



PSEUDOMONAS AGAR F

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso



Da sinistra: *P. aeruginosa* e *B. cepacea*
su Pseudomonas Agar F

1 – DESTINAZIONE D'USO

Pseudomonas Agar F (King B Medium) è utilizzato per la differenziazione di *Pseudomonas aeruginosa* in base alla capacità di produrre fluoresceina.

2 – COMPOSIZIONE

PSEUDOMONAS AGAR F, TERRENO DISIDRATATO

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Triptone	10,00 g
Peptone	10,00 g
Potassio fosfato bibasico	1,50 g
Magnesio solfato	1,50 g
Agar	15,00 g

PSEUDOMONAS AGAR F, PIASTRE PRONTE ALL'USO

FORMULA TIPICA

Pseudomonas Agar F	38 g
Glicerolo	10 mL
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

Pseudomonas spp. sono bastoncini Gram-negativi aerobi, non sporigeni, diritti o leggermente ricurvi, di 0,5 - 1,0 per 1,5 - 5,0 µm; hanno un metabolismo respiratorio aerobico molto stretto con l'ossigeno, ma in alcuni casi il nitrato può essere utilizzato come alternativa che consente la crescita anaerobica.¹ Di solito sono mobili con uno o più flagelli polari. *Pseudomonas* spp. sono catalasi positivi e la maggior parte delle specie di interesse clinico sono ossidasi positive (tranne *P. luteola* e *P. oryzihabitans*).¹

P. aeruginosa è ampiamente distribuita nelle acque superficiali, reflue e marine, sul suolo, sulla vegetazione e in tutti gli ambienti umidi; inoltre è in grado di crescere nell'acqua distillata, di sopravvivere nei disinfettanti, nei cosmetici e di contaminare gli alimenti. *P. aeruginosa* è considerata un patogeno opportunista soprattutto nei pazienti immunocompromessi ed è caratterizzata da multiresistenza agli antibiotici, rappresentando quindi un rischio per la salute negli ambienti ospedalieri. *P. aeruginosa* può causare polmonite associata a ventilazione meccanica, infezioni del tratto urinario, ustioni e infezioni di ferite, ulcere corneali e cheratite, setticemia, gastroenterite nei neonati, ascessi e meningite.²

Altre caratteristiche che possono essere associate alle specie *P. aeruginosa* (con alcune eccezioni) includono la secrezione di piovverdina (fluoresceina), un sideroforo giallo-verde fluorescente, in condizioni di carenza di ferro.² Anche altri tipi di siderofori, come piocianina (blu) piourubina (rosso) o piomelanina (marrone) possono essere prodotti da *P. aeruginosa* e tiocinobactina da *P. fluorescens*.³

King, Ward e Raney⁴ nel 1954 descrissero due terreni per il rilevamento del pigmento in *P. aeruginosa*: terreno A che aumenta la produzione di piocianina e terreno B che aumenta la produzione di fluoresceina.

Pseudomonas Agar F, noto anche come King's Medium B o Flo Agar, è una modifica della formula descritta da King, Ward e Raney⁴, è conforme alla formulazione raccomandata da ISO 16266⁵ e da FDA-BAM⁶ ed è utilizzato per il test di produzione di fluoresceina per la differenziazione di *P. aeruginosa*.

Il fosfato di potassio ha un effetto stimolante sulla produzione di fluoresceina e un effetto inibitorio sulla piocianina; i peptoni di carne e caseina in pari quantità contribuiscono alla produzione ottimale di fluoresceina, attivata dalla presenza di cationi Mg di solfato di magnesio; il glicerolo, aggiunto al terreno di base, è una fonte di carbonio per la crescita e la produzione del pigmento.⁷

Una *Pseudomonas* produttore di fluoresceina crescerà con colonie giallo-verdi, fluorescenti sotto la lampada di Wood.

Pseudomonas Agar F, in combinazione con Pseudomonas Agar P, consente di eseguire il test fenotipico convenzionale per la differenziazione di *P. aeruginosa* da altre specie del genere *Pseudomonas*, isolate da campioni clinici.⁸

Lo Standard ISO 16266⁵ raccomanda la produzione di fluoresceina su Pseudomonas Agar F (+) come test di conferma delle colonie di *P. aeruginosa* isolate dall'acqua, unitamente al test dell'ossidasi (+) e alla capacità di produrre ammoniaca in Acetamide Broth (+).

FDA-BAM⁶ 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 all'utilizzo di arginina deidrolasi (+), citrato e malonato (+), riduzione dei nitrati (+), motilità (+) e crescita a 42°C (+).

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 38 g in 1000 mL di acqua fredda purificata e aggiungere 10 mL di glicerolo (REF 421015). Riscaldare fino all'ebollizione mescolando costantemente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e distribuire in piastre Petri sterili. Pseudomonas Agar F può anche essere distribuito in provette e lasciato solidificare in posizione inclinata con una breve inclinazione.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, bianca
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	biancastro, opalescente
pH finale (20-25 °C)	7,2 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Pseudomonas Agar F	Terreno in polvere	4019612	500 g (13.2 L)
Pseudomonas Agar F	Piastre pronte all'uso	541961	2 x 10 plates ø 90 mm

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari per l'identificazione delle colonie, glicerolo (REF 421015).





8 – CAMPIONI

Il campione è costituito da colture pure di batteri. L'isolato deve essere sottoposto a colorazione di Gram ed esaminato per confermare che la morfologia sia attribuibile a *Pseudomonas*.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Inoculare una piastra o una provetta con una singola colonia prelevata dal terreno di isolamento primario, strisciare sulla superficie del terreno una singola striscia; Se si utilizzano le provette a becco di clarino, non toccare il fondo della provetta.

Incubare le piastre o le provette, con i tappi allentati, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18-24 ore. Se l'isolato non cresce o cresce lentamente, incubare nuovamente a $25-30^\circ\text{C}$ per 1-2 giorni e osservare la crescita e la produzione di pigmento.

ISO 16266: incubare le piastre in aerobiosi a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per un massimo di 5 giorni, esaminando le colture quotidianamente.⁵

FDA-BAM raccomanda una temperatura di incubazione a 25°C per almeno 3 giorni.⁶

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le specifiche caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie isolate.

Esaminare quotidianamente la crescita sotto la lampada di Wood: registrare come positiva qualsiasi fluorescenza.

11 – 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. È comunque facoltà 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.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 14207	$36 \pm 2^\circ\text{C}$ / 18-24H / A	giallo-verdastro, fluorescente sotto la lampada di wood
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	$36 \pm 2^\circ\text{C}$ / 18-24H / A	incolore, nessuna fluorescenza

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di *Pseudomonas* Agar F disidratato e pronto all'uso viene testato per le caratteristiche prestazionali confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

Le colonie pure coltivate su Tryptic Soy Agar di 4 ceppi di *Pseudomonas* e di un ceppo di *E. coli* vengono inoculate strisciando sulla superficie del terreno su piastra: *P. aeruginosa* ATCC 10145, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *B. cepacia* ATCC 25416, *E. coli* ATCC 8739. Dopo l'incubazione a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore in aerobiosi, si osserva e si registra la produzione di fluorescenza sotto la lampada di Wood. Tutti i ceppi di *P. aeruginosa* mostrano una produzione di fluorescenza mentre *B. cepacia* ed *E. coli* crescono con colonie bianche e non fluorescenti.

13 – LIMITI DEL METODO

- La presenza di colonie incolore non esclude completamente la presenza di *P. aeruginosa*.⁷
- Ceppi mucoidi di *P. aeruginosa* possono subire diversi cambiamenti fenotipici inclusa la perdita di produzione di pigmenti.⁸
- Occasionalmente si ritrovano ceppi di *Pseudomonas* che producono piccole quantità di pocianina che, normalmente, dovrebbe essere inibita sul terreno: in questo caso il colore delle colonie tende più al verde.⁷
- Pseudomonas* Agar F non deve utilizzato come terreno di isolamento, ma solo come terreno differenziale.
- Le colonie microbiche 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.

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 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.
- 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.
- 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.
- 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****Terreno disidratato**

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). Secondo la norma ISO 16266, il terreno in provetta preparato dall'utente può essere conservato a +2°C/+8°C al buio fino a 3 mesi.³

Piastre pronte

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).

16 - BIBLIOGRAFIA

- Public Health England- Identification of Pseudomonas species and other Non-Glucose Fermenters. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 17 Issue 3, 2015
- 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
- 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
- King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J Lab Clin Med 1954;44:301-7.
- ISO 16266:2006 - Water quality — Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa — Method by membrane filtration
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Microbiological Methods for cosmetics. Updated 07/2017
- MacFaddin, Jean F. (1985). Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- 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	Monouso	Fabbricante	Lato superiore	Proteggere dall'umidità
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 4	Aggiornamento capitoli 1, 14, 15	05/2022
Revisione 5	Aggiornamento capitoli 2, 6, 12, 14, 15	03/2023

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

