

**ISTRUZIONI PER L'USO****PSEUDOMONAS SELECTIVE AGAR**

Terreno di coltura pronto all'uso in flacone

*Pseudomonas aeruginosa* su
Pseudomonas Selective Agar:**1- DESTINAZIONE D'USO**Diagnostico *in vitro*. Per l'isolamento selettivo e l'identificazione presuntiva di *Pseudomonas aeruginosa* in campioni clinici e non clinici.**2 - COMPOSIZIONE - 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.

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.¹ La maggior parte delle specie sono ossidasi positive (tranne *P. luteola* e *P. oryzihabitans*) e catalasi positive.¹

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 opportunisto 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.²

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.² Alcune specie di *Pseudomonas* possono inoltre produrre altri tipi di siderofori, come piocianina (blu), piorubina (rossa) o piomelanina (marrone) in *P. aeruginosa* e tioquinolobactina in *P. fluorescens*.³

King, Ward e Raney⁴ 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 Selective Agar è preparato in accordo alla formulazione del terreno di King 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 Lowburry⁵ ed in seguito diminuita allo 0,03% da Lowbury e Collins⁶ nel 1955.

Pseudomonas Selective Agar corrisponde al terreno denominato Cetrimide Agar del metodo armonizzato EP, USP, JP⁷ ed è conforme alle specifiche qualitative ivi riportate. Il terreno è indicato dalla norma ISO 22717⁸ e da FDA-BAM⁹ per la determinazione di *P. aeruginosa* nei cosmetici. Il peptone di gelatina fornisce gli elementi per la crescita microbica ed è, secondo quanto riportato da King e coll.⁴ e da Goto ed Enomoto¹⁰, un componente critico per la produzione di pigmenti. Il cetiltrimetilammonio bromuro (cetrimide), funge da detergente cationico riducendo la tensione superficiale nel punto di contatto e ha effetti precipitanti, complessanti e denaturanti sulle proteine della membrana batterica, provocando il rilascio di azoto e fosforo dalla cellula ed ha, di conseguenza, attività battericida contro un'ampia gamma di organismi Gram-positivi ed alcuni organismi Gram-negativi diversi da *P. aeruginosa*. Il magnesio cloruro ed il potassio solfato stimolano la produzione di piocianina e di piovverina; il glicerolo è presente nel terreno come fonte di carbonio per la crescita microbica e come stimolante della produzione di piocianina.¹¹ L'identificazione presuntiva di *P. aeruginosa* è ottenuta sulla base della produzione di pigmenti e delle conseguenti caratteristiche cromatiche delle colonie.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sciogliere il contenuto del flacone in un'autoclave a 100 ± 2°C o in un bagnomaria termoregolato a 100°C. In alternativa, il flacone può essere posto in un recipiente contenente acqua, che viene posta su una piastra riscaldante e portata ad ebollizione; allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento. Raffreddare il terreno a 47-50°C distribuire in piastre di Petri sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5- CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno
pH finale a 25 °C

terreno giallo chiaro, opalescente
7,2 ± 0,2

7 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Pseudomonas Selective Agar	Terreno pronto all'uso in flacone	5119632	6 x 100 mL; 6 flaconi di vetro con tappo a vite in scatola di cartone

8 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria o piastra riscaldante, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, anse, aghi, tamponi sterili da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.





9 - 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 saprofiti (es. secrezioni respiratorie, tessuti danneggiati, orecchio, occhio, urine ecc).¹² Quando possibile, raccogliere i campioni prima dell'inizio della terapia antimicrobica ed applicare le buone pratiche di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici. I campioni non clinici analizzati con Pseudomonas Selective Agar includono prodotti farmaceutici non sterili e cosmetici. Fare riferimento alla bibliografia citata per la raccolta e la preparazione dei campioni.⁷⁻⁹

10 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente; la superficie dell'agar deve essere liscia e umida, ma senza eccessiva umidità. Inoculare con il materiale strisciando con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate assicurandosi che la semina sul quarto quadrante non si sovrapponga a quella del primo. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su una area ristretta in prossimità del bordo piastra quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa.

Incubare in aerobiosi, a 35-37°C registrare i risultati dopo 18-24 ore. Se non si osservano colonie tipiche, incubare nuovamente per 24-36 ore (72 ore in totale). Per le colture di pazienti affetti da fibrosi cistica si raccomanda di incubare le piastre a 35-37°C per 5 giorni poiché alcuni ceppi responsabili di infezioni croniche crescono molto lentamente.¹²

Per la determinazione di *P.aeruginosa* nei prodotti farmaceutici non sterili seguire le indicazioni della Farmacopea Europea⁷, qui riassunte.

- 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.

Per la determinazione di *P.aeruginosa* nei cosmetici consultare la bibliografia citata.^{8,9}

11 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

La presenza di qualsiasi tipo di crescita deve essere interpretata 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 alla luce normale.

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

La formazione di piovverdina (fluoresceina) 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 piovverdina 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.

12 - 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, 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 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

Il controllo di qualità del terreno utilizzato per il rilevamento di *P.aeruginosa* nei prodotti farmaceutici e nei cosmetici deve soddisfare i requisiti di EP⁷ e della norma ISO⁸
A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

13 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di flaconi pronti all'uso e della materia prima impiegata per la produzione, terreno in polvere Pseudomonas Selective Agar (Test Batch: TB), vengono testati per la produttività e la selettività avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento (RB).

La produttività è saggiata con metodo quantitativo con il ceppo target *P.aeruginosa* ATCC 9027. Le piastre di Pseudomonas Selective Agar del lotto in esame (TB) e del lotto di riferimento (RB), sono seminate con appropriate diluizioni in soluzione salina di una sospensione di colonie del ceppo target. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, vengono contate le colonie sviluppate sui due lotti e calcolato l'indice di produttività ($Pr = UFC_{TB} / UFC_{RB}$). Nel caso Pr sia superiore o uguale a 0,7 e nel caso la morfologia delle colonie sia tipica (colonie verdi), i risultati sono giudicati conformi.

Inoltre la produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo con i ceppi target *P.aeruginosa* ATCC 14207 e *P.aeruginosa* ATCC 10299. Dopo incubazione, le colonie appaiono con morfologia e cromie tipiche (colonie mucoidi verdi) e le cariche sono comparabili nei due lotti.

Per valutare la selettività vengono seminate con metodo Miles Misra modificato, appropriate diluizioni di sospensioni con densità pari a McFarland 0,5 dei ceppi non target *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923 e *P.mirabilis* ATCC 10005, *A.calcoaceticus* ATCC 19606. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, *A.calcoaceticus*, *E.coli* e *S.aureus* risultano completamente inibiti mentre la crescita di *P.mirabilis* risulta parzialmente inibita.

14 - LIMITI DEL METODO

- La ceftrimide può essere inibitoria anche per alcuni ceppi di *P.aeruginosa*.¹²
- Un singolo terreno di coltura è raramente adeguato per rilevare nei campioni tutti gli organismi di potenziale significato clinico. Per un recupero ottimale di *P.aeruginosa*, soprattutto nei pazienti con fibrosi cistica, si consiglia di utilizzare in aggiunta a Pseudomonas Selective Agar, altri terreni selettivi e non selettivi come Mac Conkey Agar, agar sangue ed agar cioccolato.¹²





- La completa produzione di pigmenti da parte di *P.aeruginosa* non è ottenibile con l'impiego di un unico terreno di coltura.⁴
- 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.^{4,10}
- Esistono ceppi non pigmentati di *P. aeruginosa* che si sviluppano sul terreno ma non producono la tipica colorazione verde-blu o verde giallo.
- Alcuni non-fermentanti e sporigeni aerobi possono mostrare un pigmento solubile da color tannino a marrone ed alcuni ceppi di *Serratia* possono coltivare con colonie rosa.¹¹
- Lowbury e Collins⁶ hanno riportato che *P.aeruginosa* può perdere la fluorescenza osservabile sotto i raggi UV se le culture vengono lasciate a temperatura ambiente per un breve periodo. La fluorescenza riappare quando le piastre sono re-incubate.
- *P. aeruginosa* è ossidasi positiva e comunque alcuni ceppi di *P. aeruginosa*, in particolare quelli mucoidi, presentano una reazione ritardata dell'ossidasi e pertanto possono richiedere ulteriori test per confermare l'identificazione.
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura 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 di altri test diagnostici.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in flacone qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo 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 con le precauzioni d'uso 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 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- Fare attenzione quando si aprono i flaconi con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire sufficientemente a lungo per sciogliere l'intero terreno.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la procedura di liquefazione del terreno. Non mettere i flaconi caldi a contatto con il ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento poiché ciò potrebbe causare rotture del vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno può variare considerevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume del flacone.
- Il prodotto qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre e/o le provette non utilizzate e le piastre e/o le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, 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.
- 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

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare i flaconi oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, i flaconi possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. I flaconi aperti devono essere utilizzati immediatamente per la preparazione di piastre e/o provette. Non utilizzare i flaconi se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, torbidità anomala, colore alterato, presenza di precipitato).

L'utilizzatore è responsabile della correttezza della preparazione delle piastre. L'utilizzatore è responsabile della validazione della shelf life delle piastre preparate, in funzione del metodo di stoccaggio applicato (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. Lowbury EJ. Improved culture methods for the detection of *Pseudomonas pyocyanea* *J Clin Pathol* 1951; 4:66-72
6. 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.
7. European Pharmacopoeia, current edition
8. ISO 21717:2015. Cosmetics — Microbiology — Detection of *Pseudomonas aeruginosa*.
9. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual BAM Chapter 23: Methods for Cosmetics. Content current as of:10/31/2017
10. 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 (1): 65.
11. MacFaddin, Jean F. (1985). Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
12. 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	 LOT Numero di lotto	 IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Non riutilizzare	 Fragile maneggiare con cura

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del layout e del contenuto in accordo a IVDR 2017/746	09/2021
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

