

---

# RAPID'*Listeria* spp. Agar

## User Guide

**Selective chromogenic medium for the identification and enumeration of *Listeria* spp. in human food products and environmental samples**

Catalog #3564744, Dehydrated, 500 g  
Catalog #3564745, Supplement 1, freeze dried, 10 vials  
Catalog #3564746, Supplement 2, liquid, 10 vials



# Table of Contents

Section 1	Introduction .....	1
Section 2	RAPID' <i>Listeria</i> spp. Principle .....	1
Section 3	Theoretical Formula .....	1
Section 4	Shelf Life and Storage.....	2
Section 5	Materials Required but Not Supplied.....	2
	Equipment .....	2
	Supplies.....	2
Section 6	Precautions, Limitations of Use, and Quality Control.....	3
	Precautions.....	3
	Limitations of Use .....	3
	Quality Control.....	3
Section 7	Protocol.....	3
	Preparation of Dehydrated Medium .....	3
	Sample Enrichment .....	4
	Inoculation and Plate Reading .....	4
Section 8	Confirmation of Positive Results.....	5
Section 9	Confirmation of Other Methods .....	5
	Confirmation of Positive Results with iQ-Check <i>Listeria</i> spp. Agar (NF VALIDATION Certified Protocol) .....	5
Section 10	Test Performance and Validations .....	6
Section 11	References .....	6
Section 12	Revision History .....	7

## Section 1 Introduction

Bacteria belonging to the genus *Listeria* are gram-positive, non-spore-forming, rod-shaped organisms. Certain key characteristics of *Listeria* allow for survival in food processing plant environments. *Listeria* are relatively thermotolerant bacteria, demonstrating the ability to survive at both refrigerated and high temperatures. Growth has been observed in high salt concentrations and over a wide pH range. The organism is able to form biofilms on environmental surfaces and can remain on the surface of a processing plant for years. *Listeria* spp. are often used as indicator organisms. The presence of the nonpathogenic species of this genus is indicative of poor sanitation practices and the possible presence of the pathogenic *Listeria monocytogenes*. Having a *Listeria* Environmental Monitoring Program is an important component of a solid Hazard Analysis Critical Control Point plan. The use of chromogenic substrates in culture media increases the ease of use of the media with results based on color changing enzymatic reactions.

## Section 2 RAPID' *Listeria* spp. Principle

Identification of *Listeria* spp. using RAPID' *Listeria* spp. Medium is based on the detection of  $\beta$ -D-glucosidase activity by a chromogenic substrate. *Listeria* colonies are blue to bluish-green.

The selectivity of the medium is optimized by the combined action of lithium chloride and an antibiotic mixture.

## Section 3 Theoretical Formula

Peptone	20 g
Yeast extract	1 g
Sodium pyruvate	2 g
Iron ammonium citrate	0.5 g
Maltose	1 g
Sodium chloride (NaCl)	4 g
Lithium chloride (LiCl)	10.5 g
Silica	20 g
Growth activators	2 g
Chromogenic mixture	75 mg
Antibiotic mixture	40 mg
Agar	12 g
Distilled water	qsp 1,000 ml

---

Final pH at 25°C = 7.0–7.5

## Section 4 Shelf Life and Storage

- Dehydrated agar: 15–25°C in carefully sealed package, in a dry and dark place
- Supplements: 2–8°C in a dark place
- Plate prepared from the dehydrated agar: 1 week at 2–8°C in carefully sealed package, in a dry and dark place

## Section 5 Materials Required but Not Supplied

### Equipment

- All usual laboratory equipment
- Autoclave, capable of maintaining 121°C for 15 min
- Hot plate
- Scale, sensitivity of 0.1 g
- Stirrer/homogenizer
- Thermostatically controlled incubator or incubation room, precise to ±1°C
- Water bath

### Supplies

- Confirmation:
  - RAPID'*L.mono* Agar (catalog #3563694, 90 mm x 20 plates; 3563964, 90 mm x 120 plates; 3555294, ready-to-use kit; 3564293, dehydrated, 500 g; 3564294, Supplement 1; 3564746, Supplement 2)
  - PALCAM agar (catalog #3564754, 500 g; 3564752, Supplement, 10 vials)
  - iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (catalog #3578113)
- Diluent for enumeration, tryptone salt (catalog #3555754, 9 ml x 25 tubes; 3555756, 900 ml x 6 bottles; 3555796, 3 L x 4 bags; 3564544, 500 g)
- Enrichment medium, Fraser ½ broth (catalog #3555797, 225 ml bottles x 6; 3555794, 3 L x 4 bags; 3564604, dehydrated, 500 g; 3564616, Supplement, 10 vials)
- Enrichment medium for environmental samples: Modified University of Vermont Medium (UVM)
- Inoculating loops
- Sterile petri dishes
- Sterile pipets
- Sterile weigh bags

## Section 6

# Precautions, Limitations of Use, and Quality Control

### Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 7218). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria such as *Listeria*
- Media that have come in contact with food samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations
- Pregnant women, the elderly, and immunocompromised individuals should not work with *L. monocytogenes* due to its high fatality rate
- Before using plates, allow them to dry at 25–50°C until droplets disappear from the surface of the medium, according to ISO 7218. Avoid prolonged drying to avoid modifying the efficacy of the medium

### Limitations of Use

- As part of NF VALIDATION, enumeration of *Listeria* spp. has not been tested
- As part of NF VALIDATION, sample volumes over 25 g have not been tested

### Quality Control

- Every product manufactured and marketed by Bio-Rad is subject to a quality assurance procedure at all stages, from reception of raw materials through to marketing of the finished products. Each batch of finished product undergoes quality control according to EN ISO 11133 and is marketed only if it satisfies the acceptability criteria. Documentation relative to the production and quality control of each batch is kept on file
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

## Section 7

# Protocol

### Preparation of Dehydrated Medium

1. Always shake bottle before use.
2. Dissolve 71.5 g of powder in 950 ml of distilled water and mix until a homogenous suspension is obtained.
3. Sterilize in an autoclave at 121°C for 15 min. Cool to 47–50°C.
4. For 1 L of medium, aseptically add two vials of Supplement 1, each reconstituted with 25 ml of sterile water. Mix well.
5. For 1 L of medium, aseptically add two 5 ml vials of Supplement 2. Mix well.

## Section 7 Protocol

6. Dispense in petri dishes and leave them on the bench to dry.
7. One 500 g bottle of powder makes 7 L of medium.

### Sample Enrichment

Scope (matrices)	Enrichment	Certification
Stainless steel, plastic, ceramic, and sealed concrete	Add 225 ml UVM broth to sponge Add 10 ml UVM broth to swab 30 ± 1°C for 20–24 hr	AOAC
All human food products and production environmental samples	$n$ g/ml of sample in 9 x $n$ ml Fraser ½ broth 30 ± 1°C for 22–26 hr	NF VALIDATION

1. Dilute  $n$  g or  $n$  ml of sample in 9 x  $n$  ml Fraser ½ broth. Homogenize with stirrer/homogenizer.
2. In the context of AOAC Validation, follow manufacturer's instructions for inoculating environmental swabs or sponges. Add 225 ml UVM broth to sponge in a weigh bag and homogenize for 2 min. Add 10 ml UVM broth to swab in a test tube and vortex.
3. Incubate according to table above.
4. After the enrichment step, the broth can be stored at 2–8°C for up to 72 hr.

### Inoculation and Plate Reading

1. Remove 0.1 ml of sample using a sterile pipet and place drops on the outside edge of half of the agar surface.
2. Using a sterile Pasteur pipet or inoculating loop, spread sample over half the agar surface in a to-and-fro motion.
3. On the other half of the agar surface, streak for isolation by spreading the deposit in relatively close streaks over the entire dish from the edge of the previous spread.
4. Incubate plate at 37 ± 1°C for 24 ± 2 hr.
5. *Listeria* spp. form blue to blue-green colonies on RAPID<sup>®</sup> *Listeria* spp. Agar.
6. It is possible to read the plate after 48 hr incubation.
7. After the incubation step, plates can be stored at 2–8°C for 72 hr.

## Section 8

### Confirmation of Positive Results

1. In the context of AOAC Validation, confirm suspect isolated colonies according to classic confirmation test procedure described in the standard reference methods.
2. In the context of NF VALIDATION, all samples identified as positive must be confirmed in one of the following ways:
  - a. Using the conventional tests described in the CEN or ISO standard methods (including the purification step).
  - b. Using nucleic probes as described in the ISO 7218 standard (for example, iQ-Check *Listeria* spp. Kit, catalog #3578113) using isolated colonies (with or without purification step).
  - c. Repicking and spot inoculation of at least one colony isolated from RAPID' *Listeria* spp. Agar onto RAPID' *L.mono* Agar, together with a Gram test and a catalase test. Up to 15 colonies can be confirmed on a single plate of RAPID' *L.mono* Agar.
  - d. Repicking and spot inoculation of at least one isolated colony on a PALCAM agar plate. Up to 15 colonies can be confirmed on a single PALCAM agar plate
  - e. Using any other NF VALIDATION certified method based on a different principle than that of RAPID' *Listeria* spp. The validated second method protocol should be respected in its entirety. All stages preceding the intermediate stage from which confirmation is sought must be common to the two methods.
3. Outside the NF Validation Mark, use the MALDI Biotyper System (MALDI-Time-Of-Flight Mass Spectrometer and MBT Compass Software version 4, Bruker) test directly from an isolated colony or after a purification step to confirm a sample as positive.
4. In the event of discordant results (presumptive positive with RAPID' *Listeria* spp., negative with confirmation method, and particularly with the latex test), the laboratory must follow the necessary steps to ensure validity of the result obtained.



## Section 9

### Confirmation of Other Methods

#### Confirmation of Positive Results with iQ-Check *Listeria* spp. Agar (NF VALIDATION Certified Protocol)

1. Using a sterile loop, streak 100 µl of enrichment broth (LSB or Fraser ½ broth) on RAPID' *Listeria* spp. Agar.
2. Incubate plates at 37 ± 1°C for 24 ± 2 hr.
3. *Listeria* spp. form blue-green colonies on RAPID' *Listeria* spp. Agar.

## Section 10 Test Performance and Validations

Certification	Scope	Validation Protocol	Reference Protocol	Certificate Reference
AOAC-RI	Stainless steel, plastic, ceramic, and sealed concrete	Performance Tested Methods	USDA MLG 8.11	 License# 080701
NF VALIDATION	All human food products and production environmental samples	EN ISO 16140-2	NF EN ISO 11290-1/2017	 BRD 07/12-12/06 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification Valid until: Refer to the certificate available on the AFNOR Certification website: <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

## Section 11 References

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.

Ottaviani F, Ottaviani M, Agosti M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Refrigeration Symposium Proceedings, p 6. ADRIA, Quimper, France.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online at <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>



## Section 12

# Revision History

Release date	Document number	Change
April 2020	10000127437 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Major change</li> <li>- New document design</li> <li>- Document number change – previous version RAPID' <i>Listeria</i> spp._V2_01 July 2019</li> </ul>
October 2023	10000127437 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Confirmation method clarification</li> </ul>

Visit [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia) for more information on our complete range of RAPID Chromogenic Media.

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. IQ-CHECK is a trademark of Bio-Rad Europe GmbH in certain jurisdictions. All trademarks used herein are the property of their respective owner.



**Bio-Rad**  
Laboratories, Inc.

Life Science  
Group

Website [bio-rad.com](http://bio-rad.com) USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23  
 Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23  
 Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300  
 Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000  
 Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23  
 New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23  
 Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23  
 Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311  
 United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000127437 Ver B US/EG

---

# RAPID'*Listeria* spp. Agar

## Guide d'utilisation

**Milieu chromogène sélectif pour l'identification et le dénombrement de *Listeria* spp. dans les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et les échantillons environnementaux**

N° de référence 3564744, base déshydratée, 500 g

N° de référence 3564745, Supplement 1, lyophilisé, 10 flacons

N° de référence 3564746, Supplement 2, liquide, 10 flacons



**BIO-RAD**

# Sommaire

Section 1	Introduction .....	1
Section 2	RAPID' <i>Listeria</i> spp. - Principe .....	1
Section 3	Formule théorique .....	1
Section 4	Durée de conservation et stockage .....	2
Section 5	Matériel requis non fourni .....	2
	Matériel .....	2
	Produits .....	2
Section 6	Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité .....	3
	Précautions .....	3
	Limites d'utilisation .....	3
	Contrôle qualité .....	3
Section 7	Protocole .....	4
	Préparation du milieu de culture déshydraté .....	4
	Enrichissement de l'échantillon .....	4
	Inoculation et lecture .....	4
Section 8	Confirmation des résultats positifs .....	5
Section 9	Confirmation d'autres méthodes .....	5
	Confirmation des résultats positifs avec iQ-Check <i>Listeria</i> spp. Agar (protocole certifié NF VALIDATION) .....	5
Section 10	Performance du test et validations .....	6
Section 11	Références .....	6
Section 12	Historique des révisions .....	7

## Section 1

### Introduction

Les bactéries appartenant au genre *Listeria* sont des bacilles à Gram positif, non sporulantes. Certaines caractéristiques clés de *Listeria* permettent une survie dans les ateliers de transformation de produits alimentaires. Les *Listeria* sont des bactéries relativement thermorésistantes, qui ont la capacité de survivre à des températures à la fois très basses et très élevées. Leur croissance a été observée en présence d'une forte concentration saline et sur une large gamme de pH. Le micro-organisme est capable de former des biofilms sur les surfaces des ateliers de transformation et peut y demeurer pendant des années. Les *Listeria* spp. sont souvent utilisées comme micro-organismes indicateurs. La présence d'espèces non pathogènes de ce genre est révélatrice de pratiques insuffisantes en matière d'hygiène et de l'existence éventuelle de l'espèce pathogène *Listeria monocytogenes*. La mise en œuvre d'un programme de surveillance de l'environnement lié à *Listeria* constitue un élément important d'un plan HACCP (analyse des risques et maîtrise des points critiques). L'utilisation de substrats chromogènes dans le milieu de culture augmente la simplicité de lecture grâce aux résultats basés sur des réactions enzymatiques avec changement de couleur.

## Section 2

### RAPID'*Listeria* spp. - Principe

L'identification de *Listeria* spp. à l'aide du milieu RAPID'*Listeria* spp. est basée sur la détection de l'activité  $\beta$ -D-glucosidase par un substrat chromogène. Les colonies de *Listeria* sont de couleur bleue à bleu-vert.

La sélectivité du milieu est optimisée par l'action combinée du chlorure de lithium et d'un mélange antibiotique.

## Section 3

### Formule théorique

Peptone	20 g
Extrait de levure	1 g
Pyruvate de sodium	2 g
Citrate ferrique ammoniacal	0,5 g
Maltose	1 g
Chlorure de sodium (NaCl)	4 g
Chlorure de lithium (LiCl)	10,5 g
Silice	20 g
Activateurs de croissance	2 g
Mélange chromogène	75 mg
Mélange antibiotique	40 mg
Agar	12 g
Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

---

pH final à 25 °C = 7,0–7,5

## Section 4

### Durée de conservation et stockage

- Gélose base déshydratée : 15–25 °C en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière
- Suppléments : 2–8 °C à l'abri de la lumière
- Boîte préparée à partir de la gélose base déshydratée : 1 semaine à 2–8 °C, en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière

## Section 5

### Matériel requis non fourni

#### Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Autoclave, capable de maintenir 121 °C pendant 15 min
- Plaque chauffante
- Balance, sensibilité 0,1 g
- Agitateur/homogénéisateur
- Étuve ou enceinte thermostatée, précision  $\pm 1$  °C
- Bain-marie

#### Produits

- Confirmation :
  - RAPID'*L.mono* Agar (n° de référence 3563694, 90 mm x 20 boîtes ; n° de référence 3563964, 90 mm x 120 boîtes ; n° de référence 3555294, kit prêt à l'emploi ; n° de référence 3564293, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 3564294, Supplément 1 ; n° de référence 3564746, Supplément 2)
  - PALCAM agar (n° de référence 3564754, 500 g ; n° de référence 3564752, Supplément, 10 flacons)
  - Kit de détection par PCR en temps réel iQ-Check *Listeria* spp. (n° de référence 3578113)
- Diluant pour le dénombrement, tryptone-sel (n° de référence 3555754, 9 ml x 25 tubes ; n° de référence 3555756, 900 ml x 6 flacons ; n° de référence 3555796, 3 L x 4 sachets ; n° de référence 3564544, 500 g)
- Milieu d'enrichissement, bouillon Fraser ½ (n° de référence 3555797, flacons 225 ml x 6 ; n° de référence 3555794, 3 L x 4 sachets ; n° de référence 3564604, base déshydratée, 500 g ; n° de référence 3564616, Supplément, 10 flacons)
- Milieu d'enrichissement pour les échantillons environnementaux : Milieu UVM (University of Vermont) modifié
- Œse d'inoculation

- Boîtes de Petri stériles
- Pipettes stériles
- Sacs de pesée stériles

## Section 6

# Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité

## Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 7218). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses telles que les *Listeria*.
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons alimentaires doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- Les femmes enceintes, personnes âgées et sujets immunodéprimés doivent éviter tout contact avec *L. monocytogenes* en raison du caractère hautement létal de la bactérie sur ces catégories de personnes.
- Avant d'utiliser les boîtes, laisser sécher à 25–50 °C conformément à la norme ISO 7218, jusqu'à ce que les gouttelettes disparaissent de la surface du milieu. Éviter cependant un séchage prolongé afin de ne pas altérer l'efficacité du milieu.

## Limites d'utilisation

- Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, le dénombrement de *Listeria* spp. n'a pas été testé.
- Dans le cadre de la marque NF VALIDATION, les échantillons supérieurs à 25 g n'ont pas été testés.

## Contrôle qualité

- Chaque produit fabriqué et commercialisé par Bio-Rad est soumis à une procédure d'assurance qualité à toutes les étapes, de la réception des matières premières jusqu'à la mise sur le marché du produit fini. Chaque lot de produits finis subit un contrôle qualité conforme à EN ISO 11133 et est mis sur le marché uniquement s'il satisfait aux critères d'acceptabilité. La documentation relative à la production et au contrôle qualité de chaque lot est archivée.
- Pour consulter la fiche de données de sécurité (FDS) et le certificat d'analyse, visiter [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

## Section 7 Protocole

### Préparation du milieu de culture déshydraté

1. Toujours agiter le flacon avant utilisation.
2. Dissoudre 71,5 g de poudre dans 950 ml d'eau distillée et mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène.
3. Stériliser en autoclave à 121 °C pendant 15 min. Refroidir à 47–50 °C.
4. Pour 1 L de milieu, ajouter aseptiquement deux flacons de supplément 1, chacun reconstitué avec 25 ml d'eau stérile. Bien mélanger.
5. Pour 1 L de milieu, ajouter aseptiquement deux flacons 5 ml de supplément 2. Bien mélanger.
6. Répartir dans les boîtes de Petri et laisser sécher.
7. 500 grammes de poudre permettent de reconstituer 7 L de milieu.

### Enrichissement de l'échantillon

Domaine (matrices)	Enrichissement	Certification
Acier inoxydable, plastique, céramique et béton verni	Ajouter 225 ml de bouillon UVM à l'éponge Ajouter 10 ml de bouillon UVM à l'écouvillon 30 ± 1 °C pendant 20–24 hr	AOAC
Tous les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et les échantillons environnementaux de production	$n$ g/ml d'échantillon dans 9 x $n$ ml de bouillon Fraser ½ 30 ± 1 °C pendant 22–26 hr	NF VALIDATION

1. Diluer  $n$  g ou  $n$  ml d'échantillon dans 9 x  $n$  ml de bouillon Fraser ½. Homogénéiser avec un agitateur/homogénéisateur.
2. Dans le contexte de la validation AOAC, suivre les instructions du fabricant pour l'inoculation des écouvillons ou des éponges d'échantillonnage environnemental. Ajouter 225 ml de bouillon UVM à l'éponge dans un sac de pesée et homogénéiser pendant 2 min. Ajouter 10 ml de bouillon UVM à l'écouvillon dans un tube à essai et vortexer.
3. Incuber selon le tableau ci-dessus.
4. Après l'étape d'enrichissement, le bouillon peut être stocké à 2–8 °C jusqu'à 72 hr.

### Inoculation et lecture

1. Prélever 0,1 ml d'échantillon à l'aide d'une pipette stérile et placer des gouttes sur le bord extérieur de la moitié de la surface gélosée.
2. À l'aide d'une pipette Pasteur stérile ou d'une öse d'inoculation, étaler l'échantillon sur la moitié de la surface gélosée dans un mouvement de va-et-vient.
3. Sur l'autre moitié de la surface gélosée, isoler le dépôt en stries relativement proches sur toute la boîte, en partant du bord du dernier étalement.
4. Incuber la boîte à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.
5. Les *Listeria* spp. forment des colonies de couleur bleue à bleu-vert sur la gélose RAPID'*Listeria* spp.
6. Il est possible de procéder à la lecture de la boîte après 48 hr d'incubation.
7. Après l'étape d'incubation, les boîtes peuvent être stockées à 2–8 °C pendant 72 hr.

## Section 8

### Confirmation des résultats positifs

1. Dans le contexte de la validation AOAC, confirmer les colonies isolées suspectes conformément à la procédure de test de confirmation classique décrite dans les méthodes de référence normalisées.
2. Dans le contexte de la marque NF VALIDATION, tous les échantillons identifiés comme positifs doivent être confirmés de l'une des façons suivantes :
  - a. À l'aide des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées CEN ou ISO (y compris l'étape de purification).
  - b. À l'aide de sondes nucléiques comme décrit dans la norme ISO 7218 (par exemple, kit iQ-Check *Listeria* spp., n° de référence 3578113) avec des colonies isolées (avec ou sans étape de purification).
  - c. Repiquage et inoculation par spot d'au moins une colonie isolée à partir de RAPID'*Listeria* spp. sur gélose RAPID'*L.mono*, avec un test de Gram et un test de catalase. Jusqu'à 15 colonies peuvent être confirmées sur une seule boîte gélosée RAPID'*L.mono*.
  - d. Repiquage et inoculation par spot d'au moins une colonie isolée sur une boîte gélosée PALCAM. Jusqu'à 15 colonies peuvent être confirmées sur une seule boîte gélosée PALCAM.
  - e. Utilisation de toute autre méthode certifiée par NF VALIDATION et basée sur un principe autre que celui de RAPID'*Listeria* spp. Le protocole validé de cette seconde méthode doit être respecté dans son intégralité. Toutes les étapes précédant l'étape intermédiaire où la confirmation est recherchée doivent être communes aux deux méthodes.
3. Non couvert par la marque NF Validation, les colonies suspectes peuvent être confirmées en utilisant le test MALDI Biotyper (le système Biotyper de Bruker comprend un spectromètre de masse MALDI time-of-flight et le logiciel MBT Compass, version 4) directement à partir d'une colonie isolée ou après une étape de purification.
4. En cas de résultats discordants (préssumé positif avec RAPID'*Listeria* spp., négatif avec la méthode de confirmation et particulièrement avec le test au latex), le laboratoire doit suivre les étapes nécessaires pour garantir la validité du résultat obtenu.

## Section 9



### Confirmation d'autres méthodes

#### Confirmation des résultats positifs avec iQ-Check *Listeria* spp. Agar (protocole certifié NF VALIDATION)

1. À l'aide d'une öse stérile, strier 100 µl de bouillon d'enrichissement (LSB ou Fraser ½) sur la gélose RAPID'*Listeria* spp.
2. Incuber les boîtes à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr.
3. Les *Listeria* spp. forment des colonies de couleur bleu-vert sur la gélose RAPID'*Listeria* spp.



## Section 10 Performance du test et validations

Certification	Domaine	Protocole de validation	Protocole de référence	Référence de certificat
AOAC-RI	Acier inoxydable, plastique, céramique et béton verni	Performance Tested Methods	USDA MLG 8.11	 License n° 080701
NF VALIDATION	Tous les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et les échantillons environnementaux de production	EN ISO 16140-2	NF EN ISO 11290-1/2017	 BRD : 07/12-12/06 MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR LE SECTEUR AGRO-ALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification Date de fin de validité : Se référer au certificat disponible sur le site internet AFNOR Certification : <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

## Section 11 Références

ISO 11290-1:2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. — Partie 1 : Méthode de recherche.

ISO 11290-2:2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria* spp. — Partie 2 : Méthode de dénombrement.

Ottaviani F., Ottaviani M., Agosti M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Refrigeration Symposium Proceedings, p 6. ADRIA, Quimper, France.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Samples. Référence en ligne <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>

## Section 12

# Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Avril 2020	10000127437 Ver A	- Modification importante - Nouvelle conception de document - Modification du numéro de document – version précédente RAPID' <i>Listeria</i> spp. _V2_01 juillet 2019
Octobre 2023	10000127437 Ver B	- Mise à jour des méthodes de confirmation

Visitez [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia) pour plus d'informations sur la gamme complète de milieux chromogènes RAPID.

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc., IQ-CHECK est une marque déposée de Bio-Rad Europe, GmbH dans certaines circonscriptions. Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.

**BIO-RAD**

**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

Website [bio-rad.com](http://bio-rad.com) USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23  
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23  
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300  
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000  
Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23  
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23  
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23  
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311  
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000127437 Ver B US/EG

---

# RAPID'*Listeria* spp. Agar

## Anwenderhandbuch

**Selektives chromogenes Medium zur Identifizierung und Zählung von *Listeria* spp. in Lebensmittel- und Umgebungsproben**

Katalog-Nr. 3564744, dehydriert, 500 g

Katalog-Nr. 3564745, Supplement 1, gefriergetrocknet, 10 Fläschchen

Katalog-Nr. 3564746, Supplement 2, flüssig, 10 Fläschchen



**BIO-RAD**

# Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung .....	1
Abschnitt 2	RAPID' <i>Listeria</i> spp. Testprinzip .....	1
Abschnitt 3	Theoretische Zusammensetzung .....	1
Abschnitt 4	Haltbarkeit und Lagerun .....	2
Abschnitt 5	Zusätzlich benötigte Materialien .....	2
	Geräte .....	2
	Zubehör .....	2
Abschnitt 6	Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle ....	3
	Vorsichtsmaßnahmen .....	3
	Anwendungsbeschränkungen .....	3
	Qualitätskontrolle .....	3
Abschnitt 7	Protokoll .....	3
	Vorbereitung des dehydrierten Mediums .....	3
	Probenanreicherung .....	4
	Beimpfung und Auswertung der Platten .....	4
Abschnitt 8	Bestätigung positiver Ergebnisse .....	5
Abschnitt 9	Bestätigung anderer Methoden .....	5
	Bestätigung positiver Ergebnisse mit iQ-Check <i>Listeria</i> spp. Kit (von NF VALIDATION zertifiziertes Protokoll) .....	5
Abschnitt 10	Testleistung und Testvalidierung .....	6
Abschnitt 11	Literatur .....	6
Abschnitt 12	Revisionshistorie .....	7

## Abschnitt 1

### Einleitung

Bakterien der Gattung *Listeria* sind grampositive, nicht sporenbildende, stäbchenförmige Organismen. Bestimmte Schlüsselmerkmale von *Listeria* ermöglichen das Überleben der Bakterien in Lebensmittelverarbeitungsbetrieben. *Listeria* sind Temperaturen gegenüber relativ tolerant und haben die Fähigkeit, sowohl bei kühlen als auch bei hohen Temperaturen zu überleben. Die Bakterien können auch in hohen Salzkonzentrationen und in einem weiten pH-Bereich wachsen. Sie können auf Oberflächen Biofilme bilden und dort jahrelang bleiben, beispielsweise in Verarbeitungsanlagen. *Listeria* spp. werden oft als Indikator-Organismen verwendet. Das Vorhandensein der nicht pathogenen Arten dieser Gattung weist auf mangelhafte Hygienepraktiken und das mögliche Vorhandensein pathogener *Listeria monocytogenes* hin. Ein Programm zur Umgebungsüberwachung auf *Listeria* ist ein wichtiger Bestandteil eines effektiven Plans zur Gefahrenanalyse kritischer Kontrollpunkte. Chromogene Substrate in Kulturmedien erleichtern die Verwendung der Medien mit Ergebnissen, die auf enzymatischen Reaktionen mit Farbumschlag beruhen.

## Abschnitt 2

### RAPID'*Listeria* spp. Testprinzip

Die Identifizierung von *Listeria* spp. mithilfe von RAPID'*Listeria* spp. beruht auf dem Nachweis von  $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität mit einem chromogenen Substrat. *Listeria*-Kolonien sind blau bis bläulich-grün.

Die Selektivität des Mediums wird durch die kombinierte Wirkung von Lithiumchlorid und einer Antibiotika-Mischung optimiert.

## Abschnitt 3

### Theoretische Zusammensetzung

Pepton	20 g
Hefeextrakt	1 g
Natriumpyruvat	2 g
Eisenammoniumcitrat	0,5 g
Maltose	1 g
Natriumchlorid (NaCl)	4 g
Lithiumchlorid (LiCl)	10,5 g
Silica	20 g
Wachstumsaktivatoren	2 g
Chromogene Zusammensetzung	75 mg
Antibiotika-Mischung	40 mg
Agar	12 g
Destilliertes Wasser	qsp 1.000 ml

---

Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,0–7,5

## Abschnitt 4 Haltbarkeit und Lagerung

- Dehydrierter Agar: Trocken und lichtgeschützt in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 15–25°C.
- Supplemente: Lichtgeschützt bei 2–8°C
- Aus dehydriertem Medium hergestellte Agarplatten: 1 Woche bei trockener und lichtgeschützter Lagerung in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 2–8°C

## Abschnitt 5 Zusätzlich benötigte Materialien

### Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Autoklav, in dem 15 min 121°C aufrechterhalten werden können
- Heizplatte
- Waage, bis auf 0,1 g genau
- Rührer / Homogenisator
- Thermostatisch kontrollierter Inkubator oder Inkubationskammer, bis auf  $\pm 1^\circ\text{C}$  genau
- Wasserbad

### Zubehör

- Bestätigung:
  - RAPID'*L.mono* Agar (Katalog-Nr. 3563694, 20 Platten x 90 mm; 3563964, 120 Platten x 90 mm; 3555294, gebrauchsfertiges Kit; 3564293, dehydriert, 500 g; 3564294, Supplement 1; 3564746, Supplement 2)
  - Palcam Agar (Katalog-Nr. 3564754, 500 g; 3564752, Supplement, 10 Fläschchen)
  - iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, Katalog-Nr. #3578113)
- Verdünnungsmittel zum Zählen, Tryptonsalz (Katalog-Nr. 3555754, 25 Röhrchen x 9 ml; 3555756, 6 Flaschen x 900 ml; 3555796, 4 Beutel x 3 L; 3564544, 500 g)
- Anreicherungsmedium, Halb Fraser Nährbouillon (Katalog-Nr. 3555797, 6 Flaschen x 225 ml; 3555794, 4 Beutel x 3 L; 3564604, dehydriert, 500 g; 3564616, Supplement, 10 Fläschchen)
- Anreicherungsmedium für Umgebungsproben: Modifiziertes University of Vermont-Medium (UVM)
- Impfösen
- Sterile Petrischalen
- Sterile Pipetten
- Sterile Wägebeutel

## Abschnitt 6

# Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

## Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis einzuhalten (EN ISO 7218). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen, lebenden Bakterien wie *Listeria* sollten angemessene Schutzvorkehrungen getroffen werden (zum Beispiel Handschuhe und Laborkittel tragen).
- Medien, die mit Lebensmittelproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und gemäß den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen zu entsorgen.
- Schwangere, ältere Menschen und immungeschwächte Personen sollten aufgrund des hohen Sterberisikos nicht mit *L. monocytogenes* arbeiten.
- Die Platten gemäß ISO 7218 vor dem Gebrauch bei 25–50°C trocknen lassen, bis auf der Oberfläche des Mediums keine Tröpfchen mehr vorhanden sind. Längeres Trocknen vermeiden, da sich sonst die Wirksamkeit des Mediums verändern könnte.

## Anwendungsbeschränkungen

- Im Rahmen der NF VALIDATION-Zertifizierung wurde die Zählung von *Listeria* spp. nicht geprüft.
- Im Rahmen der NF VALIDATION-Zertifizierung wurden keine Probenmengen über 25 g geprüft.

## Qualitätskontrolle

- Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt einer umfassenden Qualitätssicherung, d. h. vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte. Jede Charge des fertigen Produkts wird einer Qualitätskontrolle gemäß EN ISO 11133 unterzogen und gelangt nur dann in den Vertrieb, wenn sie die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Dokumente im Zusammenhang mit der Herstellung und der Überprüfung jeder Charge werden archiviert.
- Das Sicherheitsdatenblatt und das Analysezertifikat für das Produkt sind im Internet auf [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com) erhältlich.

## Abschnitt 7

# Protokoll

## Vorbereitung des dehydrierten Mediums

1. Den Behälter vor jedem Gebrauch schütteln.
2. 71,5 g Pulver werden in 950 ml destilliertem Wasser gelöst und zu einer homogenen Suspension gemischt.
3. In einem Autoklaven für 15 min bei 121°C sterilisieren. Auf 47–50°C abkühlen lassen.
4. Auf 1 L Medium zwei Fläschchen Supplement 1, jeweils mit 25 ml sterilem Wasser rekonstituiert, unter sterilen Bedingungen zugeben. Gründlich mischen.

5. Auf 1 L Medium zwei 5 ml Fläschchen Supplement 2 unter sterilen Bedingungen zugeben. Gründlich mischen.
6. In Petrischalen geben und auf dem Tisch fest werden lassen.
7. 500 g Pulver ergeben 7 L Medium.

## Probenanreicherung

Umfang (Matrizes)	Anreicherung	Zertifizierungsstelle
Edelstahl, Kunststoff, Keramik und versiegelter Beton	225 ml UVM-Bouillon zu einem Schwamm geben 10 ml UVM-Bouillon zu einem Tupfer geben 30 ± 1°C für 20–24 hr	AOAC-RI
Alle Lebensmittelproben und Umgebungsproben aus dem Bereich Produktion	<i>n</i> g/ml Probe in 9 x <i>n</i> ml Half Fraser Bouillon 30 ± 1°C für 22–26 hr	NF VALIDATION

1. *n* g oder *n* ml Probe in 9 x *n* ml Halb Fraser Bouillon verdünnen. Mit dem Rührer / Homogenisator homogenisieren.
2. Im Rahmen einer AOAC-Validierung die Anweisungen des Herstellers zum Inokulieren von Tupfern oder Schwämmen mit Umgebungsproben befolgen. Zu einem Schwamm in einem Wägebeutel 225 ml UVM-Bouillon geben und 2 min homogenisieren. Zu einem Tupfer in einem Teströhrchen 10 ml UVM-Bouillon geben und auf dem Vortex mischen.
3. Unter Beachtung der vorstehenden Tabelle inkubieren.
4. Nach der Anreicherung kann die Bouillon für bis zu 72 hr bei 2–8°C gelagert werden.

## Beimpfung und Auswertung der Platten

1. 0,1 ml Probe mit einer sterilen Pipette entnehmen und auf den äußeren Rand der Hälfte der Agaroberfläche tropfen.
2. Die Probe mit einer sterilen Pasteurpipette oder einer Impföse in einer Hin- und Herbewegung auf der Hälfte der Agaroberfläche verteilen.
3. Auf der anderen Hälfte der Agaroberfläche die aufgebrauchte Menge in relativ engen Streifen vom Rand der zuvor aufgetragenen Menge aus über die gesamte Schale ausstreichen, um Einzelkolonien zu erhalten.
4. Die Platte bei 37 ± 1°C für 24 ± 2 hr inkubieren.
5. *Listeria* spp. bildet auf RAPID'*Listeria* spp.- Agar blaue bis blau-grüne Kolonien.
6. Die Platte kann nach 48-stündiger Inkubation ausgewertet werden.
7. Nach der Inkubation können die Platten für 72 hr bei 2–8°C gelagert werden.



## Abschnitt 8

### Bestätigung positiver Ergebnisse

1. Im Rahmen einer AOAC-Validierung vermutete Einzelkolonien nach dem klassischen Bestätigungstestverfahren, das in den Standardreferenzmethoden beschrieben ist, bestätigen.
2. Im Rahmen einer NF-Validierung müssen alle als positiv identifizierten Proben mit einer der folgenden Methoden bestätigt werden:
  - a. Mit den in CEN- oder ISO-Normen beschriebenen herkömmlichen Tests (einschließlich des Reinigungsschritts).
  - b. Durch Verwendung von Nukleinsonden wie in der Norm ISO 7218 beschrieben (z. B. iQ-Check *Listeria* spp. Kit, Katalog-Nr. 3578113) unter Verwendung von Einzelkolonien (mit oder ohne Reinigungsschritt).
  - c. Erneutes Picken mindestens einer Einzelkolonie aus RAPID'*Listeria* spp. Agar zur Punktbeimpfung von RAPID'*L.mono* Agar, zusammen mit einem Gram-Test und einem Katalase-Test. Auf einer Platte RAPID'*L.mono* Agar können bis zu 15 Kolonien bestätigt werden.
  - d. Erneutes Picken mindestens einer Einzelkolonie und Punktbeimpfung einer PALCAM-Agarplatte. Auf einer Platte PALCAM-Agar können bis zu 15 Kolonien bestätigt werden
  - e. Verwendung einer anderen von NF VALIDATION zertifizierten Methode, die auf einem anderen Prinzip als dem von RAPID'*Listeria* spp. basiert. Das validierte zweite Methodenprotokoll sollte vollständig eingehalten werden. Alle Stufen vor der Zwischenstufe, ab der eine Bestätigung durchgeführt wird, müssen bei beiden Methoden gleich sein.
3. Zulassungsüberschreitend zur AFNOR Validierung kann das MALDI Biotyper System (MALDI-Time-Of-Flight-Massenspektrometer und MBT Compass Software Version 4, Bruker) zur Bestätigung einer positiven Probe verwendet werden. Hierzu kann eine isolierte Kolonie direkt oder nach einem Aufreinigungsschritt verwendet werden.
4. Bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen (vermutlich positiv auf RAPID'*Listeria* spp., negativ mit der Bestätigungsmethode und insbesondere beim Latex-Test) muss das Labor die erforderlichen Schritte ausführen, um die Validität des erhaltenen Ergebnisses sicherzustellen.



## Abschnitt 9

### Bestätigung anderer Methoden

#### Bestätigung positiver Ergebnisse mit iQ-Check *Listeria* spp. Kit (von NF VALIDATION zertifiziertes Protokoll)

1. Mit einer sterilen Impföse 100 µl Anreicherungsbouillon (LSB oder Halb Fraser Bouillon) auf RAPID'*Listeria* spp. Agar ausstreichen.
2. Die Platten bei 37 ± 1°C für 24 ± 2 hr inkubieren.
3. *Listeria* spp. bildet auf RAPID'*Listeria* spp. Agar blau-grüne Kolonien.

## Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierung

Zertifizierungsstelle	Umfang	Validierungsprotokoll	Referenzprotokoll	Zertifikat-Referenz
AOAC-RI	Edelstahl, Kunststoff, Keramik und versiegelter Beton	Leistungsgeprüfte Methoden	USDA MLG 8.11	 Lizenznr. 080701
NF VALIDATION	Alle Lebensmittelproben und Umgebungsproben aus dem Bereich Produktion	EN ISO 16140-2	NF EN ISO 11290-1/2017	 BRD: 07/12-12/06 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR-Zertifizierungsstelle Gültig bis: Siehe das auf der AFNOR-Zertifizierungswebsite verfügbare Zertifikat <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

## Abschnitt 11 Literatur

ISO 11290-1:2017. Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* und von *Listeria* spp. - Teil 1: Nachweisverfahren.

ISO 11290-2:2017. Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* und von *Listeria* spp. - Teil 2: Enumeration method.

Ottaviani F, Ottaviani M, Agosti M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Refrigeration Symposium Proceedings, S. 6. ADRIA, Quimper, Frankreich.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Kapitel 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online auf <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>

## Abschnitt 12

### Revisionshistorie

Versionsdatum	Dokumentnummer	Änderung
April 2020	10000127437 Ver A	- Bedeutende Änderung - Neues Dokumentdesign - Änderung der Dokumentnummer – vorhergehende Version RAPID' <i>Listeria</i> spp._V2_01. Juli 2019
Oktober 2023	10000127437 Ver B	- Präzisierung der Bestätigungsmethode

Weitere Informationen über unser vollständiges Angebot an chromogenen RAPID Medien finden Sie bei uns im Internet auf [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia).

BIO-RAD ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc. IQ-CHECK ist in bestimmten Ländern eine Marke der Bio-Rad Europe GmbH. Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.

**BIO-RAD**

**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

Website [bio-rad.com](http://bio-rad.com) **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23  
**Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23  
**Finland** 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300  
**Hungary** 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000  
**Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23  
**New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23  
**Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23  
**Sweden** 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311  
**United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000127437 Ver B US/EG

---

# RAPID'*Listeria* spp. Agar

## Manuale utente

**Terreno cromogenico selettivo per l'identificazione e l'enumerazione di *Listeria* spp. in prodotti alimentari destinati al consumo umano e campioni ambientali**

Catalogo # 3564744, disidratato, 500 g  
Catalogo #3564745, Supplement 1, liofilizzato, 10 flaconi  
Catalogo #3564746, Supplement 2, liquido, 10 flaconi



**BIO-RAD**

# Indice

Sezione 1	Introduzione .....	1
Sezione 2	Principio di RAPID' <i>Listeria</i> spp.....	1
Sezione 3	Formula teorica .....	1
Sezione 4	Durata e conservazione .....	2
Sezione 5	Materiali necessari ma non forniti.....	2
	Apparecchiatura .....	2
	Materiali.....	2
Sezione 6	Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità.....	3
	Precauzioni.....	3
	Limitazioni d'uso .....	3
	Controllo qualità .....	3
Sezione 7	Protocollo.....	4
	Preparazione del terreno disidratato.....	4
	Arricchimento del campione .....	4
	Inoculazione e lettura delle piastre .....	4
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi .....	5
Sezione 9	Conferma di altri metodi .....	5
Sezione 10	Performance del test e validazioni.....	6
Sezione 11	Riferimenti.....	6
Sezione 12	Cronologia delle revisioni .....	7

## Sezione 1

### Introduzione

I batteri appartenenti al genere *Listeria* sono organismi gram-positivi, non sporigeni, a forma di bastoncello. Alcune caratteristiche chiave di *Listeria* ne consentono la sopravvivenza negli ambienti degli stabilimenti di lavorazione alimentare. Le *Listeria* sono batteri relativamente termotolleranti, con la capacità di sopravvivere a temperature sia basse che elevate. La loro crescita è stata osservata in elevate concentrazioni di sale e in un ampio intervallo di pH. L'organismo è in grado di formare biofilm sulle superfici ambientali e di rimanere sulla superficie di uno stabilimento di lavorazione per anni. Le *Listeria* spp. vengono spesso utilizzate come organismi indicatori. La presenza di specie non patogene di questo genere è indicativa di scarse pratiche igienico-sanitarie e della possibile presenza di *Listeria monocytogenes* patogena. Un programma di controllo ambientale per *Listeria* costituisce un elemento importante di un solido piano HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points). L'uso di substrati cromogenici nei terreni di coltura ne aumenta la facilità d'uso grazie a risultati basati su reazioni enzimatiche che mutano di colore.

## Sezione 2

### Principio di RAPID' *Listeria* spp.

L'identificazione di *Listeria* spp. con il terreno RAPID' *Listeria* spp. si basa sul rilevamento dell'attività della  $\beta$ -D-glucosidasi mediante un substrato cromogenico. Le colonie di *Listeria* hanno un colore da blu a verde bluastrò.

La selettività del terreno è ottimizzata dall'azione combinata del cloruro di litio e di una miscela di antibiotici.

## Sezione 3

### Formula teorica

Peptone	20 g
Estratto di lievito	1 g
Piruvato di sodio	2 g
Citrato ferrico di ammonio	0,5 g
Maltosio	1 g
Cloruro di sodio (NaCl)	4 g
Cloruro di litio (LiCl)	10,5 g
Silicio	20 g
Attivatori di crescita	2 g
Miscela cromogenica	75 mg
Miscela di antibiotici	40 mg
Terreno di coltura agar	12 g
Acqua distillata	QSP 1.000 ml

---

pH finale a 25°C = 7,0–7,5

## Sezione 4

### Durata e conservazione

- Terreno di coltura agar disidratato: 15-25°C in una confezione sigillata con cura, in un luogo asciutto e buio
- Supplementi: 2-8°C in un luogo buio
- Piastra preparata con il terreno di coltura disidratato: 1 settimana a 2-8°C in una confezione sigillata con cura, in un luogo asciutto e buio

## Sezione 5

### Materiali necessari ma non forniti

#### Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Autoclave in grado di mantenere 121°C per 15 minuti
- Piastra riscaldante
- Bilancia, sensibilità di 0,1 g
- Agitatore/omogeneizzatore
- Incubatore o camera di incubazione con controllo termostatico, con precisione di  $\pm 1^\circ\text{C}$
- Bagnomaria

#### Materiali

- Conferma:
  - Agar RAPID'*L.mono* (RAPID'*L.mono* Agar, catalogo #3563694, 90 mm x 20 piastre; 3563964, 90 mm x 120 piastre; 3555294, kit pronto per l'uso; 3564293, disidratato, 500 g; 3564294, Supplemento 1; 3564746, Supplemento 2)
  - Agar PALCAM (PALCAM aga, catalogo #3564754, 500 g; 3564752, Supplemento, 10 flaconi)
  - iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (catalogo #3578113)
- Diluente per enumerazione, sale triptone (catalogo #3555754, 9 ml x 25 provette; 3555756, 900 ml x 6 flaconi; 3555796, 3 L x 4 sacche; 3564544, 500 g)
- Terreno di arricchimento, brodo Fraser 1/2 (catalogo #3555797, 225 ml x 6 flaconi; 3555794, 3 L x 4 sacche; 3564604, disidratato, 500 g; 3564616, Supplemento, 10 flaconi)
- Terreno di arricchimento per campioni ambientali: Terreno UVM (University of Vermont Medium) modificato
- Anse per inoculazione
- Piastre Petri sterili
- Pipette sterili
- Sacche di pesatura sterili

## Sezione 6

# Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità

## Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 7218). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi quali *Listeria*
- I terreni entrati in contatto con campioni di alimenti devono essere considerati come contaminati e quindi smaltiti in conformità alle normative e direttive locali
- Le donne in gravidanza, le persone anziane e i soggetti immunocompromessi non devono manipolare *L. monocytogenes* a causa dell'elevato tasso di mortalità
- Prima di utilizzare le piastre, lasciarle asciugare a 25–50°C fino alla scomparsa delle goccioline dalla superficie del terreno, conformemente alla norma ISO 7218. Evitare un'essiccazione prolungata per non compromettere l'efficacia del terreno

## Limitazioni d'uso

- Nell'ambito di NF VALIDATION, non è stata analizzata l'enumerazione di *Listeria* spp.
- Nell'ambito di NF VALIDATION, non sono stati analizzati i campioni con volume superiore a 25 g

## Controllo qualità

- Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo di qualità conformemente alla norma EN ISO 11133 e viene messo in commercio soltanto se risulta conforme ai criteri di accettazione. Tutta la documentazione relativa alla produzione e al controllo qualità di ciascun lotto è conservata a cura del fabbricante
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare il sito [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)



## Sezione 7 Protocollo

### Preparazione del terreno disidratato

1. Agitare sempre il flacone prima dell'uso.
2. Dissolvere 71,5 g di polvere in 950 ml di acqua distillata e miscelare fino ad ottenere una sospensione omogenea.
3. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47–50°C.
4. Per 1 L di terreno, aggiungere in condizioni asettiche due flaconi di Supplemento 1, ciascuno ricostituito con 25 ml di acqua sterile. Miscelare adeguatamente.
5. Per 1 L di terreno, aggiungere in condizioni asettiche due flaconi da 5 ml di Supplemento 2. Miscelare adeguatamente.
6. Dispensare su piastre Petri e lasciarle asciugare sul piano di lavoro.
7. Un flacone di polvere da 500 g produce 7 L di terreno.

### Arricchimento del campione

Oggetto (matrici)	Arricchimento	Certificazione
Acciaio inox, plastica, ceramica e calcestruzzo sigillato	Aggiungere 225 ml di brodo UVM alla spugna Aggiungere 10 ml di brodo UVM al tampone 30 ± 1°C per 20–24 hr	AOAC
Tutti i prodotti alimentari destinati al consumo umano e i campioni ambientali di produzione	<i>n</i> g/ml di campione in 9 x <i>n</i> ml di brodo Fraser ½ 30 ± 1°C per 22–26 hr	NF VALIDATION

1. Diluire *n* g o *n* ml di campione in 9 x *n* ml di brodo Fraser ½. Omogeneizzare con un agitatore/omogeneizzatore.
2. Nell'ambito della validazione di AOAC, seguire le istruzioni del produttore per l'inoculazione dei tamponi o delle spugne ambientali. Aggiungere 225 ml di brodo UVM alla spugna in uno sacchetto con filtro e omogeneizzare per 2 minuti. Aggiungere 10 ml di brodo UVM al tampone in una provetta per test e miscelare nel vortex.
3. Incubare secondo la tabella sopra riportata.
4. Al termine della fase di arricchimento, il brodo può essere conservato a 2–8°C per un massimo di 72 hr.

### Inoculazione e lettura delle piastre

1. Rimuovere 0,1 ml di campione con una pipetta sterile e posizionare le gocce sul bordo esterno di metà della superficie di agar.
2. Con una pipetta Pasteur sterile o un'ansa per inoculazione, distribuire il campione su metà della superficie di agar con un movimento alternativo.
3. Sull'altra metà della superficie di agar, strisciare per isolamento distribuendo il deposito in strisce relativamente ravvicinate sull'intera piastra dal bordo della distribuzione precedente.
4. Incubare la piastra a 37 ± 1°C per 24 ± 2 ore.
5. Le *Listeria* spp. formano colonie da blu a blu-verde sull'agar RAPID'*Listeria* spp.
6. È possibile leggere la piastra dopo 48 hr di incubazione.
7. Al termine della fase di incubazione, le piastre possono essere conservate a 2–8°C per 72 hr.

## Sezione 8

### Conferma dei risultati positivi

1. Nell'ambito della validazione di AOAC, confermare le colonie isolate sospette secondo la tradizionale procedura del test di conferma descritta nei metodi di riferimento standard.
2. Nell'ambito del marchio NF VALIDATION, tutti i campioni identificati come positivi devono essere confermati in uno dei seguenti modi:
  - a. Utilizzando i test convenzionali descritti nei metodi standard CEN o ISO (inclusa la fase di purificazione).
  - b. Mediante sonde nucleiche come descritto nella norma ISO 7218 (ad esempio, Kit iQ-Check *Listeria* spp., catalogo #3578113) utilizzando colonie isolate (con o senza fase di purificazione).
  - c. Prelevando nuovamente ed eseguendo l'inoculazione spot di almeno una colonia isolata da agar RAPID'*Listeria* spp. su agar RAPID'*L.mono*, unitamente ad un test di Gram test e ad un test della catalasi. È possibile confermare fino a 15 colonie su una singola piastra di agar RAPID'*L.mono*.
  - d. Prelevando nuovamente ed eseguendo l'inoculazione spot di almeno una colonia isolata su una piastra di agar PALCAM. È possibile confermare fino a 15 colonie su una singola piastra di agar PALCAM.
  - e. Utilizzando qualsiasi altro metodo certificato da NF VALIDATION in base ad un principio diverso da quello di RAPID'*Listeria* spp. Il protocollo del secondo metodo validato deve essere interamente rispettato. Tutte le fasi che precedono la fase intermedia dalla quale si ottiene la conferma devono essere comuni ai due metodi.
3. Al di fuori del marchio NF, utilizzare il sistema MALDI Biotyper (Spettrometro di massa MALDI-Time-Of-Flight e versione 4 del software MBT Compass, Bruker) testando direttamente una colonia isolata o dopo uno step di purificazione per confermare un campione positivo.
4. In caso di risultati discordanti (presunto positivo con RAPID'*Listeria* spp., negativo con metodo di conferma, e in particolare con il test al lattice), il laboratorio deve seguire le fasi necessarie per garantire la validità del risultato ottenuto.



## Sezione 9

### Conferma di altri metodi

#### Conferma dei risultati positivi con agar iQ-Check *Listeria* spp. (protocollo certificato da NF VALIDATION)

1. Utilizzando un'ansa sterile, strisciare 100 µl di brodo di arricchimento (brodo LSB o Fraser ½) su agar RAPID'*Listeria* spp.
2. Incubare le piastre a 37 ± 1°C per 24 ± 2 hr.
3. Le *Listeria* spp. formano colonie di colore blu-verde su agar RAPID'*Listeria* spp.

## Sezione 10 Performance del test e validazioni

Certificazione	Ambito di applicazione	Protocollo di validazione	Protocollo di riferimento	Riferimento al certificato
AOAC-RI	Acciaio inox, plastica, ceramica e calcestruzzo sigillato	Performance Tested Methods	USDA MLG 8.11	 PERFORMANCE TESTED <b>AOAC</b> RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 080701 Licenza # 080701
NF VALIDATION	Tutti i prodotti alimentari destinati al consumo umano e i campioni ambientali di produzione	EN ISO 16140-2	NF EN ISO 11290-1/2017	 BRD: 07/12-12/06 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato mediante certificazione AFNOR Valido fino a: fare riferimento al certificato disponibile sul sito internet AFNOR: <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

## Sezione 11 Riferimenti

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.

Ottaviani F, Ottaviani M, Agosti M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Refrigeration Symposium Proceedings, p 6. ADRIA, Quimper, France.

Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Capitolo 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online all'indirizzo <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>

## Sezione 12

# Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Aprile 2020	10000127437 Ver A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Modifica importante</li> <li>- Nuovo design del documento</li> <li>- Modifica al numero di documento – versione precedente RAPID' <i>Listeria</i> spp._V2_01 luglio 2019</li> </ul>
Ottobre 2023	10000127437 Ver B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chiarimento del metodo di conferma</li> </ul>

Per ulteriori informazioni sulla nostra gamma completa di terreni cromogenici RAPID, visitare il sito [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia).

BIO-RAD è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc. IQ-CHECK è un marchio registrato di Bio-Rad Europe GmbH in determinate giurisdizioni. Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà dei rispettivi titolari.

**BIO-RAD**

**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

Website [bio-rad.com](http://bio-rad.com) **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23  
**Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23  
**Finland** 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300  
**Hungary** 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000  
**Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23  
**New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23  
**Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23  
**Sweden** 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311  
**United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000127437 Ver B US/EG

---

# RAPID'*Listeria* spp. Agar

## Guia do usuário

**Meio cromogênico seletivo para a identificação e enumeração de *Listeria* spp. em produtos alimentícios humanos e amostras ambientais**

N° no catálogo 3564744, Desidratado, 500 g

N° do catálogo 3564745, Supplement 1, congelar seco, 10 frascos

N° do catálogo 3564746, Supplement 2, líquido, 10 frascos



**BIO-RAD**

# Índice

Seção 1	Introdução.....	1
Seção 2	RAPID' <i>Listeria</i> spp. Princípio .....	1
Seção 3	Fórmula Teórica.....	1
Seção 4	Prazo de validade e armazenamento.....	2
Seção 5	Materiais necessários, mas não fornecidos.....	2
	Equipamento.....	2
	Suprimentos.....	2
Seção 6	Precauções, limitações de uso e controle de qualidade.....	3
	Precauções.....	3
	Limitações de uso .....	3
	Controle de qualidade .....	3
Seção 7	Protocolo.....	3
	Preparação do Meio Desidratado.....	3
	Enriquecimento da amostra.....	4
	Inoculação e Leitura de Meios de Cultura .....	4
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos.....	4
Seção 9	Confirmação de outros métodos .....	5
	Confirmação de Resultados Positivos com iQ-Check <i>Listeria</i> spp. Agar (Protocolo certificado NF VALIDATION).....	5
Seção 10	Desempenho e validação do teste .....	6
Seção 11	Referências.....	6
Seção 12	Histórico de Revisão .....	7

## Seção 1

### Introdução

As bactérias pertencentes ao gênero *Listeria* são organismos gram-positivos, não formadores de esporos, em forma de bastão. Certas características chave da *Listeria* permitem a sobrevivência em ambientes de plantas de processamento de alimentos. As *Listeria* são bactérias relativamente termotolerantes, demonstrando a capacidade de sobreviver tanto em temperaturas refrigeradas quanto em altas temperaturas. O crescimento tem sido observado em altas concentrações de sal e em uma ampla faixa de pH. O organismo é capaz de formar biofilmes em superfícies ambientais e pode permanecer na superfície de uma planta de processamento por anos. *Listeria* spp. são muitas vezes utilizados como organismos indicadores. A presença das espécies não patogênicas deste gênero é indicativa de práticas sanitárias insatisfatórias e da possível presença da *Listeria monocytogenes* patogênica. A existência de um Programa de monitoramento ambiental de *Listeria* é um componente importante de um sólido plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle. O uso de substratos cromogênicos em meios de cultura aumenta a facilidade de uso dos meios com resultados baseados em reações enzimáticas de mudança de cor.

## Seção 2

### RAPID'*Listeria* spp. Princípio

A identificação de *Listeria* spp. usando o meio RAPID'*Listeria* spp. é baseada na detecção da atividade de  $\beta$ -D-glucosidase por um substrato cromogênico. As colônias de *Listeria* são azuis ou azuis-esverdeadas.

A seletividade do meio é otimizada pela ação combinada de cloreto de lítio e uma mistura de antibióticos.

## Seção 3

### Fórmula Teórica

Peptona	20 g
Extrato de levedura	1 g
Piruvato de sódio	2 g
Citrato de ferro e amônia	0,5 g
Maltose	1 g
Cloreto de sódio (NaCl)	4 g
Cloreto de lítio (LiCl)	10,5 g
Sílica	20 g
Ativadores do crescimento	2 g
Mistura cromogênica	75 mg
Mistura de antibióticos	40 mg
Ágar	12 g
Água destilada	qsp 1.000 ml

---

pH final a 25°C = 7,0–7,5

## Seção 4

### Prazo de validade e armazenamento

- Ágar desidratado: 15–25°C em embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado
- Suplemento: 2–8°C em local escuro
- Meio de cultura preparado a partir do ágar desidratado: 1 semana a 2–8°C em embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado

## Seção 5

### Materiais necessários, mas não fornecidos

#### Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Autoclave, capaz de manter 121°C por 15 min
- Placa de aquecimento
- Escala, sensibilidade de 0,1 g
- Misturador/homogeneizador
- Incubadora ou sala de incubação controlada termostaticamente, com precisão de  $\pm 1^\circ\text{C}$
- Lavagem em água

#### Suprimentos

- Confirmação:
  - RAPID'*L.mono* Agar (nº do catálogo 3563694, 90 mm x 20 placas; 3563964, 90 mm x 120 placas; 3555294, kit pronto para usar; 3564293, desidratado, 500 g; 3564294, suplemento 1; 3564746, suplemento 2)
  - PALCAM ágar (nº do catálogo 3564754, 500 g; 3564752, Suplemento, 10 frascos)
  - Kit de detecção PCR em tempo real iQ-Check *Listeria* spp. (nº do catálogo 3578113)
- Diluente para enumeração, sal de triptona (nº do catálogo 3555754, 9 ml x 25 tubos; 3555756, 900 ml x 6 garrafas, 3555796, sacos de 3 x 4 L, 3564544, 500 g)
- Meio de enriquecimento, ½ caldo Fraser (nº do catálogo 3555797, 225 ml garrafas x 6; 3555794, 3 L x 4 sacos; 3564604, desidratado, 500 g; 3564616, suplemento, 10 frascos)
- Meio de enriquecimento para amostras ambientais: Modified University of Vermont Medium (UVM modificado)
- Inoculação de loops
- Placas de Petri estéreis
- Pipetas estéreis
- Sacos de pesagem estéreis



## Seção 6

# Precauções, limitações de uso e controle de qualidade

## Precauções

- Respeite as boas práticas de laboratório (EN ISO 7218). É necessário o uso de proteção adequada, como luvas e jalecos, ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas, como a *Listeria*
- O meio que entrou em contato com amostras de alimentos deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais
- Gestantes, idosos e indivíduos imunocomprometidos não devem lidar com o *L. monocytogenes* devido a sua alta taxa de fatalidade
- Antes de usar as placas, deixe-as secar a 25–50°C até que as gotículas desapareçam da superfície do meio, de acordo com a ISO 7218. Evitar a secagem prolongada para não modificar a eficácia do meio

## Limitações de uso

- Como parte da NF VALIDATION, a enumeração de *Listeria* spp. não foi testada
- Como parte da NF VALIDATION, volumes de amostra acima de 25 g não foram testados

## Controle de qualidade

- Todos os produtos fabricados e comercializados pela Bio-Rad estão sujeitos aos procedimentos de garantia de qualidade em todas as etapas, desde a recepção da matéria-prima até a comercialização do produto final. Cada lote de produto acabado passa por um controle de qualidade de acordo com a EN ISO 11133 e é comercializado apenas quando satisfaz os critérios de aceitabilidade. A documentação relativa à produção e ao controle de qualidade de cada lote é mantida arquivada
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

## Seção 7

# Protocolo

## Preparação do Meio Desidratado

1. Agite sempre a garrafa antes de usar.
2. Dissolva 71,5 g de pó em 950 ml de água destilada e misture até obter uma suspensão homogênea.
3. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min. Resfriar a 47–50°C.
4. Para 1 L de meio, adicione asepticamente dois frascos de Supplement 1, cada um reconstituído com 25 ml de água estéril. Misture bem.
5. Para 1 L de meio, adicione asepticamente dois frascos de 5 ml de Supplement 2. Misture bem.

## Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

6. Dispense em placas de Petri e deixe-os na bancada para secar.
7. Um frasco de 500 g de pó produz 7 L de meio.

### Enriquecimento da amostra

Escopo (matrizes)	Enriquecimento	Certificação
Aço inox, plástico, cerâmica e concreto selado	Adicione 225 ml de caldo UVM à esponja Adicione 10 ml de caldo UVM ao cotonete 30 ± 1°C por 20–24 hr	AOAC
Todas as amostras ambientais de produtos e produção para alimentação humana	$n$ g/ml de amostra em ½ caldo 9 x $n$ ml Fraser 30 ± 1°C por 22–26 hr	NF VALIDATION

1. Dilua  $n$  g ou  $n$  ml de amostra em ½ caldo 9 x  $n$  ml Fraser. Uniformize com o misturador/homogeneizador.
2. No contexto da validação AOAC, siga as instruções do fabricante para inocular cotonetes ou esponjas ambientais. Adicione 225 ml de caldo UVM à esponja em um saco de pesagem e homogeneíze por 2 min. Adicione 10 ml de caldo UVM à esponja em um tubo de ensaio e agite.
3. Incube de acordo com a tabela acima.
4. Após o passo de enriquecimento, o caldo pode ser armazenado com uma temperatura entre 2–8°C por 72 hr.

### Inoculação e Leitura de Meios de Cultura

1. Remova 0,1 ml de amostra usando uma pipeta estéril e coloque gotas na borda externa da metade da superfície do ágar.
2. Usando uma pipeta Pasteur estéril ou um loop inoculante, distribua a amostra pela metade da superfície de ágar em um movimento de vai-e-vem.
3. Na outra metade da superfície de ágar, estrie o depósito em faixas relativamente próximas sobre todo a placa a partir da borda da distribuição anterior.
4. Deixe incubar o meio de cultura a 37 ± 1°C por 24 ± 2 hr.
5. *Listeria* spp. forma colônias azuis a azul-esverdeadas no RAPID *Listeria* spp. Agar.
6. É possível ler a placa após 48 hr de incubação.
7. Após o passo de incubação, as placas podem ser armazenadas a 2–8°C por 72 hr.

## Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

1. No contexto da validação AOAC, verifique as colônias isoladas suspeitas de acordo com o procedimento clássico de teste de confirmação descrito nos métodos de referência padrão.
2. No contexto do NF VALIDATION, todas as amostras identificadas como positivas devem ser confirmadas de uma das seguintes formas:

- a. Usando os testes convencionais descritos nos métodos padrão CEN ou ISO (incluindo a etapa de purificação).
  - b. Usar sondas nucléicas, conforme descrito na norma ISO 7218 (por exemplo, kit iQ-Check *Listeria* spp., nº do catálogo 3578113) usar colônias isoladas (com ou sem etapas de purificação).
  - c. Recoleta e inoculação pontual de pelo menos uma colônia isolada da RAPID'*Listeria* spp. Agar sobre a RAPID'*L.mono* Agar, juntamente com um teste de Gram e um teste de catalase. Até 15 colônias podem ser confirmadas em uma única placa de ágar RAPID'*L.mono*.
  - d. Recoleta e inoculação pontual de pelo menos uma colônia isolada em uma placa de ágar PALCAM. Até 15 colônias podem ser confirmadas em uma única placa de ágar PALCAM
  - e. Usar qualquer outro método certificado NF VALIDATION baseado em um princípio diferente do da RAPID'*Listeria* spp. O segundo protocolo de método validado deve ser completamente respeitado. Todas as etapas que precedem a etapa intermediária a partir da qual a confirmação é solicitada devem ser comuns aos dois métodos.
3. Fora da validação NF, use o sistema MALDI Biotyper (Espectômetro de Massa MALDI-Time-Of-Flight e software versão 4 MBT Compass, Bruker), teste direto a partir de uma colônia isolada ou depois da etapa de purificação para confirmar as amostras positivas.
  4. No caso de resultados discordantes (presumivelmente positivos com RAPID'*Listeria* spp., negativos com método de confirmação, e particularmente com o teste do látex), o laboratório deve seguir as etapas necessárias para garantir a validade do resultado obtido.



## Seção 9

### Confirmação de outros métodos

#### Confirmação de Resultados Positivos com iQ-Check *Listeria* spp. Agar (Protocolo certificado NF VALIDATION)

1. Usando um loop estéril, estriar 100 µl de caldo de enriquecimento (LSB ou Fraser ½ caldo) em RAPID'*Listeria* spp. Agar.
2. Incubar placas a 37 ± 1°C por 24 ± 2 hr.
3. *Listeria* spp. forma colônias azul-esverdeadas no RAPID'*Listeria* spp. Agar.

## Seção 10 Desempenho e validação do teste

Certificação	Escopo	Protocolo de Validação	Protocolo de Referência	Referência de Certificado
AOAC-RI	Aço inox, plástico, cerâmica e concreto selado	Métodos de desempenho testados	USDA MLG 8.11	 N° da licença 080701
NF VALIDATION	Todas as amostras ambientais de produtos e produção para alimentação humana	EN ISO 16140-2	NF EN ISO 11290-1/2017	 BRD: 07/12-12/06 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela certificação AFNOR Validade: Consulte o certificado disponível no site da Certificação AFNOR: <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

## Seção 11 Referências

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.

Ottaviani F, Ottaviani M, Agosti M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Refrigeration Symposium Proceedings, p 6. ADRIA, Quimper, França.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online em <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>

## Seção 12

### Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Abril de 2020	10000127437 Ver A	- Alteração importante - Novo design de documento - Alteração do número do documento – versão anterior RAPID' <i>Listeria</i> spp._V2_01 de julho de 2019
Outubro de 2023	10000127437 Ver B	- Esclarecimento do método de confirmação

Visite [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia) para obter mais informações sobre a nossa completa linha de meios cromogênicos RAPID.

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc. iQ-CHECK é uma marca comercial da Bio-Rad Europe GmbH em certas jurisdições. Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.



**Bio-Rad**  
Laboratories, Inc.

Life Science  
Group

Website [bio-rad.com](http://bio-rad.com) **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23  
**Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23  
**Finland** 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300  
**Hungary** 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000  
**Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23  
**New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23  
**Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23  
**Sweden** 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311  
**United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000127437 Ver B US/EG

---

# RAPID'*Listeria* spp. Agar

## Manual del usuario

**Medio cromogénico selectivo para la identificación y el recuento de *Listeria* spp. en muestras de productos alimentarios humanos y muestras ambientales**

Referencia #3564744, deshidratado, 500 g  
Referencia #3564745, Supplement 1, liofilizado, 10 viales  
Referencia #3564746, Supplement 2, líquido, 10 viales



**BIO-RAD**

# Tabla de Contenidos

Apartado 1	Introducción .....	1
Apartado 2	Principio de RAPID' <i>Listeria</i> spp.....	1
Apartado 3	Fórmula teórica .....	1
Apartado 4	Vida útil y conservación .....	2
Apartado 5	Materiales necesarios, no suministrados.....	2
	Equipamiento.....	2
	Fungibles .....	2
Apartado 6	Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad.....	3
	Precauciones.....	3
	Limitaciones de uso .....	3
	Control de calidad.....	3
Apartado 7	Protocolo.....	3
	Preparación del medio deshidratado.....	3
	Enriquecimiento de la muestra.....	4
	Inoculación y lectura de la placa .....	4
Apartado 8	Confirmación de los resultados positivos .....	5
Apartado 9	Confirmación de otros métodos .....	5
	Confirmación de los resultados positivos obtenidos con iQ-Check <i>Listeria</i> spp. (protocolo certificado NF VALIDATION).....	5
Apartado 10	Aplicaciones del ensayo y validaciones.....	6
Apartado 11	Referencias.....	6
Apartado 12	Historial de revisiones .....	7

## Apartado 1

### Introducción

Las bacterias del género *Listeria* son organismos gram-positivos, no formadores de esporas y en forma de bacilo. Ciertas características clave de la *Listeria* permiten la supervivencia en los entornos de las plantas de procesamiento de alimentos. La *Listeria* es una bacteria relativamente termotolerante, demostrando capacidad de supervivencia tanto a temperaturas de refrigeración como a altas temperaturas. Se ha observado crecimiento en altas concentraciones de sal y en un amplio rango de pH. Este organismo es capaz de formar biofilm en superficies ambientales y permanecer en la superficie de una planta de procesamiento durante años. *Listeria* spp. es usado a menudo como organismo indicador. La presencia de las especies no patógenas de este género es indicativa de prácticas sanitarias deficientes y de la posible presencia del patógeno *Listeria monocytogenes*. Contar con un Programa de Control Ambiental de *Listeria* es un elemento fundamental para un plan sólido de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control. El uso de sustratos cromogénicos en los medios de cultivo facilita su uso con resultados basados en reacciones enzimáticas de cambio de color.

## Apartado 2

### Principio de RAPID' *Listeria* spp.

La identificación de *Listeria* spp. usando el medio RAPID' *Listeria* spp. se basa en la detección de la actividad de la  $\beta$ -D-glucosidasa mediante un sustrato cromogénico. Las colonias de *Listeria* son de color azul a verde azulado.

La selectividad del medio se optimiza gracias a la acción combinada del cloruro de litio y una mezcla de antibióticos.

## Apartado 3

### Fórmula teórica

Peptona	20 g
Extracto de levadura	1 g
Piruvato de sodio	2 g
Citrato de hierro y amonio	0,5 g
Maltosa	1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	4 g
Cloruro de litio (LiCl)	10,5 g
Sílice	20 g
Activadores del crecimiento	2 g
Mezcla cromogénica	75 mg
Mezcla de antibióticos	40 mg
Agar	12 g
Agua destilada	c.s.p. 1.000 ml

---

pH final a 25°C = 7.0–7.5



## Apartado 4

### Vida útil y conservación

- Agar deshidratado: 15–25°C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro
- Suplementos: 2–8°C en un lugar oscuro
- Placa preparada desde agar deshidratado: 1 semana a 2–8°C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro

## Apartado 5

### Materiales necesarios, no suministrados

#### Equipamiento

- Todo el instrumental de laboratorio habitual
- Autoclave, capaz de mantener 121°C durante 15 min.
- Placa calefactada
- Balanza, sensibilidad de 0,1 g
- Agitador/homogeneizador
- Incubadora o sala de incubación controlada termostáticamente , con una precisión de  $\pm 1^\circ\text{C}$
- Baño termostático

#### Fungibles

- Confirmación:
  - RAPID'L. *mono* Agar (referencia #3563694, 90 mm x 20 placas; 3563964, 90 mm x 120 placas; 3555294, kit listo para usar; 3564293, deshidratado, 500 g; 3564294, Supplement 1; 3564746, Supplement 2)
  - PALCAM agar (referencia #3564754, 500 g; 3564752, Supplement, 10 viales)
  - iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (referencia #3578113)
- Diluyente para recuento, Sal Triptona (referencia #3555754, 9 ml x 25 tubos; 3555756, 900 ml x 6 frascos; 3555796, 3 L x 4 bolsas; 3564544, 500 g)
- Medio de enriquecimiento, caldo Fraser 1/2 (referencia #3555797, 225 ml frascos x 6; 3555794, 3 L x 4 bolsas; 3564604, deshidratado, 500 g; 3564616, Supplement, 10 viales)
- Medio de enriquecimiento para muestras ambientales: Medio de la Universidad de Vermont Modificado modificado(UVM)
- Asas de siembra
- Placas de Petri estériles
- Pipetas estériles
- Bolsas estériles para pesada

## Apartado 6

# Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad

## Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 7218). Se debe usar una protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas como *Listeria*
- Los medios que han estado en contacto con muestras de alimentos deben considerarse potencialmente contaminados y deben eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales
- Las mujeres embarazadas, los ancianos y los individuos inmunocomprometidos no deben trabajar con *L. monocytogenes* debido a su elevada tasa de mortalidad
- Antes de usar las placas, déjelas secar a 25-50°C hasta que la humedad desaparezca de la superficie del medio, de conformidad con la norma ISO 7218. Evite un secado muy prolongado para no modificar la eficacia del medio

## Limitaciones de uso

- En el contexto de validación NF VALIDATION, no se ha testado el recuento de *Listeria* spp.
- En el contexto de validación NF VALIDATION, no se han testado tamaños de muestra superiores a 25 g

## Control de calidad

- Todos los productos fabricados y comercializados por Bio-Rad están sujetos a un protocolo de garantía de calidad en todas las etapas, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos acabados. Cada lote de producto acabado se somete a un control de calidad según la norma EN ISO 11133 y su comercialización está condicionada a que cumpla los criterios de aceptabilidad. Asimismo, se mantiene un registro de toda la documentación relativa a la producción y el control de calidad de cada lote
- Para información de seguridad del producto SDS y del certificado de análisis, visite [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

## Apartado 7

# Protocolo

## Preparación del medio deshidratado

1. Agitar siempre el frasco antes de usar.
2. Disolver 71,5 g de polvo en 950 ml de agua destilada y mezclar hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Enfriar a 47–50°C.

## Apartado 7 Protocolo

4. Para 1 L de medio, añadir asépticamente dos viales de Supplement 1, cada uno reconstituido con 25 ml de agua estéril. Mezclar bien.
5. Para 1 L de medio, añadir asépticamente dos viales de 5 ml de Supplement 2. Mezclar bien.
6. Dispensar en placas de Petri y dejar en una superficie nivelada para secar.
7. Un frasco de 500 g de polvo permite obtener 7 L de medio.

## Enriquecimiento de la muestra

Alcance (matrices)	Enriquecimiento	Certificación
Acero inoxidable, plástico, cerámica y hormigón o pavimentos agroalimentarios	Añadir 225 ml de caldo UVM a la esponja Añadir 10 ml de caldo UVM al hisopo 30 ± 1°C durante 20–24 hr	AOAC
Todos los productos alimentarios humanos y muestras ambientales de producción	$n$ g/ml de muestra en 9 x $n$ ml de caldo Fraser ½ 30 ± 1°C durante 22–26 hr	NF VALIDATION

1. Diluir  $n$  g o  $n$  ml de muestra en 9 x  $n$  ml de caldo Fraser ½. Homogeneizar con agitador/homogeneizador.
2. Con respecto a la validación de AOAC, seguir las instrucciones del fabricante para la inoculación de esponjas o hisopos ambientales. Añadir 225 ml de caldo UVM a la esponja en una bolsa para pesada y homogeneizar durante 2 min. Añadir 10 ml de caldo UVM al hisopo en un tubo de ensayo y agitar (vórtex).
3. Incubar conforme a la tabla anterior.
4. Después de la etapa de enriquecimiento, el caldo se puede conservar a 2–8 °C durante 72 hr.

## Inoculación y lectura de la placa

1. Tome 0,1 ml de muestra con una pipeta estéril y dispense gotas en el borde exterior de la mitad de la superficie del agar.
2. Utilizando una pipeta Pasteur estéril o un asa de siembra, distribuya la muestra sobre la mitad de la superficie de agar en un movimiento de ida y vuelta.
3. En la otra mitad de la superficie del agar, aisle extendiendo el depósito en estrías relativamente cercanas sobre toda la placa desde el borde de la extensión anterior.
4. Incube la placa a 37 ± 1°C durante 24 ± 2 hr.
5. *Listeria* spp. forman colonias de color azul a azul-verde en RAPID<sup>®</sup> *Listeria* spp. Agar.
6. Es posible realizar una lectura de placa tras 48 hr de incubación
7. Tras la etapa de incubación, las placas pueden almacenarse a 2–8°C durante 72 hr.

## Apartado 8

### Confirmación de los resultados positivos

1. En el contexto de la validación AOAC, confirme las colonias aisladas sospechosas siguiendo el procedimiento clásico de prueba de confirmación indicado en los métodos de referencia normalizados.
2. En el contexto de validación NF VALIDATION, todas las muestras identificadas como positivas deben confirmarse de una de las siguientes formas:
  - a. Empleando las pruebas convencionales descritas en los métodos estándar CEN o ISO (incluida la fase de purificación).
  - b. Utilizando sondas nucleicas como se describe en la norma ISO 7218 (por ejemplo, iQ-Check *Listeria* spp. Kit, referencia #3578113) sobre colonias aisladas (con o sin fase de purificación).
  - c. Recogida de al menos una colonia aislada de RAPID'*Listeria* spp. Agar en RAPID'*L. mono* Agar, junto con una prueba de Gram y una prueba de catalasa. Se pueden confirmar hasta 15 colonias en una única placa de RAPID'*L. mono* Agar.
  - d. Recogida e inoculación localizada de al menos una colonia aislada en una placa de agar PALCAM. Se pueden confirmar hasta 15 colonias en una única placa de agar PALCAM
  - e. Usando cualquier otro método certificado NF VALIDATION basado en un principio diferente al de RAPID'*Listeria* spp. Se deberá respetar en su totalidad el protocolo del segundo método validado. Todas las etapas previas a la etapa intermedia desde la que se realiza la confirmación deben ser comunes a los dos métodos.
3. No contemplado en el marco de Validación NF, las colonias sospechosas pueden ser confirmadas empleando el test MALDI Biotyper (Espectómetro de Masa MALDI-Time-Of-Flight y el Software MBT Compass version 4, Bruker), directamente a partir de una colonia aislada o tras una etapa de purificación.
4. En el caso de producirse resultados discordantes (supuestos positivos con RAPID'*Listeria* spp., negativos con el método de confirmación, y en particular con la prueba de látex), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.



## Apartado 9

### Confirmación de otros métodos

#### Confirmación de los resultados positivos obtenidos con iQ-Check *Listeria* spp. (protocolo certificado NF VALIDATION)

1. Usando un asa estéril, aísle 100 µl de caldo de enriquecimiento (caldo LSB o Fraser ½) en RAPID'*Listeria* spp. Agar.
2. Incube la placa a 37 ± 1°C durante 24 ± 2 hr.
3. *Listeria* spp. forman colonias de color azul-verde en RAPID'*Listeria* spp. Agar.

## Apartado 10 Aplicaciones del ensayo y validaciones

Certificación	Alcance	Protocolo de validación	Protocolo de referencia	Referencia de certificado
AOAC-RI	Acero inoxidable, plástico, cerámica y hormigón o pavimentos agroalimentarios	Performance Tested Methods	USDA MLG 8.11	 Licencia# 080701
NF VALIDATION	Todos los productos alimentarios humanos y muestras ambientales de producción	EN ISO 16140-2	NF EN ISO 11290-1/2017	 BRD: 07/12-12/06 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado mediante certificación AFNOR Válido hasta: Consulte el certificado disponible en la página web de Certificación AFNOR: <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

## Apartado 11 Referencias

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.

Ottaviani F, Ottaviani M, Agosti M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Refrigeration Symposium Proceedings, p 6. ADRIA, Quimper, France.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online en <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>

## Apartado 12

### Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Abril de 2020	10000127437 Ver A	- Cambio significativo - Nuevo diseño del documento - Cambio en el número de documento - versión anterior RAPID' <i>Listeria</i> spp._V2_01 julio 2019
Octubre de 2023	10000127437 Ver B	- Aclaración del método de confirmación

Visite [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia) para más información sobre nuestra gama completa de medios cromogénicos RAPID.

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc. IQ-CHECK es una marca registrada de Bio-Rad Europe GmbH en diversos países. Todas las marcas comerciales utilizadas en el presente documento son propiedad de sus respectivos dueños.

**BIO-RAD**

**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

Website [bio-rad.com](http://bio-rad.com) **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23 **France** 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050 **Italy** 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23 **Russian Federation** 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23 **Switzerland** 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311 **United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000127437 Ver B US/EG

---

# RAPID'*Listeria* spp. Agar

## 用户指南

用于对人类食品和环境样品中 *李斯特菌属* 进行鉴定和计数的选择性显色培养基

目录 #3564744, 干粉, 500 g

目录 #3564745, 添加剂 1, 冻干, 10 小瓶

目录 #3564746, 添加剂 2, 液体, 10 小瓶



**BIO-RAD**

# 目录

第 1 部分	简介 .....	1
第 2 部分	RAPID' <i>Listeria</i> spp. 原理 .....	1
第 3 部分	理论配方 .....	1
第 4 部分	保质期及储存条件 .....	2
第 5 部分	其他仪器、试剂与耗材 .....	2
	仪器 .....	2
	试剂和耗材 .....	2
第 6 部分	预防措施、使用限制和质量控制 .....	3
	预防措施 .....	3
	使用限制 .....	3
	质量控制 .....	3
第 7 部分	操作流程 .....	3
	干粉培养基的制备 .....	3
	样品增菌 .....	4
	接种和平板读数 .....	4
第 8 部分	阳性结果的确认 .....	4
第 9 部分	其他方法的确认 .....	5
	用 iQ-Check <i>Listeria</i> spp. 确认阳性结果 ( NF 验证认证方案 ) .....	5
第 11 部分	参考资料 .....	6
第 12 部分	修订记录 .....	7



## 第 1 部分

### 简介

属于 *李斯特菌属* 的细菌是革兰氏阳性、无芽孢杆菌。 *李斯特菌* 的某些关键特征使其能够在食品加工厂环境中生存。 *李斯特菌* 是相对耐热的细菌，在冷藏和高温环境下都能存活。在高盐浓度和较宽的 pH 范围内观察到生长能力。该生物体能够在环境表面形成生物膜，并能在加工设备的表面停留多年。 *李斯特菌属* 经常被用作指示生物。该属非致病性菌种的存在表明卫生条件差，并且可能存在致病性 *单核细胞增生李斯特菌*。制定 *李斯特菌* 环境监测计划是可靠的危害分析关键控制点计划的重要组成部分。在培养基中使用显色底物提高了培养基的易用性，根据酶促反应引起的显著颜色变化从而得出最终结果。

## 第 2 部分

### RAPID' *Listeria* spp. 原理

使用 RAPID' *Listeria* spp. 培养基鉴定 *李斯特菌属* 是基于用显色底物检测  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活性。

*李斯特菌* 的菌落是蓝色至蓝绿色。

通过氯化锂和抗生素混合物的联合作用优化培养基的选择性。

## 第 3 部分

### 理论配方

蛋白胨	20 g
酵母抽提物	1 g
丙酮酸钠	2 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
麦芽糖	1 g
氯化钠 (NaCl)	4 g
氯化锂 (LiCl)	10.5 g
二氧化硅	20 g
生长活化剂	2 g
显色混合物	75 mg
抗生素混合物	40 mg
琼脂	12 g
蒸馏水	qsp 1,000 ml

---

25°C 时的最终 pH 值 = 7.0–7.5

## 第 4 部分

### 保质期及储存条件

## 第 4 部分

### 保质期及储存条件

- 干粉培养基：在 15–25°C 下妥善密封包装，置于干燥避光处
- 添加剂：2–8°C 避光处
- 干粉平板的制备：在 2–8°C 下妥善密封包装，干燥避光处储存 1 周

## 第 5 部分

### 其他仪器、试剂与耗材

#### 仪器

- 所有常用的实验室仪器
- 高压灭菌器，能够在 121°C 下维持 15 分钟
- 热平板
- 天平，灵敏度为 0.1 g
- 搅拌器/均质器
- 恒温控制的孵化器或孵化室，精确到  $\pm 1^\circ\text{C}$
- 水浴

#### 试剂和耗材

- 确认：
  - RAPID'*L.mono* 培养基 ( 目录 #3563694, 90 mm x 20 块平板; 3563964, 90 mm x 120 块平板; 3555294, 即用型试剂盒; 3564293, 干粉, 500 g; 3564294, 添加剂 1; 3564746, 添加剂 2 )
  - PALCAM 培养基 ( 目录 #3564754, 500 g; 3564752, 添加剂, 10 小瓶 )
  - iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit ( 目录 #3578113 )
- 计数用稀释剂，胰蛋白胍盐 ( 目录 #3555754, 9 ml x 25 管; 3555756, 900 ml x 6 瓶; 3555796, 3 L x 4 袋; 3564544, 500 g )
- 增菌培养基，半弗雷泽培养基 ( 目录 #3555797, 225 ml 瓶 x 6; 3555794, 3 L x 4 袋; 3564604, 干粉, 500 g; 3564616, 添加剂, 10 小瓶 )
- 用于环境样品的增菌培养基：改良后的佛蒙特大学培养基 (UVM)
- 接种环
- 无菌培养皿
- 无菌移液管
- 无菌称重袋

## 第 6 部分

### 预防措施、使用限制和质量控制

#### 预防措施

- 遵守良好实验室规范 (EN ISO 7218)。在处理 *李斯特菌* 等具有潜在传染性的活细菌时，应穿戴适当的防护装置，如手套和实验室外套
- 与食品样品接触过的培养基应被视为潜在传染性材料处理，并根据当地法规和规定进行废弃物处理
- 由于 *单核细胞增生李斯特菌* 的致死率很高，孕妇、老年人和免疫功能低下的人群不应接触
- 在使用平板之前，根据 ISO 7218，在 25-50°C 下进行烘干，直到液滴从培养基表面消失。避免长时间烘干，以免改变培养基的功效

#### 使用限制

- 作为 NF 验证的一部分，*李斯特菌属* 的计数未经过测试
- 作为 NF 验证的一部分，超过 25 g 的样品量未经过测试

#### 质量控制

- Bio-Rad 公司生产和销售的每一种产品，从接收原材料到销售成品的各个阶段都要受到质量保证程序的约束。每批成品都根据 EN ISO 11133 进行质量控制，只有满足验收标准才能上市。与每批次生产和质量控制有关的文件均进行存档
- 有关 SDS 产品安全信息和分析证书，请访问 [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)。

## 第 7 部分

### 操作流程

#### 干粉培养基的制备

1. 使用前请摇晃瓶子。
2. 将 71.5 g 粉末溶解在 950 ml 蒸馏水中，并进行搅拌，直到得到均匀的悬浮液。
3. 在高压灭菌器中 121°C 下灭菌 15 分钟。冷却至 47-50°C。
4. 对于 1 L 的培养基，以无菌方式加入两瓶添加剂 1，每瓶用 25 ml 无菌水重新调制。混合均匀。
5. 对于 1 L 的培养基，以无菌方式加入两小瓶 5 ml 的添加剂 2。混合均匀。
6. 分装在培养皿中，并将其放在台面上晾干。
7. 一瓶 500 g 粉末可制成 7 L 培养基。

## 第 8 部分

### 阳性结果的确认

#### 样品增菌

范围 ( 食品基质 )	增菌条件	证书
不锈钢、塑料、陶瓷和密封混凝土	将 225 ml UVM 肉汤加入海绵中 将 10 ml UVM 肉汤加入拭子中 30 ± 1°C 下培养 20-24 小时	AOAC
所有人类食品及生产环境样品	<i>n</i> g/ml 样品在 9 x <i>n</i> ml 半弗雷泽肉汤中 30 ± 1°C 下培养 22-26 小时	NF 验证

1. 在 9 x *n* ml 半弗雷泽肉汤中稀释 *n* g 或 *n* ml 样品。用搅拌器/均质器进行均质处理。
2. 在 AOAC 验证的背景下，遵循制造商的说明书接种环境拭子或海绵。将 225 ml UVM 肉汤加入称重袋中的海绵中，并均质化 2 分钟。将 10 ml UVM 肉汤加入试管中的拭子中并进行涡旋。
3. 根据上表进行培养。
4. 增菌步骤后，肉汤可在 2-8°C 下储存长达 72 小时。

#### 接种和平板读数

1. 使用无菌移液管取出 0.1 ml 样品，滴在一半培养基表面的外缘。
2. 使用无菌巴斯德吸管或接种环，以来回移动的方式将样品铺满半个培养基表面。
3. 在另一半的培养基表面上，通过将沉积物以相对紧密的条纹从上一次铺开的边缘铺满整个培养皿来进行分离。
4. 在 37±1°C 下培养平板 24±2 小时。
5. 李斯特菌属在 RAPID' *Listeria* spp. 培养基上形成蓝色至蓝绿色的菌落。
6. 培养 48 小时后也可以读取结果。
7. 培养结束后，平板可以在 2-8°C 下储存 72 小时。

## 第 8 部分

### 阳性结果的确认

1. 在 AOAC 验证的背景下，根据标准参考方法中描述的经典确认测试程序确认可疑的分离菌落。
2. 在 NF 验证的背景下，所有被确定为阳性的样品必须以下列方式之一加以确认：
  - a. 使用 CEN 或 ISO 标准方法中描述的常规测试 ( 包括纯化步骤 ) 。
  - b. 使用 ISO 7218 标准中描述的核探针 ( 例如，iQ-Check *Listeria* spp. Kit，目录 #3578113 )、使用分离的菌落 ( 有或无纯化步骤 ) 。
  - c. 将从 RAPID' *Listeria* spp. 培养基中分离出的至少一个菌落重新挑选并定点接种到 RAPID' *L.mono* 培养基上，同时进行革兰氏试验和过氧化氢酶试验。一个 RAPID' *L.mono* 培养基上最多可以确认 15 个菌落。

- d. 在 PALCAM 培养基上重新挑选至少一个分离的菌落并定点接种。一个 PALCAM 培养基上最多可以确认 15 个菌落
  - e. 直接从分离的菌落或在纯化步骤之后采用 MALDI Biotyper 试验 ( Bruker Biotyper 系统包括 MALDI 飞行时间质谱仪和 MBT Compass 软件, 第 4 版 )。由 MALDI Biotyper Complete Solution 提供的菌属和/或菌种的鉴定信息不包括在 NF 验证标志的范围内。
  - f. 使用任何其他与 RAPID' *Listeria* spp. 不同原理的 NF 验证认证的方法, 都应完全遵循第二种方法的验证方案。在寻求确认的中间阶段之前的所有阶段必须是这两种方法所共有的。
3. 在 NF 验证标记之外, 使用 MALDI Biotyper 系统(MALDI 飞行时间质谱仪和 MBT Compass 软件版本 4,Bruker)可直接对分离的菌落或在纯化步骤后测试, 以确认样品为阳性。
  4. 如果出现不一致的结果 ( RAPID' *Listeria* spp. 推定为阳性, 而确认法特别是乳胶试验则为阴性 ), 实验室必须遵循必要的步骤, 以确保所获结果的有效性。

## 第 9 部分

### 其他方法的确认

#### 用 iQ-Check *Listeria* spp. 确认阳性结果 ( NF 验证认证方案 )

1. 使用无菌环, 在 RAPID' *Listeria* spp. 培养基上滴加 100 µl 增菌液 ( LSB 或半弗雷泽肉汤 )。
2. 在 37±1°C 下培养平板 24±2 小时。
3. 李斯特菌属在 RAPID' *Listeria* spp. 培养基上形成蓝绿色的菌落。

## 第 10 部分

### 测试性能和验证

证书	范围	验证方案	参考方案	证书参考
AOAC-RI	不锈钢、塑料、陶瓷和密封混凝土	性能测试方法	USDA MLG 8.11	 许可 # 080701
NF 验证	所有人类食品及生产环境样品	EN ISO 16140-2	NF EN ISO 11290-1/2017	 BRD : 07/12-12/06 农业企业的替代分析方法 通过 AFNOR 认证 有效期请参阅 AFNOR 认证网站上提供的证书: <a href="http://nf-validation.afnor.org/en">http://nf-validation.afnor.org/en</a>

## 第 11 部分

### 参考资料

## 第 11 部分

### 参考资料

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.

Ottaviani F, Ottaviani M, Agosti M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Refrigeration Symposium Proceedings, p 6. ADRIA, Quimper, France.

United States Department of Agriculture. *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8.11 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-to-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Sponges. Online at <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>

## 第 12 部分

### 修订记录

发布日期	文件编号	变更
2020 年 4 月	10000127437 Ver A	- 主要变更 - 新的文档设计 - 文件编号变更 – 先前版本 RAPID' <i>Listeria</i> spp._V2_01 2019 年 7 月
2023 年 10 月	10000127437 Ver B	- 确认方法澄清

请访问 [www.bio-rad.com/rapidmedia](http://www.bio-rad.com/rapidmedia) , 了解有关我们全系列 RAPID 显色培养基的更多信息。

BIO-RAD 是 Bio-Rad Laboratories, Inc. 的商标。IQ-CHECK 是 Bio-Rad Europe GmbH 在某些司法管辖区的商标。此处使用的所有商标均为其各自所有者的财产。

**BIO-RAD**

**Bio-Rad  
Laboratories, Inc.**

Life Science  
Group

Website [bio-rad.com](http://bio-rad.com) USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23  
Brazil 4003 0399 Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23  
Finland 00 800 00 24 67 23 France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300  
Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050 Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000  
Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 00 800 00 24 67 23  
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23  
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23  
Sweden 00 800 00 24 67 23 Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311  
United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

Sig 0220



10000127437 Ver B US/EG