



LISTERIA FRASER BROTH LISTERIA FRASER BROTH HALF CONCENTRATION LISTERIA FRASER SUPPLEMENT (FERRIC AMMONIUM CITRATE)

Terreni di base in polvere e supplemento liofilizzato per la preparazione dei brodi per l'arricchimento primario e secondario di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp.
Brodi Fraser e half-Fraser pronti per l'uso.



provetta inoculata con *L.monocytogenes* sulla destra

DESTINAZIONE D'USO

Brodi selettivi per le fasi di arricchimento primario e secondario e per la preparazione del campione nelle procedure indicate da ISO 11290 per la determinazione ed il conteggio di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. nei campioni della filiera alimentare.

DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Fraser broth e half-Fraser broth, preparati in accordo alla formulazione raccomandata da ISO 11290, sono una modificazione del brodo di arricchimento UVM2 e, rispetto a quest'ultimo, contengono in più il ferro ammonio citrato. Entrambi i terreni di base contengono gli agenti selettivi, termostabili, acriflavina ed acido nalidissico (a concentrazioni dimezzate nel half-Fraser broth) e richiedono l'aggiunta del supplemento con ferro ammonio citrato.

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

Fraser broth e half-Fraser broth sono raccomandati da ISO 11290-1 per l'arricchimento primario e secondario nella procedura per la determinazione di *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. nei campioni della filiera alimentare. Half-Fraser broth, con o senza supplemento selettivo, è previsto da ISO 11290-2 per la preparazione del campione da sottoporre a procedura di conteggio di *L.monocytogenes* e di *Listeria* spp.

Fraser Broth è indicato da OM 7 dicembre 1993 per la numerazione di *L.monocytogenes* nei prodotti alimentari

FORMULE TIPICHE

LISTERIA FRASER BROTH BASE (g/l)

Digerito enzimatico di tessuto animale	5,000
Digerito enzimatico di caseina	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)

Digerito enzimatico di tessuto animale	5,000
Digerito enzimatico di caseina	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	0,010
Acriflavina	0,0125

*equivalenti a 12 g Sodio fosfato bibasico biidrato

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

FERRIC AMMONIUM CITRATE SUPPLEMENT (x fiala)



Ferro Ammonio Citrato 0,25 g

LISTERIA FRASER BROTH**PRONTO IN PROVETTA/FLACONE (g/l)**

Digerito enzimatico di tessuto animale	5,000
Digerito enzimatico di caseina	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
Ferro Ammonio Citrato	0,500

LISTERIA FRASER BROTH HALF CONCENTRATION (g/l)**PRONTO IN FLACONE (g/l)**

Digerito enzimatico di tessuto animale	5,000
Digerito enzimatico di caseina	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	0,010
Acriflavina	0,0125
Ferro Ammonio Citrato	0,500

*equivalenti a 12 g Sodio fosfato bibasico biidrato

PREPARAZIONE DEI TERRENI IN POLVERE

Sospendere 27,5 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.

PREPARAZIONE DEI TERRENI IN PROVETTA O FLACONE

I terreni sono pronti per l'uso

CARATTERISTICHE DEL TERRENO E DEI SUPPLEMENTI

Aspetto dei terreni in polvere: polvere fine, omogenea di colore beige

Aspetto dei terreni completi in soluzione e pronti per l'uso in provetta o flacone: giallo-bruno, limpido

Aspetto del supplemento: pastiglia bassa, fragile marrone, soluzione marrone e limpida dopo ricostituzione.

pH finale dei terreni completi Fraser e Half-Fraser a 20-25°C: 7,2 ± 0,2

PROCEDURA DELL'ANALISI**Metodo per la determinazione di *L.monocytogenes* e *Listeria* spp. con doppio arricchimento (ISO 11290-1:2017)**

- Eseguire l'arricchimento del campione in half-Fraser broth, con un rapporto campione/terreno liquido 1:10 (es. 25 g di campione + 225 ml di half-Fraser broth) ed incubando a 30°C per 25 ± 1 ore.
- Inoculare con 0,1 ml della coltura del primo arricchimento una piastra di terreno ALOA ed una piastra di un altro terreno a scelta del Laboratorio, basato su un principio diverso da quello di ALOA (es. PALCAM o Oxford).
- Eseguire una subcoltura di 0,1 ml dal brodo half-Fraser broth (indipendentemente dal suo colore) in una provetta contenente 10 ml di Fraser broth. Incubare a 37°C per 24 ± 2 ore. Nel caso si desideri determinare specie di *Listeria* diverse da *L.monocytogenes* una incubazione per ulteriori 24 ore consente di recuperare più specie.
- Inoculare con 0,1 ml della coltura del secondo arricchimento una piastra di terreno ALOA ed una piastra di un altro terreno a scelta del Laboratorio, basato su un principio diverso da quello di ALOA (es. PALCAM o Oxford)..
- Esaminare per la presenza di colonie tipiche di *L.monocytogenes* le piastre di ALOA dopo incubazione a 37°C ± 1°C per 24 ± 2 ore; se non vi fosse crescita o non vi fossero colonie tipiche, re-incubare per altre 24 ± 2 ore.
- Esaminare le piastre del secondo terreno seminato (es. PALCAM o Oxford) dopo il periodo di incubazione previsto per la presenza di colonie tipiche di *Listeria* spp.
- Confermare le colonie tipiche con le modalità ed i test indicati in ISO 11290-1.

Note

1. E' possibile conservare a 5°C per non più di 72 ore il pre-arricchimento in half Fraser broth, prima della sub-coltura nel brodo di secondo arricchimento (Fraser broth).

2. Half-Fraser broth e Fraser broth possono essere conservati a 5 °C per non più di 72 ore prima della semina su piastra.

Metodo per il conteggio di *L.monocytogenes* e *Listeria* spp (ISO 11290-2:2017)

Il metodo ISO 11290-2 raccomanda la seguente procedura:

- Preparare una sospensione del campione in Buffered Peptone Water o in altro brodo d'arricchimento in accordo alla norma ISO 6887 (tutte le parti); nel caso si esegua sia la determinazione che il conteggio in accordo alle parti 1 e 2 della norma ISO 11290, la sospensione del campione può essere fatta in half-Fraser broth (con o senza l'aggiunta del supplemento selettivo).



- Inoculare 0,1 ml della sospensione del campione e 0,1 ml delle diluizioni successive su piastre da 90 mm di terreno ALOA.
- In presenza di campioni con sospette cariche basse, inoculare 1 ml della sospensione del campione e 1 ml delle diluizioni successive su piastre da 140 mm di terreno ALOA.
- Esaminare dopo incubazione a 37°C per 24 ± 2 ore e, se non vi fosse crescita o non vi fossero colonie tipiche, re-incubare per altre 24 ± 2 ore.
- Contare le colonie di *L.monocytogenes* e le colonie di *Listeria* spp. nelle piastre in cui vi siano meno di 150 colonie (piastre diametro 90 mm) o 360 colonie (piastre da 140 mm), in accordo a quanto descritto nel capitoletto "lettura ed interpretazione dei risultati".
- Confermare le colonie tipiche con i test indicati in ISO 11290-2.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La presenza di *Listeria* spp. nei brodi Fraser e half-Fraser è normalmente indicata dall'intorbidimento e dall'annerimento dei brodi. La procedura della norma ISO prevede la sub-coltura e la semina delle piastre indipendentemente dalla comparsa o meno di tale annerimento.

Terreno ALOA.

- Considerare come *L.monocytogenes* presunte le colonie blu-verde circondate da un alone opaco (colonie tipiche).
- Considerare come *Listeria* spp. presunte le colonie blu-verde con o senza alone opaco.

Secondo terreno di semina.

Dopo incubazione alla temperatura e per il tempo previsto per il secondo terreno solido selettivo di semina, esaminare per la presenza di colonie tipiche in accordo alle caratteristiche del terreno scelto..

Nota

I test di conferma per *L.monocytogenes*, obbligatori secondo la norma ISO 11290 ed impiegando il terreno ALOA, sono: β-emolisi (+), utilizzo di L-ramnosio (+), utilizzo di D-xilosio (-). I test di conferma per *Listeria* spp. sono: esame microscopico (corti e stretti bastoncini o coccobacilli), catalasi (+).

CONTROLLO QUALITÀ

E' responsabilità dell'utilizzatore eseguire il 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.

CEPPI DI CONTROLLO		INCUB. T° / t / ATM	SPECIFICHE
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC 19111	37°C / 24h A	buona crescita
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC 13932	37°C / 24h A	buona crescita
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	37°C / 24h A	< 100 colonie dopo trapianto in TSA
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	37°C / 24h A	crescita inibita nella subcoltura in TSA
<i>L.monocytogenes</i> +	ATCC 13932	37°C / 24h A	> 10 colonie tipiche dopo trapianto in terreno ALOA
<i>E. faecalis</i> +	ATCC 29212		
<i>E. coli</i>	ATCC 25922		
<i>L.monocytogenes</i> +	NCTC 7973	37°C / 24h A	> 10 colonie tipiche dopo trapianto in terreno ALOA
<i>E. faecalis</i> +	ATCC 29212		
<i>E. coli</i>	ATCC 25922		

CONSERVAZIONE

Terreno in polvere: conservare a 10 / +30°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento ecc.). La data di scadenza si applica al prodotto nella sua confezione originale e conservato come indicato.

Supplemento: conservare fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a +2 + 8°C. La data di scadenza si applica al prodotti nella sua confezione originale e conservato come indicato.

Terreni pronti per l'uso in provetta o flacone: Conservare a 2-8°C nella confezione originale, al riparo della luce. In queste condizioni i prodotti sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni di deterioramento.

PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza.

I prodotti qui descritti sono solo per uso di Laboratorio. Devono essere usati da operatori adeguatamente addestrati. Operare con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare le provette ed i flaconi 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.
- 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.
- 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.
- ORDINANZA 7 dicembre 1993 Limiti di *Listeria monocytogenes* in alcuni prodotti alimentari. (GU Serie Generale n.291 del 13-12-1993)

CONFEZIONI

Terreni in polvere

4015962	Listeria Fraser Broth Base,	500 g (9.1 l)
4015964	Listeria Fraser Broth Base,	5 kg (91 l)
CND: W0104010101		
4015942	Listeria Fraser Broth Base Half Concentration,	500 g (9.1 l)
4015944	Listeria Fraser Broth Base Half Concentration,	5 kg (91 l)
CND: W0104010101		

Supplementi

4240056	Listeria Fraser Supplement (Fe Ammonium Citrate)	10 flaconi, ciascuno per 500 ml di terreno di base
42185056	Listeria Fraser Supplement (Fe Ammonium Citrate)	1 flacone per 9 litri di terreno di base
42185056A	Listeria Fraser Supplement (Fe Ammonium Citrate)	9 flaconi per 9 litri di terreno di base
CND: W0104010104		

Terreni pronti per l'uso

551596	Listeria Fraser Broth	20 x 10 ml provette pronte per l'uso
551596N	Listeria Fraser Broth	20 x 9 ml provette pronte per l'uso
CND: W0104010206		
5115962	Listeria Fraser Broth	6 x 90ml flaconi pronti per l'uso
5115963	Listeria Fraser Broth	6 x 225ml flaconi pronti per l'uso
CND: W0104010306		
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
CND: W0104010306		



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, Milano, Italia.