

BRILLIANT GREEN BILE BROTH 2%

Terreno di coltura in polvere e provette pronte all'uso



Brilliant Green Bile Broth 2% da sinistra: *E.coli*,
K.pneumoniae, *Salmonella* spp.

1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per il test di conferma dei coliformi negli alimenti.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

Sali biliari (oxgall)	20,0 g
Lattosio	10,0 g
Peptone	10,0 g
Verde brillante	13,3 mg

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

3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Brilliant Green Bile Broth 2% è una modifica del terreno liquido di MacConkey, formulato da Dunham e Schoenlein¹ nel 1926 per ottenere il massimo recupero dei batteri del gruppo coli-aerogenes, inibendo la maggior parte degli organismi Gram-positivi.²

Brilliant Green Bile Broth 2% è raccomandato da ISO 4831, ISO 4832, FDA-BAM per il test di conferma dei batteri coliformi negli alimenti e da APHA per il test di conferma nelle acque.³⁻⁶

Il peptone fornisce azoto, carbonio e minerali per la crescita microbica; il lattosio è un carboidrato fermentabile. Il verde brillante inibisce gli organismi Gram-positivi e alcuni batteri Gram-negativi diversi dai coliformi, mentre la miscela di sali biliari (oxgall), fornisce un ulteriore effetto soppressivo sugli organismi Gram-positivi; il verde brillante ed i sali biliari sopprimono anche la crescita dei batteri anaerobi che fermentano il lattosio e che potrebbero dare falsi positive. I coliformi, resistenti agli effetti inibitori sia del verde brillante che della bile bovina, a 30 °C o 37 °C provocano la fermentazione del lattosio con produzione di gas.

4-PREPARAZIONE

Sospendere 40 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Scaldare fino a completo scioglimento, mescolare bene e distribuire 10 mL in provette contenenti un tubo Durham capovolto. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare il brodo il più velocemente possibile. Con inoculi superiori a 1 mL per 10 mL di terreno, utilizzare un terreno a concentrazione multipla e sterilizzare a 100°C per 30 minuti.

5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere
Aspetto del terreno in provetta
pH (20-25°C)

Fine granulometria omogenea, grigio-verde
blu-verde, limpido.
7,2 ± 0,2

6-MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Brilliant Green Bile Broth 2%	Terreno di coltura in polvere	4012652	500 g (12,5 L)
		4012654	5 kg (125 L)
Brilliant Green Bile Broth 2%	Provette pronte all'uso	551265	20 x 10 mL con tubo di Durham

7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette, flaconi, beute autoclavabili, anse da microbiologia, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8-CAMPIONI

Campioni di alimenti e di acque. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

9-PROCEDURA DELL'ANALISI

Per la conferma dei batteri coliformi enumerati con la tecnica del numero più probabile (MPN)³ procedere come segue.

Da ciascuna delle provette incubate di Lauryl Pepto Bios Broth a concentrazione singola e doppia (REF 401580) inoculare con un'ansa una provetta di Brilliant Green Bile Broth 2% ed incubare a 30°C o 37°C per 24 ore ± 2 ore oppure, se non si osserva la formazione di gas, per 48 ± 2 h.

Per la conferma dei batteri coliformi enumerati con la tecnica del conteggio delle colonie⁴ procedere come segue.

Inoculare cinque colonie sospette di ciascun tipo coltivate su Violet Red Bile Lactose Agar (REF 402185), in provette di Brilliant Green Bile Broth 2%. Incubare le provette a 30°C o 37°C per 24 h ± 2 h.

10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

In presenza di crescita batterica, il terreno diventa torbido e di colore verde-giallastro; la formazione di gas può essere osservata accumulando di bolle nei tubi Durham.





Considerare come coliformi le colonie o la crescita in terreni liquidi che mostrano la formazione di gas nel tubo Durham delle provette di Brilliant Green Bile Broth incubate a 30 o 37°C per 24-48 ore.

11-CONTROLLO QUALITA' DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto 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 / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	30°C/24 H/A	buona crescita con produzione di gas
<i>E. coli</i> ATCC 8739	30°C/24 H/A	buona crescita con produzione di gas
<i>C. freundii</i> ATCC 43864	30°C/24 H/A	buona crescita con produzione di gas
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	30°C/24 H/A	crescita parzialmente inibita, senza produzione di gas

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

12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Brilliant Green Bile Broth 2% in polvere e pronto all'uso in provetta, viene testato per produttività, specificità e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo delle diluizioni ad estinzione: il terreno in provetta è inoculato con 1 mL delle appropriate diluizioni decimali dei ceppi target ed incubato a 35-37°C per 16-24 ore. Viene registrata la diluizione più alta che mostra la crescita e la produzione di gas nel lotto di riferimento (GrRB) e nel lotto in esame (GrTB).

La produttività è testata con i seguenti ceppi target: *E. coli* ATCC 25925, *E. coli* ATCC 8739, *C. freundii* ATCC 43864, *E. aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae* ATCC 13048. L'indice di produttività $Gr_{RB}-Gr_{TB}$ per ciascun ceppo è ≤ 1 e si osserva sviluppo gas nei tubi Durham.

La specificità viene testata con diluizioni appropriate del ceppo non-target *S. Typhimurium* ATCC 14028. Dopo l'incubazione il ceppo mostra una buona crescita senza produzione di gas.

La selettività è testata con diluizioni appropriate dei ceppi non target *S. aureus* ATCC 25923 ed *E. faecalis* ATCC 19433. Dopo incubazione delle provette inoculate la crescita di *S. aureus* è totalmente abitata mentre la crescita di *E. faecalis* è parzialmente inibita.

13-PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è destinato ai 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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.
- Prestare attenzione quando si aprono le provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Le provette sono monouso; non trasferire o suddividere il contenuto del tubo in altri contenitori.
- Le provette pronte per l'uso sono soggette a sterilizzazione finale in autoclave.
- 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 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.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno disidratato

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). Secondo Baird RM et al. le provette preparate autonomamente possono essere conservate a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ in contenitori con tappo a vite per un massimo di quattro settimane.²

Provette pronte all'uso

Conservare le provette nella loro confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. Se correttamente conservate, le provette possono essere utilizzate fino alla data di scadenza. Non utilizzare le provette oltre questa data. Le provette estratte dal confezionamento secondario possono essere utilizzate sino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere utilizzate





immediatamente. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare provette con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, colore atipico).

15- BIBLIOGRAFIA

1. Dunham HG, Schoenlein HW. Brilliant Green bile media. Stain Technol. 1926; 1:129-134
2. 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; 206-207.
3. ISO 4831:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique
4. ISO 4832:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique
5. FDA-BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Content current as of:10/09/2020
6. APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd ed. 2017.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF or 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> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Lato superiore	 Proteggere dalla luce	 Monouso

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2022

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

