



# LISTERIA UVM1 ENRICHMENT BROTH

Terreno di coltura in polvere e terreno pronto all'uso

## 1 - DESTINAZIONE D'USO

Brodo di arricchimento primario per la procedura di isolamento e identificazione di *Listeria monocytogenes* negli alimenti secondo USDA-FSIS.

## 2 - COMPOSIZIONE\*

(PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA)

Proteose Peptone	5,000 g
Tryptone	5,000 g
Estratto di lievito	5,000 g
Estratto di carne	5,000 g
Sodio cloruro	20,000 g
Sodio fosfato bibasico	12,000 g
Potassio fosfato monobasico	1,350 g
Esculina	1,000 g
Acido nalidissico	0,020 g
Acridina	0,012 g

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

## 3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Nonostante le maggiori misure di controllo a partire dagli anni '90 abbia ridotto in modo significativo la contaminazione di *L. monocytogenes* in molte categorie di alimenti, in particolare nella carne e nei prodotti a base di carne, essa rimane una delle cause più incidenti tra le malattie di origine alimentare.<sup>1</sup>

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

I protocolli ISO, FDA e USDA-FSIS differiscono per quanto riguarda i terreni di coltura raccomandati, ma tutti prevedono una o più fasi di arricchimento seguite da coltura in piastra in uno o due terreni di isolamento selettivi.

Originariamente descritto da Donnelly e Baigent<sup>3</sup>, il terreno modificato dall'Università del Vermont (UVM) è stato modificato da MacCalin e Lee<sup>4</sup> diminuendo la concentrazione di acido nalidissico e aumentando quella di acridina. Il brodo di arricchimento *Listeria* UVM1 corrisponde alla formulazione modificata da MacCalin e Lee e soddisfa i requisiti dell'USDA-FSIS.<sup>5</sup>

*Listeria* UVM1 Enrichment Broth è raccomandato come brodo di arricchimento primario per la procedura di isolamento e identificazione di *Listeria monocytogenes* negli alimenti secondo USDA-FSIS MLG 8.11,<sup>6,7</sup> seguito da un arricchimento secondario in MOPS-BLEB.

I fattori di crescita essenziali per la crescita microbica sono forniti dai peptoni, che sono fonti di azoto, carbonio e minerali, e dall'estratto di lievito, che è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. I fosfati sono utilizzati come agenti tampone per controllare il pH del terreno di coltura. La selettività è garantita dalla presenza di acido nalidissico, con una marcata attività antibatterica contro i batteri Gram-negativi, e di acridina, un derivato dell'acridina con proprietà batteriostatiche nei confronti di molti batteri Gram-positivi e una debole attività antimicotica. L'elevata tolleranza al sale (NaCl) di *Listeria* è utilizzata per inibire la crescita degli enterococchi. L'esculina viene idrolizzata da tutte le specie di *Listeria*.

## 4 - PREPARAZIONE

Sospendere 54,4 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Mescolare accuratamente e riscaldare per sciogliere completamente la polvere. Distribuire un volume adeguato di brodo in beute e autoclavare a 121°C per 15 minuti.

## 5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in provetta	giallo, limpido
pH (20-25°C)	7,2 ± 0,2

## 6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
<i>Listeria</i> UVM1 Enrichment Broth	Terreno di coltura in polvere	4015982	500 g (9.2 L)
		4015984	5 kg (92L)
<i>Listeria</i> UVM1 Broth	Flaconi pronti all'uso	5115983	6 x 225 mL

## 7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, flaconi o provette sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

## 8 - CAMPIONI

Carne rossa, pollame, pesci siluriformi, prodotti a base di uova pronti per il consumo e campioni ambientali. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni alimentari, attenersi alle regole di buona pratica di laboratorio e fare riferimento al documento USDA-FSIS MLG 8.11.<sup>6</sup>

## 9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

- Eseguire l'arricchimento primario aggiungendo 225 mL di *Listeria* UVM1 Enrichment Broth a 25 g o 25 mL di campione. Omogeneizzare per 2 minuti e incubare a 30° ± 2°C per 20-26 ore.
- Trasferire 0,1 mL di brodo UVM in 10 mL di MOPS-BLEB (REF 401601M) e incubare a 35° ± 2°C per 18-24 ore.
- Allo stesso tempo, dal brodo di arricchimento primario, trasferire 0,1 mL su una piastra di terreno MOX (401601 *Listeria* Oxford Agar Base + 4240039 MOX COL Selective Supplement) e incubare a 35° ± 2°C per 24-28 ore.





4. Utilizzare la coltura in MOPS-BLEB per inoculare una seconda piastra di terreno MOX (solo per la procedura di coltura) o per la rilevazione molecolare di *Listeria monocytogenes*.

#### 10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, *Listeria* spp. produce una torbidità nel brodo di arricchimento.

Dopo la subcoltura sul terreno di coltura e l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie. Seguire la procedura descritta dal metodo USDA-FSIS MLG 8.11<sup>6</sup> per l'identificazione delle colonie.

#### 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
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	30°C / 24h / A	buona crescita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	30°C / 24h / A	inibito
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	30°C / 24h / A	parzialmente inibito

A: incubazione in aerobiosi; 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 *Listeria* UVM1 Enrichment Broth disidratato e pronto all'uso viene testato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con il metodo della diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate di organismi target in provette, incubando a 30°C per 24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel lotto di riferimento ( $G_{RB}$ ) e nel lotto di prova ( $G_{TB}$ ). La produttività viene 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 in esame 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, incubate a 30°C per 24 ore. Miscele di ceppi target e non target: *L. monocytogenes* ATCC 19111 + *E. coli* ATCC 25922 + *E. faecalis* ATCC 29212. Dopo l'incubazione delle provette inoculate e la subcoltura su piastre PALCAM, i ceppi target mostrano più di 10 colonie per piastra.

Inoltre, la selettività viene testata inoculando circa 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 inibita. La selettività è stata testata anche con il ceppo non target *C. albicans* ATCC 18804 con il metodo della diluizioni ad estinzione: il ceppo è totalmente inibito.

#### 13 – LIMITI DEL METODO

- Poiché possono crescere specie di *Listeria* diverse da *L. monocytogenes*, l'identificazione di *Listeria monocytogenes* deve essere confermata da test adeguati.
- Le tecniche per la rilevazione di *Listeria* negli alimenti variano a seconda del materiale in esame e delle leggi locali. Per le procedure complete, consultare i vari compendi o le normative nazionali.

#### 14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura e le provette pronte all'uso 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
- I terreni disidratati 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](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.
- Applicare le buone pratiche di fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- I flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave.
- 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

##### 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).

### 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).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni 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).

### 16 - BIBLIOGRAFIA

1. 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
2. Gasanov 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
3. Donnelly CW, Baigent GJ. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. Appl Environ Microbiol 1986; 52:689.
4. McClain D, Lee WH. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry J Ass Off Assol Chem. 1988; 71: 660
5. Laboratory Guidebook, Notice of Change: Media and Reagents. USDA-FSIS, Chapter MLG Appendix 1.09, 12/29/2017.
6. Laboratory Guidebook, Notice of Change: Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Meat, Poultry, Ready to Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. USDA-FSIS, Chapter MLG 8.11, 1/02/2019.
7. Laboratory Guidebook, Notice of Change: Flow Chart Specific for FISI Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* - Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* (Culture Method only). USDA-FSIS, Chapter MLG 8 Appendix 1.4, 1/02/2019.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT 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 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	02/2023

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

