

Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar (VRBD)

REF 0185e, 185e, 245e, 533200

Zweckbestimmung und Anwendungsbereich

VRBD-Agar (violet red bile dextrose agar, bzw. violet red bile glucose agar = VRBG) dient dem Nachweis und der Zählung von galletoleranten Gram-negativen Bakterien nach EP und USP (European und United States Pharmacopoeia) in nicht sterilen Arzneimitteln bzw. *Enterobacteriaceae* in Lebensmitteln, wie z.B. pasteurisierter Milch, Milch und Molkepulver, getrockneter Säuglingsnahrung und Folgenahrung, Eiprodukte sowie Schlachtkörpern verschiedener Tiere. Der Nährboden findet ebenfalls Verwendung beim Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Fleisch, Fleischerzeugnissen, Wurstwaren entsprechend der Vorgaben der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des LFGB.

Die Zusammensetzung des Nährbodens entspricht den Vorgaben der aktuellen European Pharmacopoeia (EP), der United States Pharmacopoeia (USP), der ISO 21528-1 und -2 sowie weitgehend dem § 64 LFGB.

Der Nährboden ist als LI-Medium in 90 mm Schalen (heipha Art.-Nr. 0185e), als Standardmedium in 90 mm Schalen (Art.-Nr. 185e), als RT-Abklatschmedium (Art.-Nr. 245e) sowie in Flaschen für das Plattengussverfahren (Art.-Nr. 533200) erhältlich.

Typische Zusammensetzung pro l

Pankreashydrolysat aus Gelatine	7 g	Neutralrot	30 mg
Hefeextrakt	3 g	Kristallviolett	2 mg
Gallensalze	1,5 g	Glucose x H ₂ O	10 g
NaCl	5 g	Agar	15 g
pH 7,6 ± 0,2			

Das Medium kann zur Erfüllung der geforderten Spezifikationen angepasst und/oder supplementiert werden

Der Nährboden ist klar und violett gefärbt.

Lagerbedingungen und Verwendungsdauer

Das Produkt ist gemäß den Angaben auf dem Etikett aufrecht zu lagern sowie vor direkter Sonneneinstrahlung, Licht und starken Temperaturschwankungen zu schützen. Kühl gelagerte Fertigmedien müssen vor dem Beimpfen auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Haltbarkeit des Produktes im ungeöffneten Zustand ist auf dem Etikett angegeben. Nach Ablauf des Verfalldatums sollte es nicht mehr verwendet werden. Nach dem Öffnen der Primärverpackung muss das Produkt umgehend eingesetzt werden.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Die Berührung sowie das Anhusten oder -niesen eines unbeimpften Nährmediums ist generell zu vermeiden, da dies zur Kontamination des Nährmediums führen kann. Nach einem solchen Vorfall ist das Nährmedium zu verwerfen und darf nicht mehr eingesetzt werden.

Nährmedien, die Inhaltsstoffe tierischen oder menschlichen Ursprungs enthalten (wie z. B. Schaf- oder Humanblut oder Fleischextrakt - siehe Zusammensetzung) sind als potentiell infektiös anzusehen. Ein Kontakt des Anwenders mit solchen Medien ist zu vermeiden. Nach direktem Kontakt mit dem Medium, wird die Desinfektion des betroffenen Hautareals empfohlen.

heipha mikrobiologische Fertigmedien sind zum einmaligen Gebrauch bestimmt.

Prinzip der Methode und Verfahrensbeschränkungen

Ein Definitionsmerkmal der *Enterobacteriaceae* ist die Säurebildung aus Glucose, welche durch Rotfärbung der Kolonien und Gallensäurepräzipitation um die Kolonien angezeigt wird. Rote Kolonien deuten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf *Enterobacteriaceae* hin.



Abbildung 1:

Kolonien von *Escherichia coli* ATCC 8739 auf VRBD-Agar (Art.-Nr. 0185e)

Inkubation: 1 Tag bei 30-35°C

Die Begleitflora wird weitgehend durch den Zusatz von Kristallviolett und Gallensalzen gehemmt. Einige Bakterien der nicht gehemmten Begleitflora können die gleiche Reaktion zeigen wie die Enterobacteriaceae, z. B. *Aeromonas spp.* und müssen ausdifferenziert werden. Auch *Yersinia*-Spezies können auf dem Nährmedium wachsen.

Zusätzlich benötigte Materialien

Übliche Laborausrüstung, Brutschrank, Desinfektionsmittel.

Beschreibung der Durchführung; Kulturbedingungen

Der Nachweis und die quantitative Bestimmung von galletoleranten Gram-negativen Bakterien in nicht-sterilen Arzneimitteln erfolgen nach den Vorgaben der aktuellen Europäischen bzw. United States Pharmacopöen.

Für den Abwesenheitstest von galletoleranten, Gram-negativen Bakterien wird entsprechend den Vorgaben der harmonisierten Fassung der EP bzw. USP die Probe in CASO-Bouillon (heipha Art.-Nr. 502090-W) homogenisiert (Verdünnung 1:10) und die Keime für 2-5 Stunden bei 20-25°C wieder belebt. Aus dem Homogenisat werden 10 ml in Mossel-Bouillon nach EP und USP (Art.-Nr. 528101) bei 30-35°C für 24-48 Stunden selektiv angereichert, anschließend auf VRBD-Agar subkultiviert und aerob für 18 bis 24 Stunden bei 30-35°C inkubiert.

Für den quantitativen Nachweis entsprechend EP und USP werden von dem oben beschriebenen Homogenisat weitere Dezimalverdünnungen in CASO-Bouillon hergestellt und diese in Mossel-Bouillon über-

führt und für 24-48 Stunden bei 30-35°C inkubiert. Nach der selektiven Anreicherung wird aus jeder angelegten Kultur ein Ausstrich auf VRBD-Agar angelegt und für 18 bis 24 Stunden bei 30-35°C inkubiert. Anhand der höchsten Verdünnungsstufe mit Wachstum bzw. der niedrigsten Verdünnungsstufe ohne Wachstum wird die ungefähre Keimzahl ermittelt.

Entsprechend der ISO 21528-1 zum Nachweis oder zur Keimzahlbestimmung mittels MPN-Verfahren von *Enterobacteriaceae* in Lebensmitteln werden die Proben nach Suspension - und weiteren Dezimalverdünnungen für das MPN-Verfahren - in gepuffertem Peptonwasser (z.B. Art.-Nr. 193r od. 5071000) vorangereichert und anschließend selektiv in Mossel-Bouillon (Art.-Nr. 2192r) angereichert. Anschließend wird auf VRBD-Agar ausgestrichen und für 22 bis 26 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur Keimzahlbestimmung von *Enterobacteriaceae* in Lebensmitteln mit der Plattengussmethode entsprechend der ISO 21528-2 wird der VRBD Agar (Art.-Nr. 533200) bei 95°C im Wasserbad für 45 Minuten verflüssigt und anschließend in einem zweiten Wasserbad auf 44 bis 47°C abgekühlt (mindestens 45 Minuten, maximal 3,25 Stunden). Je 1 ml der homogenisierten Probe und weiteren Dezimalverdünnungen werden in eine sterile Petrischale vorgelegt und nach spätestens 15 min mit 10 ml des flüssigen, auf 44 bis 47°C temperiertem VRBD-Agars überschichtet und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Nachdem der Agar erstarrt ist, werden weitere 15 ml des flüssigen VRBD-Agars zur Überschichtung gegeben. Nach Erstarren des Agars werden die Platten 22 bis 26 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die charakteristischen Kolonien sind meist rosa bis rot, mit oder ohne Präzipitathof und werden zur Bestätigung entsprechend der ISO 21528 einer weiterführenden biochemischen Differenzierung unterzogen (s. u.).

Eine Inkubationszeit von mehr als 26 Stunden verringert die Selektivität des Nährbodens.

Qualitätskontrolle

Teststämme	Inokulum / Inkubation	Wachstumseigenschaften
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10-100 KBE / 16-18 h ; 30-35°C	gutes Wachstum (Wiederfindung ≥ 50%)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10-100 KBE / 18-24 h ; 30-35°C	Rötliche Kolonien mit Präzipitathof
<i>Salmonella Thyphimurium</i> ATCC 14028	10-100 KBE / 16-18 h ; 30-35°C	gutes Wachstum (Wiederfindung ≥ 50%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10-100 KBE / 16-18 h ; 30-35°C	gutes Wachstum (Wiederfindung ≥ 50%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10-100 KBE / 18-24 h ; 30-35°C	Farblose bis rosafarbene Kolonien ohne Präzipitathof
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	104 – 105 KBE/ 22-26 h, 35-37°C	Kein Wachstum

Die hier beschriebene Qualitätskontrolle bezieht sich auf die Artikelnummern 185e und 0185e und umfasst die Vorgaben der aktuellen Pharmakopöen. Zusätzliche Testungen entsprechend der ISO 11133 sind enthalten.

Weiterführende Identifizierung

Entsprechend der EP bzw. USP werden alle gewachsenen Kolonien als positives Ergebnis gewertet.

Entsprechend der ISO 21528 bilden *Enterobacteriaceae* charakteristische rosafarbene oder rote Kolonien mit oder ohne Präzipitathof. Manche *Enterobacteriaceae* können aber auch als farblose bzw. weiße Kolonien wachsen. Die Bestätigungsreaktionen für verdächtige Kolonien sind in der ISO 21528 beschrieben.

Fleisch und Fleischerzeugnisse bzw. Wurstwaren werden nach den Vorgaben der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren 64 des LFGB untersucht. Eine weitere Ausdifferenzierung ausgehend von VRBD-Agar ist hier nicht vorgesehen.

Zur Überprüfung des oxidativen und fermentativen Glucoseabbaus der *Enterobacteriaceae* eignet sich auch das OF-Medium (Art.-Nr. 390r). Dazu sollten die verdächtigen Kolonien vorher auf einem kohlehydratfreien Nähragar (z.B. Art.-Nr. 3871e) subkultiviert werden.

Entsorgung

Bitte beachten Sie bei der Entsorgung von bewachsenen Nährmedien die jeweils gültigen gesetzlichen Vorschriften (z. B. 20 Minuten bei 121°C autoklavieren, desinfizieren, verbrennen usw.).

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB - Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln 06.00-24 (1987): Untersuchung von Lebensmitteln. Bestimmung von Enterobacteriaceae in Fleisch. Spatelverfahren (Referenzverfahren).

Amtsblatt der Europäischen Union L 338/1-26 (2005-11): Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

European Pharmacopoeia 7.0 (2011): 2.6.13 Microbial examination for non-sterile products: test for specified micro-organisms.

DIN ISO/TS 11133-2 (2004-10) : Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Anleitung für die Vorbereitung und Herstellung von Nährmedien - Teil 2: Praktische Anleitung zur Leistungsprüfung von Nährmedien

ISO 21528-1 and -2 (2004-08): Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment. - Part 2: Colony-count method.

United States Pharmacopoeia 34 NF29 (2011): <62> Microbiological examination of nonsterile products: Tests for specified microorganisms.