

LISTERIA ENRICHMENT BROTH

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Brodo di arricchimento selettivo per la procedura di isolamento e identificazione di *Listeria monocytogenes* in campioni alimentari e ambientali.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglimento IN ACQUA *

Idrolisato triptico di caseina	17,0 g
Peptone di soia	3,0 g
Estratto di lievito	6,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Glucosio	2,5 g
Potassio fosfato bibasico	2,5 g
Acriflavina HCl	0,015 g
Acido nalidissico	0,040 g
Cicloesimide	0,050 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Listeria Enrichment Broth (LEB) si basa sulla formula ideata da Lovett *et al.* nel 1987 come alternativa alla procedura di arricchimento a freddo.¹

È stato dimostrato che questo terreno è in grado di recuperare un inoculo inferiore a 10 UFC/mL dal latte crudo.

Il peptone di caseina e il peptone di soia forniscono azoto, nutrienti a base di carbonio e oligoelementi essenziali per la crescita microbica; l'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B, per la stimolazione della crescita. Il glucosio è un carboidrato che aumenta il tasso di crescita di *Listeria*; il fosfato dipotassico è usato come agente tampone per controllare il pH del terreno; il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico. La selettività è garantita dalla cicloesimide, un composto antimicotico, dall'acido nalidissico con una marcata attività antibatterica contro i batteri Gram-negativi e dall'acriflavina, un derivato dell'acridina con proprietà batteriostatiche nei confronti di molti batteri Gram-positivi e una debole attività antifungina. Poiché tutti questi antimicrobici sono termostabili, vengono inclusi nel terreno di coltura in polvere e possono essere sterilizzati in autoclave.^{2,3}

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 36,1 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Mescolare accuratamente e riscaldare per sciogliere completamente la polvere. Distribuire e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione	giallo chiaro, limpida
pH finale (20-25 °C)	7,3 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Listeria Enrichment Broth	Terreno di coltura in polvere	4016012	500 g (13,8 L)
		4016014	5 kg (138,5L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

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

8 – CAMPIONI

Alimenti, prodotti lattiero-caseari, campioni 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.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

- Aggiungere una porzione di 25 g o 25 mL di campione a 225 mL di Listeria Enrichment Broth e omogeneizzare.
- Incubare a 30 °C per 48 ore.
- Trasferire un'ansata il brodo di arricchimento su uno o più terreni di coltura (ad es. piastre ALOA, Oxford o PALCAM).
- Incubare le piastre di agar a 37 °C per 24-24 ± 2 ore.

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 dagli standard internazionali per l'identificazione delle colonie.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono messi in vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utente finale può 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.²



CEPPI DI CONTROLLO
L. monocytogenes ATCC 19111
S. aureus ATCC 25923

INCUBAZIONE T°/ T - ATM
30°C / 48h / A
30°C / 48h / A

RISULTATI ATTESI
crescita
inibito

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 Enrichment Broth disidratato viene sottoposto a test di produttività e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate di organismi target in provette, incubando a 30°C per 48 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel lotto di riferimento (Gr_{RB}) e nel lotto di prova (Gr_{TB}). La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. monocytogenes* ATCC 13932. L'indice di produttività Gr_{RB}/Gr_{TB} per ciascun ceppo in esame deve essere ≤ 1 .

La produttività e la selettività sono testate insieme in una miscela di circa 100 UFC di organismi target e 1000 UFC di organismi non target per provetta, incubate a 30°C per 48 ore. Miscela 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 ALOA, 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 inferiore a 100 UFC dopo la subcoltura su Tryptic Soy Agar, mentre *E. coli* è totalmente inibito. La selettività è stata testata anche con il ceppo non target *C. albicans* ATCC 18804 con il metodo delle diluizioni a estinzione: il ceppo è totalmente inibito.

13 – LIMITE DEL METODO

- Poiché possono crescere specie di *Listeria* diverse da *L. monocytogenes*, l'identificazione di *L. monocytogenes* deve essere confermata da test adeguati.
- Le cellule di *Listeria* danneggiate possono non crescere su questo terreno.⁴
- 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 è destinato al controllo microbiologico ed è 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
- *Listeria* Enrichment Broth deve essere maneggiato 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.
- Applicare le Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura preparati.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area 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.
- 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

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'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).

16 - REFERENCES

1. Lovett J, Francis DW, Hunt JM. *Listeria monocytogenes* in Raw Milk: Detection, Incidence, and Pathogenicity. *J Food Prot* 1987; 50:188-19
2. Martindale The Extra Pharmacopoeia (1982) Twenty-eighth Edition. The Pharmaceutical Press, London.
3. Haley, L.D., Trandel, J.B., Coyle, M.B. (1980) Practical methods for culture and identification of fungi in the clinical microbiological laboratory. Cumitech n. 11, ASM, Washington, D.C.
4. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods 4th ed.





TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	o REF	 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	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	03/2023
Revisione 5	Temperatura di sterilizzazione	05/2025

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

