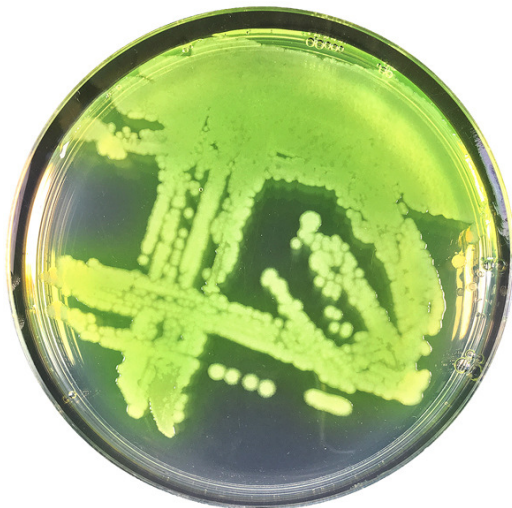




PSEUDOMONAS SELECTIVE AGAR (CETRIMIDE)

Terreno di coltura in flacone



Pseudomonas Selective Agar:
Pseudomonas aeruginosa

DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per l'isolamento di *Pseudomonas* spp. da campioni clinici e da altri materiali non di origine clinica, come ad esempio i prodotti farmaceutici non sterili ed i cosmetici e per l'isolamento e l'identificazione presuntiva di *P.aeruginosa*.

FORMULA TIPICA *

| | |
|----------------------------------|---------|
| Digerito pancreatico di gelatina | 20,0 g |
| Magnesio cloruro | 1,4 g |
| Potassio solfato | 10,0 g |
| Cetrimide | 0,3 g |
| Agar | 14,0 g |
| Acqua purificata | 1000 mL |

* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche

DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Le specie appartenenti al genere *Pseudomonas* sono aerobie, non producono spore, sono bacilli Gram negativi dritti o leggermente curvi e misurano 0.5 - 1.0µm x 1.5 - 5.0µm. Sono mobili per presenza di uno o più flagelli polari. Sono aerobi obbligati. La maggior parte delle specie sono ossidasi positive (tranne *P. luteola* e *P. oryzihabitans*) e catalasi positive. Un'altra caratteristica tipica di *Pseudomonas*, (con alcune eccezioni), è la secrezione di piovverdina (fluoresceina), un sideroforo giallo-verde fluorescente in condizioni di carenza di ferro. Alcune specie di *Pseudomonas* possono inoltre produrre altri tipi di siderofori, come piocianina (blu), piorubina (rossa) o piomelanina (marrone) in *Pseudomonas aeruginosa* e tioquinolobactina in *Pseudomonas fluorescens*.

Pseudomonas Selective Agar è preparato in accordo alla formulazione di King e coll. (Tech Agar/Medium A) con l'aggiunta di cetrimide per l'inibizione dei microrganismi diversi da *Pseudomonas*, proposta in origine alla concentrazione 0,1% da Lowbury nel 1951 ed in seguito diminuita allo 0,03% da Lowbury e Collins nel 1955.

Pseudomonas Selective Agar corrisponde al terreno denominato Cetrimide Agar del metodo armonizzato EP, USP, JP ed è conforme alle specifiche qualitative ivi riportate.

Il cetil trimetil ammonio bromuro (cetrimide), la base d'ammonio quaternario presente nella formulazione, inibisce la crescita della maggior parte dei microrganismi fatta eccezione per *Pseudomonas* spp. Il peptone fornisce gli elementi per la crescita microbica ed è, secondo quanto riportato da King e coll. e da Goto ed Enomoto, un componente critico per la produzione di pigmenti; il magnesio cloruro ed il potassio solfato stimolano la produzione di piocianina e di piovverdina; il glicerolo è presente nel terreno come fonte di carbonio per la crescita microbica e come stimolante della produzione di piocianina. L'identificazione presuntiva di *P.aeruginosa* è ottenuta sulla base della produzione di pigmenti e delle conseguenti caratteristiche cromatiche delle colonie.

PREPARAZIONE

Scaldare in bagnomaria a 100 °C portando ad ebollizione il terreno in flacone, agitando di tanto in tanto. Raffreddare a 47-50 °C e trasferire in piastre di Petri sterili.

CARATTERISTICHE DEL TERRENO

| | |
|--------------------------------|------------------------------------|
| Aspetto del terreno in flacone | terreno giallo chiaro, opalescente |
| pH finale a 25 °C | 7,2 ± 0,2 |

MATERIALI FORNITI

Falconi con 100 ml di terreno di coltura Pseudomonas Selective Agar (Cetrimide) pronto per essere sciolto in bagnomaria.

MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Termostato, bagnomaria ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, piastre di Petri, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

CAMPIONI

Possono essere utilizzati tutti i tipi di campioni clinici ove sia necessaria la ricerca di *P.aeruginosa* ed in particolare quelli che si sospetta essere contaminati da flora saprofitica o materiali non clinici (es. prodotti farmaceutici non sterili e



cosmetici). Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

PROCEDURA DELL'ANALISI

Lasciare asciugare la superficie del terreno in piastra ed inoculare con il campione su una piccola area vicini al bordo della piastra; strisciare quindi con l'ansa sui quattro quadranti per ottenere colonie isolate. Incubare a 37°C per 18-24 ore ed osservare per la presenza di colonie tipiche. In assenza di colonie o di colonie tipiche re-incubare per ulteriori 18-24 ore.

Per la determinazione di *P.aeruginosa* nei prodotti farmaceutici non sterili operare come segue.

- Preparare una diluizione 1:10 del campione usando non meno di 1 g o 1 ml di prodotto da esaminare. Con 10 ml di tale diluizione o la quantità corrispondente a 1 g o 1 ml, inoculare un volume adeguato di Tryptic Soy Broth. Incubare a 30-35°C per 18-24 ore.
- Trapiantare dalla brodocoltura su piastra di Pseudomonas Selective Agar ed incubare a 30-35°C per 18-72 ore.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Campioni clinici: dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle.

La presenza di qualsiasi tipo di crescita deve essere interpretato come presenza di *Pseudomonas* spp.

Esaminare le piastre sotto lampada UV (254 nm). La positività al test è data dalla presenza di una diffusa fluorescenza giallo-verde attorno alle colonie. La presenza di fluorescenza è propria di *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.putida*.

Esaminare per la presenza di pigmenti.

La formazione di piocianina è indicata dal colore blu o verde/blu delle colonie.

La formazione di pioverdina è indicata dal colore giallo-verde delle colonie

La formazione di piorubina è indicata dal colore da rosa chiaro al rosso o marrone scuro, delle colonie.

Quando la pioverdina si combina con la piocianina, si viene a creare il caratteristico colore verde brillante di *P.aeruginosa*. Queste caratteristiche cromatiche sono tipiche di *P.aeruginosa*, insieme alla morfologia delle colonie ed al tipico odore d'uva causato dalla produzione di aminoacetofenone.

Le colonie sviluppate sulle piastre devono essere sottoposte a prove di conferma con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione con subcoltura su terreno appropriato.

Campioni farmaceutici: la possibile presenza di *P.aeruginosa* è indicata dalla crescita su piastra di colonie. Il risultato culturale deve essere confermato con test d'identificazione. La prova è da considerarsi negativa se sulla piastra non vi è presenza di colonie o se i test d'identificazione risultassero negativi.

CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. E' comunque responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

| CEPPI DI CONTROLLO | | INCUBAZIONE T° / t / ATM | RISULTATI ATTESI |
|---------------------|------------|--------------------------|-------------------------------|
| <i>P.aeruginosa</i> | ATCC 9027 | 37°C / 24H / A | buona crescita, colonie verdi |
| <i>E. coli</i> | ATCC 25922 | 37°C / 24H / A | crescita inibita |
| <i>S.aureus</i> | ATCC 25923 | 37°C / 24H / A | crescita inibita |

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrate di American Type Culture Collection

LIMITI DEL METODO

- La cetrimide può essere inibitoria anche per alcune specie di *Pseudomonas* diverse da *aeruginosa*.
- La completa produzione di pigmenti da parte di *P.aeruginosa* non è ottenibile con l'impiego di un unico terreno di coltura (King e coll.).
- Esistono ceppi non pigmentati di *P.aeruginosa* che si sviluppano sul terreno ma non producono la tipica colorazione verde-blu o verde giallo.
- In rari casi sul terreno coltivano enterobatteri (es. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*), ed inoltre *Alkaligenes* ed *Aeromonas*, con un leggero ingiallimento del terreno; questa colorazione è facilmente distinguibile da quella di *Pseudomonas* poiché non sviluppa fluorescenza sotto UV (King e coll., Goto e coll.).
- Alcuni non-fermentanti e sporigeni aerobi possono mostrare un pigmento solubile da color tannino a marrone (King e coll.).
- Alcuni ceppi di *Serratia* possono coltivare con colonie rosa (King e coll.).
- Lowbury e Collins hanno riportato che *P.aeruginosa* può perdere la fluorescenza sotto i raggi UV se le culture vengono lasciate a temperatura ambiente per un breve periodo. La fluorescenza riappare quando le piastre sono reincubate.
- *P.aeruginosa* è ossidasi positiva e comunque alcuni ceppi di *P.aeruginosa*, in particolare quelli mucosi, presentano una reazione ritardata dell'ossidasi e pertanto possono richiedere ulteriori test per confermare l'identificazione.
- Il terreno qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.



PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente.
- Il prodotto qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* sugli animali e quelli durante il processo di produzione e distribuzione dei materiali non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto qui descritto con le precauzioni d'uso specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alla TSE.
- Il prodotto qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale. Esso deve essere usato in Laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni poiché le colture microbiche e le provette seminate sono da considerare come potenzialmente infettive.
- Il prodotto qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave ma, non essendo sottoposto a test di sterilità con metodo normato, non è etichettato come "sterile" e deve essere quindi inteso come prodotto a biocontaminazione controllata e nei limiti di specifiche definite.
- Prima dell'utilizzo verificare l'integrità del tappo a vite.
- Non utilizzare i flaconi oltre la data di scadenza. Non utilizzare i flaconi se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato).
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- Sterilizzare le provette e le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire i flaconi non utilizzati le piastre inoculate con i campioni o con i ceppi microbici in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.

CONSERVAZIONE

Conservare a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

BIBLIOGRAFIA

- APSI. Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito. Identificazione di specie *Pseudomonas* e altre Non-Fermentanti il Glucosio. Emesso da Standard Unit, Microbiology Services, PHE Batteriologia – Identificazione | ID 17 | Emissione no: 3 | Data di emissione: 13.04.15
- European Pharmacopoeia, current edition
- Goto, S., & Enomoto, S. (1970) Jpn. J. Microbiol. 14 (1), 65.
- King, B.S., Ward, M.K.W. & Roney, D.E. (1954) J. Lab. Clin. Med. 44, 301.
- Lowbury (1951). J. Clin. Pathol. 4 :66.
- Lowbury and Collins (1955) J. Clin. Pathol. 8 :47
- Mac Faddin, J.F. (1985) Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.

CONFEZIONE

| Prodotto | Tipo | Cat. N° | Confezione |
|----------------------------|---|---------|---|
| Pseudomonas Selective Agar | Terreno in flacone di vetro con tappo a vite. | 5119632 | 6 flaconi da 100 mL in scatola di cartone |

CODICE CND: W0104010306

RDM: 1553328/R



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, Milano, Italia.