

ISTRUZIONI PER L'USO

RAPPAPORT VASSILIADIS (RV) BROTH

Terreno di coltura in polvere


 Rappaport Vassiliadis (RV) Broth – da sinistra: provetta non inocolata e crescita di *S. Enteritidis*
1 - DESTINAZIONE D'USO

 Diagnostico *in vitro*. Terreno liquido d'arricchimento usato nelle procedure d'isolamento di *Salmonella* da campioni alimentari, ambientali e clinici.

2 - COMPOSIZIONE
FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)*

Triptone	4,54 g
Potassio fosfato monobasico	1,45 g
Sodio cloruro	7,2 g
Magnesio cloruro anidro	13,3 g
Verde malachite ossalato	0,036 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

 Rappaport Vassiliadis (RV) Broth è preparato in accordo alla formulazione R25/37 proposta da Rappaport nel 1956¹ e successivamente modificata da Vassiliadis nel 1976², e denominata R10/43. Due importanti modifiche furono introdotte nella composizione del terreno e nel suo impiego: una consisteva nella riduzione ad un terzo della quantità di verde malachite e l'altra nell'incubazione a 43°C invece che a 37°C. Dal 1977 al 1981, il brodo di arricchimento RV è stato confrontato, in numerosi studi scientifici, con il brodo tetratonato Muller-Kauffmann raccomandato come metodo di riferimento dall'International Standards Organization; in tutti questi studi il brodo RV si dimostrò superiore al brodo MK nell'isolamento delle salmonelle da prodotti a base di carne naturalmente contaminati, liquami e feci suine, dopo pre-arricchimento in acqua peptone tamponata.³

 Rappaport Vassiliadis (RV) Broth è indicato da FDA BAM quale brodo di arricchimento selettivo per l'isolamento di *Salmonella*.⁴

 Il Rapporto ISTISAN 96/35⁵ indica lo schema seguente per l'arricchimento selettivo di *Salmonella* negli alimenti:

Alimenti non normati: Rappaport Vassiliadis (RV) (42°C) + Selenite Cystine Broth (37°C) - Latte e derivati: Muller Kauffmann (42°C) + Selenite Cystine Broth (37°C) - Uova fresche: Rappaport Vassiliadis (RV) (42°C) + Muller Kauffmann (42°C) - Molluschi: MSRV (42°)

 Il terreno è consigliato anche come arricchimento selettivo per *Salmonella* spp. diverse dalla *Salmonella* Typhi nei campioni di feci umane da Kist e coll.⁶ e da Burkhardt⁷.

Il triptone è una fonte di azoto e di carbonio per la crescita microbica; Il verde malachite è inibitorio verso i coliformi; l'alta pressione osmotica del terreno dovuta alle alte concentrazioni di magnesio cloruro, unitamente al pH acido, agiscono da agenti inibitori della flora saprofitica, favorendo lo sviluppo nel brodo delle salmonelle. Il cloruro di magnesio sopprime gli effetti tossici del verde malachite nei confronti delle salmonelle ed il potassio fosfato monobasico agisce da sistema tampone.

 Una vasta rassegna dei lavori scientifici effettuati sul Rappaport Vassiliadis Broth è stata pubblicata da Vassiliadis nel 1983.³
4 – METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 26,5 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino a completa soluzione. Distribuire in provette con tappo a vite in ragione di 10 mL per provetta ed autoclavare a 115° per 15 minuti.

5- CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, verde blu
Aspetto del terreno in soluzione ed in provetta	blu, limpido.
pH (20-25°C)	5,2 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezioni
Rappaport Vassiliadis (RV) Broth	Terreno di coltura in polvere	4019802	500 g (18.8 L)
		4019804	5 kg (188 L)

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, flaconi o beute autoclavabili, provette con tappo a vite, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

8 - CAMPIONI

 Rappaport Vassiliadis (RV) Broth può essere inoculato direttamente con i campioni clinici quali le feci ed il tampone rettale. Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni. Per campioni alimentari ed ambientali fare riferimento alla letteratura citata.^{4,5}




9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Feci

- Inoculare la provetta di Rappaport Vassiliadis (RV) Broth caricando il tampone di raccolta nel brodo, o con un'ansata consistente di feci, o con 50 -100 µL di feci liquide. Incubare a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore.

Alimenti

- Inoculare 25 g di campione in 225 mL di Buffered Peptone Water (cod. 401278) ed incubare a $35-37^\circ\text{C}$ per 16-20 ore
- Trasferire 0,1 mL in 10 mL di Rappaport Vassiliadis (RV) Broth ed incubare a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore
- Dalle provette di Rappaport Vassiliadis Broth dopo 24 ore di incubazione a 42°C trapiantare con un'ansa su una piastra di XLD Agar (cod. 402208) e su una piastra di un altro terreno selettivo per salmonelle.

Per una descrizione dettagliata dei metodi per la ricerca di *Salmonella* negli alimenti riferirsi alla letteratura citata.^{4,5}

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, la crescita nelle provette di Rappaport Vassiliadis (RV) Broth è rivelata dall'aspetto lattiginoso del brodo o dalla comparsa di torbidità.

11 - CONTROLLO QUALITÀ 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, alle regole dell'accreditamento 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
S.Typhimurium	ATCC 14028	$42 \pm 1^\circ\text{C}$ / 18-24h / A	buona crescita, dopo subcoltura in TSA
S.Enteritidis	ATCC 13076	$42 \pm 1^\circ\text{C}$ / 18-24h / A	buona crescita, dopo subcoltura in TSA
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	$42 \pm 1^\circ\text{C}$ / 18-24h / A	crescita parzialmente inibita dopo subcoltura in TSA

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

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere Rappaport Vassiliadis (RV) Broth vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività del terreno è valutata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni appropriate di ceppi target nelle provette, incubando a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore, trapiantando su piastre di Tryptic Soy Agar e registrando la diluizione più alta ove si osserva crescita, nel Lotto di Riferimento (Cr_{LR}) e nel lotto in esame (Cr_{LE}). La produttività è valutata con i seguenti ceppi target: S.Typhimurium ATCC 14028, S.Enteritidis ATCC 13076. L'indice di produttività ($Cr_{LR}-Cr_{LE}$) per ciascun ceppo è giudicato conforme quando ≤ 1 .

La selettività del terreno è valutata con metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni appropriate di ceppi non target nelle provette, incubando a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore trapiantando su piastre di Tryptic Soy Agar. La selettività è valutata con i seguenti ceppi non target: *E.coli* ATCC 25922, *E.faecalis* ATCC 29212, *S.aureus* ATCC 25923. *E.coli* e *S.aureus* sono parzialmente inibiti e l'indice di selettività ($Cr_{LR}-Cr_{LE}$) per ciascun ceppo di prova deve essere ≥ 1 . Le UFC di *E.faecalis* su Tryptic Soy Agar si riscontrano inferiori a 10.

13 - LIMITI DEL METODO

- Rappaport Vassiliadis (RV) Broth inibisce la crescita di S.Typhi. Il terreno quindi non è indicato per la diagnosi della febbre tifoide.
- Per l'arricchimento dei campioni fecali umani i terreni più consigliati dai manuali e dalle procedure microbiologiche sono i brodi contenenti sodio selenito.^{8,9}
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra d'isolamento dopo l'arricchimento in Rappaport Vassiliadis (RV) Broth, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte ai 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 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.
- 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- 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 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.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (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 (provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

- 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.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	IVD 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 6	Aggiornamento del contenuto e del layout	09/2020
Revisione 7	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	02/2022
Revisione 8	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

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

