

LISTERIA OXFORD AGAR BASE

LISTERIA OXFORD ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

LISTERIA MOX-COL ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

LISTERIA SELECTIVE AGAR (OXFORD)

Terreno di coltura in polvere



Oxford Medium: colonie di *Listeria monocytogenes*

1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno di base selettivo e differenziale, supplementi selettivi e piastre pronte all'uso per l'isolamento e il conteggio di *Listeria* spp. da campioni alimentari.

2 - COMPOSIZIONE

LISTERIA OXFORD AGAR BASE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Peptocomplex	10,00 g
Triptosio	10,00 g
Peptone	3,00 g
Amido di mais	1,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Litio Cloruro	15,00 g
Esculina	1,00 g
Fe-ammonio citrato	0,50 g
Agar	12,00 g

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

LISTERIA MOX-COL ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO)

Moxalactam	10,0 mg
Colistina solfato	5,0 mg

LISTERIA OXFORD ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

(CONTENUTO DELLA FIALA PER 500 ML DI TERRENO)

Cicloeximide	200,0 mg
Colistina solfato	10,0 mg
Cefotetan	1,0 mg
Fosfomicina	5,0 mg
Acridavina	2,5 mg

LISTERIA SELECTIVE AGAR (OXFORD)

(PIASTRE PRONTE ALL'USO)

Listeria Oxford Agar Base	1000 mL
Cicloeximide	400,0 mg
Colistina solfato	20,0 mg
Cefotetan	2,0 mg
Fosfomicina	10,0 mg
Acridavina	5,0 mg

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Sebbene il miglioramento delle misure di controllo a partire dagli anni '90 abbia ridotto significativamente 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 colturali basati sull'arricchimento selettivo e la subcoltura su terreni cromogenici e contenenti esculina seguiti dalla caratterizzazione di *Listeria* spp. basato sulla morfologia delle colonie, sulla fermentazione degli zuccheri e sulle proprietà emolitiche.²

Listeria Oxford Agar Base è un terreno a base di esculina preparato senza antibiotici e acridavina; può essere utilizzato con Listeria Oxford Antimicrobic Supplement o con Listeria MOX-COL Antimicrobic Supplement per l'isolamento e la conta di *Listeria* spp. nei prodotti alimentari. Il terreno completo noto come "Oxford Medium" è preparato secondo la formula sviluppata da Curtis et al.³ ed è raccomandato da FDA-BAM⁴ come uno degli agar selettivi per *Listeria* a base di esculina e può essere utilizzato come secondo terreno di isolamento come raccomandato da ISO 11290-1.⁵

Il terreno Oxford completo contiene peptoni che forniscono azoto, carbonio e minerali per la crescita microbica. La selettività è data dalla presenza di cloruro di litio, attivo contro gli streptococchi, cicloeximide attiva contro lieviti e muffe, cefotetan e fosfomicina attivi su batteri Gram-positivi e Gram-negativi. L'esculina ed il ferro ammonio citrato fungono da sistema indicatore: *Listeria* spp. idrolizza l'esculina, producendo zone nere attorno alle colonie a causa della formazione di composti fenolici di ferro derivati dall'aglucone.

Il terreno "MOX" è una modifica della formulazione descritta da McClain e Lee⁶, con una ridotta concentrazione di moxalactam per ottenere una migliore crescita di *Listeria* spp. È raccomandato da USDA-FSIS^{7,8} e FDA-BAM² per il rilevamento di *L.monocytogenes*. La formulazione MOX, con moxalactam, colistina e cloruro di litio, è considerata maggiormente inibitoria verso gli stafilococchi resistenti alla meticillina e *Proteus* spp.

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 28,7 g di terreno disidratato in 500 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione agitando frequentemente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C.

Oxford medium

Aggiungere il contenuto di una fiala di Listeria Oxford Antimicrobic Supplement (REF 4240038) ricostituito con 5 mL di una soluzione di etanolo 1:1/acqua purificata sterile, in condizioni asettiche. Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

MOX-COL medium

Aggiungere il contenuto di una fiala di Listeria MOX-COL Antimicrobic Supplement (REF 4240039) ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile, in condizioni asettiche. Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.



5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Listeria OXFORD Medium

Aspetto della polvere

Aspetto della soluzione e delle piastre

pH finale (20-25 °C)

Fine granulometria omogenea, beige

ambrato, leggermente opalescente con un anello blu sulla superficie del liquido

7,0 ± 0,2

Listeria OXFORD Antimicrobial Supplement

Aspetto del supplemento liofilo

Aspetto del supplemento ricostituito

pastiglia bassa e friabile giallo-arancio

soluzione limpida di colore giallo-arancio

Listeria MOX-COL Antimicrobial Supplement

Aspetto del supplemento liofilo

Aspetto del supplemento ricostituito

pastiglia bassa e friabile di colore bianco

soluzione limpida e incolore

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Listeria Oxford Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4016002	500 g (8.7 L)
Listeria Oxford Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4016004	5 kg (87 L)
Listeria Oxford Antimicrobial Supplement	Supplemento disidratato	4240038	10 fiale, ciascuna per 500 mL di terreno
Listeria MOX-COL Antimicrobial Supplement	Supplemento disidratato	4240039	10 fiale, ciascuna per 500 mL di terreno
Listeria Oxford Selective Agar	Piastre pronte all'uso	541600	2 x 10 piastre ø 90 mm

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

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

8 – CAMPIONI

Campioni di alimenti, mangimi e della catena alimentare. 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

Eseguire l'arricchimento selettivo del campione con i brodi consigliati dal metodo di analisi scelto.

Generalmente, il brodo di arricchimento primario viene incubato a 30°C e il brodo di arricchimento secondario viene incubato a 37°C per 24 ore. I brodi di arricchimento consigliati dalla norma ISO 11290-1 sono Half Fraser Broth e Fraser Broth; i brodi selettivi indicati da USDA-FSIS sono UVM1 e MOPS-BLEB, mentre FDA-BAM comprende un solo terreno, Buffered Listeria Enrichment Broth senza e con agenti selettivi, con incubazione a 30°C per 48 ore.

Strisciare un'ansata del brodo arricchito incubato sulla superficie di una piastra di terreno Oxford o di terreno MOX-COL e di una piastra ALOA per ottenere colonie ben isolate. Esaminare le piastre dopo l'incubazione a 37°C per 24 ± 2 ore e dopo 48 ± 4 ore.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, le colonie tipiche delle specie *Listeria* hanno un diametro di circa 1 mm, grigio-marrone con alone marrone o nero. Dopo 48 ore di incubazione, le colonie tipiche delle specie *Listeria* hanno un diametro di circa 2-3 mm, nere con un alone nero e il centro infossato.

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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T - ATM	RISULTATI ATTESI
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	37°C / 48 H / A	colonie grigie con alone marrone-nero
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	37°C / 48 H / A	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 di terreno disidratato e pronto per l'uso e dei supplementi viene testato in termini di produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato e con Tryptic Soy Agar.

La produttività viene testata mediante un test quantitativo con i ceppi target *L. monocytogenes* ATCC 13932 e *L. monocytogenes* ATCC 19111: le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 35-37°C per 48 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: CFU_{TB}/CFU_{TSA}). Se Pr è ≥ 0,5 e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici (colonie grigie con alone nero-marrone) i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche. Inoltre, le caratteristiche di produttività vengono testate mediante tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi target: *L. innocua* ATCC 33090 e *L. ivanovii* ATCC 19119. La quantità di crescita e le caratteristiche delle colonie vengono valutate dopo incubazione a 35-37°C per 48 ore: *L. innocua* e *L. ivanovii* mostrano una buona crescita dopo 48 ore di incubazione con colonie grigie con alone nero-marrone.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato della goccia in superficie, inoculando le piastre con adeguate diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione McFarland 0,5 dei ceppi non target *E. faecalis* ATCC 19433, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 10231. Dopo incubazione a 37°C per 48 ore, la crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

13 – LIMITE DEL METODO

- Il terreno Oxford non consente la differenziazione di *L. monocytogenes* da altre specie del genere *Listeria*.
- L'identificazione di *L. monocytogenes* deve essere confermata da test idonei.

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
- Il terreno di base e i supplementi devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte.
- Il terreno di base e i supplementi contenenti antibiotici 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.
- Applicare le Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura preparati.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Gli integratori selettivi vengono sterilizzati mediante filtrazione su membrana.
- Fare attenzione quando si apre l'anello metallico delle fiale degli integratori per evitare lesioni.
- 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

Piastre pronte all'uso

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. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

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).

Supplementi selettivi

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).

16 - REFERENCES

1. Buchanan 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. Curtis GDW, Mitchell RG, King AF, Emma J. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol 1989; 8:95-98.
4. 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.
5. 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.
6. Mc Clain 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
7. 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
8. Laboratory Guidebook, Notice of Change: Media and Reagents. USDA-FSIS, Chapter MLG Appendix 1.09, 12/29/201
9. Curtis GDW, Baird RM. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology: Additional Monographs (II). Proceedings of the 6th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Heidelberg 30 March-3 April, 1992. Int J Food Microbiol 1993; 17:222-4.



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	 Monouso

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del Layout	02/2022
Revisione 6	Riorganizzazione e modifica delle sezioni 2, 3, 9, 11, 16; inserimento della sezione "Caratteristiche delle prestazioni".	08/2022

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

