

# FRASER BROTH BASE FRASER SELECTIVE SUPPLEMENT FRASER HALF SELECTIVE SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere e supplementi selettivi



Fraser Broth: sulla sinistra, provetta non inocolata; sulla destra, provetta inocolata con *L. monocytogenes*.

## 1 – DESTINAZIONE D'USO

Con l'aggiunta di supplementi selettivi, Fraser Broth Base viene utilizzato per l'arricchimento primario e secondario nella procedura per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. nei campioni della catena alimentare (ISO 11290-1) e per la preparazione dei campioni nella procedura di conteggio (ISO 11290-2).

## 2 – COMPOSIZIONE

### FRASER BROTH BASE, TERRENO DISIDRATATO

#### FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA \*

Digerito enzimatico di tessuto animale	5,00 g
Digerito enzimatico di caseina	5,00 g
Estratto di carne	5,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Sodio cloruro	20,00 g
Sodio fosfato bibasico biidrato°	12,00 g
Potassio fosfato monobasico	1,35 g
Esculina	1,00 g
Litio cloruro	3,00 g

° equivalenti a 9.6 g di sodio fosfato bibasico anidro

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

### FRASER HALF SELECTIVE SUPPLEMENT (FIALA PER 225 ML DI TERRENO)

Ferro Ammonio Citrato	112,50 mg
Acido nalidissico	2,25 mg
Acriflavina HCl	2,81 mg

### FRASER SELECTIVE SUPPLEMENT (FIALA PER 500 ML DI TERRENO)

Ferro Ammonio Citrato	250 mg
Acido nalidissico	10 mg
Acriflavina HCl	12,5 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.<sup>1</sup>

L'identificazione prevede tradizionalmente metodi di coltura basati sull'arricchimento selettivo e piastramento diretto seguiti dalla caratterizzazione di *Listeria* spp. in base alla morfologia della colonia, alla fermentazione degli zuccheri e alle proprietà emolitiche.<sup>2</sup>

I protocolli ISO,<sup>3,4</sup> FDA,<sup>5</sup> USDA-FSIS<sup>6</sup> differiscono per i terreni di coltura consigliati, ma prevedono tutti uno o più passaggi di arricchimento seguiti dalla semina in uno o due terreni di isolamento selettivi.

Fraser Broth è stato sviluppato da Judy A. Fraser e William H. Sperberby<sup>7</sup> mediante una modifica del brodo di arricchimento secondario USDA, attraverso l'aggiunta di cloruro di litio e citrato di ammonio ferrico. L'efficacia di Fraser Broth è stata documentata testando un'ampia gamma di campioni alimentari e ambientali provenienti da impianti di trasformazione alimentare.

Fraser Broth Base contiene tutti gli ingredienti di base ad eccezione di ferro ammonio citrato, acriflavina e acido nalidixico che sono contenuti in supplementi selettivi che consentono la preparazione dei due terreni completi Half-Fraser Broth e Fraser Broth.

Half-Fraser Broth e Fraser Broth sono utilizzati per l'arricchimento primario e secondario, nella procedura per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. nei campioni della catena alimentare secondo ISO 11290-1.<sup>3</sup> Half-Fraser Broth può essere utilizzato per la preparazione del campione nella procedura di conteggio secondo ISO 11290-2.<sup>4</sup>

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 usati come agenti tampone per controllare il pH nel terreno. La selettività è data dalla presenza di acido nalidissico con spiccata attività antibatterica nei confronti principalmente di batteri Gram-negativi e di acriflavina che inibisce molti batteri Gram-positivi; il cloruro di litio e l'elevata tolleranza al sale (NaCl) della *Listeria* sono utilizzati per inibire la crescita degli enterococchi. Half-Fraser Broth contiene la metà delle concentrazioni di acriflavina e acido nalidissico rispetto a Fraser Broth. L'esculina viene idrolizzata a glucosio ed esculetina (6-7-diidrossicumarina): l'esculetina reagisce con i sali di ferro nel terreno, conferendogli un colore bruno-nero. Poiché tutta la *Listeria* spp. idrolizza l'esculina, le colture che non anneriscono possono essere considerate prive di *Listeria*.<sup>7</sup>

## 4 – PREPARAZIONE

### HALF-FRASER BROTH

Sospendere 12,91 g di Fraser Broth Base in 225 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione per sciogliere completamente la polvere. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente e aggiungere il contenuto di una fiala di Fraser Half Selective Supplement (codice 4240044) ricostituito con 3 mL di una soluzione 1:1 etanolo/acqua distillata sterile.

### FRASER BROTH

Sospendere 28,7 g di Fraser Broth Base in 500 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione per sciogliere completamente la polvere. Autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente aggiungere il contenuto di una fiala di Fraser Selective Supplement (codice 4240043) ricostituito con 5 mL di una soluzione 1:1 etanolo/acqua distillata sterile.

Mescolare bene e versare in provette o flaconi sterili in condizioni asettiche.



**5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO**

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in provetta e in flacone	marrone-giallo, limpido
Aspetto del supplemento liofilizzato	compressa bassa e fragile di colore giallo ocra, soluzione giallo ocra opalescente dopo la ricostituzione.
pH (20-25 °C)	7,2 ± 0,2

**6 – MATERIALI FORNITI**

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Fraser Broth Base	Terreno in polvere	4014952	500 g (8.7 L)
		4014954	5 kg (87 L)
Fraser Selective Supplement	Supplemento liofilo	4240043	10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno
Fraser Half Selective Supplement	Supplemento liofilo	4240044	10 flaconi, ciascuno per 225 mL di terreno

**7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI**

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

**8 – CAMPIONI**

Alimenti, materie prime animali, filiera alimentare e campioni ambientali. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.<sup>3,4</sup>

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

- In generale, per preparare la sospensione iniziale, aggiungere una porzione di 25 g o 25 mL del materiale da testare a 225 mL di Half-Fraser Broth, per ottenere una diluizione dieci volte superiore, e omogeneizzare.
- Incubare il terreno di arricchimento primario a 30 °C ± 1 °C per 25 h ± 1 h.
- Trasferire 0,1 mL della 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 *Listeria* spp. oltre al rilevamento di *Listeria monocytogenes*, un'ulteriore incubazione di 24 ore può consentire il recupero di più specie.
- Dalla coltura di arricchimento primaria inoculare, mediante un'ansa, la superficie del primo terreno di semina selettivo, Agar *Listeria* secondo Ottaviani e Agosti (ALOA) (REF 401605), per ottenere colonie ben separate. Procedere allo stesso modo con il secondo terreno di semina selettivo scelto (ad es. PALCAM o Oxford Agar, REF 401604 o 401600).
- Dal terreno di arricchimento secondario, ripetere la procedura con i due terreni di semina selettivi.
- Incubare le piastre ALOA a 37°C ± 1°C per 24 ± 2 ore; in assenza di crescita o di colonie tipiche, incubare nuovamente per altre 24 ± 2 ore.
- Incubare il secondo terreno di semina secondo le istruzioni per l'uso
- Esaminare le piastre per la presenza di presunte colonie di *L. monocytogenes* o *Listeria* spp.

Note: È possibile conservare a 5 °C il campione pre-arricchito prima del trasferimento in brodo Fraser per un massimo di 72 ore. Il brodo Half-Fraser e il brodo Fraser possono essere refrigerati a 5 °C prima dell'isolamento su agar selettivo per un massimo di 72 ore. Dopo l'incubazione, le piastre di ALOA possono essere refrigerate a 5 gradi centigradi per un massimo di 48 ore prima della lettura.

**Conteggio di *Listeria monocytogenes* e di *Listeria* spp (ISO 11290-2)<sup>4</sup>**

- Preparare una sospensione del campione in Buffered Peptone Water o altro brodo di arricchimento adatto secondo ISO 6887 (tutte le parti); nel caso in cui sia il rilevamento che il conteggio vengano eseguiti secondo le parti 1 e 2 della norma ISO 11290, la sospensione del campione può essere preparata in brodo Fraser (con o senza l'aggiunta del supplemento selettivo).
- Inoculare 0,1 mL della sospensione del campione e 0,1 mL di ulteriori diluizioni decimali su piastre da 90 mm di terreno ALOA.
- Per i campioni con un numero sospetto di ceppi target basso, inoculare 1 mL della sospensione del campione e 1 mL di ulteriori diluizioni decimali su piastre da 140 mm di terreno ALOA.
- Esaminare dopo l'incubazione a 37°C per 24 ± 2 ore e, se non si osserva crescita o colonie tipiche, incubare nuovamente per altre 24 ± 2 ore.
- Contare le colonie di *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. in piastre con meno di 150 colonie (piastre di 90 mm di diametro) o 360 colonie (piastre di 140 mm) come indicato nella sezione "lettura e interpretazione".

**10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Dopo l'incubazione, tipicamente *Listeria* spp. produce un annerimento dei due brodi di arricchimento. Dopo la subcoltura sui terreni selettivi, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

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

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

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

I test di conferma obbligatori per *L. monocytogenes*, secondo ISO 11290 e utilizzando il terreno ALOA, sono i seguenti: β-emolisi (+), utilizzo dei carboidrati (L-ramnosio +; D-xilosio -). I test facoltativi di conferma 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 opzionali sono: VP (+), mobilità a 25°C (+). Possono essere utilizzate gallerie miniaturizzate per l'identificazione biochimica di *Listeria 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.<sup>5</sup>

CEPPO DI CONTROLLO		INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>L.monocytogenes</i> +	ATCC 13932	30 or 37°C / 24h A	> 10 colonie tipiche dopo subcoltura su ALOA
<i>E. faecalis</i> +	ATCC 29212		
<i>E. coli</i>	ATCC 25922		
<i>L.monocytogenes</i> +	NCTC 7973	30 or 37°C / 24h A	> 10 colonie tipiche dopo subcoltura su ALOA
<i>E. faecalis</i> +	ATCC 29212		
<i>E. coli</i>	ATCC 25922		
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	30 or 37°C / 24h A	< 100 colonie dopo subcoltura su TSA
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	30 or 37°C / 24h A	totalmente inibito dopo subcoltura su TSA

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection; NCTC: National Collection of Type Culture; 30°C per Half-Fraser Broth, 37°C per Fraser Broth

## 12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di Fraser Broth Base disidratato addizionato con Fraser Selective Supplement (REF 4240043) 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 della diluizione fino all'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 ( $G_{FRB}$ ) e nel lotto di prova ( $G_{RTB}$ ). La produttività è testata con i seguenti ceppi target: *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. monocytogenes* ATCC 13932. L'indice di produttività  $G_{FRB}-G_{RTB}$  per ciascun ceppo testato deve essere  $\leq 1$  e le provette devono presentare annerimento.

La produttività e la selettività sono testate insieme a miscele di circa  $\leq 100$  UFC di organismi target e  $\geq 1000$  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 incubazione delle provette inoculate e sottocoltura su piastre ALOA, i ceppi bersaglio mostreranno più di 10 colonie per piastra.

Inoltre, la selettività viene testata inoculando  $\geq 1000$  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 triptico Soy Agar mentre *E. coli* è totalmente inibito. La selettività è testata anche con il ceppo non bersaglio *C. albicans* ATCC 18804 mediante il metodo della diluizione fino all'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

- Fraser Broth Base e i supplementi 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 i supplementi 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 contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Fraser e Fraser-Half Supplement sono classificati come pericolosi secondo la normativa vigente. 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.
- Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- I supplementi sono sterilizzati mediante filtrazione su membrana.
- 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](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

### 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).

**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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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
7. 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**

<b>REF</b> o REF Numero di catalogo	<b>LOT</b> 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	

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	01/2023

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

