

RAPPAPORT VASSILIADIS ENRICHMENT SALMONELLA BROTH EP

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido per l'arricchimento selettivo di *Salmonella* in prodotti farmaceutici non sterili.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Peptone di soia	4,50 g
Sodio cloruro	8,00 g
Potassio fosfato monobasico	0,60 g
Potassio fosfato bibasico	0,40 g
Magnesio cloruro anidro	13,58 g ^
Verde malachite ossalato	0,036 g

^ equivalente a 29.0 g/L di magnesio cloruro esaidrato

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Rappaport nel 1956¹ ideò un brodo di arricchimento per *Salmonella* che includeva verde malachite e cloruro di magnesio come inibitori. Vassiliadis nel 1976² modificò il terreno di Rappaport riducendo a un terzo la concentrazione di verde malachite e incubando a 43°C anziché 37°C. Van Schothorst e Renaud³ hanno riferito che l'uso del peptone di soia invece del peptone animale ha migliorato il recupero della *Salmonella*. Rappaport Vassiliadis Enrichment Salmonella Broth EP si basa sulla formulazione di Van Schothorst³ e Renaud e soddisfa i requisiti della Farmacopea Europea.⁴

Il terreno viene utilizzato come terreno di arricchimento selettivo per l'isolamento di *Salmonella* da prodotti farmaceutici non sterili previo pre-arricchimento in Tryptic Soy Broth, secondo il metodo riportato dalla Farmacopea Europea.⁴

Rappaport Vassiliadis Enrichment Salmonella Broth EP differisce dal terreno standard ISO (REF 401981) per le concentrazioni leggermente diverse di cloruro di sodio e tampone fosfato.

L'efficienza di questo terreno di arricchimento si basa sulla capacità di *Salmonella* spp. di moltiplicarsi a pressioni osmotiche relativamente elevate, a valori di pH relativamente bassi, a temperature elevate e con esigenze nutrizionali ridotte.⁵

I fattori di crescita essenziali sono forniti dal peptone di soia; il verde malachite è inibitore di organismi diversi dalle salmonelle; l'elevata pressione osmotica del terreno dovuta alle alte concentrazioni di cloruro di magnesio, unitamente al pH acido, agiscono da inibitori della flora saprofitica, favorendo la crescita di *Salmonella* nel brodo. Il cloruro di magnesio inoltre contrasta l'effetto tossico del verde malachite per le salmonelle. I fosfati sono usati come agenti tampone per controllare il pH nel terreno.

4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 27,1 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare delicatamente per sciogliere, distribuire 10 mL in provette con tappo a vite e sterilizzare in autoclave a 115°C per 15 minuti.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, blu-verde
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	blu, limpido
pH finale (20-25 °C)	5,2 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Rappaport Vassiliadis Enrichment Salmonella Broth EP	Terreno di coltura in polvere	4019792	500 g (18,4 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, flaconi, provette con tappo a vite, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Prodotti farmaceutici non sterili. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento alla Farmacopea Europea.⁴

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

Il seguente metodo è un riassunto della tecnica raccomandata dalla Farmacopea Europea.⁴

- Inoculare non meno di 10 g o 10 mL in 90 mL di Tryptic Soy Broth (REF 402155), miscelare e incubare a 30-35°C per 18-24 ore.
- Trasferire 0,1 mL della coltura in 10 mL di Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth EP e incubare a 30-35 °C per 18-24 h.
- Eseguire una subcoltura su piastre di agar XLD (REF 402206) e incubare a 30-35 °C per 18-48 h.

10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, la crescita dei microrganismi nel brodo di arricchimento è indicata da un aspetto lattiginoso del brodo o da torbidità.

La possibile presenza di *Salmonella* è indicata dalla crescita di colonie rosse ben sviluppate, con o senza centro nero, sulle piastre XLD Agar. Ciò è confermato dai test di identificazione.

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
S. Typhimurium ATCC 14028
S. aureus ATCC 25923

INCUBAZIONE T° / T / ATM
30-35 °C / 18-24h / A
30-35 °C / 18-24h / A

RISULTATI ATTESI
buona crescita
inibito

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

12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Rappaport Vassiliadis Enrichment Salmonella Broth EP Broth disidratato viene testato per la produttività e la selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato. La produttività è testata mediante il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando meno di 100 UFC/provetta dell'organismo target S. Typhimurium ATCC 14208 e incubando a 30-35 °C per 18-24 ore. Il ceppo target mostra una buona crescita. La selettività viene valutata inoculando più di 100 UFC/provetta del ceppo non target S. aureus ATCC 25923 e incubando a 30-35 °C per 18-24 ore. La crescita del ceppo non target è totalmente inibita.

13 – LIMITEI DEL METODO

- RVS Broth è inibitorio per S.Typhi.
- Dopo l'arricchimento selettivo, anche se le colonie microbiche sulle piastre sono differenziate sulla base delle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati, da coltura pura, per identificazione completa.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per 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 buone pratiche di fabbricazione nel processo di produzione dei terreni.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi 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 qui descritto 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.

15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

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'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati autonomamente e della validazione della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre, provette, flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo la norma ISO 6579, le provette e i flaconi di RVS Broth preparati in laboratorio, possono essere conservati a 2-8°C per un massimo di tre mesi.⁶

16 - Bibliografia

1. Konforti K, Navon B, Rappaport F. A new enrichment medium for certain salmonellae. J Clin Pathol 1956; 9:261-266.
2. Vassiliadis P, Pateraki E, Papiconomou N, Papadakis J, Trichopoulos D. Nouveau procédé d'enrichissement de salmonella. Ann. Microb. Irist, Pasteur 1976; 127 B: 195.
3. Van Schothorst M, Renaud AM. Dynamics of salmonella isolation with modified Rappaport's medium (R10). J Appl Bacteriol 1983; 54:209
4. European Pharmacopoeia 11th Edition, 2022, Vol. 1; 2.6.13 Microbiological Examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms: 01/2021:20631.
5. 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; 5:254-255.
6. ISO 6579:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella —Part 1: Detection of Salmonella spp

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	Utilizzare entro	Fabbricante	
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 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	03/2023

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

