

LISTERIA FRASER BROTH BASE

LISTERIA FRASER SUPPLEMENT (FE AMMONIUM CITRATE)

Terreno di coltura in polvere e supplemento

LISTERIA FRASER BROTH

Terreno pronto all'uso in fialone e provetta

1 – DESTINAZIONE D'USO

Listeria Fraser Broth Base, con l'aggiunta di citrato di ammonio ferrico, viene utilizzato per l'arricchimento secondario nella procedura di rilevamento di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. in campioni della catena alimentare (ISO 11290-1).

2 – COMPOSIZIONE

LISTERIA FRASER BROTH BASE, TERRENO DISIDRATATO

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Digerito enzimatico di tessuto animale	5,000 g
Digerito enzimatico di caseina	5,000 g
Estratto di carne	5,000 g
Estratto di lievito	5,000 g
Sodio cloruro	20,000 g
Sodio fosfato bibasico anidro*	9,500 g
Potassio fosfato monobasico	1,350 g
Esculina	1,000 g
Litio cloruro	3,000 g
Acido nalidissico	20,00 mg
Acriflavina HCl	25,00 mg

LISTERIA FRASER BROTH, TERRENO PRONTO IN FLACONE E PROVETTA

FORMULA TIPICA PER LITRO

Digerito enzimatico di tessuto animale	5,000 g
Digerito enzimatico di caseina	5,000 g
Estratto di carne	5,000 g
Estratto di lievito	5,000 g
Sodio cloruro	20,000 g
Sodio fosfato bibasico anidro*	9,500 g
Potassio fosfato monobasico	1,350 g
Esculina	1,000 g
Litio cloruro	3,000 g
Acido nalidissico	20,00 mg
Acriflavina	25,00 mg
Ferro Ammonio Citrato	0,500 g

*equivalenti a 12 g Sodio fosfato bibasico biidrato

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

LISTERIA FRASER SUPPLEMENT (FE AMMONIUM CITRATE)

CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO

cod. 4240056

Ferro Ammonio Citrato 0,25 g

CONTENUTO DELLA FIALA PER 5 L

cod.42185056 e 42185056A

2,5 g

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Nonostante il miglioramento delle misure di controllo a partire dagli anni '90 abbia ridotto in modo significativo la prevalenza di *L. monocytogenes* in molte categorie di alimenti, in particolare nella carne e nei prodotti a base di carne, essa rimane una causa significativa di malattie di origine alimentare.¹

L'identificazione prevede tradizionalmente metodi di coltura basati su arricchimento selettivo e colture in piastra, seguiti dalla caratterizzazione di *Listeria* spp. in base alla morfologia delle colonie, alla fermentazione degli zuccheri e alle proprietà emolitiche.²

I protocolli ISO,^{3,4} FDA,⁵ USDA-FSIS⁶ differiscono per quanto riguarda i terreni di coltura raccomandati, ma tutti prevedono una o più fasi di arricchimento seguite da semina in piastra in uno o due terreni di isolamento selettivi. Il Fraser Broth è stato sviluppato da Judy A. Fraser e William H. Sperberby⁷ modificando il brodo di arricchimento secondario USDA con l'aggiunta di cloruro di litio e citrato di ammonio ferrico. L'efficacia del Fraser Broth è stata documentata analizzando un'ampia gamma di campioni alimentari e ambientali provenienti da impianti di trasformazione alimentare.

Listeria Fraser Broth Base contiene tutti gli ingredienti di base, ad eccezione del citrato di ammonio ferrico che è contenuto nel supplemento liofilizzato che consente di preparare il terreno di coltura completo Fraser Broth. L'acriflavina e l'acido nalidissico, essendo termostabili, sono inclusi nel terreno di coltura.

Fraser Broth viene utilizzato per l'arricchimento secondario nella procedura per la rilevazione di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. in campioni provenienti dalla catena alimentare, secondo la norma ISO 11290-1.³

I peptoni e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, vitamine, in particolare del gruppo B, e oligoelementi per la crescita microbica; i fosfati sono utilizzati come agenti tampone per controllare il pH del terreno. La selettività è garantita dalla presenza di acido nalidissico, con una marcata attività antibatterica contro i batteri Gram-negativi, e di acriflavina, che inibisce molti batteri Gram-positivi; il cloruro di litio e l'elevata tolleranza al sale (NaCl) di *Listeria* sono utilizzati per inibire la crescita degli enterococchi. Fraser Broth contiene concentrazioni doppie di acriflavina e acido nalidissico rispetto a Half-Fraser Broth. L'esculina viene idrolizzata in glucosio e aesculetina (6-7-diidrossicumarina): l'aesculetina reagisce con i sali di ferro presenti nel terreno di coltura, conferendo un colore marrone-nero.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 27,5 g in 500 mL (o 275 g in 5 litri) di acqua fredda purificata. Riscaldare fino all'ebollizione con frequente agitazione per sciogliere completamente la polvere. Autoclavare a 121°C per 15 minuti e raffreddare a 25-50°C. A 500 mL di terreno aggiungere il contenuto di una fiala di Listeria Fraser Supplement (Fe Ammonium Citrate) (REF 4240056) ricostituita con 5 mL di acqua purificata sterile. A 5 litri di terreno di coltura aggiungere il contenuto di una fiala di Listeria Fraser Supplement (Fe Ammonium Citrate) (REF 42185056 o 42185056A) ricostituita con 20 mL di acqua depurata sterile. Mescolare bene e dispensare in flaconi o provette sterili in condizioni asettiche.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

Fine granulometria omogenea, beige

Aspetto della soluzione e del terreno in provetta

giallo-marrone, trasparente

Aspetto del supplemento liofilizzato

pastiglia bassa e soffice, dopo ricostituzione soluzione marrone opalescente

pH (20-25 °C)

7,2 ± 0,2



6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Listeria Fraser Broth Base	Terreno in polvere	4015962	500 g (9,1 L)
		4015964	5 kg (91 L)
Listeria Fraser Supplement (Fe Ammonio Citrato)	Supplemento disidratato	4240056	10 flaconi ciascuno x 500 mL di terreno
Listeria Fraser Supplement (Fe Ammonio Citrato)	Supplemento disidratato	42185056	1 flacone per 5 mL di terreno
Listeria Fraser Supplement (Fe Ammonio Citrato)	Supplemento disidratato	42185056A	9 flaconi, ciascuno x 5 L di terreno
Listeria Fraser Broth	Flaconi pronti all'uso	5115962	6 x 90 mL
		5115963	6 x 225 mL
		5115964	6 x 200 mL
Listeria Fraser Broth	Provette pronte all'uso	551596	20 x 10 mL
		551596N	20 x 9 mL

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

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

8 – CAMPIONI

Alimenti, prodotti di origine animale, campioni della catena alimentare e ambientali. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.^{3,4}

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI
Rilevazione di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp (ISO 11290-1)³

- In generale, per preparare la sospensione iniziale, aggiungere una porzione di campione di 25 g o 25 mL a 225 g o 225 mL di brodo Half-Fraser, per ottenere una diluizione di 1:10, e omogeneizzare.
- Incubare il terreno di arricchimento primario a 30 °C ± 1 °C per 25 h ± 1 h.
- Trasferire 0,1 mL di coltura in una provetta o flacone contenente 10 mL di terreno di arricchimento secondario (Fraser Broth) e incubare per 24 h ± 2 h a 37 °C ± 1°C. Nel caso di rilevamento di *Listeria* spp. diverse da *Listeria monocytogenes*, un'ulteriore incubazione di 24 ore può consentire il recupero di altre specie.
- Dalla coltura di arricchimento primaria inoculare, mediante un'ansa, la superficie del primo terreno di coltura selettivo (Agar Listeria secondo Ottaviani e Agosti-ALOA, REF 401605), per ottenere colonie ben separate. Procedere allo stesso modo con il secondo terreno di coltura selettivo scelto (ad esempio, PALCAM o Oxford Agar, REF 401604 o 401600).
- A partire dal terreno di arricchimento secondario, ripetere la procedura con i due terreni di coltura selettivi.
- Incubare le piastre ALOA a 37°C ± 1°C per 24 ± 2 ore; se non c'è crescita o non ci sono colonie tipiche, reincubare per altre 24 ± 2 ore.
- Incubare il secondo terreno di coltura secondo le istruzioni per l'uso.
- Esaminare le piastre per verificare la presenza di colonie presuntive di *L. monocytogenes* o *Listeria* spp.

Note

È possibile conservare a +5 °C il campione pre-arricchito dopo l'incubazione e prima del trasferimento in Fraser broth per massimo 72 h. Half Fraser broth e Fraser broth possono essere conservati a +5 °C prima dell'isolamento su agar selettivo per massimo 72 ore. Dopo l'incubazione, le piastre di ALOA possono essere refrigerate a +5 °C per un massimo di 48 ore prima della lettura.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, tipicamente *Listeria* spp. produce un annerimento dei due brodi di arricchimento.

Dopo la subcoltura e l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie sui terreni di coltura.

Con le piastre ALOA, considerare come presunte *L. monocytogenes* le colonie blu-verdi circondate da un alone opaco; considerare presuntivamente *Listeria* spp. le colonie blu-verdi con o senza alone opaco.

Secondo terreno di coltura: esaminare la presenza di colonie tipiche in base alle caratteristiche del terreno scelto.

Confermare le colonie tipiche con i metodi e i test indicati nella norma ISO 11290-1 o ISO 11290-2, dopo la purificazione delle colonie in Tryptic Soy Yeast Extract Agar (REF 402166).

I test di conferma obbligatori per *L. monocytogenes*, secondo la norma ISO 11290 e utilizzando il terreno ALOA, sono i seguenti: β-emolisi (+), utilizzo dei carboidrati (L-rhamnose +; D-xilosio -). I test di conferma facoltativi per *L. monocytogenes* sono: catalasi (+), mobilità a 25°C (+), CAMP Test (+). I test di conferma obbligatori per *Listeria* spp. sono: esame microscopico, catalasi (+); i test facoltativi sono: VP (+), mobilità a 25°C (+).

È possibile utilizzare gallerie miniaturizzate per l'identificazione biochimica di *L. monocytogenes* (Listeria Monoconfirm Test REF 193000).

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, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi utili per il controllo qualità.³

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932+	37°C / 24h / A	> 10 colonie tipiche dopo coltura su ALOA
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212+		
<i>E. coli</i> ATCC 25922		
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 7973+	37°C / 24h / A	> 10 colonie tipiche dopo coltura su ALOA
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212+		
<i>E. coli</i> ATCC 25922		
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	37°C / 24h / A	< 100 colonie dopo coltura su TSA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	37°C / 24h / A	totalmente inibito dopo coltura su TSA

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





12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Listeria Fraser Broth Base disidratato, addizionato con Listeria Fraser Supplement-Fe Ammonium Citrate (REF 4240056), 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 opportune diluizioni decimali degli organismi target nelle provette, incubando a 37°C per 24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita nel lotto di riferimento (G_{RB}) e nel lotto di prova (G_{TB}). La produttività è testata con i seguenti ceppi target: *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. monocytogenes* ATCC 13932. L'indice di produttività $G_{RB}-G_{TB}$ per ciascun ceppo di prova deve essere ≤ 1 e le provette devono presentare annerimento.

La produttività e la selettività sono testate insieme a miscele di ≤ 100 UFC di organismi target e ≥ 1000 UFC di organismi non target per provetta, incubando a 37°C per 24 ore. Miscele di ceppi target e non target: *L. monocytogenes* ATCC 13932 + *E. coli* ATCC 25922 + *E. faecalis* ATCC 29212 e *L. monocytogenes* NCTC 7973 + *E. coli* ATCC 25922 + *E. faecalis* ATCC 29212. Dopo l'incubazione delle provette inoculate e la subcoltura su piastre ALOA, i ceppi target mostreranno più di 10 colonie per piastra.

Inoltre, la selettività viene testata inoculando ≥ 1000 UFC per provetta dei seguenti ceppi non target: *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. coli* ATCC 25922. Dopo l'incubazione *E. faecalis* mostra una crescita con meno di 100 UFC dopo la subcoltura su Tryptic Soy Agar mentre *E. coli* è totalmente inibito. La selettività è testata anche con il ceppo non target *C. albicans* ATCC 18804 mediante il metodo delle diluizioni ad estinzione: il ceppo è totalmente inibito.

13 – LIMITI DEL METODO

- Dopo 40 ore di incubazione per alcuni enterococchi possono essere osservate una scarsa crescita e una debole reazione dell'esculina.
- Poiché possono crescere specie di *Listeria* diverse da *L. monocytogenes*, l'identificazione di *Listeria monocytogenes* deve essere confermata da test adeguati.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura ed il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi devono essere maneggiati con adeguate protezioni. 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 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 all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Provette e flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire a sufficienza per sciogliere tutto il terreno di coltura.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la liquefazione del terreno in flacone. Non mettere le beute calde in un bagno di ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento, poiché ciò potrebbe causare crepe nel vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno in flacone può variare notevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume della bottiglia.
- Una volta liquefatto, il terreno in flacone non può essere solidificato e disciolto una seconda volta.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura in polvere, 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.
- 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

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).

Supplemento liofilizzato

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 preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

Provette e Flaconi pronti all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni i flaconi sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. I flaconi estratti dal confezionamento secondario possono





essere utilizzati sino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere usati immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare i flaconi con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

16- BIBLIOGRAFIA

- Buchanana RL *et al.* A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments Food Control Volume 75, May 2017, Pages 1-13
- Gasnov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiol Rev. 2005 Nov;29(5):851-75
- ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method.
- ISO 11290-2:2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 2: Enumeration method.
- U.S. Department of Health and Human Services, F.D.A. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods, April 2022.
- USDA-FSIS. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-To-Eat, Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Samples. MLG 8.13, 10/01/2021
- Fraser JA, Sperber WH. Rapid Detection of *Listeria* spp. in Food and Environmental Samples by Esculin Hydrolysis. J Food Prot 1988 Oct;51(10):762-765.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	Fabbricante	Utilizzare entro	Proteggere dall'umidità	Fragile, maneggiare con cura
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Lato superiore	Proteggere dalla luce	Non riutilizzare

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del layout	02/2023
Revisione 7	Aggiornamento del contenuto	06/2024

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

