



# RAPPAPORT VASSILIADIS SEMI-SOLID MEDIUM MODIFIED (MSRV)

## NOVOBIOCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo



Migrazione di *Salmonella Typhimurium*  
su piastra di MSRVR

### 1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno di base e supplemento per l'arricchimento/isolamento selettivo di ceppi mobili di *Salmonella* da alimenti e mangimi, feci animali e campioni ambientali dalla fase di produzione primaria.

### 2 - COMPOSIZIONE\*

#### MSRV MEDIUM –TERRENO DISIDRATATO

##### FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA

Triptosio	4,6 g
Idrolisato acido di caseina	4,6 g
Sodio cloruro	7,3 g
Potassio fosfato monobasico	1,5 g
Magnesio cloruro anidro	10,9 g
Verde malachite ossalato	0,04 g
Agar	2,7 g

#### NOVOBIOCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

##### CONTENUTO DEL FLACONE

Novobiocina	10 mg
-------------	-------

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

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il terreno Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) è una modifica semisolida del brodo di arricchimento Rappaport Vassiliadis, originariamente descritto da De Smedt *et al*<sup>1</sup> nel 1986 con una concentrazione di novobiocina di 20 mg/L. Il terreno MSRVR consente la determinazione dei ceppi mobili di *Salmonella* in alimenti contaminati o altri campioni. L'uso di questo terreno dopo il pre-arricchimento o l'arricchimento selettivo ha dato risultati migliori nell'isolamento di *Salmonella* rispetto ai metodi convenzionali.<sup>2-4</sup>

Veenman *et al*.<sup>5</sup> hanno dimostrato la presenza di zone di migrazione più ampie sul terreno MSRVR con una minore concentrazione di novobiocina e l'influenza della novobiocina sulla motilità batterica.

Il terreno MSRVR con una concentrazione di novobiocina di 10 mg/L è raccomandato dalla norma ISO 6579-1<sup>6</sup> per la determinazione di *Salmonella* in alimenti, campioni di mangimi, campioni ambientali provenienti dall'area di produzione alimentare, in alternativa al brodo RVS e come unico terreno di arricchimento selettivo per campioni della fase di produzione primaria.

Il principio del metodo si basa sulla capacità delle salmonelle di spostarsi dal punto di inoculazione attraverso il terreno selettivo, più rapidamente di altri microrganismi competitivi, producendo aloni opachi di crescita.

I fattori di crescita essenziali sono forniti dai peptoni. Il verde malachite, l'elevata pressione osmotica dovuta all'elevata concentrazione di cloruro di magnesio, la presenza di novobiocina e il pH acido, agiscono come inibitori della flora saprofitica, favorendo la crescita di ceppi mobili di *Salmonella*. 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 – PREPARAZIONE

Sospendere 31,6 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente per sciogliere completamente. Non sterilizzare in autoclave. Raffreddare a circa 47-50°C.

#### Formulazione ISO 6579-1

Aggiungere il contenuto di una fiala di Novobiocin Antimicrobic Supplement (REF 4240045), ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e versare 15-20 mL in piastre Petri sterili e lasciare asciugare per un'ora. Concentrazione finale di novobiocina nel terreno: 10 mg/L

#### Formulazione originale De Smedt

Aggiungere il contenuto di due flaconcini di Novobiocin Antimicrobic Supplement (REF 4240045), ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile. Mescolare bene e versare 15-20 mL in piastre Petri sterili e lasciare asciugare per un'ora. Concentrazione finale di novobiocina nel terreno: 20 mg/L

### 5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, blu-verde
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	terreno semisolido, blu, trasparente
Aspetto del supplemento liofilizzato	pastiglia bassa e compatta, bianca
Aspetto del supplemento ricostituito	incoloro, limpido
pH (20-25°C)	5,2 ± 0,2

### 6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Rappaport Vassiliadis Semisolid Medium (MSRV)	Terreno di coltura in polvere	4019822	500 g (15.8 L)
Novobiocin Antimicrobic Supplement	Supplemento liofilizzato	4240045	10 flaconi, 10 mg/flacone

### 7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, piastre Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari per l'identificazione completa delle colonie.



## 8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali, campioni ambientali nel settore della produzione e manipolazione degli alimenti, campioni della fase di produzione primaria come feci animali, polvere e tamponi. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.

## 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

### Sintesi della procedura ISO 6579 per alimenti, campioni di mangimi e campioni ambientali provenienti dall'area di produzione alimentare.<sup>6</sup>

1. Preparare il campione di prova in conformità con la norma internazionale specifica relativa al prodotto in questione. In generale, una porzione del campione viene aggiunta a una quantità di Buffered Peptone Water preriscaldata (REF 401278) per ottenere una diluizione dieci volte superiore (ad esempio, una porzione da 25 g di campione viene miscelata con 225 mL di Buffered Peptone Water).
2. Incubare a una temperatura compresa tra 34 °C e 38 °C per 18 h ± 2 h.
3. Trasferire 0,1 mL della coltura ottenuta in Buffered Peptone Water sulla superficie di una piastra MSR/V Agar o in una provetta contenente 10 mL di RVS Broth (REF 401981). Inoculare l'agar MSR/V in da uno a tre punti equidistanti sulla superficie del terreno.
4. Trasferire 1 mL della coltura ottenuta in Buffered Peptone Water in una provetta contenente 10 mL di Muller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth (REF 401745 - MKTTn Broth).
5. Incubare le piastre di MSR/V Agar inoculate (o le provette di RVS Broth) a 41,5 °C ± 1 per 24 h ± 3 h. Non capovolgere le piastre.
6. Incubare il brodo MKTTn inoculato tra 34 °C e 38 °C per 24 h ± 3 h.
7. Dal terreno MSR/V (o RVS Broth) e dal MKTTn Broth trasferire con un'ansa alcune colonie su una piastra di XLD Agar ISO Formulation (codice 402208) e su un altro terreno selettivo per *Salmonella* basato su caratteristiche diagnostiche diverse da quelle del XLD agar (es. Chromogenic *Salmonella* Agar REF 405350). Con le piastre di MSR/V utilizzare un'ansa da 1 µL, con il brodo MKTTn utilizzare un'ansa da 10 µL.
8. Incubare le piastre XLD capovolte tra 34 °C e 38 °C ed esaminarle dopo 24 h. Incubare il secondo terreno selettivo secondo le specifiche istruzioni per l'uso.

### Sintesi della procedura ISO 6579 per i campioni della fase di produzione primaria.<sup>6</sup>

Dopo il pre-arricchimento in Buffered Peptone Water, inoculare solo il terreno MSR/V come descritto sopra. La sensibilità del metodo può essere migliorata utilizzando una seconda procedura di arricchimento selettivo, ad es. MKTTn Broth incubato a 41,5 °C per 24 ore.

#### NOTE:

Dopo l'incubazione, è consentito conservare il campione pre-arricchito e l'arricchimento selettivo a 2-8 °C per un massimo di 72 ore.<sup>6</sup>

Nei prodotti a base di latte in polvere e nel formaggio, la *Salmonella* può subire lesioni subletali. Incubare i terreni di arricchimento selettivo da questi prodotti per ulteriori 24 h ± 3 h. Anche quando si analizzano campioni di focolai questo tempo di incubazione aggiuntivo può essere utile.<sup>6</sup>

Fare riferimento allo standard ISO per le procedure dettagliate.

## 10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Le piastre di MSR/V con crescite sospette mostreranno una zona torbida grigio-bianca che si estende dalla goccia inoculata. Se le piastre sono negative dopo 24 ore, incubare nuovamente per altre 24 h ± 3 h.

I test di conferma biochimica includono: TSI Agar, Urea Agar, L-Lysine Decarboxylase Medium, rilevamento della β-galattosidasi (opzionale), rilevamento dell'indolo (opzionale).<sup>6</sup> La conferma sierologica include il rilevamento della presenza degli antigeni O- e H di *Salmonella*.

La conferma biochimica può essere sostituita con il test rapido MUCAP (REF 191500). Tutte le colonie positive al MUCAP Test devono essere confermate sierologicamente.

## 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 ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
S. Enteritidis ATCC 13076	41.5 °C ± 1 °C / 24-48 h / A	crescita con zona torbida
S. Typhimurium ATCC 14028	41.5 °C ± 1 °C / 24-48 h / A	crescita con zona torbida
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	41.5 °C ± 1 °C / 48 h / A	inibito
<i>E. coli</i> ATCC 25922	41.5 °C ± 1 °C / 48 h / A	inibito

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

## 12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di terreno disidratato Rappaport Vassiliadis Semisolid Medium (MSRV) addizionato con Novobiocin Antimicrobial Supplement (10 mg/L) viene testato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un Lotto di riferimento precedentemente approvato.

Le caratteristiche di produttività sono valutate inoculando 0,1 mL di sospensioni di ceppi target sulla superficie della piastra di MSR/V, ad almeno 5 mm dal bordo. Ceppi target testati: S. Typhimurium ATCC 14028, S. Enteritidis ATCC 13076. I diametri delle zone di migrazione vengono misurati dopo incubazione a 41,5 °C ± 1 °C per 24 e 48 ore. Se i diametri delle zone nel Lotto di prova sono confrontabili con quelli ottenuti nel Lotto di riferimento, il Lotto di prova è considerato conforme.

La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato in superficie inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland di *E. coli* ATCC 25922 e *E. faecalis* ATCC 29212. Dopo 48 ore di incubazione a 41,5 °C, la crescita di *E. coli* è totalmente o parzialmente inibita e non si osservano zone di migrazione, mentre la crescita di *E. faecalis* è totalmente inibita.

## 13 – LIMITI DEL METODO

- La combinazione di verde malachite, cloruro di magnesio e pH basso non consente la crescita di alcuni sierotipi di *Salmonella* come *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A.
- Il terreno non è adatto alla rilevazione di ceppi immobili di *Salmonella*, che si presentano comunque con un'incidenza molto bassa (inferiore allo 0,1%). Se si sospetta la presenza di ceppi non mobili, si raccomanda un metodo convenzionale con pre-arricchimento e arricchimento selettivo.
- Le colonie di presunta *Salmonella* devono essere messe in sub-coltura e la loro identità confermata mediante opportuni test biochimici e sierologici.



#### 14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura e il supplemento sono destinati esclusivamente al controllo microbiologico e all'uso professionale; devono essere utilizzati da personale di laboratorio adeguatamente addestrato e qualificato, osservando le precauzioni approvate in materia di rischio biologico e le tecniche asettiche.
- Il terreno di base e il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- I terreni in polvere e i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Novobiocin Antimicrobic Supplement è classificato come pericoloso dalla normativa vigente. Prima dell'uso consultare le schede 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](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.
- Prestare attenzione quando si apre l'anello metallico delle fiale per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione su membrana.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminazioni con il terreno in polvere, il supplemento o i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno e il supplemento non utilizzato ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi 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).
- 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

##### Terreno disidratato

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).

##### Supplemento selettivo

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

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). Secondo la norma ISO 6579-1 le lastre preparate autonomamente possono essere conservate con la superficie rivolta verso l'alto, protette dall'essiccamento e al buio per un massimo di due settimane a +2°C +8°C.<sup>6</sup>

#### 16 - BIBLIOGRAFIA

- De Smedt JM, F Bolderdijk RF, Rappold H, Lautenschlaeger D. Rapid Salmonella Detection in Foods by Motility Enrichment on a Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium. J Food Prot. 1986 Jul;49(7):510-514.
- De Smedt JM, Chartron S, Cordier JL, Graff E, Hoekstra H, Lecoupeau JP, Lindblom M, Milas J, Morgan RM, Nowacki R, et al. Collaborative study of the International Office of Cocoa, Chocolate and Sugar Confectionery on Salmonella detection from cocoa and chocolate processing environmental samples. Int J Food Microbiol. 1991 Aug;13(4):301-8.
- De Smedt JM, Bolderdijk R, Milas J. Salmonella detection in cocoa and chocolate by motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium: collaborative study. J AOAC Int. 1994 Mar-Apr;77(2):365-73.
- Perales I, Erkiaga E. Comparison between semisolid Rappaport and modified semisolid Rappaport-Vassiliadis media for the isolation of Salmonella spp. from foods and feeds. Int J Food Microbiol. 1991 Oct;14(1):51-7
- Veenman C, Korver H, Mooijman KA. Improvements in the method for detection of Salmonella spp. In animal faeces. National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands. RIVM report 330300 010. 2007.
- ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella -- Part 1: Detection of Salmonella spp. - ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp. — Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC

#### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 <b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b>	 <b>LOT</b> Numero di lotto	 Monouso	 Fabbricante	 Lato superiore	 Proteggere dall'umidità
 Limiti di temperatura		 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le istruzioni per l'Uso	 Utilizzare entro	 Fragile maneggiare con cura	 Proteggere dalla luce diretta

#### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

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