

## PHENOL RED BROTH BASE

Terreno di coltura in polvere



Phenol Red Broth w/ lactose: da sinistra provetta non inoculata, *E.coli* (lac +), *S.Enteritidis* (lac -)

### 1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno per la differenziazione di genere e di specie dei batteri, sulla base della loro capacità di fermentare specifici carboidrati, addizionati al terreno di base.

### 2 - COMPOSIZIONE

#### FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)\*

Peptone	10,000 g
Estratto di carne	3,000 g
Sodio cloruro	5,000 g
Rosso fenolo	0,018 g

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

### 3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Phenol Red Broth Base, preparato secondo una modificazione della formula proposta da Vera<sup>1</sup> nel 1950, è impiegato per la differenziazione di genere e di specie dei batteri, sulla base della loro capacità di fermentare specifici carboidrati<sup>2</sup>. Phenol Red Broth addizionato, in provette separate, di 5 g/L di dulcitolio, 10 g/L di saccarosio e 10 g/L di lattosio, è indicato da FDA-BAM<sup>3</sup> tra i test per l'identificazione di *Salmonella*.

Il terreno di base contiene un peptone povero in carboidrati e l'estratto di carne che sono fonte di azoto, carbonio e minerali per la crescita batterica; il sodio cloruro contribuisce all'equilibrio osmotico del terreno; il rosso fenolo è un indicatore di pH: quando il carboidrato, addizionato al terreno di base alla concentrazione del 0,5-1%, è degradato con formazione di acidi dal microorganismo in esame, il rosso fenolo vira al giallo; in caso di test negativo, vi sarà un attacco catabolico dei peptoni con la formazione di ioni ammonio ed il conseguente viraggio dell'indicatore verso il rosso-rosa dovuto all'ambiente alcalino. Il terreno di base, senza aggiunta di carboidrati ed inoculato con i ceppi in esame, è impiegato come controllo negativo del test di fermentazione.

### 4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 18 g in 1000 mL di acqua purificata fredda ed aggiungere il carboidrato prescelto alla concentrazione finale del 0,5-1%. Scaldare fino a completa soluzione e distribuire in provetta, se necessario munite di un tubo Durham invertito, in ragione di 3-4 mL. Autoclavare a 118°C per 15 minuti. In alternativa, al terreno di base autoclavato e raffreddato, aggiungere una soluzione sterilizzata per filtrazione del carboidrato in modo che la concentrazione finale risulti del 0,5-1%.

### 5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, rosata.
Aspetto del terreno in soluzione ed in provetta	rosso aranciato, limpido.
pH (20-25°C)	7,4 ± 0,2

### 6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Phenol Red Broth Base	Terreno di coltura in polvere	4019102	500 g (27,8 L)

### 7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette, flaconi o beute autoclavabili, tubi Durham, anse da microbiologia, terreni di coltura accessori e carboidrati.

### 8 - CAMPIONI

Il campione è costituito da colture di batteri isolati da campioni diversi, purificate su appropriato terreno (es. Tryptic Soy Agar o Agar Sangue).

### 9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Con un'ansa o un tampone, caricati con la coltura in esame, inoculare pesantemente il terreno nelle provette con la serie di carboidrati prescelti per il test; inoculare anche una provetta priva di carboidrati.

Incubare, con i tappi allentati, in aerobiosi o in anaerobiosi in funzione del microorganismo in esame, a 35-37°C ed eseguire le letture dopo 18-24 ore e 48 ore. Potrebbe essere necessaria un'incubazione prolungata, fino a 30 giorni prima di considerare il risultato come negativo.<sup>2</sup>

### 10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Osservare la presenza di crescita (torbidità) ed il viraggio del colore del terreno.

Reazione positiva (degradazione del carboidrato): il terreno vira al giallo e si può osservare la formazione di bollicine di gas.

Reazione negativa: il terreno si presenta torbido di colore rosso-rosa.

Provetta di controllo senza carboidrati: il terreno si presenta di colore rosso-rosa.

Dopo che si è osservata una reazione positiva scartare la provetta; prolungando infatti il periodo di incubazione si può assistere ad un'inversione della reazione con viraggio dell'indicatore verso l'alcalinità.



### 11 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del terreno 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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T	GLUCOSIO
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37-37° / 18-24H / A	AG
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	37-37° / 18-24H / A	AG
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 14207	37-37° / 18-24H / A	K

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection; A: reazione acida, colore giallo; G: produzione di gas; K: reazione alcalina, colore rosso-rosa.

### 12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita un campione rappresentativo di tutti i lotti di terreno disidratato Phenol Red Broth Base addizionato, in provette separate, di glucosio, lattosio, mannosio e saccarosio è testato per le caratteristiche prestazionali confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

Culture 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 sono inoculate pesantemente nelle provette. Dopo incubazione in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore, si osserva e si registra il viraggio di colore del terreno. Tutti i ceppi mostrano caratteristiche di crescita in accordo alle specifiche.

### 13 - LIMITI DEL METODO

- Il termine "carboidrato" è generico; il test può essere eseguito con "veri zuccheri" i cui nomi terminano con *osio* (lattosio, glucosio, saccarosio ecc.) o con alcoli, i cui nomi terminano con *olo* (dulcitolio, mannitolo). A questa semplice regola vi sono alcune eccezioni come ad esempio salicina che appartiene alla classe dei glicosidi.
- La concentrazione d'impiego dei carboidrati indicata nel metodo sopra riportato è del 5-10%. Di norma si utilizza la concentrazione del 1% poiché riduce la possibilità di re-inversione alcalina delle reazioni positive.<sup>2</sup> Per la salicina<sup>2</sup>, così come per il dulcitolio<sup>3</sup>, si raccomanda la concentrazione del 5%.
- Alcuni carboidrati possono sopportare la sterilizzazione in autoclave a 116-118°C per 15 minuti con una degradazione minima o nulla. La sterilizzazione in autoclave non è consigliabile per i seguenti zuccheri: arabinosio, lattosio, maltosio, salicina, saccarosio, trealosio, xilosio.<sup>2</sup>
- Il terreno dopo autoclavatura, a caldo appare di colore aranciato; dopo raffreddamento assume una colorazione rosso-arancio.
- L'aggiunta di certi carboidrati al terreno può provocare una diminuzione del pH che deve essere ricorretto con NaOH 0,1N, goccia dopo goccia.
- Secondo MacFaddin<sup>2</sup> il tubo Durham invertito, nell'esame delle *Enterobacteriaceae*, si rende necessario solo per il terreno addizionato di glucosio. Se il ceppo in esame produce gas dal glucosio, produrrà gas anche da tutti gli altri carboidrati degradati.
- Anche l'osservazione di una singola bollicina rende il test positivo per la produzione di gas (CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>) da parte dei ceppi aerogenici.
- Sottoporre le colture 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 (provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).



**16 - BIBLIOGRAFIA**

1. Vera HD. Relation of peptones and other culture media ingredients to accuracy of fermentation tests. Am.J.PublicHealth 1950; 40:1267-1272..
2. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
3. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev 12/2019

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

 <b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b> Numero di catalogo	 <b>LOT</b> 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 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2020
Revisione 6	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.

