

## RAPPAPORT VASSILIADIS SOY (RVS) BROTH

Terreno di coltura in polvere e terreno pronto all'uso



RVS Broth: terreno non inoculato a sinistra e terreno dopo crescita di *Salmonella* sp. sulla destra.

### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido per l'arricchimento selettivo di *Salmonella* in alimenti, acque e campioni ambientali.

### 2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA \* ^

#### FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA \*

Peptone di soia	4,50 g
Sodio cloruro	7,20 g
Potassio fosfato monobasico	1,26 g
Potassio fosfato bibasico	0,18 g
Magnesio cloruro	13,40 g
Verde malachite ossalato	0,036 g

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

^ La formulazione riportata utilizza ingredienti anidri per meglio conservare la polvere. La formulazione Biolife per litro corrisponde alla formulazione Standard ISO, che si riferisce ad un volume totale di 1110 mL.

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Rappaport nel 1956<sup>1</sup> ideò un brodo di arricchimento per *Salmonella* che includeva verde malachite e cloruro di magnesio come inibitori. Vassiliadis nel 1976<sup>2</sup> modificò il terreno Rappaport riducendo a un terzo la concentrazione di verde malachite e incubando a 43°C anziché 37°C. Van Schothorst e Renaud<sup>3</sup> riportarono che l'uso del peptone di soia invece del peptone animale migliorava i tassi di recupero della *Salmonella*. Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth si basa sulla formulazione di Van Schothorst e Renaud e soddisfa i requisiti di ISO 6579-1<sup>4</sup> e ISO 19250<sup>5</sup>.

Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth è utilizzato come terreno di arricchimento selettivo per l'isolamento di *Salmonella* da cibo, acqua e campioni ambientali con incubazione a 41,5 °C, dopo il pre-arricchimento in Buffered Peptone Water.

L'efficienza di questo terreno di arricchimento si basa sulla capacità di *Salmonella* spp. di moltiplicarsi a pressioni osmotiche relativamente alte, a valori di pH relativamente bassi, a temperature elevate e con esigenze nutrizionali ridotte.<sup>6</sup>

I fattori di crescita essenziali sono forniti dal peptone di soia; il verde malachite inibisce la crescita degli organismi diversi dalle salmonelle; l'elevata pressione osmotica del terreno dovuta alle elevate concentrazioni di cloruro di magnesio, unitamente al pH acido, agiscono da inibitori della flora saprofitica, favorendo la crescita 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 del terreno.

### 4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 26,6 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare 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 della soluzione	blu, limpida
pH finale (20-25 °C)	5,2 ± 0,2

### 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth	Terreno di coltura in polvere	4019812	500 g (18,7 L)
RVS Broth	Provette pronte all'uso	551981	20 x 10 mL
RVS Broth	Flaconi pronti all'uso	5119812	6 x 100 mL

### 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

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

### 8 – CAMPIONI

Cibo, acqua e campioni ambientali. 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.<sup>4,5</sup>

### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

#### Campioni alimentari

Il seguente metodo è un riassunto tratto dalla norma ISO 6579-1<sup>4</sup>

- Preparare il campione di prova in conformità con la norma internazionale specifica relativa al prodotto in questione. In generale, una porzione del campione da testare viene aggiunta a una quantità di Buffered Peptone Water preriscaldato (REF 401278) per ottenere una diluizione dieci volte superiore (ad esempio, una porzione di test da 25 g viene miscelata con 225 mL di Buffered Peptone Water).
- Incubare a una temperatura compresa tra 34 °C e 38 °C per 18 h ± 2 h.
- Trasferire 0,1 mL della coltura ottenuta in Buffered Peptone Water in una provetta contenente 10 mL di brodo RVS o sulla superficie di una piastra di MSRV Agar (REF 401982).





- 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).
- Incubare il brodo RVS inoculato (o le piastre MSR/V) a  $41,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$  per  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .
- Incubare il brodo MKTTn inoculato tra  $34 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  per  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .
- Da RVS Broth o MSR/V medium e MKTT Broth trasferire un'ansa di crescita su una piastra di XLD Agar (codice 402208) e su un altro terreno selettivo per *Salmonella* con caratteristiche diverse da quelle dell'agar XLD (es. Chromogenic Salmonella Agar REF 405350). Con le piastre positive di MSR/V utilizzare un'ansa da  $1 \text{ } \mu\text{L}$ , con il brodo MKTTn utilizzare un'ansa da  $10 \text{ } \mu\text{L}$ .
- Incubare le piastre XLD capovolte tra  $34 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  ed esaminarle dopo 24 h. Incubare il secondo terreno di coltura selettivo secondo le istruzioni per l'uso.

**NOTE**

Dopo l'incubazione, è consentito conservare il campione pre-arricchito e l'arricchimento selettivo a  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$  per un massimo di 72 ore<sup>4</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  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ . Anche quando si analizzano campioni di focolai, può essere vantaggioso allungare il tempo di incubazione.<sup>4</sup>

Fare riferimento allo standard ISO per le procedure dettagliate.

**Campioni di acque**

Il seguente metodo è un riassunto tratto dalla norma ISO 19250.<sup>5</sup>

- Pre-arricchimento non selettivo per volumi  $< 10 \text{ mL}$ : inoculare 50 mL di Buffered Peptone Water con il campione o le sue diluizioni e incubare a  $36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  per  $18 \pm 2 \text{ h}$ .
- Pre-arricchimento non selettivo per volumi  $> 10 \text{ mL}$ : filtrare un volume d'acqua adeguato all'acqua in esame. Posizionare la membrana filtrante in 50 mL di Buffered Peptone Water. In alternativa, aggiungere il campione allo stesso volume di Buffered Peptone Water a doppia concentrazione. Si noti che quest'ultima procedura non è adatta per acque minerali ad alto contenuto di sale o acqua di mare.
- Incubare le colture a  $36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  per  $18 \pm 2 \text{ h}$ .
- Trasferire da 0,1 mL a 10 mL di RVS Broth e incubare a  $41,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  per  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  e, se necessario, per  $48 \pm 4 \text{ h}$ .
- Dalle provette di RVS Broth trasferire un'ansa di crescita su una piastra di XLD Agar ISO Formulation (codice 402208) e su un altro terreno selettivo per *Salmonella* con caratteristiche diverse da quelle dell'XLD agar (es. Chromogenic Salmonella Agar REF 405350).
- Incubare le piastre XLD capovolte tra  $34 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  ed esaminarle dopo 24 h. Incubare il secondo terreno di coltura selettivo secondo le istruzioni per l'uso.

**NOTE**

Per le acque reflue è stato dimostrato che tempi di incubazione più brevi della coltura di pre-arricchimento o l'inoculazione diretta del campione in terreno selettivo producono risultati migliori.<sup>5</sup>

Per rilevare le specie di *Salmonella* a crescita lenta, incubare il brodo RVS per un totale di  $48 \pm 4 \text{ ore}$ .<sup>5</sup>

Fare riferimento allo standard ISO per le procedure dettagliate.

**10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Dopo l'incubazione, la crescita dei microrganismi nel RVS Broth è indicata dall'aspetto lattiginoso del brodo o dalla torbidità.

Fare riferimento alle istruzioni per l'uso dei due terreni su piastra per la descrizione delle caratteristiche delle colonie di *Salmonella*.

Contrassegnare le colonie sospette su ciascuna piastra. Selezionare la colonia sospetta per la sottocoltura e la conferma.

I test di conferma biochimica includono: TSI Agar, Urea Agar, L-Lysine Decarboxylase Medium, rilevamento della  $\beta$ -galattosidasi (opzionale), rilevamento dell'indolo (opzionale).<sup>4</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**

Tutti i lotti di prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore finale 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.<sup>3</sup>

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T - ATM	RISULTATI ATTESI
S. Typhimurium ATCC 14028 + P. aeruginosa ATCC 27853 + E. coli ATCC 25922	$41,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} / 24 \text{ h} \pm 3 / \text{A}$	$> 10$ colonie tipiche dopo subcoltura su XLD Agar
E. faecalis ATCC 29212 E. coli ATCC 25922	$41,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} / 24 \text{ h} \pm 3 / \text{A}$ $41,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} / 24 \text{ h} \pm 3 / \text{A}$	$< 100$ colonie tipiche dopo subcoltura su TSA parzialmente inibito dopo subcoltura su TSA

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

**12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI**

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) Broth disidratato e pronto per l'uso viene testato per la produttività e la selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali di microrganismi target in provette, incubando a  $41,5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  per 24 ore, subcoltivando su piastre di Tryptic Soy Agar e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita nel lotto di riferimento ( $\text{Gr}_{\text{RB}}$ ) e nel lotto di prova ( $\text{Gr}_{\text{TB}}$ ). La produttività è testata con i seguenti ceppi target: S. Typhimurium ATCC 14208, S. Enteritidis ATCC 13076, L'indice di produttività  $\text{Gr}_{\text{RB}}/\text{Gr}_{\text{TB}}$  per ciascun ceppo di prova deve essere  $\leq 1$ .

La produttività e la selettività sono testate insieme a miscele di circa 100 UFC di organismi target e 1000 UFC di organismi non target per provetta, incubando a  $41,5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  per 24 ore. Miscela di ceppi target e non target: S. Typhimurium ATCC 14028 + E. coli ATCC 25922 + P. aeruginosa ATCC 27853. Dopo l'incubazione delle provette inoculate e la sottocoltura su piastre XLD Agar, il ceppo target mostrerà più di 10 colonie per piastra

Inoltre, la selettività viene valutata inoculando circa 10.000 UFC/provetta di organismi non target e incubando a  $41,5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  per 24 ore e subcoltivando su piastre di Tryptic Soy Agar. La selettività è testata con i seguenti ceppi non target: E. coli ATCC 25922, E. faecalis ATCC 2921. E. coli è parzialmente inibito mentre le UFC di E. faecalis devono essere inferiori a 10 sulle piastre di subcoltura di Tryptic Soy Agar.

**13 – LIMITE 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.



- Le colonie di presunta *Salmonella* devono essere sottocoltivate e la loro identità confermata mediante opportuni test biochimici e sierologici.

#### 14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico e sono per uso professionale; deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno disidratato deve essere maneggiato con adeguate protezioni. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza.
- Applicare le Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di produzione dei supporti preparati.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Le provette e i flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni provetta e ogni flacone di questo terreno di coltura è monouso.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati 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 le Schede di Sicurezza 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 dei prodotti, 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

##### Provette/flaconi pronti all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni le provette sono valide fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le provette estratte dal confezionamento secondario possono essere utilizzate sino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere usate immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare le provette con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

##### Terreno di coltura in polvere

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 controllo qualità dei terreni preparati in autonomia e della convalida della loro durata, in base al tipo e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e imballaggio). Secondo la norma ISO 6579-1, le provette e le fiasche preparate di brodo RVS possono essere conservate a 2-8°C per un massimo di tre mesi.<sup>4</sup>

#### 16 - REFERENCES

- Konforti K, Navon B, Rappaport F. A new enrichment medium for certain salmonellae. *J Clin Pathol* 1956; 9:261-266.
- Vassiliadis P, Pateraki E, Papiconomou N, Papadakis J, Trichopoulos D. Nouveau procédé d'enrichissement de salmonella. *Ann. Microb. Irist, Pasteur* 1976; 127 B: 195.
- Van Schothorst M, Renaud AM. Dynamics of salmonella isolation with modified Rappaport's medium (R10). *J Appl Bacteriol* 1983; 54:209
- 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 MSR/V and SC
- ISO 19250:2010. Water quality -- Detection of *Salmonella* spp.
- 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.

#### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	 Proteggere dall'umidità
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Monouso

#### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 9	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

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

