

LISTERIA FRASER BROTH BASE
LISTERIA FRASER BROTH HALF CONCENTRATION
FERRIC AMMONIUM CITRATE SUPPLEMENT

Terreni di base e supplemento per l'arricchimento primario e secondario di *Listeria* spp.
e per la determinazione di *Listeria* spp. con metodo MPN

FORMULE TIPICHE**LISTERIA FRASER BROTH BASE (g/l)**

Proteose Peptone	5.000
Tryptone	5.000
Estratto di carne	5.000
Estratto di lievito	5.000
Sodio cloruro	20.000
Sodio fosfato bibasico anidro	9.500 *
Potassio fosfato monobasico	1.350
Esculina	1.000
Litio cloruro	3.000
Acido nalidissico	0.020
Acriflavina	0.025

LISTERIA FRASER BROTH HALF CONCENTRATION (g/l)

Proteose Peptone	5.0000
Tryptone	5.0000
Estratto di carne	5.0000
Estratto di lievito	5.0000
Sodio cloruro	20.0000
Sodio fosfato bibasico anidro	9.5000 *
Potassio fosfato monobasico	1.3500
Esculina	1.0000
Litio cloruro	3.0000
Acriflavina	0.0125
Acido nalidissico	0.0100

*equivalenti a 12 g Sodio fosfato bibasico biidrato

FERRIC AMMONIUM CITRATE SUPPLEMENT (x fiala)

Ferro Ammonio Citrato	0.25 g
-----------------------	--------

PREPARAZIONE DEI TERRENI IN POLVERE

Sospendere 27.4 g di Listeria Fraser Broth o di Listeria Fraser Broth Half Concentration in 500 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione fino a completa soluzione. Autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente, quindi aggiungere il contenuto di una fiala di Ferric Ammonium Citrate Supplement (codice 4240056) ricostituito con 5 ml di acqua distillata sterile. Mescolare bene e distribuire in provette sterili con le cautele dell'asepsi.
pH finale 7.2 ± 0.2

DESCRIZIONE

Listeria Fraser Broth e Listeria Fraser Broth Half Concentration preparati in accordo alla formulazione descritta da Fraser, sono una modificazione del brodo di arricchimento UVM2 e, rispetto a quest'ultimo, contengono in più il ferro ammonio citrato. Il brodo "half concentration" contiene acido nalidissico e acriflavina a concentrazioni dimezzate rispetto al Listeria Fraser Broth. Entrambi i terreni richiedono l'aggiunta del supplemento con ferro ammonio citrato.

La presenza di *Listeria* nei due brodi é indicata dall'annerimento della coltura, dovuta alla reazione della esculetina, prodotta dall'idrolisi dell'esculina, con gli ioni ferro.

Fraser Broth e Fraser Broth Half Concentration sono raccomandati da ISO 11290 per l'arricchimento primario e secondario di *Listeria* nei prodotti alimentari e sono indicati dal Rapporto ISTISAN 96/35 per la determinazione di *Listeria* negli alimenti (eccetto latte e derivati).

Fraser Broth é raccomandato da USDA-FSIS per il secondo arricchimento di *Listeria* negli alimenti e in campioni di origine ambientale ed inoltre dall'Ordinanza del Ministero della Sanità del 7.2.93 per la determinazione di *Listeria* spp con metodo MPN.

IMPIEGO

Il metodo ISO 11290-1 (Draft, May 2002) (ricerca di *L.monocytogenes*) raccomanda la seguente procedura:

- 1 Inoculare il campione con le cautele dell'asepsi in Listeria Fraser Broth Half Concentration in rapporto 1:9. Incubare a 30°C per 18-24 ore.
- Inoculare con 0,1 ml di brodocoltura una piastra di terreno ALOA ed una piastra di un altro terreno a scelta. Esaminare dopo incubazione a 37°C per 24 +/- 2 ore e, se non vi fossero colonie tipiche, reincubare per altre 24 +/- 2 ore
- Eseguire una subcultura di 0,1 ml dal brodo Fraser Half in una provetta contenente 10 ml di Fraser Broth. Incubare a 37°C per 24 ore e per altre 24 ore in caso di risultati negativi.
- Inoculare con 0,1 ml di brodocoltura una piastra di terreno ALOA ed una piastra di un altro terreno a scelta. Esaminare dopo incubazione a 37°C per 24 +/- 2 ore e, se non vi fossero colonie tipiche, reincubare per altre 24 +/- 2 ore.
- Confermare le colonie con i test raccomandati dalla norma.

Il metodo ISO 11290-2 (Draft, May 2002 - conteggio di *L.monocytogenes*) raccomanda la seguente procedura:

- Preparare una sospensione del campione in Buffered Peptone Water o in Fraser Broth Half Concentration. Incubare a temperatura ambiente per 1 ora.
- Inoculare con 0,1 ml di brodocoltura una piastra di terreno ALOA. Esaminare dopo incubazione a 37°C per 24 +/- 2 ore e, se non vi fossero colonie tipiche, reincubare per altre 24 +/- 2 ore.
- Contare come *L.monocytogenes* le colonie tipiche confermate con i test descritti dalla norma.

Il metodo "semplificato" da noi raccomandato e che ha ottenuto, in Francia, la validazione AFNOR (1) è il seguente:

- Eseguire l'arricchimento del campione in Fraser Broth Half Concentration, secondo le metodiche usuali con un rapporto campione/terreno liquido 1:10 (es. 25 g di campione + 225 ml di Fraser Broth Half Concentration – cod. 401594) ed incubando a 30°C per 24 ore.
- Inoculare con 0,1 ml di brodocoltura una piastra di terreno ALOA. Esaminare dopo incubazione a 37°C per 24 +/- 2 ore.

Considerare come *L. monocytogenes* le colonie verde-blue circondate da un alone opaco. Eseguire le prove di conferma appropriate in accordo a ISO 11290 oppure con il test rapido Biolife Monocytogenes ID Disc -cod.193005 . In caso di assenza di colonie tipiche reincubare per ulteriori 24 +/- 2 ore. Se non si sviluppano colonie tipiche riportare i risultati come "assenza di *L.monocytogenes*". In caso di sviluppo di colonie tipiche nelle ulteriori 24 ore di incubazione confermare le colonie come riportato sopra.

CONTROLLO QUALITA' DELL'UTILIZZATORE

Controllo produttività

L.monocytogenes ATCC 19117: crescita ed annerimento

Controllo selettività

S.aureus ATCC 25923: inibito

Incubazione 37°C per 24 ore

CONSERVAZIONE

Terreni in polvere: conservare a 10-30°C al riparo della luce, in luogo asciutto. In queste condizioni *Listeria* Fraser Broth o di *Listeria* Fraser Broth Half Concentration sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Una volta aperte le confezioni,

conservare i prodotti mantenendo il tappo dei contenitori ben chiusi. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento della polvere ecc.)

Conservare le provette di terreno completo preparate in laboratorio per un massimo di 7 giorni a 2-8°C

Supplemento liofilo: conservare fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a 2 - 8°C.

Terreni pronti in provetta e flacone: conservare a 2-8°C al riparo della luce, fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento.

PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

Terreni in polvere: i preparati qui descritti non sono classificati come pericolosi ai sensi della legislazione vigente ma contengono litio cloruro (classificato Xi irritante) ad una concentrazioni >1% e come tali richiedono la scheda di sicurezza, che deve essere consultata prima dell'uso. Come per tutti i terreni in polvere anche la loro manipolazione deve essere effettuata con una adeguata protezione delle vie respiratorie. Non ingerire.

Supplemento: il preparato Ferric Ammonium Citrate Supplement qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni >1%.

Terreni pronti all'uso in flacone e provetta: I preparati qui descritti non sono classificati come pericolosi ai sensi della legislazione vigente né contengono sostanze pericolose in concentrazioni ≥1%.

I prodotti qui descritti devono essere usati in laboratorio, da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare le provette dopo il loro uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

BIBLIOGRAFIA

- Fraser, J.A., Sperber, W.H. (1988) J. Food Protect. 51, 10, 762-765.
- Normalisation Francaise, AFNOR (1993) V08-55
- Progetto del comitato CD 11290: Ricerca di *Listeria monocytogenes*, ISO/TC 34/SC 9
- Rapporto ISTISAN 96/35. ISSN 1123-3117. Metodi di analisi per il controllo microbiologico degli alimenti. Raccolta a cura di D.De Medici, L.Fenicia, L.Orefice e A.Stacchini.
- ISO 11290 (Draft, May 2002) Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.

CONFEZIONI

Terreni in polvere

4015961	Listeria Fraser Broth Base,	100 g (1.8 l)
4015962	Listeria Fraser Broth Base,	500 g (9.1 l)
4015964	Listeria Fraser Broth Base,	5 kg (91 l)

4015941	Listeria Fraser Broth Base Half Concentration,	100 g (1.8 l)
4015942	Listeria Fraser Broth Base Half Concentration,	500 g (9.1 l)
4015944	Listeria Fraser Broth Base Half Concentration,	5 kg (91 l)

Supplemento

4240056	Ferric Ammonium Citrate Supplement,	10 fiale, ciascuna per 500 ml
----------------	--	-------------------------------

I due terreni sono disponibili anche nelle seguenti confezioni pronti per l'uso

551596	Listeria Fraser Broth	20 x 10 ml provette pronte per l'uso
5115962	Listeria Fraser Broth	6 x 90ml flaconi pronti per l'uso
5115963	Listeria Fraser Broth	6 x 225ml flaconi pronti per l'uso
5115942	Listeria Fraser Broth Base Half Concentration	6 x 90ml flaconi pronti per l'uso
5115943	Listeria Fraser Broth Base Half Concentration	6 x 225ml flaconi pronti per l'uso