

## ISTRUZIONI PER L'USO

**PSEUDOMONAS AGAR P**

Terreno di coltura in polvere



Pseudomonas Agar P:  
sulla sinistra *P.aeruginosa*, sulla destra *B.cepacia*

**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Pseudomonas Agar P (Terreno A di King) è impiegato per il test di produzione della piocianina per la differenziazione di *Pseudomonas aeruginosa*.

**2 - COMPOSIZIONE****FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)\***

Peptone	20,0 g
Potassio solfato	10,0 g
Magnesio cloruro	1,4 g
Agar	15,00 g

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

**3 - 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 0,5-1,0 µm x 1.5-5,0 µm. Sono mobili per presenza di uno o più flagelli polari. Sono aerobi obbligati ma, in alcuni casi, viene utilizzato il nitrato come alternativa all'ossigeno che ne consente la crescita anaerobica.<sup>1</sup> La maggior parte delle specie sono ossidasi positive (tranne *P. luteola* e *P. oryzihabitans*) e catalasi positive.<sup>1</sup>

*P.aeruginosa* è ampiamente distribuito nelle acque superficiali, reflue e marine, nel suolo, sulla vegetazione e in generale, in tutti gli ambienti umidi; inoltre, è in grado di crescere in acqua distillata, di sopravvivere nei disinfettanti, nei cosmetici e di contaminare gli alimenti. *P. aeruginosa* è considerato un patogeno opportunista soprattutto nei pazienti immunocompromessi e si caratterizza per essere multi-resistente agli antibiotici, rappresentando quindi un rischio per la salute in ambienti ospedalieri. *P.aeruginosa* può provocare infezioni delle vie urinarie, delle ustioni e delle ferite, ulcere corneali e cheratiti, setticemie, gastroenteriti nei neonati, ascessi, polmoniti associate alle attrezzature per la ventilazione e meningiti.<sup>2</sup>

Un'altra caratteristica tipica di *Pseudomonas*, (con alcune eccezioni), è la secrezione di piovverina (fluoresceina), un sideroforo giallo-verde fluorescente in condizioni di carenza di ferro.<sup>3</sup> Alcune specie di *Pseudomonas* possono inoltre produrre altri tipi di siderofori, come piocianina (blu), piourubina (rossa) o piomelanina (marrone) in *P. aeruginosa* e tioquinolobactina in *P. fluorescens*.<sup>4</sup>

King, Ward e Raney<sup>4</sup> nel 1954 descrissero due terreni, uno dei quali (medium A) stimola la produzione di piocianina di *P. aeruginosa*, mentre l'altro (medium B) stimola la produzione di fluoresceina.

Pseudomonas Agar P, noto anche come King's Medium A o Tech Agar, è una modificazione della formula descritta da King, Ward e Raney,<sup>4</sup> è conforme alla formulazione inclusa in FDA-BAM<sup>5</sup>. La produzione di piocianina è evidenziata dalla presenza di una colorazione da blu a blu-verde della crescita batterica e del terreno circostante.

Il potassio solfato ed il magnesio cloruro inclusi nel terreno, stimolano la produzione di piocianina ed inibiscono la produzione di fluoresceina;<sup>6</sup> il peptone fornisce composti di azoto e di carbonio per la crescita batterica ed inoltre, grazie ad un basso contenuto di fosforo, ha un ridotto effetto inibitorio sulla produzione di piocianina; il glicerolo, addizionato al terreno di base, è una fonte di carbonio per la crescita e per la formazione di piocianina.<sup>6</sup>

Pseudomonas Agar P, combinato con Pseudomonas Agar F, consente di eseguire i test fenotipici convenzionali per la differenziazione di *P.aeruginosa* da altre specie del genere *Pseudomonas*, isolati da campioni clinici.<sup>7</sup> FDA-BAM<sup>5</sup> raccomanda i test di produzione di piocianina e fluoresceina su Pseudomonas Agar P (+) e Pseudomonas Agar F (+) per la conferma delle colonie di *P. aeruginosa* isolate dai cosmetici, insieme ad altri test: arginina diidrolasi (+), utilizzo di citrato (+) e malonato (+), riduzione dei nitrati (+), motilità (+) e crescita a 42 ° C (+)

**4 - METODO DI PREPARAZIONE**

Sospendere 46,4 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda ed aggiungere 10 ml di glicerolo (REF 421015). Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 47-50°C e distribuire in piastre sterili. In alternativa, dopo bollitura, distribuire in provette ed autoclavare a 121°C per 15 minuti; raffreddare in posizione inclinata in modo da ottenere un corto becco di clarino.

**5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO**

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, beige

Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra

biancastro, leggermente opalescente

pH (20-25°C)

7,2 ± 0,2

**6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Pseudomonas Agar P	Terreno di coltura in polvere	4019622	500 g (10,8 L)





### 7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, piastre di petri sterili, flaconi o beute autoclavabili, anse da microbiologia, glicerolo (REF 421015), reagenti e terreni di coltura accessori.

### 8 - CAMPIONI

Il campione è costituito da colture pure di batteri sui quali, dalla colorazione Gram, sia stata valutata la compatibilità con *Pseudomonas* sp.

### 9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Inoculare il terreno in piastra o in provetta con una singola colonia prelevata dal terreno d'isolamento primario, seminando con una linea d'inoculo su piastra o su becco di clarino; nelle provette non seminare il fondo del terreno.

Incubare le piastre o le provette con i tappi allentati a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per 18-24 ore. Se non si osserva crescita o se la crescita fosse lieve, re-incubare a  $25-30^\circ\text{C}$  per 1-2 giorni ed osservare per la crescita e per la produzione di pigmento.

FDA-BAM<sup>5</sup> per la conferma di *P.aeruginosa* nei cosmetici indica una temperatura di incubazione di  $25^\circ\text{C}$  per almeno 3 giorni.

### 10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Osservare le piastre o le provette giornalmente e riportare il test positivo per la produzione di piocianina quando si osserva la presenza di una colorazione da blu a blu-verde della crescita, diffusa nel terreno circostante.

FDA-BAM<sup>5</sup> indica la seguente procedura di lettura dei risultati: rompere un'aliquota di terreno con un'asta di vetro in una quantità approssimativamente uguale di acqua distillata e agitare energicamente fino a quando l'acqua non ha rimosso il più possibile il pigmento. Decantare in un separatore. Sotto cappa chimica, aggiungere 5-10 mL di cloroformio all'acqua nel separatore e agitare (sfiatando di tanto in tanto per evitare la pressione interna). La piocianina blu migrerà verso il cloroformio. Aspirare lo strato di cloroformio ed aggiungere circa 3 ml di acqua distillata. Aggiungere 1 goccia 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La piocianina diventa rossa e migra verso l'acqua.

### 11 - CONTROLLO QUALITA'

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 responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T° / t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 14207	$35 \pm 2^\circ\text{C}$ / 18-24H / A	crescita e terreno di colore da blu a blu-verde
<i>B.cepacia</i> ATCC 25415	$35 \pm 2^\circ\text{C}$ / 18-24H / A	crescita incolore

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

### 12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di *Pseudomonas* Agar P viene testato per caratteristiche prestazionali specifiche (produzione di piocianina) confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato. Il terreno in piastra è inoculato con colture pure di *P.aeruginosa* ATCC 9027, *P.aeruginosa* ATCC 14207, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *P.aeruginosa* ATCC 10299, *P.aeruginosa* d'isolamento clinico, *B.cepacia* ATCC 25415. Le piastre vengono incubate a  $35-37^\circ\text{C}$  per 18-24 ore in aerobiosi. Viene osservata e registrata per ciascun ceppo il colore della crescita microbica. I 5 ceppi di *P.aeruginosa* sviluppano una colorazione verde-blu a carico della crescita e del terreno circostante, *B.cepacia* cresce incolore.

### 13 - LIMITI DEL METODO

- La presenza di colonie incolore non esclude completamente la presenza di *P.aeruginosa*.<sup>6</sup>
- Ceppi mucoidi di *P.aeruginosa* isolati da pazienti con fibrosi cistica possono subire diversi cambiamenti fenotipici inclusa la perdita di produzione di pigmenti.<sup>7</sup>
- Occasionalmente, è possibile rilevare su *Pseudomonas* Agar P una lieve produzione di fluoresceina. In questo caso la crescita assumerà una tonalità verde-azzurro.<sup>6</sup>
- È possibile confermare la presenza di piocianina attraverso l'estrazione con cloroformio con il metodo descritto sopra.
- Pseudomonas* Agar P non deve essere utilizzato come terreno di isolamento di *Pseudomonas* da campioni clinici e da altri materiali, ma come terreno differenziale.
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa.

### 14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.





- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto 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 del prodotto, 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.

### 15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. 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 (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utilizzatore è responsabile del processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

### 16 - BIBLIOGRAFIA

1. Public Health England- Identification of Pseudomonas species and other Non-Glucose Fermenters. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 17 Issue 3, 2015
2. Istituto Superiore di Sanità. Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici. A cura di Lucia Bonadonna e Massimo Ottaviani 2007, iv, 204 p. Rapporti ISTISAN 07/5
3. Meyer JM, Geoffroy VA, Baida N, Gardan L, Izard D, Lemanceau P, et al. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. Appl Environ Microbiol 2002;68:2745-53
4. King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J Lab Clin Med 1954;44:301-7.
5. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Microbiological Methods for cosmetics. Updated 07/2017
6. MacFaddin, Jean F. (1985). Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
7. Hoibi N, Ciofu O, Bjarnsholt T. Pseudomonas. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 2015.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	Utilizzare entro	Fabbricante	
Limiti di temperatura		Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Proteggere dalla luce	Proteggere dall'umidità

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 5	Modifiche a: "destinazione d'uso", "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	05/2022

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

