

ANVÄNDNINGSPROSEDURER

RAPPAPORT VASSILIADIS (RV) BROTH

Dehydrerat odlingsmedium



Rappaport Vassiliadis (RV) Broth
från vänster: icke-inokulerat rör och *S. Enteritidis*-tillväxt.

1 – AVSEDD ANVÄNDNING

In vitro-diagnostik. Flytande medium för selektiv anrikning av *Salmonella* i livsmedels-, miljö- och kliniska prover.

2 – TYPISK SAMMANSÄTTNING *

(EFTER REKONSTITUERING MED 1 LITER VATTEN)

Trypton	4,540 g
Kaliumdivätefosfat	1,450 g
Natriumklorid	7,200 g
attenfri magnesiumklorid	13,300 g
Malakitgrönt oxalat	0,036 g

* Formeln kan justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de prestandakriterier som krävs.

3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Rappaport Vassiliadis (RV) buljong bereds enligt formeln R25/37 som föreslogs av Rappaport 1956¹ och modifierades av Vassiliadis 1976², och kallas R10/43. Två viktiga modifieringar infördes i sammansättningen och användningen: den ena modifieringen bestod i att mängden malakitgrönt reducerades till en-tredjedel och den andra i att inkubationen skedde vid 43 °C istället för 37 °C.

Mellan 1977 och 1981 har RV-berikningsbuljongen i elva studier jämförts med den standardiserade Muller-Kauffmann-tetrationsbuljongen (MK-buljong) som rekommenderas som referensmetod av Internationella standardiseringsorganisationen. I alla dessa studier var RV-buljongen överlägsen MK-buljongen när det gällde isolering av *Salmonella* från naturligt kontaminerade köttprodukter, avloppsvatten och avföring från friska grisar, efterförberikning i buffrat peptonvatten.³

Rappaport Vassiliadis (RV)-buljong rapporteras av FDA BAM⁴ som en selektiv anrikningsbuljong för isolering av *Salmonella*.

ISTISAN 96/35⁵ Rapporten anger följande schema för selektiv anrikning av *Salmonella* i livsmedel:

Icke-reglerade livsmedel: Rappaport Vassiliadis (RV) (42 °C) + selenitcystinbuljong (37 °C)

Mjolk och mjölkprodukter: Muller Kauffmann (42 °C) + selenit-cystinbuljong (37 °C)

Färska ägg: Rappaport Vassiliadis (RV) (42 °C) + Muller Kauffmann (42 °C)

Blötdjur: MSRV (42 °C)

Mediet rekommenderas också som ett selektivt berikningsbuljong för *Salmonella* spp. andra än *Salmonella* Typhi i humana avföringsprover av Kist et al.⁶ och av Burkhardt⁷.

Tryptone är en källa till kväve och kol för mikrobiell tillväxt; malakitgrönt hämmar koliforma bakterier; mediets höga osmotiska tryck på grund av de höga koncentrationerna av magnesiumklorid, tillsammans med det sura pH-värdet, fungerar som hämmare av den saprofytiska floran, vilket gynnar utvecklingen av *Salmonella* i buljongen. Magnesiumklorid undertrycker de toxiska effekterna av malakitgrönt på *Salmonella*; kaliumdihydrogenfosfat fungerar som ett buffertsystem.

En omfattande översikt av de vetenskapliga artiklar som publicerats om Rappaport Vassiliadis-buljong publicerades av Vassiliadis 1983.³

4 – ANVISNINGAR FÖR BEREDNING AV MEDIUM

Lös upp 26,5 g i 1 000 ml kallt renat vatten. Värm upp för att lösa upp, fördela 10 ml i skruvlockrör och sterilisera genom autoklavering vid 115 °C i 15 minuter.

5 – FYSISKA EGENSKAPER

Utseende på dehydratiserat medium

blågrönt, fint, homogent, fritt flytande pulver

Mediets utseende

blått, klart

Slutligt pH vid 20–25 °C

5,2 ± 0,2

6 – MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
Rappaport Vassiliadis (RV) Broth	Dehydrerat medium	4019802	500 g (18,8)
		4019804	5 kg (188 L)

7 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Autoklav, vattenbad, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, Erlenmeyer-kolvar, rör, flaskor, sterila öglor och svabbprover, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.





8 – PROVER

Rappaport Vassiliadis (RV)-buljong kan inokuleras med humana kliniska prover såsom avföring eller rektalpinne. Samla in prover före antimikrobiell behandling om möjligt. God laboratoriesed för insamling, transport och förvaring av proverna bör tillämpas. För livsmedels- och miljöprover, se angivna referenser.^{4,5}

9 – TESTFÖRFARANDE

Avföring:

- Inokulera röret med Rappaport Vassiliadis (RV)-buljong med en rejäl ögla av avföring eller med 50–100 µl flytande avföring.
- Rektala svabpprover som mottagits färskas eller i transportmedium ska sköljas noggrant i 1 ml saltlösning.
- Inkubera de inokulerade rören i aerob atmosfär vid $42 \pm 1^\circ\text{C}$ i 18–24 timmar.

Livsmedel:

- Inokulera 25 g prov i 225 ml buffrad peptonvatten (kod 401278) och inkubera vid $35\text{--}37^\circ\text{C}$ i 16–20 timmar
- Överför 0,1 ml till 10 ml Rappaport Vassiliadis (RV)-buljong och inkubera vid $42 \pm 1^\circ\text{C}$ i 24 timmar
- Överför en ögla full med tillväxt från rören med Rappaport Vassiliadis-buljong till en platta med XLD-agar (kod 402208) och till ett annat selektivt medium för *Salmonella*.

För en detaljerad beskrivning av metoder för att detektera *Salmonella* i livsmedel, se den citerade litteraturen.^{4,5}

10 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation indikeras tillväxten av organismer genom att buljongen får ett mjölkigt utseende eller blir grumlig.

11 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkterna släpps för försäljning efter att kvalitetskontrollen har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Slut användaren kan dock utföra sin egen kvalitetskontroll i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Här nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontrollen.

KONTROLLSTAMMAR	INKUBATIONSTEMPERATUR/T/ATM	FÖRVÄNTADE RESULTAT
S.Enteritidis ATCC 13076	$42 \pm 1^\circ\text{C}$ / 18–24 timmar / A	god tillväxt efter subkultur till Tryptone Soy Agar-platta
S.Typhimurium ATCC 14028	$42 \pm 1^\circ\text{C}$ / 18–24 timmar / A	god tillväxt efter subkultur till Tryptone Soy Agar-platta
E.coli ATCC 25922	$42 \pm 1^\circ\text{C}$ / 18–24 timmar / A	tillväxten delvis hämmad efter subkultur till Tryptone Soy Agar-platta

A: aerob inkubation; ATCC är ett varumärke som står för American Type Culture Collection

12 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan försäljning testas ett representativt prov av alla partier av dehydrerad Rappaport Vassiliadis (RV) buljong med avseende på produktivitet och selektivitet genom att jämföra resultaten med ett tidigare godkänt referensparti.

Produktiviteten testas med utspädningsmetoden genom att inokulera 1 ml av lämpliga decimala utspädningar av målorganismer i provrör, inkubera vid $42 \pm 1^\circ\text{C}$ i 18–24 timmar, subodla på Tryptone Soy Agar-plattor och registrera den högsta utspädningen som visar tillväxt i referensbatchen (G_{RB}) och i testbatchen (G_{TB}). Produktiviteten testas med följande målstammar: S.Typhimurium ATCC 14028, S.Enteritidis ATCC 13076. Produktivetsindexet G_{RB}/G_{TB} för varje teststam ska vara ≤ 1 .

Selektiviteten utvärderas med utspädningsmetoden genom att inokulera 1 ml lämpliga decimala utspädningar av icke-målorganismer i provrör, inkubera vid $42 \pm 1^\circ\text{C}$ i 18–24 timmar och subodla på Tryptone Soy Agar-plattor. Selektiviteten testas med följande icke-målorganismer: E.coli ATCC 25922, E.faecalis ATCC 29212, S.aureus ATCC 25923. E.coli och S.aureus hämmas delvis och selektivetsindexet G_{RB}/G_{TB} för varje teststam ska vara ≥ 1 ; E.faecalis CFU ska vara mindre än 10 på de subkultiverade plattorna med Tryptone Soy Agar.

13 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Rappaport Vassiliadis (RV) buljong är hämmande för S.Typhi. Mediet är därför inte indicerat för diagnos av tyfoidfeber.
- För anrikning av humana fekalprover är de mest rekommenderade medierna enligt mikrobiologiska manualer och procedurer selenitalthiga buljonger.^{8,9}
- Efter anrikningen i Rappaport Vassiliadis (RV)-buljong rekommenderas det att biokemiska, immunologiska, molekylära eller masspektrometriska tester utförs på isolat från ren odling för fullständig identifiering, även om de mikrobiella kolonierna på plattorna differentieras på basis av deras morfologiska och kromatiska egenskaper. Om det är relevant, utför test av antimikrobiell känslighet.
- Detta odlingsmedium är avsett som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolkningsresultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten från andra diagnostiska tester.

14 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Det här är en produkt för kvalitativ *in vitro*-diagnostik, endast avsedd för professionellt bruk. Den ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Uttorkade medier måste hanteras med lämpligt skydd. Konsultera säkerhetsdatabladet före användning.
- Detta odlingsmedium innehåller råmaterial av animaliskt ursprung. Kontroller av djuren före och efter slakt samt under produktions- och distributionscykeln för råvarorna kan inte helt garantera att denna produkt inte innehåller några överförbara patogener. Det rekommenderas därför att kulturmediet behandlas som potentiellt smittsamt och hanteras med iakttagande av de vanliga särskilda försiktighetsåtgärderna: förtär inte, andas inte in och undvik kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE Statement från webbplatsen www.biolifeitaliana.it, som beskriver de åtgärder som Biolife Italiana har vidtagit för att minska riskerna i samband med smittsamma djursjukdomar.
- Tillämpa god tillverkningssed i produktionsprocessen för beredda medier.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar som odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Sterilisera allt biologiskt riskavfall innan det kasseras. Kassera det oanvända mediet och de steriliserade plattorna som inokulerats med prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Använd inte odlingsmediet som aktiv ingrediens i farmaceutiska preparat eller som produktionsmaterial avsett för konsumtion av människor och djur
- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet för produkten finns tillgängliga på webbplatsen www.biolifeitaliana.it.





- Meddela Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) och berörda myndigheter om allvarliga incidenter som inträffar i samband med användningen av *in vitro*-diagnostiken.
- Informationen i detta dokument har definierats efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten men utan förpliktelse eller ansvar. I alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som tagits från mänskliga och djuriska organ, miljöprover och produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befrägar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att våra produkter är lämpliga för det avsedda ändamålet.

15 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Förvaras vid +10 °C /+30 °C på en torr plats, skyddad från direkt ljus. Vid korrekt förvaring kan produkten användas fram till utgångsdatum. Använd inte produkten efter detta datum. Undvik att öppna flaskan på fuktiga platser. Efter användning måste behållaren stängas ordentligt. Kassera produkten om behållaren och/eller locket är skadade, eller om behållaren inte är väl tillsluten, eller vid uppenbar försämring av pulvret (färgförändringar, hårdning, stora klumpar).

Användaren ansvarar för tillverknings- och kvalitetskontrollprocesserna för beredda medier och för valideringen av hållbarhetstiden för de färdiga produkterna, beroende på typ (rör/flaskor) och förvaringsmetod (temperatur och förpackning).

16 – REFERENSER

- Rappaport, F., N. Konforti, and B. Navon. (1956) A new enrichment medium for certain salmonellae. J. Clin. Pathol. 9:261-266.
- Vassiliadis, P., Pateraki, E., Papiconomou, N., Papadakis, J. and Trichopoulos, D. (1976) Nouveau procédé d'enrichissement de salmonella. Ann. Microb. Irist. Pasteur 127 B, 195.
- Vassiliadis, P. (1983) The Rappaport Vassiliadis enrichment Broth for the isolation of salmonellas: an overview. J. App. Bact. 54, 69
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev 07/2020
- Rapporto ISTISAN 96/35. ISSN 1123-3117. Metodi di analisi per il controllo microbiologico degli alimenti. Raccolta a cura di D. De Medici, L. Fenicia, L. Orefice e A. Stacchini.
- Kist, M., et al. 2000. Infektionen des Darmes. In: Mauch, H., Lüttiken, R., and S. Gatermann (eds.): MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, vol. 9. Urban & Fischer, Munich, Germany.
- Bockemühl, J. 1992. Enterobacteriaceae. In: Burkhardt, F. (ed.). Mikrobiologische Diagnostik. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Strockbine NA, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Nataro JP. Escherichia, Shigella and Salmonella. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015.
- Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): SMI B 30: investigation of faecal specimens for enteric pathogens. Issue 8.1, 04/2014.

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

 REF eller REF Katalognummer	 LOT Batch-kod	 IVD Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik	 Tillverkare	 Använd senast
 Temperaturbegränsning	 Innehållet räcker till <n> tester	 Se bruksanvisningen	 Förvara skyddat från direkt ljus	 Förvaras torrt

REVIDERINGSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringarna	Datum
Revidering 1	Uppdaterad layout och innehåll	2020/09
Revidering 2	Uppdatering av "försiktighetsåtgärder och varningar" och "förvaringsförhållanden och hållbarhet"	2022/03
Revidering 3	Borttagning av föråldrad klassificering	2023/04

Anmärkning: mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar inkluderas inte i granskningshistoriken.

