

VIOLET RED BILE GLUCOSE AGAR (VRBGA) EP

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la determinazione dei batteri Gram negativi bile tolleranti nei prodotti farmaceutici

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Idrolisato pancreatico di gelatina	7,00 g
Estratto di lievito	3,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Sali biliari n. 3	1,50 g
Glucosio	10,00 g
Rosso neutro	0,03 g
Violetto cristallo	0,002 g
Agar	15,00 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il Violet Red Bile Glucose Agar è stato ideato da Mossel¹ per il conteggio delle *Enterobacteriaceae*, aggiungendo glucosio al Violet Red Bile Lactose Agar. I lavori successivi di Mossel *et al.*^{2,3} hanno dimostrato che il lattosio poteva essere omesso, dando vita alla formulazione nota come VRBG.

Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar EP soddisfa i requisiti della Farmacopea Europea⁴ ed è raccomandato per i test di presenza/assenza e per il conteggio di batteri Gram-negativi tolleranti alla bile in prodotti farmaceutici non sterili.

Il digest pancreatico della gelatina fornisce carbonio, azoto e oligoelementi per la crescita batterica; il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Gli agenti selettivi del terreno sono il cristal-violetto e i sali biliari n° 3, che inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi. La dissimilazione del glucosio provoca l'acidificazione del terreno, con conseguente precipitazione dei sali biliari e assorbimento del rosso neutro. Le *Enterobacteriaceae* crescono con colonie di colore da rosso-rosa a rosso-violetto, spesso circondate da una zona di precipitazione rossa. I batteri non fermentanti il glucosio (ad esempio *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* ecc.) presentano colonie trasparenti e incolori.

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 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar EP	Terreno in polvere	4021892	500 g (12 L)
Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar EP	Piastre pronte all'uso	542189	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.

8 – CAMPIONI

Prodotti farmaceutici non sterili. Consultare il riferimento appropriato per la raccolta, la conservazione e la preparazione dei campioni.⁴

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

Preparare la sospensione del campione in Tryptic Soy Broth utilizzando almeno 1 g o 1 mL di campione.

Incubare questa sospensione a 20°C / 25°C per 2-5 ore per garantire la riattivazione ma non la moltiplicazione dei batteri.

a- Test di assenza

Inoculare una quantità della sospensione iniziale in Enterobacteriaceae Enrichment Broth Mossel EP (REF 401467) per garantire un inoculo di 1 g di campione e incubare a 30°C / 35°C per 24-48 ore.

Sottocoltivare su piastre di VRBG Agar EP e incubare a 30°C / 35°C per 18-24 ore.

b- Test quantitativo

Inoculare quantità adeguate di Enterobacteriaceae Enrichment Broth Mossel EP (REF 401467) con la sospensione iniziale e/o la diluizione del campione contenente rispettivamente 1 g, 0,1 g, 0,01 g e 0,001 g del prodotto da esaminare.

Incubare a 30°C / 35°C per 24-48 ore.

Sottocoltivare ciascuna coltura su una piastra di VRBG Agar EP (REF 402189) e incubare a 30°C / 35°C per 18-24 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 delle *Enterobacteriaceae* sono di colore rosa, rosso o viola (con o senza aloni di precipitazione).

Le colonie tipiche dei Gram-negativi glucosio non fermentanti sono trasparenti e incolori.

Test di assenza: secondo la Farmacopea Europea, il prodotto è conforme al test se non vi è crescita di colonie su piastre VRBG Agar EP.



Test quantitativo: fare riferimento alla Farmacopea Europea per i criteri di interpretazione del numero probabile di batteri per g o mL di prodotto.

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 8739	30-35°C/18-24H-A	buona crescita, colonie rosa-rosse con alone rosso
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	30-35°C/18-24H-A	buona crescita, colonie incolori
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	30-35°C/18-24H-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 VRBG Agar EP disidratato e pronto all'uso viene sottoposto a test di produttività e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con metodo quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 8739, *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *P. aeruginosa* ATCC 9027. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 30-35°C per 18 ore. Le colonie vengono contate sul lotto di prova (TB) e sul lotto di riferimento (RB) e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: UFC_{TB}/UFC_{RB}). Se Pr è $\geq 0,7$ e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

Inoltre, le caratteristiche di produttività sono testate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con il ceppo target *Y. enterocolitica* ATCC 23715. Dopo l'incubazione, vengono valutate la quantità di crescita e le caratteristiche delle colonie: il ceppo target mostra una buona crescita con colonie di colore rosa-rosso.

La selettività viene valutata con il metodo della goccia superficiale di Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland di *S. aureus* ATCC 6538 e di *E. faecalis* ATCC 19433. I ceppi non target sono totalmente inibiti.

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).⁵
- Il terreno non è completamente specifico per gli enterici; altri batteri possono dare le stesse reazioni. Per un'identificazione positiva sono necessari ulteriori test biochimici.⁵
- La selettività del terreno diminuisce dopo 24 ore di incubazione e gli organismi precedentemente inibiti possono crescere.⁵

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 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.
- 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'area 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.
- 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).

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'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

Secondo la norma ISO 21528-1, le piastre preparate in laboratorio da inoculare in superficie possono essere conservate a +2 °C - +8 °C al buio e protette dall'evaporazione per un massimo di 2 settimane.⁶

16 - Bibliografia

1. Mossel DAA, Mengerink WH, Scholts HH. Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae. J Bacteriol. 1962 Aug;84(2):381.
2. Mossel DAA, Eelderink I, Koopmans M, Van Rossem F. Lab Practice 1978; 27:1049.
3. Mossel DAA, Eelderink I, Koopmans M, Van Rossem F. Influence of Carbon Source, Bile Salts and Incubation Temperature on Recovery of Enterobacteriaceae from Foods Using MacConkey-type Agars. J Food Prot 1979 Jun;42(6):470-475.
4. European Pharmacopoeia 11th Edition, 2022, Vol. 1; 2.6.13 Microbiological Examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms: 01/2021:20631.
5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
6. ISO 21528-1:2017 Microbiology of the food chain —Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 1: Detection of Enterobacteriaceae.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	 Monouso
 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 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

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

