobacter* cuprinde peste 20 de specii și subspecii distincte în funcție de ecologie și capacitatea lor patogenă (tabelul 1).

Campylobacter jejuni subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis* și *Campylobacter helveticus* formează un grup apropiat din punct de vedere genetic și sunt cel mai frecvent izolate din scaune diareice umane și animale. *Campylobacter hyoilei*, izolat din leziunile enteritei proliferative porcine, a fost identificat mai târziu printr-o gamă largă de metode fenotipice și genotipice ca o tulpină de *Campylobacter coli*. Totuși, s-a sugerat că aceste tulpini pot reprezenta o variantă patogenică (patovar) a *Campylobacter coli* și identificarea unui marker genetic care este evident specific pentru *Campylobacter hyoilei* și observarea unor diferențe metabolice (Dep et al., 1999), face ca această perspectivă să fie fezabilă.

Tabelul 1

Genul *Campylobacter*

<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter sputorum</i>
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i>
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>oylei</i>	<i>C. sputorum</i> biovar <i>fecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i> (<i>C. hyoilei</i>)	<i>C. sputorum</i> biovar <i>paraureolyticus</i>
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Campylobacter mucosalis</i>
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	<i>Campylobacter concisus</i>
<i>Campylobacter helveticus</i>	<i>Campylobacter curvus</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>Lawsonii</i>	

Capitolul II

PROPRIETĂȚI MORFOLOGICE, CULTURALE, BIOCHIMICE ȘI ANTIGENICE

Potrivit „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (1984), genul *Campylobacter* cuprinde bastonașe subțiri, Gram negative, mici, nesporulate, incurbate în formă de spirală (0,2-0,8 μm – 0,5-5 μm), ce cresc în atmosfera de 5-10% oxigen, fiind considerate microaerofile. Atunci când două sau mai multe celule bacteriene sunt grupate împreună, ele capătă forma de „S” sau „V” cu aspect de „aripi de pescăruși”. Campilobacteriile nu formează spori și capsule, majoritatea speciilor sunt mobile datorită prezenței unui flagel polar care determină o mobilitate specifică asemănătoare cu „zbor de musculițe” sau „tirbușonare”. Ca excepție sunt *Campylobacter gracilis*, care este non-motil și *Campylobacter showae*, care are mai mulți flageli. (Debruyne et al., 2005).

Baciliile sunt adaptați colonizării tractului digestiv și aparatului reproducător, prezentând o motilitate particulară, care permite bacteriilor să traverseze epiteliul de acoperire prin mișcări de „tirbușonare”. După unii autori, *Campylobacter* se transformă, în condiții nefavorabile, în forme cocoide, imobile sau hiperspiralizate, necultivabile (Portner et al., 2007), „dormante”, prin care supraviețuiesc timp îndelungat în mediul inconjurător și revin la forma cultivabilă, virulentă, când ajung într-o gazdă favorabilă. Cappelier (1997) a observat în condiții de laborator, că tulpinile de *Campylobacter*, izolate din solul din jurul crescătoriiilor de pui, s-ar fi putut transforma în forme viabile, dar necultivabile și ar fi putut fi cultivate după trecerea prin tractul intestinal al găinilor. Toate aceste variante morfologice ale *Campylobacter* sunt ușor evidențiate în colorarea cu azuriiu-eozină sau cristal violet. În același timp, în substraturi naturale, în principal materii fecale, celulele *Campylobacter* sunt, de obicei, slab colorate după Gram.

Bacteriile din genul *Campylobacter* sunt microaerofile și capnofile, adică necesită pentru cultivare concentrații reduse de oxigen (5%) și un nivel ridicat (5-10%) de dioxid de carbon. Activitatea oxidazei este prezentă la toate speciile, cu excepția *Campylobacter gracilis*. Nu fermentează și nici nu oxidează carbohidrații; în schimb, obțin energie din aminoacizi sau intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici (Vandamme, 2000). *Campylobacter jejuni* hidrolizează hipuratul, acetatul de indoxil și reduce nitratul. Cele mai multe tulpini sunt rezistente la cefalotină și, de asemenea, a fost raportată rezistența la fluorochinolone, o categorie de antibiotice utilizate în mod obișnuit pentru tratarea bolilor animale și umane (Koenraad et al., 1995).

Campilobacteriile sunt sensibile la uscare și expunere prelungită la lumina puternică a soarelui, ceea ce limitează posibilitatea transmiterii lor. Cu toate acestea, rezistența bacteriilor din genul *Campylobacter* la acțiunea factorilor de mediu este foarte mare: în lapte sau apă supraviețuiesc la 4 °C timp de câteva săptămâni; în ape de suprafață la 25°C – 4 zile; în apa din apeduct la 20°C – 12-24 ore, la 37°C – 6-12 ore. În laptele de vacă la 25°C campilobacteriile mor după 3 zile, în sol și îngrășământul de păsări se păstrează până la 30 de zile. La 4°C, campilobacteriile din

fecalele umane mor după 3 săptămâni, în urină – după 5 săptămâni, în bilă – după 1-2 luni. La 25°C capacitatea de a supraviețui în bilă este redusă la 1-3 săptămâni, la 37°C ele nu numai că supraviețuiesc, dar și se înmulțesc, după încălzire la 60°C, campilobacteriile mor după 1 minut, fierberea și clorinarea apei le elimină complet.

Scurtă descriere a speciilor de *Campylobacter*

Campilobacteriile pot fi împărțite în două grupe în funcție de cerințele specifice față de temperatură:

- 1) specii care se dezvoltă la 25°C, dar nu și la 42°C (*C. fetus*);
- 2) specii care se dezvoltă la 42°C, dar nu și la 25°C, numite campilobacterii termotolerante și care sunt principalii agenți ai gastroenteritelor umane. Acestea din urmă includ mai multe specii dintre care cele mai importante sunt: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. hyoilei*, *C. hyointestinalis* și *C. showae*.

Dintre speciile genului *Campylobacter*, *C. jejuni* este cea mai frecvent izolată în patologia umană; *C. coli* și *C. fetus* sunt izolate în proporții egale. Alte specii cum ar fi *C. upsaliensis*, *C. lari*, sunt mai rar izolate în Europa.

Campylobacter jejuni este semnificativă pentru om, fiind responsabilă de 85-90% din cazurile de gastroenterită acută campilobacteriană la om, cu caracter epidemiologic de toxiiinfecție alimentară, iar uneori implicată și în infecțiile urinare. Este larg răspândită la păsări și mamifere, cele mai multe cu rol de purtător intestinal.

Campylobacter coli a fost separată ca specie distinctă pe baza hibridizării ADN-ului, fiind implicată în 5-15% din cazurile de enterită campilobacteriană la om. Se găsește în intestinul diferitelor animale, gazda ei obișnuită fiind porcul. Este mai puțin exigent la dezvoltarea pe mediile de cultură decât alte specii și trece mai lent în forme cocoide. Se deosebește de *C. jejuni* pe baza incapacității sale de a hidroliza hipuratul de sodiu.

Campylobacter lari apare frecvent pe carcasele, pipotele și ficatul de pasăre, producând enterite la om și păsări.

Campylobacter sputorum cu 3 subspecii (*sputorum*, *bubulus* și *mucosalis*), manifestă toleranță mai mare față de oxigen, este capabil să reducă nitrații și să producă H₂S.

Campylobacter concisus produce gingivite și peritonite la om (tabelul nr. 2).

Campylobacter este un microaerofil și se dezvoltă mai bine într-o atmosferă care conține 5% oxigen. Microaerofilia se datorează incapacității de a sintetiza compuși care leagă Fe⁺⁺⁺ la nivele suficiente care să permită dezvoltarea în condiții aerobe. Unii cercetători au constatat o creștere a toleranței față de aerul atmosferic în mediile agarizate la care se adaugă câte 0,025% sulfat feros, metasulfid de sodiu și piruvat de sodiu (FBP). Adăugarea acestor substanțe la mediile de cultură mărește capacitatea de supraviețuire a *Campylobacter* și îi păstrează morfologia caracteristică, mobilitatea și viabilitatea la 4°C (30 zile) sau la temperatura camerei (20 zile) în condiții atmosferice normale. Pentru dezvoltare, în afară de o concentrație optimă de 5% O₂, bacteria are nevoie, de asemenea, de o concentrație optimă de dioxid de carbon (10%) și de azot (85%). Absența uneia

sau a două componente din atmosfera de incubare inhibă dezvoltarea acestei bacterii. Sulfatul feros și clorura de cadmiu au efect antagonist asupra dezvoltării bacteriei, iar factorii prezenți în mediul cu sânge și cu tioglicolat neutralizează activitatea inhibitorie a sărurilor de cadmiu.

Tabelul 2

Reprezentanții genului *Campylobacter* și rolul lor în patologia umană

Specia	Sursa de izolare	Clinica
<i>C. jejuni</i>	Omul, animalele, păsările	Septicemie, gastroenterită, proctită, avorturi spontane, afectarea organelor interne
<i>C. jejuni</i> spp. <i>doylei</i>	Omul, animalele, păsările	Gastrită, gastroenterită
<i>C. coli</i>	Omul, porcinele, vitele cornute mari, ovinele, păsările	Septicemie, gastroenterită, afectarea organelor interne
<i>C. lari</i>	Omul, păsările, câinii, pisicele, maimuțele	Septicemie, gastroenterită, infecția tractului urinar
<i>C. upsaliensis</i>	Omul, câinii, pisicele	Septicemie, gastroenterită, abcese
<i>C. fetus</i> spp. <i>fetus</i>	Omul, ovinele, vitele cornute mari	Septicemie, gastroenterită, avorturi spontane, afectarea organelor interne
<i>C. hyointestinalis</i>	Omul, porcinele, vitele cornute mari, hîrciogii	Gastroenterită, proctită (homosexuali)
<i>C. sputorum</i>	Omul, porcinele, vitele cornute mari	Gastroenterită, abcese
<i>C. mucosalis</i>	Porcinele	Adenomatoză intestinală, enterită, ileită
<i>C. consisus</i>	Omul	Paradontită, colită, gastroenterită, septicemie
<i>C. rectus</i>	Omul	Periodontită, gastroenterită
<i>C. curvus</i>	Omul	Gastroenterită, periodontită
<i>C. showae</i>	Omul	Gingivită, periodontită, stomatită

Pe medii lichide campilobacteriile produc turbiditate discretă observabilă la câțiva mm sub fața superioară a coloanei de mediu. Coloniile dezvoltate pe suprafață mediilor solide pot avea două aspecte principale:

- a) colonii foarte mici, aplatizate, cenușii, fin granulate și translucide, cu margini neregulate, asemănătoare picăturilor mici de miere;
- b) colonii rotunde cu margini translucide.

Uneori formează colonii de tip R, cu suprafața uscată, marginile neregulate sau colonii cu aspect mucos. Mediile cu sânge sunt favorabile dezvoltării campilobacteriilor, acestea producând doar o ușoară hemoliză de tip alfa.

Campilobacteriile au metabolism de tip respirator și proprietăți metabolice limitate. Reduc nitrații cu excepția speciilor aerotolerante. Sunt incapabile să fermenteze sau să oxideze hidrații de carbon, deoarece nu pot fosforila și transporta glucoza. Nu produc acizi sau substanțe finale neutre din metabolizarea diferitor substraturi. Nu hidrolizează gelatina, cazeina, esculina și sunt indol, RM și VP negative, oxidazo-pozitive și posedă catalază în mod obișnuit. Nu elaborează lipaze și, cu excepția speciei *C. mucosalis* care produce pigmenți galbeni, sunt apigmentogene (anexa 1).

Capitolul III

FACTORII ȘI CĂILE DE TRANSMITERE

3.1 PRIN PRODUSE ALIMENTARE

Infecția apare în general vara și este rezultatul ingestiei alimentelor preparate necorespunzător. Adesea transmiterea infecției are loc prin carnea de pasăre. Spre deosebire de *Salmonella*, *Campylobacter* nu se multiplică în alimente, dar ele pot supraviețui o perioadă de timp în mediul extern. Igiena necorespunzătoare în bucătărie de asemenea poate duce la infecții, de exemplu, prin intermediul plăcilor de tăiere sau cuțitelor care sunt insuficient prelucrate după prepararea cărnii crude.

Produsele alimentare deseori contaminate cu *Campylobacter* sunt: carnea de pasăre și produsele din aceasta care nu au fost supuse unui tratament termic adecvat, laptele nepasteurizat sau produsele din acesta, carnea tocată, care nu a fost supusă unui tratament termic complet, cârnații, produși în formă crudă, apa potabilă contaminată, de exemplu, din fântână.

3.2 DE LA PERSOANĂ LA PERSOANĂ

De asemenea, este posibil mecanismul fecal-oral de transmitere a campilobacteriilor de la o persoană la alta (prin intermediul mâinilor murdare).

3.3 PRIN CONTACT DIRECT CU ANIMALELE

Proprietarii de animale de companie se pot infecta de la animalele proprii. În acest caz, transmiterea este efectuată prin gunoiul de la animale.

3.4 PRIN APĂ POLUATĂ

Uneori cu *Campylobacter* sunt infectate lacurile. În cazuri rare, este posibilă contaminarea în timpul scăldatului.

Capitolul IV

PATOGENEZA INFECȚIEI CU *CAMPYLOBACTER*

Nu toate infecțiile cu *Campylobacter* devin simptomatice. Printre factorii implicați în apariția bolii manifeste se numără: mărimea inoculului bacterian care ajunge în intestinul subțire, virulența tulpinii infectante, imunitatea specifică a gazdei față de patogenul ingerat. Pacienții contaminați cu un număr mare de microorganisme ($>10^4$), prezentând hipoaciditate gastrică, sunt mult mai expuși, iar cei care prezintă hipogamaglobulinemie fac forme prelungite și severe de boală.

Campylobacter se atașează mai întâi de suprafața enterocitelor, apoi cu ajutorul flagelului lezează membrana celulară și pătrunde în interiorul celulei. Destul de repede pătrunde în sânge. Bacteriemia este observată nu numai în forma acută, ci și în cazul bolilor cronice ale stomacului. La locul porții de intrare se dezvoltă modificări inflamatorii. Odată cu pătrunderea bacteriilor în sânge, se eliberează o toxină care provoacă o intoxicație generală. Prin diseminare hematogenă sunt afectate mai multe organe și țesuturi. La femeile gravide se observă o transmitere transplacentară a infecției, care duce la avort și infecția intrauterină a fătului.

Capitolul V

CLINICA CAMPILOBACTERIOZEI

Cele mai frecvente infecții produse de *C. jejuni* sunt cele **gastro-enterale**, manifestate clinic prin cefalee, febră, dureri abdominale, scaune diareice, uneori sangvinolente, rareori însoțite de vomă.

Simptomatologia persistă o săptămână, infecția se poate croniciza dar, în general, este autolimitantă și controlată dacă pierderile hidroelectrolitice sunt restabilite. La copii manifestările clinice sunt diareea, uneori sanguinolentă, febra, durerile abdominale și vărsăturile, iar în mod excepțional pot apărea complicații meningeale și encefalopatii.

Infecțiile extraenterale de tip septicemii, au fost semnalate mai rar, în special la persoanele cu deficiențe imunologice și sunt produse de *C.fetus* (în aceste cazuri germenii au putut fi izolați și din hemoculturi). *C. fetus* este de asemenea asociat cu producerea avorturilor și artritelor septicice, tromboflebitelor, peritonitelor, salpingitelor, etc.

Infecțiile cu *Campylobacter jejuni* se pot asocia cu colecistită, pancreatită, hepatită, peritonită, ulcere hemoragice la nivelul ileonului terminal sau cu complicații extraintestinale cum sunt: miocardita, pericardita, sindromul hemolitic-uremic, glomerulonefritele, eritemul nodos, vasculita, celulita. Complicațiile tardive care pot apărea sunt: artrita reactivă și sindromul Guillan-Barré (polinevrita acută idiopatică).

Artrita reactivă se poate dezvolta la câteva săptămâni de la infecție, fiind raportate cazuri de persistență îndelungată a manifestărilor reumatologice. Conform datelor din literatura de specialitate se estimează că artrita reactivă apare la 1-5% dintre pacienții cu infecții recente cu *Campylobacter*. Durata episodului acut de artrită este extrem de variabilă; 5% dintre artritile reactive din infecția cu *Campylobacter* pot avea o evoluție cronică sau pot suferi recăderi.

Sindromul Guillan-Barré este o consecință neobișnuită a infecției cu *C. jejuni* (se estimează o prevalență de 1 la 2000 infecții), care se manifestă la 2-3 săptămâni de la episodul diareic. Aproximativ 30% dintre pacienții cu această complicație neurologică o asociază în mod caracteristic cu o infecție recentă cu *Campylobacter jejuni*. La baza acestei asocieri stă probabil mimetismul molecular aparent între antigenele *C. jejuni* și gangliozidele neuronale.

Campylobacter fetus produce infecție umană la pacienții cu afecțiuni hepatice (ciroza alcoolică), maligne, diabet zaharat, SIDA și la vârstnici. *Campylobacter fetus* are tropism pentru endoteliul vascular, fiind izolat în endocardite, anevrisme infectate, tromboflebite septicice și celule, mai ales la persoanele imunosupresate. Alte infecții semnalate sunt meningoencefalitele, osteomielitele, empiemul, colecistitele, pericarditele, miocarditele, peritonitele și salpingitele.

Capitolul VI

IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA BACTERIILOR DIN GENUL *CAMPYLOBACTER* DIN PRELEVATE DE LA PACIENT

6.1 PRELEVAREA PROBELOR

Materialele pentru cercetare pot fi:

- de la pacienți și persoane cu suspecție de boală – mase fecale, spălături rectale, lavaj gastric, mase vomitive, sânge, biotrate, secțiuni de intestin, lavaje de pe mâini și tegumente și altele;
- material cadaveric – exsudate, secțiuni de organe (ficat, splină, intestine și altele);
- obiecte de mediu – materii prime alimentare și produse de origine animală, apă și altele.

Printre simptomele clinice ale campilobacteriozei se regăsește hemocolita. Prezența sângelui în scaun este o indicație absolută pentru examinarea bacteriologică a maselor fecale la campilobacterii.

La pacienții cu campilobacterioză probele de mase fecale sau tamponul rectal servesc drept material pentru examinarea bacteriologică.

Colectarea materialului trebuie efectuată fără întârziere, de preferință înainte de inițierea tratamentului antimicrobian, ulterior pe parcursul întregii perioade de boală – în cazul în care este indicată investigația bacteriologică (aparitia sângelui în scaun, intensificarea sau reapariția diareei, convalescența precoce). Proba se colectează imediat după defecare. Este preferabilă recoltarea maselor fecale în recipiente de unică folosință. În caz dacă nu este posibil, recipientul trebuie supus tratamentului termic. Utilizarea dezinfectanților este categoric interzisă, deoarece chiar și urme de dezinfectanți pot avea efect bactericid asupra campilobacteriilor.

6.2 TRANSPORTUL ȘI DEPOZITAREA PROBELOR

Dacă instituția medicală poate transmite proba recoltată imediat în laborator, utilizarea mediilor de transport nu este obligatorie. Probele de mase fecale sunt transportate în stare nativă. Este permisă păstrarea de scurtă durată (nu mai mult de o oră) a probelor de materii fecale native la 4°C.

În cazul când transportarea probei durează mai mult de o oră din momentul recoltării, este obligator să fie utilizat un mediu de transport cu păstrarea tubului la temperatura camerei: soluția fiziologică (3 – 5 ore), mediul tioglicolic pentru controlul sterilității (până la 72 ore), mediul Amies cu cărbune (anexa 7, p.A7.1) sau mediul Cary-Blair (48 ore) (anexa 7, p.A 7.2).

6.3 IZOLAREA CULTURII PURE DE CAMPILOBACTERII ȘI SELECTAREA COLONIILOR PENTRU CONFIRMARE

În laborator, din recipientele cu prelevatul nativ sau introdus în mediul de transport, se efectuează inocularea cu ansa bacteriologică cu diametrul de 3 mm pe o cutie Petri cu unul din mediile de cultură pentru izolarea și diferențierea campilobacteriilor (mCCD agar, Skirrow agar, agar Karmali sau alt mediu conform anexei 7).

Incubarea mediilor inoculate se face la temperatura de 41,5°C în condiții de microaerobioză (anexa 2).

Creșterea campilobacteriilor pe mediile de cultură pentru izolare și diferențiere se examinează zilnic: peste 24, 48 și final 72 ore cu înregistrarea rezultatelor obținute în formularele de evidență respective.

Pe mediu de cultură mCCD agar coloniile tipice de *Campylobacter* sunt de culoare cenușie, deseori cu luciu metalic, plate și umede cu tendință de expansiune. Pot apărea și alte forme de colonii: *C.jejuni* formează colonii mici, până la 1 mm în diametru, plate, semitransparente, de nuanță cenușie cu suprafață netedă și margini regulate, iar *C.coli* – colonii mari (2-3 mm în diametru), convexe, suculte, de culoare cenușie-gălbuie, cu suprafață netedă și margini regulate.

Pe Skirrow agar, după incubare la 41,5°C timp de 48 ore, campilobacteriile formează colonii cremoase, cu diametrul de la 1 mm până la 8 mm, cu luciu metalic. Caracterul creșterii coloniilor poate capăta aspect de "ouă prăjite" sau de "roire" cu benzi și striuri care se răspândesc după liniile de însămânțare.

Pe mediu Karmali agar *Campylobacter* formează colonii rotunde, cu margini regulate, transparente, de culoare gri sau colonii care se răspândesc după liniile de însămânțare.

Pe mediu agar Preston tulpinile de *Campylobacter* formează colonii de culoare gri, cu suprafața umedă, care se extind și tind să se contopească.

Pe medii de cultură solide cu sânge *Campylobacter* produce două tipuri de colonii, dintre care prima are formă neregulată cu diametru 2 – 8 mm. Coloniile de acest tip sunt incolore sau gri deschis, transparente, omogene (aspectul picăturilor de apă), nehemolitice. Ocazional, în timpul cultivării de lungă durată, suprafața devine argintie mată, cu o consistență non-vâscoasă. Coloniile de tipul II au o formă rotunjită, 1-2 mm în diametru, margini regulate, suprafață netedă lucioasă, bombate, transparente, omogene, cel mai frecvent incolore (după cultivarea prelungită sunt capabile să formeze pigment gălbui), nu provoacă hemoliză, posedă o consistență non-vâscoasă.

6.4 CONFIRMAREA SPECIILOR DE *CAMPYLOBACTER*

Deoarece oxigenul atmosferic este nociv pentru bacteriile din genul *Campylobacter*, manoperele descrise mai jos se efectuează fără întârziere.

6.4.1. Selectarea coloniilor pentru confirmare

Pentru confirmare se selectează de pe fiecare cutie Petri cu diferite medii selective (anexa 7) cel puțin câte o colonie considerată tipică sau minimum patru colonii suspecte de *Campylobacter*.

Pentru subcultivare fiecare colonie selectată se repică pe suprafața unei plăci cu Columbia agar cu sânge (anexa 7, p.A 7.6). Cutiile se incubează în atmosferă de microaerobioză la 41,5°C timp de 24-48 ore. Culturile pure se folosesc pentru examinarea caracterelor morfologice, a mobilității, a creșterii în condiții de microaerobioză la 25°C și de aerobioză la 41,5°C și depistarea prezenței oxidazei.

6.4.2. Examinarea morfologiei și a mobilității

O colonie de pe placa cu Columbia agar cu sânge se suspendă în 1 ml bulion Brucella (anexa 7, p A 7.7) și se examinează microscopic pentru determinarea morfologiei și a mobilității.

Pe frotiurile colorate Gram sau Giemsa se observă prezența unor bacterii subțiri cu o morfologie caracteristică: bacili dispuși în diplo asemănați cu niște „aripi de pescăruși”.

Preparatul nativ lamă-lamelă la microscopul cu fond întunecat, sau cu contrast de fază, relevă prezența bacteriilor spiralate, prezentând mișcări active datorită flagelului polar.

Se rețin pentru examinare ulterioară toate culturile în care s-au găsit bacili curbați cu mobilitate de ”tirbușonare” sau ”în zbor de musculiță”.

6.4.3. Studiul creșterii la 25°C (microaerobioză)

Se repică cultura pură pe suprafața unei plăci cu Columbia agar cu sânge (anexa 7, p.A 7.6) și se incubează la 25°C în atmosfera microaerobă timp de 44±4 ore. Se examinează prezența creșterii vizibile a coloniilor de *Campylobacter*.

6.4.4. Studiul creșterii la 41,5°C (aerobioză)

Se repică cultura pură pe suprafața unei plăci cu Columbia agar cu sânge (anexa 7, p.A7.6) și se incubează la **41,5°C** în atmosfera aerobă timp de 44±4 ore. Se examinează prezența creșterii vizibile a coloniilor de *Campylobacter*.

6.4.5. Detecția oxidazei

Folosind o ansă de uz unic sau o baghetă de sticlă, se ia o parte dintr-o colonie bine izolată de pe fiecare placă individuală și se transferă pe o hârtie de filtru umețată prealabil cu reactiv pentru detecția oxidazei. Apariția culorii mov, violet sau albastru intens în 10 sec. indică reacția pozitivă. Dacă se folosește un kit de determinare a oxidazei disponibil în comerț, se respectă instrucțiunea producătorului. Nu se recomandă de a efectua acest test din coloniile izolate pe agar cu cărbune (mediu mCCD agar), deoarece coloniile nu pot da culoarea caracteristică (mov, violet sau albastru).

Confirmarea rezultatelor se face utilizând probe de control pozitive și negative. Exemple de tulpini de control corespunzătoare sunt *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (probă de control pozitivă), *Escherichia coli* ATCC 25922 (probă de control negativă).

6.4.6. Interpretare

Caracterele de bază ale *Campylobacter* spp. sunt prezentate în tabelul 4

Tabelul 4

Caracterele *Campylobacter* spp.

Morfologie	Bacili mici curbați
Mobilitate	Caracteristică
Creștere microaerobă la 25°C	-
Creștere aerobă la 41,5°C	-
Oxidază	+

Testele de diferențiere dintre *Campylobacter* spp. și bacterii din alte genuri cu caracteristici morfologice similare sunt prezentate în tabelul 3.

6.5 IDENTIFICAREA SPECIILOR DIN GENUL *CAMPYLOBACTER*

6.5.1. Detecția catalazei

Pe o lamă de microscop curată se aplică o picătură de soluție de apă oxigenată de 3% în care, cu ajutorul ansei bacteriologice, se introduce cultura pură izolată. Testul este pozitiv dacă apar bule de gaz în interval de 30 s. Bacteriile din genul *Campylobacter* sunt catalazo-pozitive, cu excepția speciei rare *C. upsaliensis*.

Confirmarea rezultatelor se face utilizând probe de control pozitive și negative. Exemple de tulpini de control corespunzătoare sunt *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (probă de control pozitivă), *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 sau NCTC 775 (probă de control negativă).

6.5.2. Testarea sensibilității la acidul nalidixic și cefalotină (cefazolină)

Din cultura pură de *Campylobacter* se prepară o suspensie în bulion Brucella (anexa 7 p.A7.7) cu densitatea de 0,5 pe scara McFarland (aprox. $1,5 \times 10^8$ celule/ml) sau conform standardului de turbiditate 5U (aprox. $2,5 \times 10^8$ celule/ml). Această suspensie se diluează în raport 1:10 cu același bulion. Cu suspensia obținută se inoculează prin inundare suprafața unei plăci de agar Mueller Hinton 5% (anexa 7 p. A7.8.2). Se lasă în contact 5 min, apoi se elimină excesul de suspensie. Se usucă placa cu mediu timp de 10 min în termostat la 37°C. Pe suprafața mediului inoculat se aplică un disc cu acid nalidixic 30μg și un disc cu cefalotină (cefazolină) 30μg. Se incubează la temperatura de 37°C timp de 20-24 ore în microaerobioză.

Cultura testată se consideră rezistentă dacă ea crește până la periferia discului cu antibiotic.

Cultura testată se consideră sensibilă dacă în jurul discului se formează o zonă de inhibiție totală a creșterii de orice dimensiuni.

6.5.3. Testul hidrolizei hipuratului de sodiu

Din cultura pură de campilobacterii se face o suspensie densă în 0,4 ml soluție de hipurat de sodiu, evitând încorporarea a celei mai mici cantități de agar. Se agită pentru a omogeniza bine suspensia și se incubează timp de 2 ore la temperatura de 37°C în baia de apă sau 4 ore în termostat la 37°C, după care în eprubetă se adaugă 0,2 ml soluție de ninhidrină (anexa 7, p. A7.10.2.2), se amestecă și se termostatează repetat timp de 10 min la temperatura de 37°C.

Test pozitiv: amestecul capătă culoare violet închis (indică hidroliza hipuratului).

Test negativ: culoarea amestecului nu se schimbă (culoare cenușie sau violet pal).

Campylobacter jejuni produce hidroliza hipuratului de sodiu, reprezentanții altor specii din genul *Campylobacter* nu hidrolizează hipuratul.

6.5.4. Detecția hidrolizei acetatului de indoxil

Se plasează o colonie selectată pe un disc de acetat de indoxil (anexa 7) și se adaugă o picătură de apă distilată sterilă. Pentru o reacție clară este necesară o ansă plină de inocul dintr-o colonie. Dacă acetatul de indoxil este hidrolizat, se produce apariția culorii albastru închis în interval de 5-10 min.

Confirmarea rezultatelor (pp. 6.4.4-6.4.5) se face utilizând controale pozitive și negative cu tulpini de *Campylobacter*. Exemple de tulpini de control corespunzătoare sunt *Campylobacter jejuni* NCTC 11351 sau ATCC 33291 (probă de control pozitivă), *Campylobacter coli* NCTC 11366 sau ATCC 33559 (probă de control negativă).

6.5.5. Testul de producere a ADN-azei

Principiu: ADN-aza este o enzimă extracelulară care depolimerizează ADN-ul. Developarea reacției se face diferențiat fie prin albastru de toluidină O incorporat în mediul de cultură agarizat, fie printr-o soluție precipitantă de acid clorhidric cu care inundăm suprafața mediului după apariția culturii.

- Albastrul de toluidină O formează cu ADN un complex albastru, în timp ce produșii de degradare rezultați sub acțiunea ADN-azei se colorează metacromatic în roz până la roșu.
- Soluția 1N de HCl precipită ADN, dar nu și oligo- sau mono-nucleotidele rezultate sub acțiunea ADN-azei.

Proba: Cultura de pe mediul agarizat.

Necesar: geloză-sânge pentru anaerobi suplimentată cu 2g ADN/litru; Soluție 1N de HCl

Tehnica efectuării: Se însămânțează tulpina în striu pe jumătatea unei plăci cu mediul de testare. Se incubează în condițiile de temperatură și atmosferă corespunzătoare până la apariția culturii.

Citire și interpretare:

La developarea cu albastru de toluidină:

Test pozitiv: un halou roz până la roșu în jurul coloniei sau striului de creștere a bacteriilor.

Test negativ: Absența oricărei zone roz/roșii în jurul creșterii bacteriene. Testul negativ se reincubează pentru 24 de ore înainte de înregistrarea rezultatului final.

La developarea cu soluție de HCl:

Test pozitiv: un halou clar de cca 2 mm în jurul creșterii bacteriene pe fon de opacifiere a mediului determinată de precipitarea ADN.

Test negativ: Absența oricărei zone clare în jurul creșterii bacteriene.

6.5.6. Testul rapid pentru determinarea producerii de hidrogen sulfurat (H_2S)

Tulpina izolată se însămânțează prin înțepare în mediul de cultură (anexa 7, p **A 7.10.2**). Se incubează timp de 24-48 de ore la temperatura de 42°C în condiții de microaerobioză.

Test pozitiv (producere de H_2S): partea superioară a mediului se înnegrește.

Test negativ: culoarea mediului rămâne neschimbată.

Tulpinile de *Campylobacter coli* pot produce hidrogenul sulfurat (11 – 89% din cazuri).

NOTĂ: Pentru identificarea și diferențierea speciilor tulpinilor selectate de campilobacterii pot fi utilizate sisteme de testare biochimică API CAMPY sau altele cu principii similare cu respectarea recomandărilor producătorului.

Interpretare

Speciile de *Campylobacter* crescute la 41,5°C pot fi identificate la nivelul speciei (tabelul 5) conform criteriilor prezentate în tabelul 5.

Tabelul 5

Criterii de diferențiere a speciilor genului *Campylobacter*

Criteriul	<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.lari</i>	<i>C.upsaliensis</i>
Catalaza	+	+	+	-
Acidul nalidixic	S	S	R/S*	S
Cefalotina	R	R	R	S
Hidroliza hipuratului de sodiu	+	-	-	-
Hidroliza acetatului de indoxil	+	+	-	+
Hidrogenul sulfurat	-	+	-	-
+ = pozitiv; - = negativ; S = sensibil; R = rezistent *există tulpini <i>C. lari</i> atât sensibile cât și rezistente.				

Capitolul VII

TESTAREA SENSIBILITĂȚII LA ANTIBIOTICE

Sensibilitatea campilobacteriilor față de antibiotice se determină utilizând metoda difuzimetrică. În acest scop din cultura pură de campilobacterii se pregătește o suspensie în soluție fiziologică sterilă conform standardului de turbiditate 5U, care apoi se diluează cu soluție fiziologică sterilă de 10 ori. Din suspensia finală se fac însămânțări cu un tampon steril pe cutii Petri cu mediul geloză eritrită sau agar Mueller – Hinton, suplimentate cu 5% sânge de cal sau berbec. Incubarea este realizată în condiții de microaerobioză la 42°C. Evidența rezultatelor se efectuează peste 48 – 72 de ore.

Antibiograma include aprecierea sensibilității la ciprofloxacina 5mg, eritromicina 15mg și tetraciclina 30mg în conformitate cu cerințele "European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST, 2017). Mediile se incubează timp de 24-48 h, la temperatura de 42°C, în condiții de microaerobioză.

După 24-48 ore de incubare se măsoară zonele de inhibiție din jurul discurilor cu antibiotice, ulterior comparându-le cu valorile EUCAST Breakpoint Tables v 7.1 (ciprofloxacina – 26 mm, eritromicina – 20 mm pentru *C. jejuni* și 24 mm pentru *C. coli*, tetraciclina – 30 mm).

Capitolul VIII

METODA SEROLOGICĂ DE DIAGNOSTIC

În cazul campilobacteriozei intestinale are loc răspunsul imun clasic: în primul rând apar anticorpii contra antigenului flagelar și antigenelor membranei externe.

Examenul serologic în campilobacterioză este utilizat în diagnosticarea retrospectivă și pentru supravegherea epidemiologică a infecției date.

Reacția serologică care posedă o specificitate mai înaltă este reacția de aglutinare (RA). În calitate de antigen este folosită suspensia de bacterii tratată cu formol la temperaturi înalte. Titrul reacției constituie, la majoritatea bolnavilor, 1:40 și mai mare. Cu ajutorul acestei reacții este posibil de pus în evidență aglutininele anti-campilobacterii în prima săptămână de boală, de urmărit dinamica acumulării lor până la nivelul maximal – sfârșitul săptămânii a III și dispariția – săptămâna a XVI.

O sensibilitate mai înaltă posedă reacția de hemaglutinare indirectă (RHA), titrul căreia, de obicei, este mai mare de 1:160 și atinge uneori 1:1600-1:3200. Cu toate acestea, RHA este foarte rar utilizată în diagnosticul campilobacteriozei umane din cauza specificității joase. În practica veterinară această reacție este utilizată pe larg în diagnosticul campilobacteriozei la vitele cornute mari și mici.

Pentru confirmarea diagnosticului clinic de campilobacterioză poate fi utilizată metoda anticorpilor fluorescenți. Titrele reacției imunofluorescente indirecte la oamenii sănătoși constituie 1:2-1:8, pe când la 85% persoane bolnave de campilobacterioză în faza acută titrele depășesc martrorii de 3 ori, iar la reconvalescenți – de 28-64 ori.

Analiza imunoenzimatică (AIE) permite de a stabili diagnoza de campilobacterioză în 80-90% cazuri. Cu ajutorul AIE titrele diagnostice de imunoglobuline pot fi puse în evidență la mijlocul primei săptămâni de boală, iar titrul maximal este atins în săptămâna a III – IV.

Cu toate acestea, reacțiile serologice descrise mai sus nu pot fi utilizate în diagnosticul precoce a campilobacteriozei. Problema examenului serologic se datorează faptului, că campilobacteriile posedă o structură antigenică policomponentă, care enumeră peste 70 serotipuri.

Capitolul IX

IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA BACTERIILOR DIN GENUL *CAMPYLOBACTER* ÎN PRODUSE ALIMENTARE

Efectuarea controlului privind depistarea bacteriilor din genul *Campylobacter* permite:

- a evalua gradul de contaminare a produselor alimentare cu aceste microorganisme,
- a obține o situația reală în privința incidenței și prevalenței genului *Campylobacter*,
- a evalua eficiența măsurilor luate pentru a preveni apariția agenților patogeni noi și bolilor emergente cu transmitere alimentară care prezintă risc pentru sănătatea publică.

9.1. EȘANTIONAREA ȘI PREPARAREA PRODUSELOR ALIMENTARE PENTRU ANALIZĂ

9.1.1. Cerințe generale

Este important ca laboratorul să primească o probă care este reprezentativă pentru lotul de produs și care nu s-a deteriorat sau modificat în timpul transportului sau depozitării. Masa și volumul probelor prelevate trebuie să fie suficiente pentru efectuarea investigațiilor și minim de două ori vor depăși dimensiunile probei (lor) analitică (ce).

Cerințele generale privind eșantionarea, transportarea și prepararea probelor produselor alimentare pentru analiză sunt stipulate în SM EN ISO 7218 și SM EN ISO 6887 (Partea 1).

Luând în considerație că campilobacteriile sunt foarte sensibile la acțiunea factorilor de mediu, cum ar fi: uscare, înghețare (dar supraviețuiesc cel mai bine la temperaturi scăzute), pH redus, încălzire, acțiunea razelor UV și păstrarea îndelungată, la etapa de eșantionare a produselor alimentare la prezența *Campylobacter* spp., trebuie să fie respectate următoarele reguli:

- eșantionarea și expedierea probelor în laborator pentru investigații trebuie efectuată în timp cât mai scurt, dacă este posibil nu mai mult de o oră;
- eșantionarea produselor alimentare solide se efectuează în pachete sterile impermeabile la gaze, se elimină excesul de aer și se închide etanș. Probele produselor lichide se prelevează în veselă sterilă de sticlă sau de unică folosință cu capac ermetic;
- expedierea probelor în laborator se efectuează în termocontainer cu elemente de răcire sau geanta – frigider;

- probele care urmează să fie analizate *nu trebuie să fie* în stare *congelată* și până la începutul investigației probele sunt păstrate în loc ferit de lumină, la temperatura $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$. Probele *produselor congelate* sunt dezghețate la loc ferit de lumină la temperatura $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ nu mai mult de 24 ore, sau în decursul a 3 ore la temperatura $18 - 27^{\circ}\text{C}$;
- după deschiderea pachetului, probele imediat se supun procesării. Prepararea probei medii, eșantionului de produs pentru însămânțare și însămânțarea propriu-zisă se efectuează în termen cât mai scurt. Pentru prepararea probei medii produsul se mărunțește, amestecarea activă a probei mărunțite nu se recomandă.

9.1.2. Cerințe specifice

Cerințele speciale de eșantionare (punctele de colectare, periodicitatea și metodele de prelevare) la diferite etape de producere și pentru diferite tipuri de produse sunt stipulate în Regulile privind criteriile microbiologice pentru produsele alimentare și într-un șir de standarde naționale specifice. În unele cazuri, pot fi stabilite suplimentar prin acordul părților implicate.

9.1.2.1 Eșantionarea și prepararea probelor din carne, a cărnii separate mecanic și a cărnii proaspete, inclusiv reguli de prelevare pentru carcasele de pasăre și pentru carnea proaspătă de pasăre.

Metodele de prelevare a probelor (distructive și nedistructive), selectarea zonelor pentru prelevarea de probe și normele pentru depozitarea și transportul probelor de pe suprafața carcasei în timpul procesării primare a animalelor sacrificate (bovină, porcină, ovină, caprină, cabalină) și a păsărilor de curte sunt descrise în standardele SM ISO 17604 și SM EN ISO 13307.

Pentru detectarea microorganismelor patogene se recomandă prelevarea de probe din carcase de toate tipurile de animale sacrificate imediat înainte de răcire sau în camera de răcire, dar nu mai târziu de 12 ore după sacrificare.

Pentru analizele de depistare a microorganismelor patogene, inclusiv *Campylobacter*, se prelevă aleatoriu cinci carcase întregi de păsări domestice cu piele de pe gât, dar trebuie să se asigure că sunt analizate și bucăți de păsări cu piele și/sau bucăți de păsări fără piele ori cu foarte puține porțiuni cu piele, iar această alegere trebuie făcută pe baza evaluării riscurilor.

În cazul în care se efectuează teste pentru verificarea respectării criteriilor de igienă în ceea ce privește *Salmonella* și *Campylobacter* din carcasele de păsări domestice în abatoare, când testele pentru *Salmonella* și *Campylobacter* sunt efectuate în același laborator, trebuie prelevată în mod aleatoriu piele de pe gât de la cel puțin 15 carcase de păsări după răcirea acestora în cursul fiecărei sesiuni de prelevare. Înainte de examinare, probele de piele de pe gât de la cel puțin trei carcase de păsări domestice din același efectiv de origine trebuie puse în comun pentru a forma o probă de 26 g. Astfel, probele de piele de pe gât formează probe finale de $5 \times 26\text{g}$ (26g sunt necesare pentru a efectua analizele pentru *Salmonella* și *Campylobacter* în paralel utilizând o singură probă). După prelevare probele se păstrează și se transportă la laborator la o temperatură de cel

puțin 1°C și cel mult 8°C, iar intervalul de timp dintre prelevare și testare pentru *Campylobacter* trebuie să fie de cel mult 48 de ore pentru a se asigura menținerea integrității probelor. Probele care au ajuns la o temperatură de 0°C nu trebuie utilizate pentru a verifica respectarea criteriului pentru *Campylobacter*.

Prepararea probelor din carnea păsărilor și produselor de pasăre, carne, semifabricate din carne și altor produse din carne se efectuează după SM EN ISO 6887 (Partea 2 și 6).

În vederea preparării suspensiei inițiale în laborator, la cantitatea de testare de 26g se adaugă nouă volume (234 ml) de apă peptonată tamponată (*buffered peptone water* – BPW). Înainte de utilizare aceasta este adusă la temperatura camerei. Acest amestec se tratează într-un stomacher sau pulsifier timp de aproximativ un minut. Se evită formarea spumei eliminând, pe cât posibil, aerul din punga stomacher. 10 ml (~1 g) din această suspensie inițială se transferă într-un tub steril gol, iar 1 ml din acești 10 ml se utilizează la numărarea *Campylobacter* pe plăci de selecție prin metoda cantitativă. Restul suspensiei de bază (250 ml ~ 25 g) este utilizat pentru detectarea *Salmonella*.

În cazul în care se efectuează teste pentru verificarea respectării criteriilor de igienă în ceea ce privește *Salmonella* și *Campylobacter* din carcacele de păsări domestice în abatoare, când testele pentru *Salmonella* și *Campylobacter* sunt efectuate în două laboratoare diferite, trebuie prelevată în mod aleatoriu piele de pe gât de la cel puțin 20 de carcace de păsări după răcirea acestora în cursul fiecărei sesiuni de prelevare. Înainte de examinare, probele de piele de pe gât de la cel puțin trei carcace de păsări domestice din același efectiv de origine trebuie puse în comun pentru a forma o probă de 35 g. Astfel, probele de piele de pe gât formează probe finale de 5 × 35 g, care apoi sunt divizate pentru a obține probe finale de 5 × 25 g (la *Salmonella*) și de 5 × 10 g (la *Campylobacter*). După prelevare, probele se păstrează și se transportă la laborator la o temperatură de cel puțin 1 °C și cel mult 8 °C, iar intervalul de timp dintre prelevare și testare pentru *Campylobacter* nu trebuie să fie mai mare de 48 de ore pentru a se asigura menținerea integrității probelor. Probele care au ajuns la o temperatură de 0 °C nu trebuie utilizate pentru a verifica respectarea criteriului pentru *Campylobacter*. Probele de 5 × 25 g se utilizează pentru a verifica respectarea criteriilor de igienă și a criteriului siguranței pentru *Salmonella*. Probele finale de 5 × 10 g se utilizează pentru verificarea respectării criteriului de igienă pentru *Campylobacter* prin metoda cantitativă.

9.1.2.2. Eșantionarea cu utilizarea metodei de tampon

Pentru a asigura colectarea maximă a microorganismelor, tampoanele (9.1.5) trebuie să fie suficient de mari (după caz).

La prelevarea probelor de pe suprafețe foarte umede, tampoanele pot fi folosite uscate; dacă suprafețele sunt uscate (de exemplu, eșantioane de mediu), tampoanele sunt umectate cu un lichid diluant adecvat (soluție salină de peptonă, apă peptonată tamponată preparate conform ISO 6887-1, apa sterilă).

Tamponul este îndepărtat din plicul steril și vârful este umezit prin imersiune într-un tub de testare cu un lichid diluant. Vârful tamponului este presat pe peretele tubului pentru a elimina

excesul de lichid. Atunci când se prelevă probe de pe suprafețe, se utilizează un tampon pe o suprafață suficient de mare pentru a oferi o acoperire atentă a materialului selectat din toate părțile tamponului. Se efectuează o eșantionare optimă cu un tampon din mai multe locuri diferite sau folosind mai multe tamponuri pentru a obține colectarea maximă a microorganismelor dorite. La prelevarea probelor de pe suprafețe cu fisuri și brazde, se preia materialul organic de la adâncimea maximă și se strânge cât mai mult material pe tampon.

După procedura de eșantionare, becul este rupt sau tăiat în condiții sterile. Dacă este necesar, este plasat în mediu de transport (mediile Cary-Blair, Amies cu carbon activ sau medii analogice).

9.1.2.3 Eșantionarea și prepararea probelor de lapte și produse lactate Recomandările de bază privind modul de eșantionare a diferitor tipuri de produse lactate sunt descrise în SM SR EN ISO 707. În unele cazuri sunt necesare cerințe suplimentare privind eșantionarea.

Regulile specifice pentru pregătirea laptelui și a produselor lactate pentru investigații microbiologice sunt descrise în SM SR EN ISO 6887, partea 5.

Produsele lactate, cașcavalul, brânza, produsele din brânză sunt minuțios măcinate și neutralizate: untul și înghețata sunt topite la temperatura nu mai mare de 45°C până la consistența smântânii, după care din probă se preiau minimum 50 g și se centrifughează la 20000xg (cu răcire) timp de 40 min. Se îndepărtează supernatantul și stratul de grăsime, iar sedimentul este supus investigației.

Capitolul X

PROCEDURA DE ANALIZĂ

Metodele de determinare a *Campylobacter* spp. (cantitativă și calitativă) se aplică pentru produsele destinate consumului uman și pentru probele de mediu din zonele de producere a alimentelor și de manipulare a acestora.

10.1. METODA CALITATIVĂ

Metoda de determinare calitativă a *Campylobacter* spp. asigură determinarea prezenței sau absenței acestor microorganisme într-o cantitate de produs (masă sau volum), pentru care se introduce cantitatea necesară de probă preparată (10, 25 sau 50 g/cm³) într-un volum de 9 ori mai mare de mediu de îmbogățire bulion Bolton așa încât să se obțină un raport probă pentru analiză/mediu de 1:10 (masă/volum sau volum/volum). La cercetarea produselor lactate lichide se analizează supernatantul preparat conform p. 9.1.2.3, prealabil dizolvat în 10 ml de bulion de îmbogățire și apoi adăugat în 90 ml de bulion de îmbogățire.

Suspensia inițială se preincubează timp de 4 ore la temperatura de 37°C, iar în cazul probelor de produse alimentare congelate sau produse alimentare care sunt depozitate mai mult de 10 zile – timp de 3 ore la temperatura 32°C și 2 ore la temperatura 37°C, ulterior se incubează la temperatura de 41,5°C timp de 24-48 ore. Incubarea în toate etapele se efectuează în condiții de microaerobioză.

Cultura obținută în mediul de îmbogățire se inoculează cu o ansă sterilă cu \varnothing 3 mm pe suprafața mediilor selective de izolare: primul mediu selectiv de izolare este mCCD agar, iar în calitate de al doilea mediu selectiv poate fi utilizat mediu cu acțiune diferită decât mCCD agar (ex.: agar Skirrow, agar Karmali, agar Preston sau mediu cromogen pentru *Campylobacter*). După un timp de incubare de 44±4 ore se examinează cutiile Petri cu selectarea coloniilor tipice și/sau suspecte de *Campylobacter*. Etapele de izolare, selectare și confirmare a coloniilor tipice/suspecte se efectuează conform metodologiei descrise în pp. 6.3- 6.5.

Schema de cercetare a produselor alimentare pentru determinarea calitativă a bacteriilor din genul *Campylobacter* este prezentată în Anexa 4.

Exprimarea rezultatelor

La interpretarea rezultatelor se indică prezența sau absența *Campylobacter* în x g/ml de probă pentru analiză.

10.2.METODA CANTITATIVĂ

Metoda cantitativă de determinare a *Campylobacter* spp. asigură determinarea numerică a acestor microorganisme într-un gram sau un mililitru de produs cercetat.

Pregătirea probei, suspensiei inițiale și diluțiilor decimale trebuie să fie efectuate în conformitate cu SM EN ISO 6887 și standardul specific pentru anumite produse.

Inocularea și incubarea

Folosind o pipetă sterilă se transferă 0,1 ml de suspensie inițială în două cutii Petri cu mediu mCCD agar. Cu ajutorul unei spatule sterile inoculul se distribuie cu grijă și uniform pe suprafața mediului, fără atingerea marginilor cutiei, până când întregul lichid vizibil dispare de pe suprafața gelozei. Dacă este necesar, această procedură se repetă cu diluțiile decimale ulterioare.

În cazul în care pentru unele produse trebuie să fie evaluate cantități mici de *Campylobacter*, numărul limită poate fi redus cu un factor de 10, prin examinarea a 1,0 ml din suspensia inițială care se distribuie pe suprafața unui mediu de agar într-o cutie Petri cu diametrul de 140 mm sau pe suprafața mediului de agar distribuit în trei cutii Petri mici cu diametrul de 90 mm, folosind o spatulă sterilă. În ambele cazuri, însămânțarea trebuie efectuată în duplicat, utilizând două cutii Petri mari sau șase cutii Petri mici.

Cutiile se incubează la temperatura 41,5°C timp de 40-48 ore în condiții de microaerobioză.

Numărarea și selectarea coloniilor pentru confirmare

Sunt selectate cutiile Petri pe care s-au dezvoltat mai puțin de 150 de colonii tipice sau suspecte (p.6.4.1), aceste colonii sunt numărate. Pentru efectuarea testelor de confirmare aleatoriu sunt selectate cinci colonii suspecte pentru subcultivarea pe mediul Columbia agar cu sânge (anexa 7, p. A7.6) și obținerea coloniilor izolate. Cutiile sunt incubate în condiții de microaerobioză, la o temperatură de 41,5°C, timp de 24-48 de ore. Culturile pure obținute se utilizează pentru a studia morfologia, mobilitatea, creșterea microaerobă la 25°C, creșterea aerobă la o temperatură de 41,5°C și prezența oxidazei conform pp.6.4.3-6.4.5.

Schema de cercetare a produselor alimentare pentru determinarea cantitativa a bacteriilor din genul *Campylobacter* este prezentată în Anexa 5.

Exprimarea rezultatului

Numărarea coloniilor de Campylobacter

Dacă se confirmă cel puțin 80% din coloniile selectate (p.6.4.1), numărul de *Campylobacter* este considerat numărul mediu de colonii numărate pe mediul selectiv.

În toate celelalte cazuri, se calculează numărul de campilobacterii care a fost obținut în conformitate cu p.6.3 și confirmat (p.6.4). Rezultatul este rotunjit la un număr întreg de colonii.

Se calculează numărul (N) de colonii de *Campylobacter* prezente într-un ml/g din proba de testare ca o medie ponderată bazată pe două diluții succesive utilizând ecuația:

$$N = \frac{\Sigma a}{V \cdot [n_1 + 0,1 \cdot n_2] \cdot d'}$$

unde,

N – numărul coloniilor;

a – suma numărului de colonii caracteristice identificate;

V – volumul probei;

n – numărul de cutii luate în calcul;

d – factor de diluție.

**Caracterele de diferențiere pentru *Campylobacter*, *Arcobacter* și *Helicobacter pylori*
(adaptat după Penner¹)**

Specii						Creșterea			Sensibilitatea		
	Catalaza	Nitrat	H ₂ S (TSI)	Hipurat	Ureaza	25°C	37°C	42°C	Acid nali dixic	Cefalotină	Conținut G+C (mol%)
<i>Campylobacter fetus subsp. fetus</i>	+	+	-	-	-	+	+	(-)	R	S	33-34
<i>C.fetus subsp.venerealis</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	R	S	33-34
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	+	-	-	(+)	+	+	R	S	35-36
<i>C. jejuni</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	S	R	30-32
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	S	R	31-33
<i>C. lari</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	R	R	31-33
<i>C. upsaliensis</i>	(-)	+	-	-	-	-	+	+	S	S	35-36
<i>C. cinaedi</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	S	I	37-38
<i>C. fennelliae</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	S	S	37-38
<i>C. sputorum</i>	-	+	(+)	-	-	-	+	+	(S)	S	31-32
<i>biovar sputorum</i>											
<i>biovar bubulus</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	R	S	31-32
<i>biovar fecalis</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	R	S	32-33
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	R	S	38-39
<i>C. concisus</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	R	R	38-39
<i>Arcobacter cryaerophilia</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	d	R	29-30
<i>A. nitrofigilis</i>	+	+	ND	-	+	+	+	-	S	S	28-29
<i>Helicobacter pylori</i>	+	d	-	-	+	-	+	+	R	S	36-37

+ reacție pozitivă; - reacție negativă; ND – nedeterminat; (+) majoritatea tulpini pozitive; (-) majoritatea tulpini negative; d – diferite reacții; R- rezistent; S – sensibil; I – intermediar.

^a Sensibilitatea la antibiotice a fost determinată cu discuri de 30μg.

+ = >99% pozitive;

- = > 99% negative

Crearea condițiilor de microaerobioză

Atmosfera optimă pentru cultivarea bacteriilor din genul *Campylobacter* este compusă din: bioxid de carbon (CO_2) – 10 %, oxigen (O_2) – 5 %, azot (N_2) – 85 %. Pentru crearea acestei condiții sunt utilizate următoarele metode:

1. *Cu utilizarea amestecului de gaz de la producător cu compoziția sus numită.*

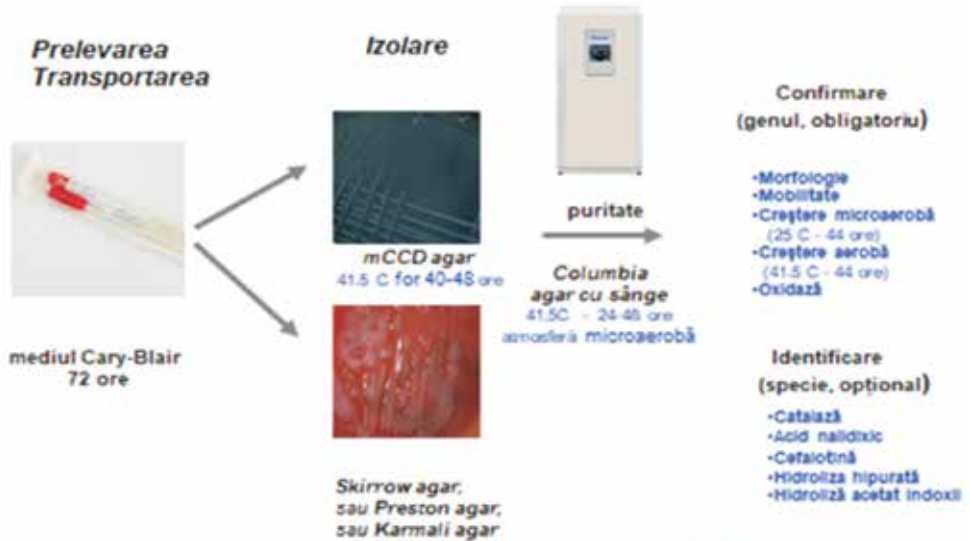
1.1 Varianta 1. Probele însămânțate se introduc în sistemul pentru cultivarea anaerobă (anaerostat). Sistemul de închide și prin pompare se reglează nivelul aerului până la marcajul minus 0,9 – 1,0 atmosfere după scara manometrului. Procedura de pompare a conținutului din vas și umplerea spațiului cu amestec de gaz se face de două ori, ulterior anaerostatul se plasează în termostat la temperatura (42 ± 1) °C.

1.2 Varianta 2. Probele însămânțate se introduc în containere cu volum stabilit pentru cultivarea în condiții anaerobe și apoi se plasează în pachete impermeabile la gaze. Pachetele sunt umplute cu amestec de gaz, eliminând manual excesul de amestec din pachet. Procedura de umplere – eliminare se repetă de două ori, umplerea fiind procedura finală, după ce pachetele se ermetizează prin fixarea cu clamă și se introduc în termostat la temperatura (42 ± 1) °C.

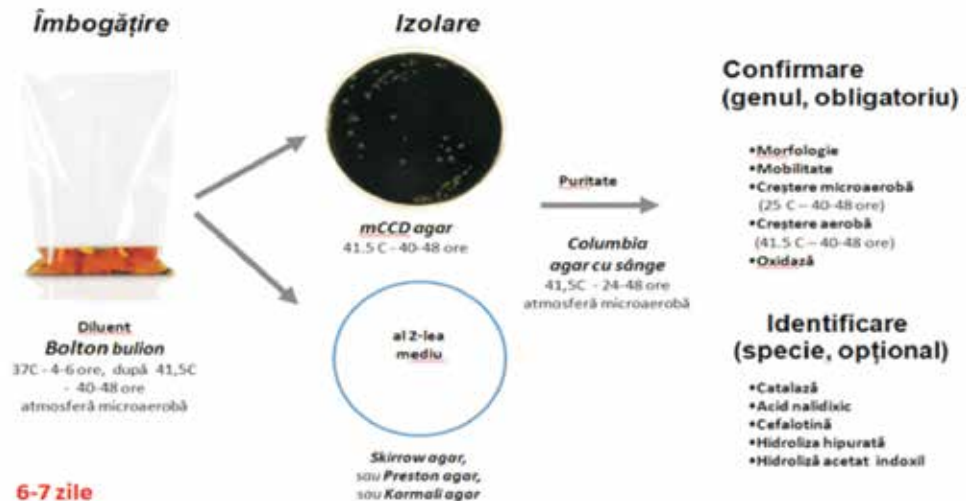
2. *Cu utilizarea pachetelor gazogeneratoare pentru campilobacterii, care după deschidere se introduc sau în anaerostat, sau în pachete sterile impermeabile la gaze. Pachetele gazogeneratoare sunt prevăzute pentru un volum anumit a anaerostatului/pachetelor etanșe la gaze, fapt ce trebuie luat în considerație la utilizarea lor. Incubarea are loc la temperatura (42 ± 1) °C.*

3. *Cultivarea în incubatoare anaerobe sau cu CO_2 – incubator, care menține temperatura (42 ± 1) °C.*

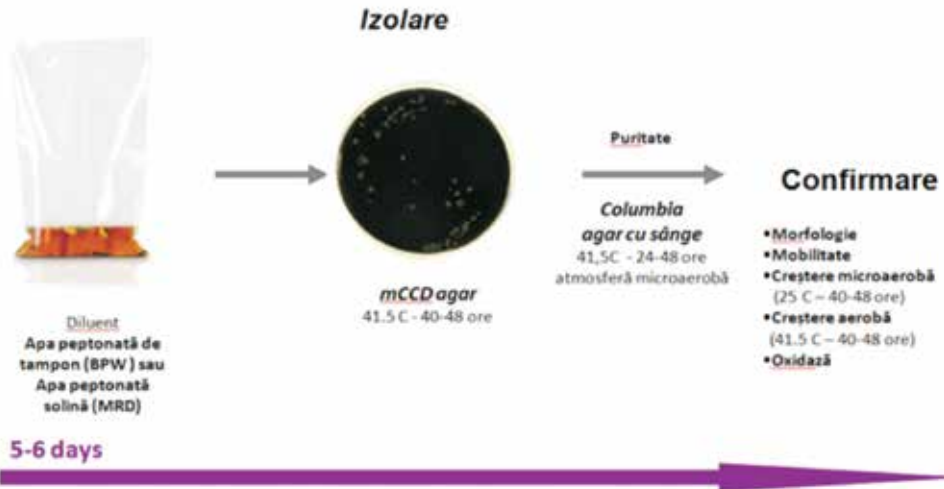
Metoda de detectare *CAMPYLOBACTER* spp. în probe umane



Metoda de detectare *Campylobacter* spp. în produse alimentare



Metoda de numărare *Campylobacter spp.* în produse alimentare



Exemple de interpretare a testelor de identificare, confirmare, diferențiere a *Campylobacter*

Teste de identificare primară

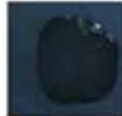
Morfologie



Testarea catalazei



pozitiv



negativ

Testarea oxidazei



pozitiv



negativ

Teste de diferențiere

Testarea sensibilității la acid nalidixic și cefalotină



Testul hidrolizei hipuratului de sodiu



Testarea sensibilității la antibiotice după EUCAST

- ✓ Ciprofloxacină 5mg
- ✓ Erythromycină 15 mg
- ✓ Tetracyclină 30mg



Compoziția și prepararea mediilor de cultură și a reactivilor

Selectivitatea mediilor pentru creșterea bacteriilor de genul *Campylobacter*, în relație cu microflora concomitentă, este atinsă prin introducerea în compoziția lor a antibioticelor: cefoperazonă, colistină, amfotericină E, vancomicină, trimetoprim, polimixină și altele. Cu scopul creșterii aerotoleranței și scăderii potențialului de oxido – reducere a mediilor, se introduce sânge de berbec defibrinat în cantitate nu mai mică de 7% la volum sau carbune, la fel agenți de regenerare: piruvat de sodiu, metabisulfid de sodiu, ferum sulfat (II).

Deoarece bacteriile din genul *Campylobacter* sunt microorganisme microaerofile și este important de evitat contactul oxigenului cu mediile de cultivare, este necesar de a respecta următoarele reguli:

- de preferință, vor fi utilizate mediile proaspăt pregătite, termenul de păstrare al cărora nu trebuie să depășească două săptămâni în condiții de frigider;
- amestecarea componentelor mediilor (la dizolvarea antibioticelor, la amestecarea sângelui) și a mediilor gata, după introducerea suplimentelor, trebuie să fie efectuată în așa mod, încât să se evite intrarea bulelor de aer în acest timp;
- uscarea suprafeței placilor cu agar din cutiile Petri înainte de însămânțare se efectuează în termostat la temperatura 42°C, timp de 2 – 3 ore, cu capacele închise.

Se recomandă de a utiliza mediile de cultură (deshidratate sau gata pentru utilizare) și reactivi comerciali care corespund compoziției indicate în anexă, pregătite și utilizate strict în conformitate cu instrucțiunea producătorului. Ca alternativă se permite utilizarea mediilor de cultură preparate în condiții de laborator din componente distincte.

Performanțele mediilor de cultură trebuie verificate conform metodelor și criteriilor descrise în SM EN ISO 11133.

A 7.1. Mediul „Amies” cu cărbune

Compoziție (g/l):	
Clorură de sodiu (NaCl)	3,0
Clorură de potasiu (KCl)	0,2
Fosfat de sodiu (Na_2HPO_4) sau $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,15
Fosfat de potasiu (KH_2PO_4)	0,2
Tioglicolat de sodiu	1,0
Clorură de calciu (CaCl_2), sol. 1%	10,0 ml
Clorură de magneziu ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sol. 1%	10,0 ml
Cărbune farmaceutic neutru	10,0
Agar	4,0
Apă distilată	1000,0 ml

Preparare:

Se dizolvă agarul în apă prin încălzire, în care ulterior se adaugă toate componentele enumerate, cu excepția cărbunelui. Componentele se amestecă bine, după care se adaugă și cărbunele. Mediul se repartizează în tuburi câte 6,0 ml, după care se sterilizează prin autoclavare la temperatura de 121°C timp de 15 min. Se răcește în poziție verticală. În timp ce agarul se solidifică, tuburile se întorc de mai multe ori, pentru a menține o suspensie uniformă de particule de cărbune. Mediul se păstrează la frigider (+4 – +8°C).

*Medii de cultură comerciale: Amies Transport Medium with Charcoal (M651, Himedia); Amies Transport Medium (CM0425,Oxoid).

A 7.2. Mediul Cary-Blair

Compoziție (g/l):	
Na ₂ HPO ₄	1,1
Clorură de sodiu NaCl	5,0
CaCl ₂ , soluție 1%	10,0 ml
Agar	5,0
Apă distilată proaspăt preparată	1000,0 ml

Preparare:

Componentele solide se dizolvă în apă prin încălzire și agitare. Se răcește amestecul până la 50°C și se adaugă soluția de CaCl₂ ajustând pH 8,4 ± 0,2. Mediul se repartizează în volum de 7 ml în tuburi cu capac filetat și se autoclavează 15 min. cu vapori fluenți. După răcire se înșurubează capacele. Mediul conservat la 4°C poate fi folosit până la 18 luni.

*Medii de cultură comerciale: Cary-Blair Medium (CM019,Oxoid); Modified Cary – Blair Medium (M1660, HiMedia); Cary-Blair Medium Base, transport Medium w/o Charcoal (M202, HiMedia).

A 7.3. Bulion Bolton

A 7.3.1. Mediu de bază

Compoziție (g/l):	
Digest enzimatic de țesuturi animaliere	10,0
Hidrolizat de lactalbumină	5,0
Extract de drojdie	5,0
Clorura de sodiu	5,0
Piruvat de sodiu	0,5
Metabisulfid de sodiu	0,5
Carbonat de sodiu	0,6
Acid α – ketoglutaric	1,0
Hemină (dizolvată în hidroxid de sodiu 0,1 %)	0,01
Apă	1000

Preparare:

Se dizolvă componentele de bază sau mediul de bază complet, deshidratat, în apă, prin încălzire dacă este necesar. Se ajustează pH, dacă este necesar, așa încât după sterilizare pH mediului complet să fie de $7,4 \pm 0,2$ la $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se repartizează mediul de bază în flacoane cu volumul corespunzător. Se sterilizează în autoclavă la temperatura de $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de 15 min.

A 7.3.2. Sânge de cal defibrinat lizat steril

Se folosește sânge de cal lizat saponin sau lizat prin înghețare apoi dezghețare.

A 7.3.3. Soluție de antibiotice

Compoziție:	
Cefoperazonă	0,02 g
Vancomicină	0,02 g
Trimetoprim lactat	0,02 g
Amfotericină B	0,01 g
Etanol / apă distilată sterilă 50/50 (fracție volumetrică)	5 ml

Preparare:

Se dizolvă componentele în amestec 50/50 de etanol și apă distilată sterilă.

A 7.3.4. Mediu complet

Compoziție:	
Mediu de bază (bulion Bolton)	1000 ml
Sânge de cal defibrinat lizat steril	50 ml
Soluție de antibiotice	5 ml

Preparare:

La mediul de bază, adus la temperatura de 47°C – 50°C , se adaugă aseptice sângele, apoi soluția de antibiotice și se omogenizează, se repartizează aseptice mediul în tuburi sau flacoane de capacitate corespunzătoare pentru a obține cantitatea necesară pentru analiză. Dacă mediul complet a fost preparat din timp, el nu trebuie păstrat mai mult de 4 ore la temperatura ambiantă, sau la întuneric la $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mai mult de 7 zile.

*Medii de cultură și suplimente comerciale: Bolton bulion bază (CM0983, Oxoid; M1592, Himedia); Bolton bulion, supliment modificat pentru Bolton bulion (SR0208, Oxoid; FD231, HiMedia); Sânge de cal lizat/Laked Horse Blood (SR0048, Oxoid; HB026, HiMedia); Bolton bulion, mediu gata de utilizare în flacoane (Ref 400260 Liofilchem).

A 7.4. Agar modificat cu cărbune, cefoperazonă, deoxicolat (agar mCCD)

A 7.4.1. Mediu de bază

Compoziție:	
Extract de carne	10,0 g
Digest enzimatic de țesuturi animaliere	10,0 g
Clorură de sodiu	5,0 g
Cărbune	4,0 g
Digest enzimatic de cazeină	3,0 g
Sodiu deoxicolat	1,0 g
Sulfat de fier (II)	0,25 g
Sodiu piruvat	0,25 g
Agar	8,0 g până la 18,0 g ¹
Apă	1000 ml
¹ În funcție de puterea de gelifiere a agarului	

Preparare:

Se dizolvă componentele de bază sau mediul de bază complet, deshidratat, în apă, prin aducere la fierbere. Se ajustează pH-ul, dacă este necesar, așa încât după sterilizare pH mediului complet să fie $7,4 \pm 0,2$ la 25°C . Se repartizează mediul de bază în flacoane de capacitate corespunzătoare. Se sterilizează în autoclavă la 121°C timp de 15 min.

A 7.4.2. Soluția de antibiotic

Compoziție:	
Cefoperazonă	0,032 g
Amfotericină B	0,01 g
Apă	5 ml

Preparare: Se dizolvă componentele în apă. Se sterilizează prin filtrare (d_0 porilor $0,22 \mu\text{m}$).

A 7.4.3. Mediu complet

Compoziție:	
Mediu de bază (mCCD)	1000 ml
Soluție de antibiotice	5 ml

Preparare:

Se adaugă soluția de antibiotice la mediul de bază răcit la 47°C – 50°C , apoi se omogenizează cu atenție. Se toarnă circa 15 ml mediu complet în cutii Petri sterile. Se lasă să se solidifice. Chiar înainte de folosire, se usucă cu atenție plăcile de agar, de preferat fără capace și cu suprafața agarului orientat în jos, într-o etuvă de uscare timp de 30 min sau până când suprafața agarului este lipsită de umiditate vizibilă. Dacă au fost preparate înainte, plăcile de agar neuscate nu se păstrează mai mult de 4 ore la temperatura ambiantă, sau la întuneric la $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ mai mult de 7 zile.

A 7.4.4. Supliment Skirrow modificat

Prepararea suplimentului selectiv

1. Rifogal 1 ampulă, 2ml (250 mg substanță activă)
2. Cefoperazonă 825 mg
3. Amfotericină B 50mg
4. Apă distilată sterilă 250 ml

Amestecul în volum de 250 ml va fi repartizat în tuburi câte 5 ml și depozitat la minus 20°C.

1. Bază agar din bulion pe infuzie cord și creier 18,6 gr
2. Agar 6 gr
3. Apa distilată (sterilă) 500 ml
4. Sânge uman sau de cal 35 ml (7%)

La 500 ml de bază mediu de agar preparat și răcit la 45°C-50°C se adaugă 5 ml supliment Skirrow modificat.

*Medii de cultură și suplimente comerciale: Campylobacter Blood-Free Selective Medium/Modified CCDA-Preston (CM0739, Oxoid); CCDA Selective Supplement (SR0155, Oxoid); Blood Free Campylobacter Selective Agar Base (M887, Himedia); CAT Selective Supplement (FD145, HiMedia); Campylobacter Agar Base Blood Free/CCDA (Nr. 1129, Conda); CCDA Supplement (Nr. 6053, Conda); Campylobacter Blood Free Medium Base (Ref. 610130, Liofilchem); Campylobacter CCDA Supplement (Ref. 81037, Liofilchem).

A 7.5. *Medii de cultură comerciale care pot fi utilizate pentru izolarea Campylobacter spp. ca al doilea mediu selectiv, bazate pe un principiu diferit de mediul mCCD agar.

A 7.5.1. Agar Karmali:

- Campylobacter agar base/Karmali (CM0935, Oxoid); Campylobacter selective supplement/Karmali (SR0167, Oxoid) sau Modified Karmali selective supplement (SR0205, Oxoid);
- Karmali Campylobacter Agar Base (M1222, Himedia); Campylobacter Selective Supplement w/Hemin (Karmali); Modified (FD167, Himedia) sau Campylobacter Selective Supplement w/Hemin (Karmali) (FD132, Himedia);
- Campylobacter Karmali Agar Base (Ref. 610200 Liofilchem); Campylobacter Karmali Supplement (Ref. 81036, Liofilchem).

A 7.5.2. Agar Skirrow:

- Campylobacter agar base (CM0689, Oxoid); Skirrow Selective Supplement (SR0069 Oxoid); Sânge de cal lizat/Laked Horse Blood (SR0048, Oxoid); Campylobacter selective agar (Skirrow); mediu gata de utilizare (PB0118, Oxoid);
- Campylobacter Agar Base (M994, HiMedia); Campylobacter Supplement-III (Skirrow) (FD008, HiMedia); Sânge de cal lizat/Laked Horse Blood (HB026, HiMedia);

A 7.5.3. Agar Preston

- Campylobacter agar base (CM0689, Oxoid); Preston Campylobacter Selective Supplement (SR0117 sau SR0204, Oxoid); Campylobacter Growth Supplement (SR0232, Oxoid); Sânge de cal lizat/Laked Horse Blood (SR0048, Oxoid);
- Preston Agar Base (M939, HiMedia); Campylobacter Selective Supplement IV (Preston Selective Supplement) (FD042, HiMedia) sau Campylobacter Selective Supplement IV, Modified (Preston Selective Supplement) (FD158, HiMedia); Sânge de cal lizat/Laked Horse Blood (HB026, HiMedia).

A 7.6. Agar cu sânge Columbia

A 7.6.1. Mediu de bază

Compoziție:	
Digest enzimatic de țesuturi animale	23,0 g
Amidon	1,0 g
Clorură de sodiu	5,0 g
Agar	8,0 g până la 10,0 g ¹
Apă	1000 ml
¹ În funcție de puterea de gelifiere a agarului	

Preparare:

Se dizolvă componentele de bază sau mediul de bază complet, deshidratat, în apă, prin încălzire. Se ajustează pH-ul, dacă este necesar, așa încât după sterilizare pH mediului complet să fie 7,3±0,2 la 25°C. Se repartizează mediul de bază în flacoane de capacitate corespunzătoare. Se sterilizează în autoclavă la 121°C timp de 15 min.

A 7.6.2. Sânge de oaie defibrinat steril

A 7.6.3. Mediu complet

Compoziție:	
Mediu de bază (Agar Columbia)	1000 ml
Sânge de oaie defibrinat steril	50 ml

Preparare:

Se adaugă aseptice sângele la mediul de bază răcit la 47°C – 50°C, apoi se omogenizează. Se toarnă circa 15 ml mediu complet în cutii Petri sterile. Se lasă să se solidifice. Chiar înainte de folosire, se usucă cu atenție plăcile de agar, de preferat fără capace și cu suprafața agarului orientat în jos, într-o etuvă de uscare timp de 30 min sau până când suprafața agarului este lipsită de umiditate vizibilă. Dacă au fost preparate înainte, plăcile de agar neuscate nu se păstrează mai mult de 4 ore la temperatura ambiantă, sau nu mai mult de 7 zile la 3°C±2°C.

*Medii de cultură și suplimente comerciale: Columbia Blood Agar Base (CM 0331 Oxoid); Sterile defibrinated sheep blood (SR0051B, Oxoid); Columbia Blood Agar Base M144, HiMedia); Columbia Agar whit 5 % sheep blood, mediu gata de utilizare (M 1013, Biomerieux); Columbia Agar (Sheep blood 5%); mediu gata de utilizare (Ref. 11025 Liofilchem); Columbia Agar Base (Nr.1104, Conda).

A 7.7. Bulion *Brucella*

Compoziție:	
Digest enzimatic de cazeină	10,0 g
Digest enzimatic de țesuturi animale	10,0 g
Glucoză	1,0 g
Extract de drojdie	2,0 g
Clorură de sodiu	5,0 g
Disulfid de sodiu	0,1 g
Apă	1000 ml

Preparare:

Se dizolvă componentele de bază sau mediul de bază complet, deshidratat, în apă, prin încălzire dacă este necesar.

Se ajustează pH-ul, dacă este necesar, așa încât după sterilizare pH mediului complet să fie $7,0 \pm 0,2$ la 25°C . Se repartizează mediul în cantități de 10 ml în tuburi de capacitate corespunzătoare. Se sterilizează în autoclavă la 121°C timp de 15 min.

*Medii de cultură și suplimente comerciale: *Brucella* Broth Base (M 348, Himedia); *Brucella* Medium Base (CM0169, Oxoid); *Brucella* Broth (Nr.1223, Conda); *Brucella* Broth, mediu gata de utilizare (Ref. 24418, Liofilchem).

A 7.8. Agar cu sânge *Mueller – Hinton*

A 7.8.1. Mediu de bază

Compoziție:	
Digest enzimatic din țesuturi animale	6,0 g
Digest enzimatic de cazeină	17,5 g
Amidon, solubil	1,5 g
Agar	8,0 g până la 18,0g ¹
Apă	1000 ml

¹ În funcție de puterea de gelificare a agarului

Preparare:

Se dizolvă componentele de bază sau mediul de bază complet, deshidratat, în apă, prin aducere la fierbere.

Se ajustează pH, dacă este necesar, așa încât după sterilizare pH mediului complet să fie de $7,3 \pm 0,2$ la 25°C . Se repartizează mediul de bază în flacoane de capacitate corespunzătoare. Se sterilizează în autoclavă la 121°C timp de 15 min.

A 7.8.2. Sânge de oaie defibrinat steril

A 7.8.3. Mediu complet

Compoziție:	
Mediu de bază (Agar Mueller – Hinton)	1000 ml
Sânge de oaie defibrinat steril	50 ml

Preparare:

Se adaugă aseptice sângele la mediul de bază, răcit la 47 °C – 50 °C, apoi se omogenizează. Se toarnă circa 15 ml mediu complet în cutii Petri sterile. Se lasă să se solidifice. Chiar înainte de utilizare, se usucă cu atenție plăcile de agar, de preferat fără capace și cu suprafața agarului orientat în jos, într-o etuvă de uscare timp de 30 min sau până când suprafața agarului este lipsită de umiditate vizibilă. Dacă au fost preparate înainte, plăcile de agar neuscate nu se păstrează mai mult de 4 ore la temperatura ambiantă, sau nu mai mult de 7 zile la 3°C±2°C.

*Medii de cultură și suplimente comerciale: Mueller-Hinton Agar (CM0337, Oxoid); Sterile defibrinated sheep blood (SR0051B, Oxoid); Mueller-Hinton Agar With 5% Sheep Blood, mediu gata pentru utilizare (PB 0431, Oxoid); Mueller Hinton Agar (M173, Himedia); Mueller Hinton II Agar (Sheep Blood 5%), mediu gata pentru utilizare (Ref. 10131, Liofilchem).

A 7.9. Mediu de cultură pentru determinarea producerii hidrogenului sulfurat

Compoziție:	
Bulion peptonat	100,0 ml
Extract de drojdie	0,7 g
Agar	0,5 g
Sulfat de fier	2,5 g
Metabisulfid de sodiu	2,5 g
Piruvat de sodiu	2,5 g

Preparare

Se amestecă componentele și se ajustează pH-ul 7,2-7,4. Mediul se sterilizează în autoclavă timp de 20 min. la 1 atm. (121 °C). Se toarnă în tuburi sterile câte 4 ml.

A 7.10. Reactivi

A 7.10.1. Reactiv pentru detecția oxidazei

Compoziție:	
N,N,N',N' – Tetrametil -1-4-fenilendiamină dihidroclorică	1,0 g
Apă	100 ml

Preparare:

Se dizolvă componentul în apă înainte de utilizare.

*Produse comerciale: Oxidase Detection Strips (MB 0266, Oxoid); Oxidase Test Stick (Ref. 88029, Liofilchem); Oxidase Discs (DD018, HiMedia).

A 7.10.2 Reactivi pentru detectarea hidrolizei hipuratului

A 7.10. 2.1 Soluție de hipurat de sodiu

Compoziție:	
Hipurat de sodium	10 g
Soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) constând din:	
Clorură de sodium	8,5 g
Hidrogenfosfat disodic dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8,98 g
Dihidrogenfosfat monosodic monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	2,71 g
Apă	1000 ml

Preparare:

Se dizolvă hipuratul de sodiu în soluție PBS. Se sterilizează prin filtrare. Se distribuie aseptice reactivul în cantități de 0,4 ml în tuburi mici, de capacitate corespunzătoare. Se păstrează la aproximativ -20°C .

*Produs comercial: Hippurate Disk (R21085, Oxoid)

A 7.10.2.2 Ninhidrin soluție de 3,5% (masă/volum)

Compoziție:	
Ninhidrin	1,75 g
Acetonă	25 ml
Butanol	25 ml

Preparare:

Se dizolvă ninhidrinul într-un amestec de acetonă/butanol. Se păstrează soluția la frigider pentru o perioadă de maxim 1 săptămână, la întuneric.

*Produse comerciale: Ninhydrin Reagent (R21238, Oxoid) sau BactiDrop Ninhydrin (R21534, Oxoid).

A 7.11. Rondele de acetat de indoxil

Compoziție:	
Acetat de indoxil	0,1 g
Acetonă	1 ml

Preparare:

Se dizolvă indoxil acetatul în acetonă. Se adaugă 25 μl din această soluție, pe rondele de hârtie albă (diametru de 0,6 cm pînă la 1,2 cm). După uscare la temperatura camerei, rondelele se păstrează la 4°C în eprubete sau sticle brune în prezența silicagelului.

*Produs comercial: Indoxyl acetate (RM1695, HIMEDIA).

*NOTĂ: Orice denumire de producător, utilizată în acest document, este indicată doar pentru comoditatea utilizatorului și nu este o recomandare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. SM EN ISO 7218:2007/A1:2016 Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Cerințe generale și ghid pentru examenele microbiologice
2. SM EN ISO 6887-1:2017 Microbiologia lanțului alimentar. Pregătirea probei pentru analiză, a suspensiei inițiale și a diluțiilor decimale pentru examenul microbiologic. Partea 1: Reguli generale pentru pregătirea suspensiei inițiale și a diluțiilor decimale
3. Regulile privind criteriile microbiologice pentru produsele alimentare, aprobate prin HG nr. 221 din 16.03.2009
4. REGULAMENTUL (UE) 2017/1495 AL COMISIEI din 23 august 2017 de modificare a Regulamentului (CE) nr. 2073/2005 în ceea ce privește *Campylobacter* în carcasele de pui pentru îngrășare
5. SM ISO 17604:2013 Microbiologia produselor alimentare și nutrețurilor. Prelevarea eșantioanelor din carcase pentru analiza microbiologică
6. SM EN ISO 13307 Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Etapa de producție primară. Tehnici de prelevare a probelor
7. SM EN ISO 6887-2:2017 Microbiologia lanțului alimentar. Pregătirea probei pentru analiză, a suspensiei inițiale și a diluțiilor decimale pentru examenul microbiologic. Partea 2: Reguli specifice pentru pregătirea cărnii și a produselor din carne
8. SM EN ISO 6887-6:2014 Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Pregătirea probelor pentru analiză, a suspensiei inițiale și a diluțiilor decimale pentru examenul microbiologic. Partea 6: Reguli specifice pentru pregătirea probelor prelevate în etapa de producție primară
9. SM SR EN ISO 707:2012 Lapte și produse lactate. Ghid pentru eșantionare.
10. SM SR EN ISO 6887-5:2014 Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Pregătirea probelor, a suspensiei inițiale și a diluțiilor decimale pentru examenul microbiologic. Partea 5: Reguli specifice pentru pregătirea laptelui și a produselor lactate
11. SM EN ISO 11133:2015 Microbiologia produselor alimentare, hranei pentru animale și a apei. Preparare, producere, depozitare și încercări de performanță ale mediilor de cultură
12. SM EN ISO 10272-1:2018 Microbiologia lanțului alimentar. Metoda orizontală pentru detecția și enumerarea *Campylobacter* spp. Partea 1: Metoda de detecție
13. SM EN ISO 10272-2:2018 Microbiologia lanțului alimentar. Metoda orizontală pentru detecția și enumerarea *Campylobacter* spp. Partea 2: Tehnica de numărare a coloniilor
14. СП 3.1.7.2816-10 Профилактика кампилобактериоза среди людей
15. Методические рекомендации Микробиологическая диагностика кампилобактериоза (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 26 декабря 2008 г. № 01/15702-8-34)

Acest material a fost tipărit cu suportul financiar al Agenției Elvețiene pentru Dezvoltare și Cooperare (SDC) și Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) în cadrul Proiectului privind sănătatea mamei și a copilului și imunizare – contribuție la Programul „Susținerea măsurilor de promovare a încrederii”.