

**ISTRUZIONI PER L'USO**

## MRVP MEDIUM

### Terreno di coltura in polvere



#### 1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno per la differenziazione batterica sulla base dei test rosso metile (MR) e Voges Proskauer (VP).

#### 2 - COMPOSIZIONE

##### FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA)\*

Peptocomplex	7 g
Glucosio	5 g
Tampone fosfato	5 g

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

MRVP Medium:

in alto reazione MR (*E.coli* +, *E.aerogenes* -)

in basso reazione Voges Proskauer (*E.coli* -, *E.aerogenes* +)

Nelle due fotografie la prima provetta non è inoculata

#### 3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Voges e Proskauer<sup>1</sup> nel 1898 e Clark e Lubs<sup>2</sup> nel 1915 furono i batteriologi che, per primi, osservarono che il gas prodotto durante la fermentazione degli zuccheri era una miscela di CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> ed evidenziarono la reazione di colore rosso prodotta in appropriati terreni di coltura, dopo il trattamento con idrossido di potassio. Clark e Lubs ottimizzarono il brodo di coltura proponendo una formulazione con 0,5% di peptone, 0,5% di glucosio e 0,5% di K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, che è la base del terreno MRVP utilizzato tutt'oggi.

Entrambi i test, rosso metile e Voges-Proskauer, sono storicamente usati insieme ai test della produzione di indolo e dell'utilizzo del citrato (gruppo di test noti come IMViC) per la differenziazione delle *Enterobacteriaceae*, ma ora sono anche impiegati per caratterizzare altri gruppi di batteri tra cui *Actinobacteria*.<sup>3</sup>

Il terreno è raccomandato FDA BAM<sup>4</sup> per i test MR e VP nelle procedure d'identificazione di *Salmonella*.

Il test del rosso metile determina la capacità dei batteri di degradare il glucosio attraverso la fermentazione acido mista, con produzione di significative quantità di acido lattico, succinico, acetico, formico; questi metaboliti rimangono stabili durante il periodo di incubazione, superando il sistema tampone del terreno ed abbassando il pH a valori inferiori a 4,4. Questa acidità è visualizzata aggiungendo al terreno un indicatore di pH, il rosso metile, che si presenta giallo a pH superiori a 5,1 e rosso a valori di pH di 4,4 o inferiori.<sup>3</sup>

Il test Voges-Proskauer determina la capacità dei batteri di degradare il glucosio attraverso la fermentazione 2-3 butandiolica. Il piruvato che si forma per glicolisi nella via Embden-Meyerhof, con la fermentazione 2-3 butandiolica, è trasformato in α-acetolattato, poi in acetoina ed infine in butandiolo. In presenza di ossigeno e di alcali, quali il potassio idrossido, l'acetoina è ossidata a diacetile che reagisce con i gruppi guanidinici dell'arginina contenuta nei peptoni, dando luogo ad un composto di colore rosso; α-naftolo e la creatina sono catalizzatori ed intensificatori della reazione cromatica. Per gli enterobatteri fermentanti il lattosio vi è, quasi sempre, una correlazione negativa tra test MR e test VP: *Escherichia coli* è MR positivo e VP negativo, *Enterobacter aerogenes* è MR negativo e VP positivo.

#### 4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 17 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Scaldare leggermente fino a completa soluzione, distribuire 5 mL in provette con tappo a vite ed autoclavare a 121°C per 15 minuti.

#### 5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, beige

Aspetto del terreno in soluzione

beige, limpido

pH (20-25°C)

6,9 ± 0,2

#### 6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
MRVP Medium	Terreno di coltura in polvere	4017352	500 g (29,4 L)

#### 7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, beute e provette con tappo a vite autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti accessori per l'esecuzione dei test MR e VP e per l'identificazione completa delle colonie.



**8 - CAMPIONI**

Il campione è costituito da colture pure di batteri isolati da campioni clinici o altri materiali.

**9 - PROCEDURA DELL'ANALISI**

Inoculare con una carica batterica leggera il terreno in provetta con una coltura pura di 18-24 ore del ceppo in esame.

Incubare in aerobiosi per un minimo di 48 ore e fino a 5 giorni a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Per il rapido test VP, con inoculo pesante, è possibile incubare a  $35^\circ\text{C}$  a bagnomaria per 4 ore.<sup>6</sup>

**10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Dopo l'incubazione, è necessario preparare delle aliquote del brodo MRVP Medium sulle quali eseguire i due test.

**1-Test rosso metile (MR)**

Con le precauzioni dell'asepsi rimuovere un'aliquota da 2,5 mL ed aggiungere 5 gocce di Reattivo Rosso Metile

Test positivo: colore rosso sulla superficie del terreno

Test negativo: colore giallo sulla superficie del terreno

In caso di reazione ritardata, indicata dallo sviluppo di una colorazione arancio, ripetere il test alla fine dei 5 giorni di incubazione.<sup>6</sup>

**2- Test Voges-Proskauer (VP)**

Con le precauzioni dell'asepsi rimuovere un'aliquota da 2,5 mL per il metodo di Barrit<sup>7</sup>, oppure 1 mL per il metodo di O'Meara<sup>8</sup>, oppure 0,2 mL per il metodo rapido di Barry e Feeney<sup>9</sup>.

2A – Metodo di Barrit: a 2,5 mL di MRVP Medium aggiungere 0,6 mL di reattivo A di Barrit A e 0,2 mL di reattivo B di Barrit; mescolare bene dopo ciascuna aggiunta di reattivo per aerare la coltura. Eseguire la lettura dopo 10-15 minuti.

Test positivo: colore rosso rosato sulla superficie del brodo.

Test negativo: colore giallo sulla superficie del brodo; lo sviluppo di un colore ramato è indice di test negativo.

2B – Metodo di O'Meara: 2B - a 1 mL di terreno MRVP incubato a  $35^\circ\text{C}$  per 4 ore in un bagnomaria, aggiungere 1 mL di reagente O'Meara. Agitare delicatamente la provetta da 30 secondi a 1 minuto per esporre il mezzo all'ossigeno al fine di ossidare l'acetoina.

Test positivo: colore rosso rosato sulla superficie del brodo.

Test negativo: colore giallo sulla superficie del brodo; lo sviluppo di un colore ramato è indice di test negativo.

2C - Test rapido di Barry e Feeney

A 0,2 mL di una brodocoltura di 4-6 ore a  $35^\circ\text{C}$  in MRVP Medium inoculato con una singola colonia da terreno selettivo, aggiungere 2 gocce di reattivo Barry e Feeney, 3 gocce di Reattivo A di Barrit e 2 gocce di Reattivo B di Barrit. Agitare le provette dopo ciascuna aggiunta di reattivo. Eseguire la lettura dopo 15 minuti

**Reattivi**

Reattivo Rosso Metile: in 300 mL di alcool etilico 95% sciogliere 0,1 g di rosso metile e portare a volume 500 mL con acqua distillata.

Reattivo A di Barrit: 5 g di  $\alpha$ -naftolo in 100 mL di alcol etilico assoluto.

Reattivo B di Barrit; soluzione di KOH 40% in acqua purificata.

Reattivo O'Meara: 40% KOH + 0,3% creatina.

Reattivo Barry e Feeney: creatina 0,3% in acqua purificata

Nella tabella sottostante adattata da Edwards e Ewing<sup>10</sup> e MacFaddin<sup>6</sup> sono indicate le risposte di alcuni enterobatteri ai test MR e VP.

Microrganismo	MR	VP
<i>Escherichia coli</i>	+	-
<i>Shigella</i>	+	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	-
<i>Salmonella</i> spp.	+	-
<i>Salmonella arizonae</i>	+	-
<i>Citrobacter</i> spp	+	-
<i>Klebsiella ozaenae</i>	+	-
<i>K.rhinoscleromatis</i>	+	-
<i>Morganella morganii</i>	+	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-
<i>Providencia</i> spp	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	V	+
<i>Hafnia alvei</i> (35°C)	V+	V
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-(35°C)
<i>Proteus mirabilis</i>	+	V-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	V+	V-

V+: variabile, di solito positivo; V-: variabile, di solito negativo; V:variabile

**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. Qui di seguito 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	33-37°C / 48H / A	MR + / VP -
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 23357	33-37°C / 48H / A	MR - / VP +

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





### 13 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di terreno in polvere MRVP Medium viene testato per le caratteristiche prestazionali, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

Colonie pure coltivate su Tryptic Soy Agar di 7 ceppi di *Enterobacteriaceae* strains sono inoculate leggermente nelle provette: *E.coli* ATCC 25922, *C.freundii* ATCC 8090, *E.cloacae* ATCC 13047, *E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *S.Typhimurium* ATCC 14028, *S.flexneri* ATCC 12022. Dopo incubazione a 35-37 °C per 48 ore in aerobiosi, vengono aggiunti alle colture i reattivi specifici per i test MR e VP ed osservati i cambiamenti di colore. Tutti i ceppi mostrano una reattività secondo le specifiche per entrambi i lotti testati.

### 13 - LIMITI DEL METODO

- I risultati dei test MR e VP devono essere utilizzati insieme ad altri test biochimici per differenziare i generi e le specie all'interno delle *Enterobacteriaceae*.
- Per il test MR ciascun laboratorio, per ottenere risultati riproducibili, dovrebbe standardizzare la densità dell'inoculo, il volume del terreno di semina, le dimensioni delle provette, il volume di terreno sul quale eseguire il test. A volte appare una reazione arancio quando si utilizza un volume troppo grande di terreno.<sup>6</sup>
- La reazione del rosso metile non può essere accelerata aumentando la concentrazione di glucosio del terreno. Eseguire la lettura non prima di 48 ore di incubazione.<sup>6</sup>
- Leggere il test VP dopo 48 ore di incubazione. Incubazioni più prolungate possono produrre condizioni acide nel brodo che interferiranno con lettura dei risultati. Solo in caso di test negativo continuare nell'incubazione.<sup>6</sup>
- Non considerare automaticamente i ceppi VP positivi come MR negativi o viceversa; pur essendo vero nella maggioranza dei casi, vi sono comunque batteri, come *Hafnia alvei* e *Proteus mirabilis* che possono essere positivi ad entrambi i test, anche se la reazione VP è spesso ritardata.<sup>6</sup>
- È importante seguire l'ordine indicato per l'aggiunta dei reattivi A e B di Barrit: prima α-naftolo, poi KOH. Se i reattivi sono invertiti si hanno reazioni deboli o falsi negativi.
- Non superare il volume di 0,2 ml di KOH 40%, poiché l'eccesso del reattivo può mascherare le reazioni deboli e dar luogo a colorazioni ramate dovute ad una reazione del KOH con α-naftolo.<sup>6</sup>
- La colorazione massima per il test VP positivo si ha dopo 1 ora dall'aggiunta dei reattivi. Superando il tempo di un'ora, i ceppi negativi possono presentare una colorazione ramata, inducendo a falsi positivi. Secondo Vaughn<sup>11</sup>, questi falsi positivi con letture oltre l'ora sono più frequenti con incubazione a 30°C piuttosto che a 35°C.
- Dopo ciascuna aggiunta dei reattivi α-naftolo e KOH, le provette del test devono essere agitate delicatamente per esporre il brodo all'ossigeno atmosferico per promuovere l'ossidazione dell'acetoina, se presente, a diacetile.<sup>6</sup>
- L'identificazione completa dei microrganismi esaminati sul terreno deve essere effettuata con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.

### 14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, 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](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.
- 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](http://www.biolifeitaliana.it).
- Comunicare a Biolife Italiana Srl ([complaint@biolifeitaliana.it](mailto:complaint@biolifeitaliana.it)) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- 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

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 (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).



**16 - BIBLIOGRAFIA**

1. Voges O, B. Proskauer B. Beitrage zur Ernaehrungsphysiologie und zur Differential Diagnose der Bakterien der hemmorrhagischen Septicamie. Z. Hyg. 1898; 28:20-32.
2. Clark WM, Lubs HA. The differentiation of bacteria of the colon-aerogenes family by the use of indicators. J Infect Dis 1915; 17:169-173.
3. McDevitt S. Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. American Society for Microbiology. 08 December 2009
4. Food and Drug Administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 5: Salmonella; 11/13/2019.
5. Palitzsch, S.. Application of methyl-red to the colorimetric estimation of hydrogen ion concentrations. Biochem. Z. 1911; 37:131-138.
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. Barritt MM. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of a-naphthol. J Pathol Bacteriol 1936; 42:441-454.
8. O'Meara RAQ. A simple delicate and rapid method of detecting the formation of acetyl-methylcarbinol by bacteria fermenting carbohydrate. J Pathol Bacteriol 1931; 34:401-406.
9. Barry L, Feeney KL. Two quick methods for Voges-Proskauer test. App Microbiol 1967; 15:1138
10. Edwards R. & Ewing V.H. (1955) - Identification of Enterobacteriaceae. Minneapolis: Burgess Publishing Company.
11. Vaughn R, Mitchell NB, Levine M. J. The Voges-Proskauer and methyl red reactions in the coli-aerogenes group. J Amer Water Works Assoc 1939; 31: 993

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

<b>REF</b> Numero di catalogo	o REF	<b>LOT</b> Numero di lotto	<b>IVD</b> Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Utilizzare entro
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Proteggere dalla luce	Proteggere dall'umidità	

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del layout	06/2020
Revisione 6	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	03/2022
Revisione 7	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

