

# PSEUDOMONAS AGAR BASE CN PSEUDOMONAS SUPPLEMENT CFC PSEUDOMONAS SUPPLEMENT PP PSEUDOMONAS SUPPLEMENT PSEUDOMONAS CN SELECTIVE AGAR

Terreno di coltura in polvere, supplementi selettivi, piastre pronte all'uso



Pseudomonas CN Selective Agar: colonie di *P. aeruginosa* su membrana filtrante

## PSEUDOMONAS CN SELECTIVE AGAR PIASTRE PRONTE 55 E 90 MM

Pseudomonas Agar Base	1000 mL
Cetrimide	200 mg
Acido nalidissico	15,0 mg
Glicerolo	10 mL

## 1 – DESTINAZIONE D'USO

Per l'isolamento e il conteggio di *Pseudomonas* spp in acque, prodotti alimentari e campioni ambientali.

## 2 – COMPOSIZIONE

### PSEUDOMONAS AGAR BASE, TERRENO DISIDRATATO

#### FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA \*

Peptone di gelatina	16,0
Idrolizzato acido di caseina	10,0
Potassio solfato anidro	10,0
Magnesio cloruro anidro	1,4
Agar	11,5

### CN PSEUDOMONAS SUPPLEMENT

#### (CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO)

Cetrimide	100 mg
Acido nalidissico	7,5 mg

### CFC PSEUDOMONAS SUPPLEMENT

#### (CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO)

Cetrimide	5 mg
Acido fusidico	5 mg
Cefalosporina	25 mg

### PP PSEUDOMONAS SUPPLEMENT

#### (CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO)

Penicillina G	50000 UI
Pimaricina	5 mg

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

## 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

*Pseudomonas aeruginosa* è un patogeno ambientale opportunista caratterizzato da un elevato grado di adattabilità, in grado di crescere in acque con concentrazioni di nutrienti molto basse e di sopravvivere in acque disinfettate.<sup>1</sup> *Pseudomonas* spp. sono tra i batteri psicotropi più frequentemente presenti nel latte crudo e sono la causa più comune del deterioramento della carne in temperatura di refrigerazione.<sup>2</sup> Pseudomonas Agar Base è una modifica del King's A Medium<sup>3</sup> in cui la concentrazione di peptoni è significativamente aumentata e sono presenti cloruro di magnesio e solfato di potassio per migliorare la produzione di pigmenti.

L'uso della cetrimide a 10 mg/L e dell'acido nalidissico a 15 mg/L, (CN Pseudomonas Supplement), è stato descritto da Goto ed Enomoto<sup>4</sup> dopo gli studi di Lowbury e Collins<sup>5</sup> sulle proprietà selettive della cetrimide nei confronti di un ampio range di Gram-positivi e alcuni microrganismi Gram-negativi diversi da *P. aeruginosa*. La combinazione di cetrimide e acido nalidissico sopprime fortemente la crescita di *Klebsiella*, *Proteus* e *Providencia* spp.

CFC Supplement si basa sulla formulazione ideata da Mead e Adams<sup>6</sup> che hanno dimostrato che la riduzione di cetrimide a 10 mg/L ha migliorato il recupero delle *Pseudomonas* psicrofile pigmentate e non pigmentate associate al deterioramento della carne di pollame. Per migliorare la selettività del terreno, hanno aggiunto una cefalosporina e acido fusidico.

PP Supplement si basa sulla formulazione inclusa nella norma ISO 11059<sup>7</sup> e contiene la penicillina come agente inibitore dei batteri Gram-positivi e il composto antimicotico pimaricina (natamicina).

Pseudomonas Agar Base supplementato con glicerolo e CN Supplement corrisponde al terreno raccomandato dalla norma ISO 16266<sup>8</sup> per l'isolamento e il conteggio di *P. aeruginosa* nei campioni di acqua.

La base del terreno addizionata con CFC Supplement corrisponde al terreno raccomandato dalla norma ISO 13720<sup>7</sup> per l'isolamento e il conteggio di *Pseudomonas* spp. nei prodotti a base di carne.

La base del terreno addizionata con PP Supplement corrisponde al terreno raccomandato da ISO/TS 11059<sup>9</sup> per l'isolamento e il conteggio di *Pseudomonas* spp. nel latte e nei prodotti lattiero-caseari.

## 4- PREPARAZIONI DEI TERRENI

Sospendere 24,5 g in 500 mL di acqua purificata fredda e aggiungere 5 mL di glicerolo (REF 421025) per la preparazione di CN Pseudomonas Agar (ISO 16266); omettere il glicerolo per la preparazione dei terreni CFC e PP. Portare ad ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 45-50°C e aggiungere l'apposito supplemento selettivo come segue:

**CN Supplement (ISO 16266)** Aggiungere il contenuto di una fiala di CN Pseudomonas Supplement (REF 4240046), ricostituito con 2 mL di acqua distillata sterile/etanolo (1:1), a 500 mL di Pseudomonas Agar Base preraffreddato. Mescolare bene e versare in piastre di Petri sterili.





**CFC Supplement (ISO 13720)** Aggiungere il contenuto di una fiala di CFC Pseudomonas Supplement (REF 4240075), ricostituito con 2 mL di acqua distillata sterile/etanolo (1:1), a 500 mL di Pseudomonas Agar Base preraffreddato. Mescolare bene e versare in piastre di Petri sterili.

**PP Supplement (ISO/TS 11059)** Aggiungere il contenuto di una fiala di PP Pseudomonas Supplement (REF 4240048), ricostituito con 2 mL di acqua distillata sterile, a 500 mL di Pseudomonas Agar Base preraffreddato. Mescolare bene e versare in piastre di Petri sterili.

## 5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

### Pseudomonas Agar Base

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto del terreno in soluzione	incoloro, limpido
pH di Pseudomonas CN (20-25 °C) (ISO 16266)	7,1 ± 0,2
pH di Pseudomonas CFC e PP (ISO 13720 ISO/TS 11059)	7,2 ± 0,2

### CN Supplement

Aspetto del supplemento liofilizzato	compressa alta di colore bianco
Aspetto del supplemento ricostituito	soluzione limpida incoloro

### CFC Supplement

Aspetto del supplemento liofilizzato	compressa alta di colore bianco
Aspetto del supplemento ricostituito	limpido, da incoloro a giallo chiaro

### PP Supplement

Aspetto del supplemento liofilizzato	compressa alta di colore bianco
Aspetto del supplemento ricostituito	biancastro, torbido

## 6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Pseudomonas Agar Base	Terreno in polvere	4019602	500 g (10,2 L)
CN Pseudomonas Supplement	Supplemento liofilo	4240046	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
CFC Pseudomonas Supplement	Supplemento liofilo	4240075	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
PP Pseudomonas Supplement	Supplemento liofilo	4240048	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Pseudomonas CN Selective Agar	Piastre pronte all'uso	541960	2 x 10 piastre ø 90 mm
Pseudomonas CN Selective Agar	Piastre pronte all'uso	491960	3 x 10 piastre ø 55 mm

## 7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre Petri sterili, Glicerolo (REF:421025), terreni di coltura e reagenti ausiliari.

## 8 – CAMPIONI

Campioni di acqua, carne e prodotti a base di carne, latte e prodotti lattiero-caseari. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.<sup>7-9</sup>

## 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI– LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### Acque (ISO 16266)<sup>8</sup>

1. Filtrare attraverso un filtro a membrana da 0,45 µm il volume appropriato di acqua (acqua in bottiglia o acqua di sorgente: 250 mL, altre acque, incluse acque di piscina e acqua per il consumo umano: 100 mL).
2. Posizionare ciascuna membrana su una piastra preparata con CN Supplement, assicurandosi che non vi sia aria intrappolata sotto la membrana.
3. Incubare a 36 ± 2 °C per 44 ± 4 h. Esaminare le membrane per la crescita dopo 22 ± 2 h e 44 ± 4 h.
4. Contare tutte le colonie che producono una colorazione verde/blu (piocianina) come *P.aeruginosa*.
5. Esaminare la membrana sotto i raggi UV. Contare tutte le colonie non produttrici di piocianina e le colonie pigmentate bruno-rossastre che emettono fluorescenza come presunta *P.aeruginosa* e confermare la loro identità utilizzando il test dell'ossidasi (Oxidase Test Strip, REF 191040ST), il brodo di acetammide (Acetamide Broth, REF 5510101) e il terreno King's B (Pseudomonas Agar F, REF 401961).

### Prodotti a base di carne (ISO 13720)<sup>9</sup>

1. Trasferire sulla superficie di una piastra preparata con CFC Supplement 0,1 mL della sospensione iniziale. Ripetere questa operazione con le successive diluizioni prelevando altre due piastre di agar CFC, utilizzando una nuova pipetta sterile per ogni diluizione decimale (se si effettua una sola diluizione si utilizzano due piastre).
2. Distribuire il liquido sulla superficie dell'agar con uno spargitore sterile finché la superficie non è completamente asciutta.
3. Incubare le piastre a 25 °C ± 1 °C per 44 h ± 4 h. Contare le colonie sulle piastre contenenti meno di 150 colonie e selezionare casualmente cinque colonie da ciascuna piastra per i test di conferma.
4. Confermare la presenza di *Pseudomonas* con il test dell'ossidasi. Le colonie che mostrano una reazione ossidasica positiva sono considerate come colonie di *Pseudomonas*.

### Latte e prodotti lattiero-caseari (ISO/TS 11059)<sup>7</sup>

1. Trasferire sulla superficie della piastra preparata con PP Supplement 0,1 mL della sospensione iniziale. Ripetere questa operazione con le successive diluizioni prelevando altre piastre di PP Agar, utilizzando una nuova pipetta sterile per ogni diluizione decimale (se si effettua una sola diluizione si utilizzano due piastre).
2. Distribuire il liquido sulla superficie dell'agar con uno spargitore sterile finché la superficie non è completamente asciutta.
3. Incubare le piastre a 25 °C ± 1 °C per 48 h ± 2 h. Contare le colonie sulle piastre contenenti meno di 150 colonie e selezionare casualmente cinque colonie da ciascuna piastra per i test di conferma.
4. Confermare la presenza di *Pseudomonas* con test dell'ossidasi e fermentazione del glucosio su Purple Glucose Agar (REF 401970).
5. Le colonie che mostrano una reazione ossidasica positiva e l'assenza di fermentazione del glucosio sono considerate colonie di *Pseudomonas*.



### 10 – CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi utili per il controllo qualità.<sup>5</sup>

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
Pseudomonas Agar Base + CN Supplement		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	36°C / 40-48 H / A	colonie giallo-verdi, fluorescenti
<i>E. coli</i> ATCC 25922	36°C / 40-48 H / A	inibito
Pseudomonas Agar Base + CFC Supplement		
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	25°C / 40-48 H / A	colonie verde-blu, fluorescenti
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25°C / 40-48 H / A	inibito
Pseudomonas Agar Base + PP Supplement		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	25°C / 40-48 H / A	colonie giallo-verdi, fluorescenti
<i>P. fluorescens</i> ATCC 13525	25°C / 40-48 H / A	colonie verde-blu, fluorescenti
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25°C / 40-48 H / A	inibito

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

### 11 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di terreno disidratato, di pronti all'uso e di supplementi (Test Batch:TB) viene testato per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato e con Tryptic Soy Agar.

Tempo e temperatura di incubazione: Pseudomonas Agar Base + CN Supplement: 36°C per 44-48 ore, Pseudomonas Agar Base + CFC e PP Supplement: 25°C per 40-48 ore. Tecnica di inoculazione: in superficie.

La produttività di Pseudomonas Agar Base + CN Supplement è valutata mediante un test quantitativo con i seguenti ceppi target: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 10145, *P. aeruginosa* ATCC 9027. Il rapporto di produttività ( $UFC_{TB}/UFC_{TSA}$ ) deve essere  $\geq 0,5$ .

La produttività di Pseudomonas Agar Base + CFC Supplement è valutata mediante un test quantitativo con il ceppo target *P. fluorescens* ATCC 13525. Il rapporto di produttività ( $UFC_{TB}/UFC_{TSA}$ ) deve essere  $\geq 0,5$ . Inoltre, le caratteristiche di produttività sono valutate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con *P. aeruginosa* ATCC 10299 e *P. aeruginosa* ATCC 9027. Dopo l'incubazione i ceppi target mostrano una buona crescita con colonie tipiche.

La produttività di Pseudomonas Agar Base + PP Supplement è valutata mediante un test quantitativo con i ceppi target *P. fluorescens* ATCC 13525 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Il rapporto di produttività ( $UFC_{TB}/UFC_{TSA}$ ) deve essere  $\geq 0,5$ . Inoltre, le caratteristiche di produttività sono valutate con tecnica ecometrica semiquantitativa con *P. aeruginosa* ATCC 10299 e *P. aeruginosa* ATCC 9027. Dopo incubazione i ceppi target mostrano una buona crescita con colonie tipiche.

Le proprietà selettive dei terreni sono valutate con i seguenti ceppi non target: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 12413, *E. faecalis* ATCC 19433. Tutti i tipi di terreno con i supplementi selettivi mostrano un'inibizione totale di ceppi non target.

### 12 – LIMITI DEL METODO

- Laddove viene isolato un gran numero di presunte *P. aeruginosa*, la natura diffusa delle colonie può ostacolare una precisa valutazione quantitativa.<sup>8</sup>
- Il pigmento piocianina (blu-verde) è prodotto da oltre il 90% dei ceppi di *P. aeruginosa*.<sup>8</sup>
- L'identificazione di *Pseudomonas* spp. o *P. aeruginosa* deve essere confermata mediante test adeguati.

### 13 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura, le piastre pronte e i supplementi qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura e i supplementi devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. I supplementi CN, CFC e PP sono classificati come pericolosi. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it) il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- I supplementi selettivi sono sterilizzati mediante filtrazione a membrana.
- Prestare attenzione quando si aprono gli anelli metallici delle fiale dei supplementi per evitare lesioni.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).



- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego dei prodotti, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

#### 14 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

##### Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

##### Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

##### Supplementi liofilizzati

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

Secondo la norma ISO 16266, le piastre di CN agar preparate in autonomia possono essere conservate al buio e protette dall'essiccamento per non più di 4 settimane a 5 °C ± 3 °C. Non tenere l'agar sciolto per più di 4 ore. <sup>8</sup>













Secondo la norma ISO 13720, le piastre di CFC agar preparate in autonomia possono essere conservate al buio e protette dall'essiccamento per non più di 4 settimane a 5 °C ± 3 °C. <sup>9</sup>

Secondo la norma ISO 11059, le piastre di PP agar preparate in autonomia possono essere conservate al buio a 5 °C ± 3 °C per non più di 1 giorno. <sup>7</sup>

#### 15- BIBLIOGRAFIA

- Briancesco R, Paduano S, Semproni M, Vitanza L, Bonadonna L. Behavior of Pseudomonas aeruginosa and Enterobacter aerogenes in Water from Filter Jugs. Int. J. Environ. Res. Public Health 2020; 17: 8263.
- APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015
- King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J Lab Clin Med 1954; 44:301-7.
- Goto S, Enomoto S. Nalidixic acid cetrinide agar. A new selective plating medium for the selective isolation of Pseudomonas aeruginosa. Jpn J Microbiol 1970; 14: 65-72
- Lowbury EJ, Collins AG. The use of a new cetrinide product in a selective medium for Pseudomonas pyocyanea. J Clin Pathol 1955; 8:47-8.
- Mead GC, Adams BW. A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. Br Poult Sci 1977; 18: 661-70.
- ISO/TS 11059:2009 Milk and milk products — Method for the enumeration of Pseudomonas spp.
- ISO 16266:2006 Water quality – Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa by membrane filtration.
- ISO 13720:2010 Meat and meat products — Enumeration of presumptive Pseudomonas spp

#### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Fabbricante	 Utilizzare entro	 Proteggere dall'umidità	 Fragile, maneggiare con cura
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Lato superiore	 Proteggere dalla luce	 Monouso

#### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 8	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni

