

ISTRUZIONI PER L'USO

RAPPAPORT VASSILIADIS BROTH

Provette pronte all'uso


Rappaport Vassiliadis (RV) Broth
Da sinistra: provetta non inoculate e crescita di *S. Enteritidis*

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno liquido per l'arricchimento selettivo delle salmonelle da campioni alimentari, ambientali e clinici.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

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
Acqua purificata	1000 mL

*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 tetrionato 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 terreno è consigliato anche come arricchimento selettivo per *Salmonella* spp. diverse dalla *Salmonella* Typhi nei campioni di feci umane^{5,7}.

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 saprofiti, 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 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in provetta blu, limpido
pH (20-25°C) 5,2 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Rappaport Vassiliadis (RV) Broth W0104010206, EDMA: 14.01.02.01, RDM:1553334/R	Provette pronte all'uso	551980	20 x 10 mL; provette di vetro 17x125 mm, con fondo piatto e tappo a vite. Confezionamento in scatola di cartone.

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - 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

8 - 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 ± 1°C per 24 ore.

Alimenti

- Inoculare 25 g di campione in 225 mL di Buffered Peptone Water (cod. 401278) ed incubare a 35-37°C per 16-20 ore
- Trasferire 0,1 mL in 10 mL di Rappaport Vassiliadis (RV) Broth ed incubare a 42 ± 1°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}





9 - 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. Seminare un'ansata di brodo coltura su piastre di terreni per Salmonella; per la scelta di tali terreni prediligere una combinazione di un terreno con un'elevata selettività e di un terreno con una moderata selettività.

10 - 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 responsabilità 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	41.5 ± 0.5 °C / 22-26 h / A	buona crescita, dopo subcoltura in TSA
S.Enteritidis	ATCC 13076	41.5 ± 0.5 °C / 22-26 h / A	buona crescita, dopo subcoltura in TSA
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	41.5 ± 0.5 °C / 22-26 h / A	crescita parzialmente inibita dopo subcoltura in TSA

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

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di provette pronte all'uso di Rappaport Vassiliadis (RV) Broth e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere Rappaport Vassiliadis (RV) Broth REF 401980) 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 41.5 ± 0.5 °C per 22-26 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 13076, S.Enteritidis ATCC 14028. L'indice di produttività (Cr_{LR}-Cr_{LE}) per ciascun ceppo è giudicato conforme quando è ≤ 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 41.5 ± 0.5 °C per 22-26 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 su piastra.

12 - 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 Muller Kauffmann Tetrathionate 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 al 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.

13 - 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso specifiche per i prodotti 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- Fare attenzione quando si aprono le provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- La singola provetta del prodotto qui descritto è monouso. Non suddividere il prodotto in altri contenitori.
- Il prodotto qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le provette non utilizzate e le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- 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.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare le provette oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, le provette possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere utilizzate immediatamente. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare le provette se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, sedimenti, colore alterato).



**15 - BIBLIOGRAFIA**

1. Rappaport F, Konforti N, Navon B. (1956) 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. (1976) Nouveau procédé d'enrichissement de salmonella. Ann Micro Inst Pasteur 1976; 127 B: 195.
3. Vassiliadis P. The Rappaport Vassiliadis enrichment Broth for the isolation of salmonellas: an overview. J App Bact 1983; 54: 69
4. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: Salmonella. Rev 07/2020
5. Buchan BW *et al.* *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G *et al.* editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
6. 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.
7. Bockemühl, J. 1992. *Enterobacteriaceae*. In: Burkhardt, F. (ed.). Mikrobiologische Diagnostik. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
8. Peterz M, Wiberg C, Norberg P. The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of salmonella in home-made and in commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. J Appl Bacteriol. 1989 Jun;66(6):523-8.
9. 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	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile Lato superiore
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
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	04/2021

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

