



## VIOLET RED BILE AGAR (VRBL)

Terreno di coltura in polvere e terreno pronto all'uso

### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la rilevazione e il conteggio di batteri coliformi in alimenti, mangimi e campioni ambientali.

### 2 – COMPOSIZIONE<sup>A</sup>

FORMULA TIPICA (DOPO RICOSTITUZIONE CON 1 L DI ACQUA)

TERRENO DISIDRATATO, PIASTRE, FLACONI E PROVETTE PRONTE ALL'USO

Peptone	7,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sali biliari n°3	1,5 g
Lattosio	10,0 g
Rosso neutro	30,0 mg
Cristal violetto	2,0 mg
Agar	15,0 g

<sup>A</sup> Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I coliformi sono un gruppo di batteri strettamente correlati, per lo più innocui, che vivono nel suolo, nell'acqua e nell'intestino degli animali. Il conteggio dei coliformi è un indicatore di qualità dell'igiene e una presenza elevata di coliformi indica generalmente condizioni insalubri o scarse pratiche igieniche durante o dopo la produzione di alimenti.

Il Violet Red Bile Agar, progettato per il conteggio dei batteri del gruppo coli-aerogenes, è derivato dalla formula originale di MacConkey<sup>1</sup>. Il Violet Red Bile Agar è noto anche come Violet Red Bile Lactose (VRBL) Agar o Crystal Violet Neutral Red Bile Lactose Agar.

Il VRBL Agar è raccomandato dalla norma ISO 4832<sup>2</sup> per la rilevazione e il conteggio dei batteri coliformi, quando si prevede che il numero di colonie ricercate sia superiore a 100 per millilitro o per grammo del campione in esame e dalla FDA BAM per il conteggio dei coliformi su terreno solido.

Nel VRBL Agar, i fattori di crescita essenziali sono forniti dal peptone e dagli estratti di lievito, fonti di azoto, carbonio, vitamine e minerali; il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Il terreno di coltura si basa sull'uso di componenti inibitori selettivi come il cristal violetto e i sali biliari, che sopprimono la crescita dei batteri Gram-positivi, e sul sistema di indicatori lattosio e rosso neutro.<sup>3</sup> Gli organismi che attaccano rapidamente il lattosio producono colonie viola spesso circondate da aloni viola. I non fermentanti e i fermentanti tardivi di lattosio presentano colonie pallide o incolore. Alcuni batteri Gram-negativi diversi dalle *Enterobacteriaceae* possono crescere ma possono essere limitati dalla presenza degli altri microbi.

### 4A – INDICAZIONI PER IL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 41,5 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione, agitando frequentemente per dissolverlo completamente. Non sterilizzare in autoclave e non surriscaldare. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili.

### 4B – INDICAZIONI PER FLACONI E PROVETTE PRONTE ALL'USO

Liquefare il contenuto del flacone in un'autoclave a 100 ± 2°C o in un bagno d'acqua a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone può essere inserito in un recipiente contenente acqua, che viene posto su una piastra calda e portato a ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento per consentire lo scambio di pressione. Raffreddare a 47-50°C e versare il terreno di coltura in piastre Petri sterili in condizioni asettiche.

### 5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	grigio-viola, fine granulometria omogenea
Aspetto della soluzione e del terreno pronto	viola, limpido
pH (20-25 °C)	7,4 ± 0,2

### 6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Violet Red Bile Agar (VRBL)	Terreno in polvere	4021852	500 g (12 L)
		4021854	5 Kg (120 L)
Violet Red Bile Agar	Piatte pronte all'uso	542185	2 x 10 piastre ø 90 mm
Violet Red Bile Agar	Provette pronte all'uso	557777	20 x 15 mL
Violet Red Bile Agar	Flaconi pronti all'uso	5121852	6 x 100 mL
		5121853	6 x 200 mL

### 7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

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

### 8 – CAMPIONI

Materiali di importanza sanitaria come prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali, campioni ambientali nell'area della produzione e della manipolazione degli alimenti. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.<sup>2</sup>

### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

1. Preparare il campione da testare, la sospensione iniziale (diluizione primaria) e le ulteriori diluizioni in conformità alla specifica norma internazionale per il prodotto in questione.





2. Con una pipetta sterile, trasferire al centro di due piastre Petri 1 mL del campione se il prodotto è liquido, o 1 mL della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti. Ripetere la procedura descritta con ulteriori diluizioni.
3. Versare circa 15 mL di VRBL Agar in ciascuna piastra Petri.
4. Mescolare accuratamente l'inoculo con il terreno di coltura e lasciare che il terreno si solidifichi, con le piastre Petri disposte su una superficie orizzontale. Se necessario, aggiungere uno strato di copertura di circa 5 mL-10 mL di VRBL Agar per prevenire la crescita eccessiva dei microbi e ottenere condizioni semi-anaerobiche. Lasciare solidificare.
5. Capovolgere le piastre preparate e incubarle a 30°C o 37°C per 24 ore ± 2 ore.

#### 10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

Le colonie di coliformi tipiche sono di colore rosa, rosso o viola (con o senza aloni di precipitazione).

Contare le colonie nelle piastre di Petri che presentano un numero di colonie compreso tra 10 e 150.

Eseguire i test di conferma in conformità allo standard internazionale specifico per il prodotto in questione.

#### 11 – CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Tutti i lotti di prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore finale 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 elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	30°C/24H-A	buona crescita, colonie rosa-rosso con alone rosso
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	30°C/24H/A	colonie incolore
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	30°C/24H-A	inibito

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

#### 12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di VRBL Agar disidratato e pronto all'uso viene testato per verificarne la produttività, la specificità e la selettività, confrontando i risultati con il Tryptic Soy Agar.

La produttività viene testata con un metodo quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922 ed *E. coli* ATCC 8738. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 30°C per 24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i terreni e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr:  $UFC_{VRBL}/UFC_{TSA}$ ). Se Pr è  $\geq 0,5$  e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie rosa-rosso con alone rosso), i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

Inoltre, le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con *E. aerogenes* ATCC 13048. Dopo l'incubazione, il ceppo target mostra una buona crescita con colonie di colore rosa-rosso.

La specificità viene valutata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con il ceppo non target *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo l'incubazione, *P. aeruginosa* mostra una buona crescita con colonie incolore.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con gocce di opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di *E. faecalis* ATCC 19433, partendo da un 0,5 McFarland. La crescita del ceppo non target è totalmente inibita.

#### 13 – LIMITI DEL METODO

- Occasionalmente gli enterococchi crescono su questo terreno; tuttavia, le colonie sono puntiformi. In caso di dubbio, eseguire una colorazione di Gram e un test della catalasi (cocchi Gram-positivi, catalasi-negativi).<sup>4</sup>
- Il terreno non è completamente specifico per i batteri enterici; altri batteri possono dare le stesse reazioni. Per un'identificazione positiva sono necessari ulteriori test biochimici.<sup>4</sup>
- La selettività del terreno diminuisce dopo 24 giorni di incubazione e gli organismi precedentemente inibiti possono crescere.<sup>4</sup>
- Si possono osservare colonie di colore dubbio sul terreno, in particolare quando si esaminano prodotti lattiero-caseari contenenti zuccheri diversi dal lattosio; in questo caso, la conversione di questi zuccheri può dare origine a colonie dall'aspetto simile a quello dei coliformi tipici.<sup>2</sup>

#### 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 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 norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Prestare attenzione all'apertura dei 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 a sufficienza per sciogliere tutto il terreno di coltura.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la liquefazione del terreno in flacone. Non mettere le beute calde in un bagno di ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento, poiché ciò potrebbe causare crepe nel vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno in flacone può variare notevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume della bottiglia.
- Una volta liquefatto, il terreno in flacone non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- 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.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi microbici





- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni 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

#### Piastre pronte all'uso

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).

#### Flaconi pronti all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni i flaconi sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. I flaconi estratti dal confezionamento secondario possono essere utilizzati sino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere usati immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare i flaconi con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

#### Terreno di coltura in polvere

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'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre/flaconi/provette) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e imballaggio). Secondo la norma ISO 4832, le piastre preparate devono essere utilizzati entro 4 ore dalla loro preparazione.<sup>2</sup>

### 16- BIBLIOGRAFIA

1. MacConkey A. Lactose fermenting bacteria in faeces. J Hyg 1905; 5:333-379
2. ISO 4832-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique.
3. Baird RM, Corry JEL, Curtis GDW. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology. Proceedings of the 4th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Manchester 4-5 September, 1986. Int J Food Microbiol 1987; 5:282-284.
4. 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	Fabbricante	Utilizzare entro	Proteggere dall'umidità	Fragile, maneggiare con cura
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Lato superiore	Proteggere dalla luce	Monouso

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	03/2023

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

