

## PSEUDOMONAS SELECTIVE BROTH

### Terreno di coltura in polvere

#### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Per il conteggio di *Pseudomonas aeruginosa* e di *Pseudomonas* spp. in campioni liquidi con il metodo della filtrazione su membrana e per il test di conferma di *P. aeruginosa*.

#### 2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA \*

##### FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA \*

Idrolisato pancreatico di gelatina	16,0 g
Idrolisato acido di caseina	10,0 g
Potassio Solfato	10,0 g
Magnesio Cloruro	1,4 g
Cetrimide	0,2 g

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

#### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

King, Ward e Raney<sup>1</sup> nel 1954 descrissero due terreni, uno dei quali (terreno A) potenzia la produzione di piocianina da parte di *P. aeruginosa*, mentre l'altro (terreno B) potenzia la produzione di fluoresceina. Pseudomonas Selective Broth è preparato secondo la formulazione di Tech Agar/Medium A senza agar e con l'aggiunta di cetrimide per l'inibizione di microrganismi diversi da *Pseudomonas*, originariamente proposta alla concentrazione 0,1% da Lowbury<sup>2</sup> e successivamente diminuita da Lowbury e Collins nel 1955<sup>3</sup>.

Pseudomonas Selective Broth può essere utilizzato per il conteggio di *Pseudomonas* spp. mediante tecnica di filtrazione su membrana e per il test di conferma delle colonie di *P. aeruginosa* coltivate su terreni selettivi solidi.<sup>4</sup>

Il digerito pancreatico di gelatina e il digerito acido della caseina forniscono azoto, carbonio e amminoacidi per la crescita batterica e contribuiscono alla produzione di piocianina e fluoresceina. La Cetrimide ha attività battericida contro un'ampia gamma di organismi Gram-positivi e alcuni organismi Gram-negativi diversi da *P. aeruginosa*. Il cloruro di magnesio e il solfato di potassio forniscono i cationi necessari per l'attivazione e la stimolazione della produzione di fluoresceina e piocianina.<sup>5</sup> Il glicerolo è presente nel terreno come fonte di carbonio per la crescita microbica e come stimolante per la produzione di piocianina.<sup>5</sup>

#### 4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 37,6 g in 1000 mL di acqua purificata fredda e aggiungere 10 mL di glicerolo. Portare ad ebollizione con agitazione frequente, distribuire 5 mL in provette e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

#### 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione	giallo chiaro, limpido
pH finale (20-25 °C)	7,3 ± 0,2

#### 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Pseudomonas Selective Broth	Terreno di coltura in polvere	4019642	500 g (13,3 L)

#### 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio, beute, provette, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

#### 8 – CAMPIONI

Acqua e altri campioni liquidi. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili.

#### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

##### Metodo della filtrazione su membrana

- Filtrare un volume appropriato di campione sulla membrana in base al numero di *Pseudomonas* previsto. Quando la densità batterica è sconosciuta, filtrare diversi volumi o diluizioni per ottenere una piastra contabile.
- Con le precauzioni dell'asepsi, posizionare un tampone assorbente sterile in ciascuna piastra di coltura e pipettare almeno 2 mL di brodo. Rimuovere con attenzione l'eccesso di liquido dalla piastra di coltura facendolo scolare.
- Appoggiare la membrana filtrante utilizzata per raccogliere il campione sulla superficie del tampone, in modo da evitare la formazione di bolle d'aria tra filtro e tampone.
- Incubare la piastra di Petri capovolta per 24 - 72 ore a 25-35° C. L'incubazione a 35° C per 24 ore è favorevole per *P. aeruginosa*, 25° C per *P. fluorescens*.

##### Tecnica di conferma<sup>4</sup>

Selezionare cinque colonie tipiche coltivate su terreno selettivo primario, fare una sottocoltura in provette di Pseudomonas Selective Broth ed eseguire il test della citocromo ossidasi. Incubare le provette di Pseudomonas Selective Broth a 42 ± 0,5°C per 24 ore. Le colonie ossidasi positive che crescono sulle provette di Pseudomonas Selective Broth sono identificate ed elencate come *P. aeruginosa*.

#### 10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Enumerare il numero di colonie per piastra e calcolare la conta microbica.

#### 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti del prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione dei test del Controllo Qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono riportati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità del terreno di coltura.





CEPPI DI CONTROLLO  
*P. aeruginosa* ATCC 9027  
*E. coli* ATCC 25922

INCUBAZIONE T°/ T - ATM  
37° or 42°C / 24-48 H-A  
37° or 42°C/ 24-48 H-A

RISULTATI ATTESI  
buona crescita  
inibito

A: incubazione aerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

### 12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di *Pseudomonas* Selective Broth disidratato viene testato per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo della diluizione fino all'estinzione, inoculando 1 mL di opportune diluizioni decimali degli organismi target nelle provette, incubando a 42°C per 24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita nel lotto di riferimento ( $G_{RB}$ ) e nel lotto di prova ( $G_{rTB}$ ). La produttività è testata con i seguenti ceppi target: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 14207, *P. aeruginosa* ATCC 9027. L'indice di produttività  $G_{RB}-G_{rTB}$  per ciascun ceppo di prova deve essere  $\leq 1$ .

La selettività è testata con i seguenti ceppi non target: *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 18804. Dopo incubazione a 42°C per 24 ore, la crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

### 13 – LIMITI DEL METODO

- Utilizzando un agar selettivo contenente cetrimide è stata segnalata l'inibizione di alcuni ceppi di *P. aeruginosa*.<sup>6</sup>
- Occasionalmente alcuni microrganismi enterici (ad es. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*), *Alkaligenes* e *Aeromonas* mostrano una crescita con un leggero ingiallimento del terreno; tuttavia, questa colorazione è facilmente distinguibile da una leggera produzione di fluoresceina poiché questo ingiallimento non produce fluorescenza.<sup>5</sup>
- Esistono ceppi non pigmentati di *P. aeruginosa* che crescono sul terreno ma non producono il tipico colore verde-blu o giallo-verde.
- Alcuni non fermentanti e alcuni sporigeni aerobi, su questo terreno possono mostrare una pigmentazione da marrone chiaro a marrone solubile in acqua. Alcuni ceppi di *Serratia* possono presentare una pigmentazione rosa.<sup>5</sup>
- Gli studi di Lowbury e Collins<sup>3</sup> hanno mostrato che *P. aeruginosa* può perdere la sua fluorescenza sotto la luce UV se le colture vengono lasciate a temperatura ambiente per un breve periodo. Tuttavia, la fluorescenza riappare quando le provette vengono nuovamente incubate.
- Alcuni ceppi mucoidi di *P. aeruginosa* hanno una reazione ossidasi positiva ritardata e pertanto possono richiedere ulteriori test di conferma.
- Si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati da coltura pura per una completa identificazione.

### 14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- I terreni disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. 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.
- Applicare le Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura preparati.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area 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.

### 15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

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).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

### 16 - BIBLIOGRAFIA

- King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* 1954; 44:301-7.
- Lowbury EJ. Improved culture methods for the detection of *Pseudomonas pyocyanea*. *J Clin Pathol* 1951; 4:66-72
- 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.
- Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (MSDA). Chapitre 56, Microbiologie. Juillet 2000.
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore : Williams & Wilkins ; 1985.
- Hoibi N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas*. In Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015



**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

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

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2023

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

