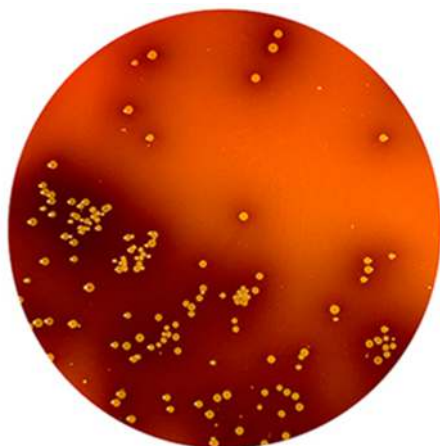


LISTERIA PALCAM AGAR BASE

LISTERIA PALCAM ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

LISTERIA SELECTIVE AGAR (PALCAM)

Terreno di coltura in polvere, terreno pronto all'uso in piastre e supplemento selettivo



1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno basale selettivo e differenziale, supplemento selettivo e piastre pronte all'uso per l'isolamento e il conteggio di *Listeria spp.* negli alimenti.

2 – COMPOSIZIONE*

LISTERIA PALCAM AGAR BASE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA

| | |
|---------------------|---------|
| Peptocomplex | 10,00 g |
| Triptosio | 10,00 g |
| Peptone | 3,00 g |
| Estratto di lievito | 3,00 g |
| Amido di mais | 1,00 g |
| Sodio cloruro | 5,00 g |
| Glucosio | 0,50 g |
| Mannitolo | 10,00 g |
| Esculina | 0,80 g |
| Fe-ammonio citrato | 0,50 g |
| Litio cloruro | 15,00 g |
| Rosso fenolo | 0,08 g |
| Agar | 12,00 g |

LISTERIA SELECTIVE AGAR (PALCAM)

PIASTRE PRONTE ALL'USO

| | |
|---------------------------|---------|
| Listeria PALCAM Agar Base | 70,8 g |
| Polimixina B solfato | 10,0 mg |
| Ceftazidime | 20,0 mg |
| Acriflavina HCl | 5,0 mg |
| Acqua purificata | 1000 mL |

LISTERIA PALCAM SELECTIVE SUPPLEMENT

CONTENUTO DEL FLACONE PER 500ML DI TERRENO

| | |
|----------------------|---------|
| Polimixina B solfato | 5,0 mg |
| Ceftazidime | 10,0 mg |
| Acriflavina HCl | 2,5 mg |

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

L'identificazione di *Listeria monocytogenes* prevede tradizionalmente metodi di coltura basati sull'arricchimento selettivo e sulla semina su terreni cromogenici e contenenti esculina, seguiti dalla caratterizzazione di *Listeria spp.* in base alla morfologia delle colonie, alla fermentazione degli zuccheri e alle proprietà emolitiche¹.

Listeria PALCAM Agar Base è un terreno a base di esculina preparato senza antibiotici e acriflavina; viene utilizzato con Listeria PALCAM Antimicrobic Supplement per l'isolamento e il conteggio di *Listeria spp.* negli alimenti.

Il terreno completo, preparato secondo la formula sviluppata da Van Netten *et al.*², è raccomandato dall'FDA-BAM³ come uno degli agar selettivi per *Listeria* a base di esculina e può essere utilizzato come secondo terreno di isolamento, come raccomandato dalla norma ISO 11290-1.⁴

PALCAM è l'abbreviazione di Polimixina-Acriflavina-Cloruro di litio-Ceftazidime-Aesculina-Mannitolo.

Il terreno completo PALCAM contiene peptoni che forniscono azoto, carbonio e minerali per la crescita microbica. La selettività è garantita dalla presenza di cloruro di litio, polimixina B, ceftazidime e acriflavina. Il terreno utilizza due sistemi di indicatori: l'idrolisi dell'esculina e la fermentazione del mannitolo. *Listeria spp.* idrolizza l'esculina, producendo zone nere intorno alle colonie a causa della formazione di composti fenolici di ferro nero derivati dall' aglucone. *Listeria spp.* non fermenta il mannitolo, mentre i contaminanti più comuni, stafilococchi e streptococchi, lo fermentano, causando il cambiamento di colore del rosso fenolo e la crescita con colonie circondate da un alone giallo.

4 – PREPARAZIONE

Sospendere 35,4 g in 500 mL di acqua fredda purificata. Riscaldare fino a ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e aggiungere il contenuto di una fiala di integratore antimicrobico Listeria PALCAM ricostituito con 5 mL di acqua purificata sterile in condizioni asettiche. Mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Listeria PALCAM Agar

| | |
|---|--|
| Aspetto della polvere | Fine granulometria omogenea, rosa chiaro |
| Aspetto del terreno in soluzione e in piastra | rosso scuro, leggermente opalescente |
| pH (20-25°C) | 7,2 ± 0,2 |

Listeria PALCAM Antimicrobic Supplement

| | |
|--------------------------------------|--|
| Aspetto del supplemento liofilizzato | pastiglia bassa e compatta, giallo-arancio |
| Aspetto della soluzione | giallo, limpido |



6 – MATERIALI FORNITI

| Prodotto | Tipo | REF | Confezione |
|--|-------------------------------|--------------------|--|
| Listeria PALCAM Agar Base | Terreno di coltura in polvere | 4016042 4016044 | 500 g (7.1 L) 5 Kg (71 L) |
| Listeria PALCAM Antimicrobial Supplement | Supplemento liofilizzato | 4240042 | 10 flaconi, ciascuno per 500 mL di terreno |
| Listeria Selective Agar (PALCAM) | Piastre pronte all'uso | 541604 | 2 x 10 piastre ø 90 mm |

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, piastre Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari per l'identificazione completa delle colonie.

8 – CAMPIONI

Acqua, alimenti, mangimi per animali, campioni ambientali nell'area della produzione e manipolazione degli alimenti. Fare riferimento agli standard internazionali applicabili per la raccolta, il trasporto, la conservazione dei campioni e operare secondo le buone pratiche di laboratorio.^{3,4}

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Eeguire l'arricchimento selettivo del campione con i brodi raccomandati dal metodo di analisi scelto.

I brodi di arricchimento raccomandati dalla ISO 11290-1 sono Half Fraser Broth e Fraser Broth, incubati rispettivamente a 30°C e 37°C per 24 ore, mentre la FDA-BAM prevede un solo terreno, Buffered Listeria Enrichment Broth senza e con agenti selettivi, con incubazione a 30°C per 48 ore.

Strisciare un'ansa del brodo arricchito incubato sulla superficie di una piastra PALCAM Medium 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 35°C, le colonie tipiche di *Listeria* spp. hanno un diametro di circa 1 mm, sono di colore verde-grigiastro o verde-oliva, talvolta con centro nero, circondate da un alone nero. Dopo 48 ore di incubazione, le colonie tipiche di *Listeria* spp hanno un diametro di circa 1,5-2 mm, sono nere con un alone nero e il centro infossato.

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 responsabilità 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 19111 | 37°C / 48 H / A | colonie grigio-verde con alone nero-bruno |
| <i>E. faecalis</i> ATCC 19433 | 37°C / 48 H / A | inibito |

A: incubazione aerobica; 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 terreno disidratato, di pronto per l'uso e di supplemento (Lotto di prova: TB) viene testato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un Lotto di riferimento precedentemente approvato e con piastre di Tryptic Soy Agar.

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

La selettività viene valutata con il metodo della semina in superficie di Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di 0,5 McFarland 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 – LIMITI DEL METODO

- Poiché *L. grayi* fermenta il mannitolo, le colonie possono presentare caratteristiche diverse da quelle di altre specie di *Listeria*.
- Il terreno PALCAM non consente di differenziare *L. monocytogenes* da altre specie del genere *Listeria*.
- L'identificazione completa di *L. monocytogenes* deve essere confermata da test adeguati.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura, il supplemento e le piastre pronte all'uso sono destinati esclusivamente al controllo microbiologico e all'uso professionale; devono essere utilizzati da personale di laboratorio adeguatamente addestrato e qualificato, osservando le precauzioni approvate in materia di rischio biologico e le tecniche asettiche.
- Il terreno di base e il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte.
- I terreni in polvere e i supplementi contenenti antibiotici devono essere manipolati con adeguate protezioni. Listeria PALCAM Antimicrobial Supplement è classificato come pericoloso dalla 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 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 norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Prestare attenzione quando si apre l'anello metallico delle fiale per evitare lesioni.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione su membrana.
- Ciascuna piastra di questo terreno di coltura è esclusivamente monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti delle specifiche definite riportate sul Certificato di Controllo Qualità.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminazioni con il terreno in polvere, il supplemento o i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno e il supplemento non utilizzato 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 la Scheda di Sicurezza del prodotto 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 del prodotto, 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

Conservare nella confezione originale a +2 /+8°C al riparo dalla luce diretta. 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 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).

Supplemento selettivo

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 produzione e di controllo dei terreni preparati 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. 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
2. Van Netten. et al. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. - *Int. J. Food Microbiol.*, 1989, vol. 8, p. 299-316.
3. ISO 11290:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method
4. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Rev 10/2017

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

| | | | | | |
|---|---|--|--|---|---|
| REF o 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 8 | Aggiornamento del contenuto e del Layout | 03/2023 |

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