



PHENOL RED AGAR BASE

Terreno di coltura in polvere

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno di base che favorisce la differenziazione tra generi e specie di batteri grazie alla loro capacità di fermentare (degradare) carboidrati specifici.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)*

Peptocomplex	11,000 g
Sodium chloride	5,000 g
Phenol red	0,025 g
Agar	15,000 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Phenol Red Agar Base, preparato secondo una modifica della formula proposta da Vera¹ nel 1950, viene utilizzato per la differenziazione tra generi e specie di batteri, per la loro capacità di fermentare (degradare) carboidrati specifici incorporati nel terreno². Il terreno di base contiene un peptone a basso contenuto di carboidrati che è fonte di azoto, carbonio e minerali per la crescita batterica; il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico; il rosso fenolo è un indicatore di pH: quando si prepara Phenol Red Agar con una concentrazione finale di 0,5-1 % di carboidrati, la maggior parte dei prodotti finali della sua fermentazione sono acidi organici, che producono un viraggio di colore dell'indicatore di pH dal rosso al giallo; se durante la reazione di fermentazione si produce gas, questo è indicato dalla spaccatura o dalla formazione di bolle nell'agar. Se il test è negativo si verificherà un attacco catabolico dei peptoni con formazione di ammoniaca, alcalinizzazione del terreno e viraggio del colore del rosso fenolo da rosso-arancio a rosa rossastro.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 31 g in 1000 mL di acqua purificata fredda e aggiungere il carboidrato scelto alla concentrazione finale di 0,5-1% (5-10 g/L). Portare ad ebollizione per sciogliere completamente il terreno, dispensare in provette adatte. Sterilizzare in autoclave a 118°C per 15 minuti. In alternativa aggiungere alla base autoclavata e raffreddata una soluzione di carboidrati sterilizzata con filtro in modo da ottenere una concentrazione finale dello 0,5-1% (vedi anche limitazioni del metodo).

5 - CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, rosata
Aspetto del terreno in soluzione	rosso-arancio, limpido
pH finale a 20-25 °C	7,4 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Phenol Red Agar Base	Terreno in polvere	4019102	500 g (16,1L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, tamponi sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, provette, beute Erlenmeyer, carboidrati, terreni di coltura ausiliari e reagenti per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

Phenol Red Agar Base non è destinato all'isolamento primario da campioni clinici; viene inoculato con microrganismi provenienti da coltura di 18-24 h su terreni solidi come Tryptic Soy Agar o agar sangue.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Con un inoculo pesante, inoculare Phenol Red Agar con coltura pura, utilizzando un'ansa da inoculo o un tampone. Strisciare sulla superficie dell'agar e inserire il tampone fino a pochi mm dal fondo della provetta. Inoculare anche una provetta priva di carboidrati. Incubare le provette con i tappi allentati, in aerobiosi o anaerobiosi a seconda del o dei microrganismi sospetti a 35-37°C per 18-48 ore. Potrebbe essere necessaria un'incubazione prolungata, fino a 30 giorni, per considerare un risultato negativo.²

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione osservare la presenza di crescita e il cambiamento di colore del terreno.

Reazione positiva (degradazione dei carboidrati): il terreno diventa giallo e si può osservare la formazione di bolle di gas.

Reazione negativa: il terreno resta di colore rosa rossastro.

Nessuna colorazione gialla dovrebbe verificarsi nella provetta di controllo.

Dopo che è stata osservata una reazione positiva, eliminare la provetta; prolungando l'incubazione si può osservare un'inversione della reazione.

11 - 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 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>E. coli</i> ATCC 25922	35-37° C / 18-24H / AE	AG
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	35-37° C / 18-24H / AE	AG
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 14207	35-37° C / 18-24H / AE	K

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection; A: produzione di acido, colore giallo; G: produzione di gas; K: alcalinità, colore rosso-rosa



**12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI**

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Phenol Red Agar Base disidratato addizionato con glucosio, lattosio e saccarosio 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 *E.coli* ATCC 25922, *S.Typhimurium* ATCC 14028, *C.freundii* ATCC 8090, *P.aeruginosa* ATCC 14207, *E.faecalis* ATCC 19433 vengono inoculate nelle provette. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore in aerobiosi, si osserva e si registra il cambiamento di colore del terreno. Tutti i ceppi mostrano caratteristiche prestazionali secondo le specifiche di entrambi i lotti.

13 - LIMITI DEL METODO

- I "Carboidrati" sono chiamati comunemente "zuccheri". Tuttavia, il test può essere eseguito con "zuccheri veri" i cui nomi terminano con "osio" (lattosio, glucosio, saccarosio ecc.) o con alcoli, i cui nomi terminano con "olo" (dulcitol, mannitolo) Esistono poche eccezioni come lo zucchero salicina (glicoside).
- La concentrazione di carboidrati nel terreno di base è solitamente dell'1% (eccezione salicina e dulcitol: 0,5%). La concentrazione dell'1% riduce la possibilità di re-inversione alcalina delle reazioni positive²
- Alcuni carboidrati possono resistere alla sterilizzazione in autoclave a 116-118°C per 15 minuti con poca o nessuna scomposizione. L'autoclave non è consigliabile per: arabinosio, lattosio, maltosio, salicina, saccarosio, trealosio, xilosio.
- Il terreno dopo la sterilizzazione in autoclave a caldo si presenta di colore arancio chiaro che cambierà in un colore rosso-arancione dopo il raffreddamento.
- L'aggiunta di alcuni carboidrati al mezzo può causare una diminuzione del pH. Se ciò si verifica, aggiungere NaOH 0,1N goccia a goccia fino al pH desiderato.
- Anche l'osservazione di una singola bolla rende il test positivo per la produzione di gas (CO₂ e H₂) da parte dei ceppi aerogeni.
- Si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa su isolati da coltura pura per l'identificazione completa.

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.
- Applicare le regole della Buona Pratica di Laboratorio nel processo di preparazione dei terreni.
- 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

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

- Vera HD. Relation of peptones and other culture media ingredients to accuracy of fermentation tests. Am.J.PublicHealth 1950; 40:1267-1272..
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	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	12/2019
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2022

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

