

VIOLET RED BILE GLUCOSE AGAR

Terreno di coltura in polvere terreni pronti all'uso

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la rilevazione e il conteggio di *Enterobacteriaceae* in alimenti, mangimi e campioni ambientali.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

TERRENO IN POLVERE E PRONTI ALL'USO

| | |
|---------------------|---------|
| Peptone | 7,0 g |
| Estratto di lievito | 3,0 g |
| Sali biliari n° 3 | 1,5 g |
| Glucosio | 10,0 g |
| Sodio cloruro | 5,0 g |
| Rosso neutro | 0,03 g |
| Violetto cristallo | 0,002 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

Le *Enterobacteriaceae* sono solitamente considerate dai produttori di alimenti come indicatori di igiene e quindi utilizzate per monitorare l'efficacia delle misure preventive adottate. Ciò si ritrova anche in diversi standard o criteri nazionali e internazionali in cui le *Enterobacteriaceae* sono incluse come indicatori di igiene.

Il Violet Red Bile Glucose (VRBG) 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 Agar. Il Violet Red Bile Glucose Agar è raccomandato dalla norma ISO 21528-1⁴ per la rilevazione e il conteggio, con una fase di pre-aricchimento e con la tecnica MPN, delle *Enterobacteriaceae*, quando si prevede che i microrganismi ricercati necessitano di essere rinvigoriti e quando il numero ricercato è inferiore a 100 per millilitro o per grammo di campione.

È raccomandato dalla norma ISO 21528-2⁵ per il conteggio delle *Enterobacteriaceae* con la tecnica della semina in piastra per inclusione, quando si prevede che il numero di colonie ricercate sia superiore a 100 per millilitro o per grammo del campione in esame.

Il peptone fornisce i fattori di crescita essenziali per la crescita batterica; l'estratto di lievito è una fonte di complesso di vitamine B per la stimolazione della crescita; il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. Il terreno di coltura si basa sull'uso dei componenti inibitori selettivi cristal-violetto e sali biliari, che sopprimono la crescita dei batteri Gram-positivi, e del sistema indicatore glucosio e rosso neutro. 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 circondate da una zona di precipitazione rossa. I batteri non fermentanti il glucosio (ad esempio, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* ecc.) presentano colonie trasparenti e incolore. Alcuni batteri Gram-negativi diversi dalle *Enterobacteriaceae* possono crescere ma possono essere limitati.

4A – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE (TERRENO DISIDRATATO)

Sospendere 41,5 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. 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.

4B – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE (TERRENO PRONTO ALL'USO IN PROVETTE O FLACONI)

Sciogliere il contenuto del flacone/provetta in un'autoclave a 100 ± 2°C o in un bagnetto a temperatura controllata (100°C). In alternativa, il flacone o la provetta possono essere posti in un contenitore riempito con acqua che viene posto su una piastra calda e portato ad ebollizione. Allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento per consentire lo scambio di pressione. Raffreddare a 47-50°C e versare il terreno in piastre Petri sterili in condizioni asettiche.

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 | Terreno in polvere | 4021882 | 500 g (12 L) |
| | | 4021884 | 5 Kg (120 L) |
| Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar | Piastre pronte all'uso | 542188 | 2 x 10 plates ø 90 mm |
| Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar | Provette pronte all'uso | 552188 | 20 x 15 mL |
| Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar | Flaconi pronti all'uso | 5121882 | 6 x 100 mL |
| | | 5121883 | 6 x 200 mL |

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

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. Consultare i riferimenti appropriati per la raccolta, la conservazione e la preparazione dei campioni.^{4,5}





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

Rilevazione di *Enterobacteriaceae* dopo il pre-arricchimento.⁴

Inoculare le piastre di agar VRBG con un'ansa di ciascuna delle colture ottenute dopo l'arricchimento in Buffered Peptone Water.

Incubare le piastre a 37 ± 1 °C per 24 ore \pm 2 ore.

Conteggio delle *Enterobacteriaceae* tramite semina in piastra per inclusione.⁵

1. Con una pipetta sterile, trasferire nella piastra Petri 1 mL del campione in esame se il prodotto è liquido, o 1 mL della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti.
2. Ripetere la procedura descritta con le ulteriori diluizioni.
3. Aggiungere in ogni piastra Petri circa 15 mL di VRBG Agar.
4. 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.
5. Dopo la completa solidificazione della miscela, aggiungere uno strato di copertura di circa 5 mL-10 mL di VRBG Agar per prevenire la crescita diffusa e ottenere condizioni semi-anaerobiche. Lasciare solidificare.
6. Capovolgere le piastre preparate e incubarle a 37 ± 1 °C per 24 ore \pm 2 ore.
7. Contare le colonie nelle piastre Petri con meno di 150 colonie.

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).

Selezionare colonie ben isolate da ciascuna delle piastre incubate per i test di conferma biochimica: reazione di ossidasi (-) e fermentazione del glucosio (+).

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 | 37°C/24H-A | Buona crescita, colonie rosa-rosse con alone rosso |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 19433 | 37°C/24H-A | Inibito |

12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

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

La produttività viene testata con un metodo quantitativo con i ceppi target *E. coli* ATCC 25922 e *S. Typhimurium* ATCC 14028. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 37°C per 24 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i terreni e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: UFC_{VRBG}/UFC_{TSA}). Se Pr \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 *Y. enterocolitica* ATCC 23715. Dopo l'incubazione, il ceppo target mostra una buona crescita con colonie rosso-violacee.

La selettività viene valutata con il metodo modificato semiquantitativo Miles-Misra, inoculando la superficie delle piastre con gocce di opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland di *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 19433. La crescita dei ceppi 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).⁶
- 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.⁶
- La selettività del terreno diminuisce dopo 24 ore di incubazione e gli organismi precedentemente inibiti possono crescere.⁶

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; 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.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi 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. 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 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.
- Le provette ed i flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.





- Evitare la contaminazione dell'ambiente di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi 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).

Provette e 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'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 auto-preparate da inoculare in superficie possono essere conservate a +2 °C - +8 °C al buio e protette dall'evaporazione per un massimo di 2 settimane.⁴ Secondo la norma ISO 21528-2 il terreno per la tecnica della semina delle piastre per inclusione deve essere utilizzato entro 4 ore dalla sua preparazione.⁵

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. ISO 21528-1:2017 Microbiology of the food chain —Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 1: Detection of Enterobacteriaceae.
5. ISO 21528-2:2017 Microbiology of the food chain —Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae —Part 2: Colony-count technique.
6. 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 | 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 7 | Aggiornamento del contenuto e del Layout | 04/2023 |

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

