

VIOLET RED BILE AGAR MUG

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

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

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Peptone	7,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Sali biliari n° 3	1,5 g
Lattosio	10,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Rosso neutro	0,03 g
Violetto cristallo	0,002 g
4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG)	0,10 g
Agar	15,0 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

La presenza di *E. coli* negli alimenti o nelle acque indica una recente contaminazione fecale e la possibile presenza di agenti patogeni, mentre i coliformi sono utilizzati come indicatore delle condizioni igienico-sanitarie dell'ambiente di lavorazione degli alimenti.

Il Violet Red Bile (VRBL) Agar, progettato per il conteggio dei batteri del gruppo coli-aerogenes, è derivato dalla formula originale di MacConkey¹. Trepeta ed Edberg² che hanno modificato il classico MacConkey Agar incorporando il composto fluorogenico 4-metilumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG), per la rapida rilevazione di *E. coli*, secondo gli studi preliminari di Dahlen e Linde³ e di Kilian e Bulow⁴.

Il VRBL Agar integrato con MUG è raccomandato dalla FDA-BAM⁵ per il conteggio di coliformi ed *E.coli* negli alimenti, con la tecnica della semina in inclusione.

Nel VRBL Agar MUG, i fattori di crescita essenziali sono forniti da peptone ed 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 dei componenti inibitori selettivi cristalvioletto e sali biliari, che inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi, e del sistema indicatore lattosio e rosso neutro.⁶ 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. La presenza di MUG consente di contare le colonie di *E. coli* distinguendole da quelle tipiche dei coliformi. Il MUG viene scisso dalla β -D-glucuronidasi prodotta da *E. coli* in 4-metilumbelliferone e glucuronide; il 4-metilumbelliferone fluorogenico può essere rilevato direttamente utilizzando una luce ultravioletta a onde lunghe.

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

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

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, verde-viola
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	viola, limpido
pH finale (20-25 °C)	7,4 \pm 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Violet Red Bile Agar MUG	Terreno di coltura in polvere	4021862	500 g (12 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre di Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari, lampada di Wood.

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 di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.⁵

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI, LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Preparare il campione, la sospensione iniziale (diluizione primaria) e le ulteriori diluizioni in conformità alla norma internazionale specifica per il prodotto in questione.
- Con una pipetta sterile, trasferire al centro di due piastre Petri 1 mL del campione di prova se il prodotto è liquido, o 1 mL della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti. Ripetere la procedura descritta con le ulteriori diluizioni.
- Versare circa 15 mL di VRBL Agar MUG in ciascuna piastra Petri.
- Mescolare accuratamente l'inoculo con il terreno di coltura e lasciare che il terreno si solidifichi, con le piastre Petri in piedi su una superficie orizzontale fresca. Se necessario, aggiungere uno strato di copertura di circa 5-10 mL di VRBL Agar MUG per prevenire la crescita diffusa e ottenere condizioni semi-anaerobiche. Lasciare solidificare
- Capovolgere le piastre preparate e incubarle a 35°C per 24 ore \pm 2 ore.

10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI





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

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

Le colonie tipiche di *E. coli* sono di colore da rosa a rosso o viola, con aloni di precipitazione e presentano una fluorescenza bluastra alla luce ultravioletta a onde lunghe (lampada di Wood).

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

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utilizzatore finale può 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	35°C/24H-A	buona crescita, colonie rosa-rosso con alone rosso, fluorescenti sotto la lampada di Wood
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	35°C/24H/A	buona crescita, colonie rosa-rosso, non fluorescenti sotto la lampada di Wood
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	35°C/24H-A	inibito

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

12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di VRBL Agar MUG disidratato viene sottoposto a test di produttività, specificità e selettività confrontando i risultati con 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 35°C per 24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i terreni e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr:UFC_{VRBL-MUG}/UFC_{TSA}). Se Pr è ≥ 0,5 e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie rosa-rosso con alone rosso, fluorescenti alla lampada di Wood), 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 rosa-rosso senza fluorescenza sotto la lampada di Wood.

La specificità è valutata mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i ceppi non target *P.aeruginosa* ATCC 27853. Dopo l'incubazione, *P.aeruginosa* mostra una buona crescita con colonie incolori.

La selettività viene valutata con il metodo semiquantitativo modificato Miles-Misra, inoculando la superficie delle piastre con una goccia di diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di *E. faecalis* ATCC 19433 da 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 (cocci Gram-positivi, catalasi-negativi).⁷
- Il terreno non è completamente specifico per gli enterici; altri batteri di accompagnamento possono dare le stesse reazioni. Per un'identificazione positiva sono necessari ulteriori test biochimici.⁷
- La selettività del terreno diminuisce dopo 24 ore di incubazione e gli organismi precedentemente inibiti possono crescere.⁷
- Ci si possono aspettare 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.⁸
- È stato riportato che circa il 40% delle specie di *Shigella*, vari bio-serotipi di *Salmonella* (13% di *Salmonella* sottogenere I) possono essere positivi alla β-glucuronidasi e fluorescenti alla lampada di Wood; solo eccezionalmente questo test è positivo con ceppi di *Providencia*, *Enterobacter* e *Yersinia* (1-5%).⁹
- Circa il 3-4% degli *E. coli* è negativo alla β-glucuronidasi, in particolare i ceppi di *E. coli* O157.⁹
- È stato riportato che fino al 10% degli isolati di *E. coli* fermentano il lattosio lentamente o sono lattosio non fermentanti.¹⁰

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 norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi 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

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 autonomamente e della validazione della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre, provette, flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo la norma ISO 4832, il terreno seminato con la tecnica della semina per inclusione deve essere utilizzato entro 4 ore dalla sua preparazione.⁸

16 - Bibliografia

1. MacConkey A. Lactose fermenting bacteria in faeces. J Hyg 1905; 5:333-379
2. Trepeta RW, Edberg SC. Methylumbelliferyl- D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of E. coli. J Clin Microbiol 1984; 19 :172.
3. Dahlén G, Linde A. Screening plate method for detection of bacterial beta-glucuronidase. Appl Microbiol 1973;26 (6): 863-6
4. Killian M, Bulow P. 1976. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol Microbiol Scand Sec B 1976; 84:245-251.
5. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria Rev 10/2020
6. 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.
7. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
8. ISO 4832-1:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique
9. Robison, B.J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of Escherichia coli in foods. Appl. Environ. Microbiol. 48:285-288
10. Gokul Yaratha, MD, Sarah Perloff, DO, Kinesh Changala, MBBS. Lactose vs non-lactose fermenting E. coli: Epidemiology, Clinical Outcomes, and Resistance. Open Forum Infect Dis 2017; V4 (Suppl 1)

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

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

