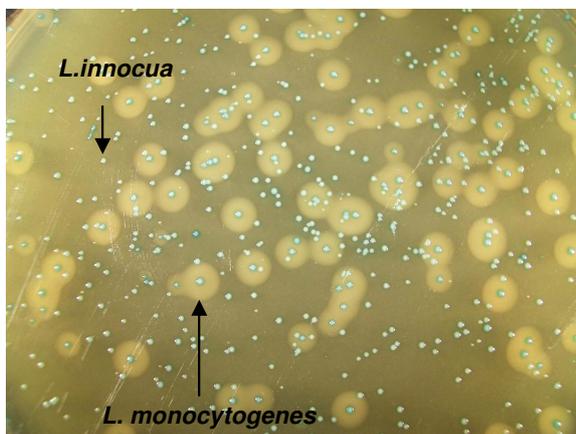


# ALOA<sup>®</sup>

## AGAR LISTERIA ACC. TO OTTAVIANI & AGOSTI ALOA<sup>®</sup> ENRICHMENT-SELECTIVE SUPPLEMENTS

Terreno in polvere, supplemento selettivo, arricchimento e piastre pronte all'uso per l'isolamento di *Listeria* spp. e la differenziazione di *L. monocytogenes*.



ALOA: colonie di *L. monocytogenes* e *L. innocua*

### FORMULE TIPICHE

#### AGAR LISTERIA ACC. TO OTTAVIANI & AGOSTI (ALOA<sup>®</sup>) (g/l) TERRENO IN POLVERE E PRONTO ALL'USO IN FLACONE

Peptone	18,00
Triptone	6,00
Estratto di lievito	10,00
Sodio piruvato	2,00
Glucosio	2,00
Magnesio glicerofosfato	1,00
Magnesio solfato	0,50
Sodio cloruro	5,00
Litio cloruro	10,00
Disodio idrogeno fosfato anidro	2,50
5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucopiranoside	0,05
Agar	13,50

<b>ALOA<sup>®</sup> SELECTIVE SUPPLEMENT</b> (contenuto della fiala da 500 ml)	
Acido nalidissico, sale sodico	0,010 g
Ceftazidime	0,010 g
Cicloeximide	0,025 g
Polimixina B solfato	38350 UI

<b>ALOA<sup>®</sup> SELECTIVE SUPPLEMENT</b> (contenuto della fiala da 200 ml)	
Acido nalidissico, sale sodico	0,004 g
Ceftazidime	0,004 g
Cicloeximide	0,01 g
Polimixina B solfato	15340 UI

<b>ALOA<sup>®</sup> ENRICHMENT SUPPLEMENT</b> (contenuto della fiala 500 ml)	
L-α- Fosfatidilinositolo	1,0 g

<b>ALOA<sup>®</sup> ENRICHMENT SUPPLEMENT</b> (contenuto della fiala da 200 ml)	
L-α- Fosfatidilinositolo	0,4 g

#### ALOA<sup>®</sup>, PIASTRE PRONTE ALL'USO (g/l)

Peptone	18,00
Triptone	6,00
Estratto di lievito	10,00
Sodio piruvato	2,00
Glucosio	2,00
Magnesio glicerofosfato	1,00
Magnesio solfato	0,50
Sodio cloruro	5,00
Litio cloruro	10,00
Disodio idrogeno fosfato anidro	2,50
5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucopiranoside	0,05
Agar	13,50
L-α- Fosfatidilinositolo	2,00
Acido nalidissico, sale sodico	0,020
Ceftazidime	0,020
Cicloeximide	0,10
Polimixina B solfato	76700 UI

**IMPIEGO PREVISTO**

Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA) è un terreno selettivo, cromogenico e differenziale per la determinazione ed il conteggio di *Listeria monocytogenes* negli alimenti ed in altri campioni. Il terreno ALOA è raccomandato dalla norma EN ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004 (determinazione di *L.monocytogenes* negli alimenti e mangimi) e dalla norma EN ISO 11290-2:1998/ Amd1:2004 (enumerazione di *L.monocytogenes* negli alimenti e mangimi).

**PRINCIPIO**

L'azione selettiva è dovuta alla presenza nel terreno di base del litio cloruro ed all'aggiunta della miscela antimicrobica del supplemento selettivo contenente ceftazidime, polymixina B, acido nalidissico e cicloeximide. L'azione differenziale è dovuta alla presenza nel terreno del composto cromogenico X-glucoside quale substrato per l'evidenziazione dell'enzima  $\beta$ -glucosidasi, comune a tutte le specie di *Listeria*. L'azione differenziale specifica è ottenuta con un substrato specifico per la fosfolipasi C (PIPLC), propria della sola specie *L.monocytogenes* e di alcuni ceppi di *L.ivanovii*. Con l'azione combinata dei due substrati è possibile differenziare le seguenti colonie:

*L. monocytogenes*: colonie verde-blu circondate da un alone opaco.

*Listeria* spp. non *monocytogenes*: colonie verde-blu senza alone opaco.

**TERRENO IN POLVERE: PREPARAZIONE**

Sospendere 35,3 g in 500 ml di acqua distillata fredda, portare ad ebollizione sotto agitazione. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 48-50°C, aggiungere il contenuto di una fiala di ALOA Enrichment Supplement, preriscaldato a 48-50°C ed il contenuto di una fiala di ALOA Selective Supplement ricostituito con 5 ml di una miscela alcool etilico/acqua distillata sterile (1:1). Mescolare bene e distribuire in piastre sterili. pH finale 7,2 ± 0,2

**DESCRIZIONE**

ALOA è un terreno cromogenico e selettivo per la ricerca ed il conteggio *L. monocytogenes* e per la sua differenziazione dalle altre specie di *Listeria*, anche in presenza di una flora mista. ALOA è stato comparato con i terreni PALCAM ed Oxford e con diversi altri terreni cromogenici, da diversi autori: tutti i risultati confermano la superiorità del terreno ALOA sia rispetto ai terreni tradizionali (1,8,10,11,13) che rispetto ad altri terreni cromogenici (3, 9).

Il terreno ALOA è raccomandato dalle norme ISO 11290-1 e ISO 11290-2 (Amendments del 24/10/2004) (5a, 5b) sia per la procedura di ricerca che per quella di conteggio di *L.monocytogenes* nei prodotti destinati al consumo umano ed animale; il terreno ALOA è inoltre raccomandato dall'FDA-BAM.

Lequerq (7) riporta che ALOA è risultato il terreno migliore tra i quattro esaminati e che la sua introduzione nei metodi d'analisi in sostituzione di Oxford e PALCAM aumenta l'isolamento ed il conteggio dei ceppi atipici di *L.monocytogenes*

Gracieux e coll. (6) riportano con ALOA una percentuale di recupero superiore dei ceppi virulenti, ipovirulenti ed avirulenti di *L.monocytogenes* rispetto al terreno PALCAM e ad altro terreno cromogeno.

Sacchetti e coll. (12) riportano che in una sperimentazione su 132 campioni di alimenti ALOA ed un secondo terreno cromogeno consentono di determinare *L.monocytogenes* in tempi più rapidi e con maggiore sensibilità e specificità rispetto al terreno PALCAM. Gli autori riportano risultati di conferma con Monocytogens ID Disc Biolife, comparabili con quelli delle gallerie del commercio, ma più rapidi.

Il terreno ALOA pronto in piastra è stato validato da AFNOR (1) insieme ad un protocollo di lavoro semplificato.

**METODO D'IMPIEGO**

Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA) può essere impiegato secondo le metodiche classiche normate o validate per l'isolamento ed il conteggio di *Listeria monocytogenes* negli alimenti e nei mangimi.

**Metodo validato AFNOR per la determinazione di *L.monocytogenes* con un unico arricchimento.**

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

- Eseguire l'arricchimento del campione in Fraser Broth Half Concentration, secondo le metodiche usuali con un rapporto campione/terreno liquido 1:10 (es. 25 g di campione + 225 ml di Fraser Broth Half Concentration – cod. 401594) ed incubando a 30°C per 24 ore.
- Inoculare con 0,1 ml di brodocoltura una piastra di terreno ALOA di diametro 90 mm. Esaminare dopo incubazione a 37°C ± 1°C per un tempo tra le 24 e le 48 ore..

**Metodo validato AFNOR per il conteggio di *L.monocytogenes*.**

- Preparare una sospensione del campione in Buffered Peptone Water o in Fraser Broth Half Concentration. Incubare a temperatura ambiente per 1 ora.
- Inoculare una piastra di ALOA di diametro 90 mm con 0,1 ml della sospensione del campione. In alternativa seminare 1 ml su una piastra di diametro 140 mm o tre aliquote da 0,3 ml su tre piastre di ALOA da 90 mm.
- Incubare a 37°C ± 1°C per 48 ± 3 ore. Una prima lettura può essere eseguita dopo 24 ore di incubazione in ogni modo la lettura finale deve essere eseguita alle 48 ore

Sia per il metodo di determinazione che per quello di conteggio leggere ed interpretare i risultati nel seguente modo:

- Considerare come *L. monocytogenes* le colonie rotonde, regolari, di colore verde-blue circondate da un alone opaco.
- Considerare come *Listeria* spp le colonie con le caratteristiche sopra descritte per *L.monocytogenes* ma prive dell'alone opaco

Eseguire le prove di conferma appropriate in accordo a ISO 11290 oppure, con maggiore rapidità ed in accordo al protocollo validato AFNOR, con il terreno ALOA Confirmation Agar (REF 401606-5416065), alla cui scheda tecnica si rimanda per i dettagli operativi.

Al di fuori delle procedure normate e validate la conferma di *L.monocytogenes* può essere eseguita con i test rapidi Monocytogenes ID Discs (REF 193005) o Mono Confirm Test (REF 193000), alle cui schede tecniche si rimanda per i dettagli operativi.

#### **Metodo per la determinazione di *L.monocytogenes* con doppio arricchimento (ISO 11290-1)**

Il metodo ISO 11290-1 (determinazione di *L.monocytogenes*) raccomanda la seguente procedura:

- Eseguire l'arricchimento del campione in Fraser Broth Half Concentration, con un rapporto campione/terreno liquido 1:10 (es. 25 g di campione + 225 ml di Fraser Broth Half Concentration) ed incubando a 30°C per 24 ± 3 ore.
- Inoculare con 0,1 ml della coltura del primo arricchimento una piastra di terreno ALOA ed una piastra di un altro terreno a scelta del Laboratorio (es. PALCAM o Oxford).
- Eseguire una subcoltura di 0,1 ml dal brodo Fraser Half in una provetta contenente 10 ml di Fraser Broth. Incubare a 37°C per 48 ± 3 ore.
- Inoculare con 0,1 ml della coltura del secondo arricchimento una piastra di terreno ALOA ed una piastra di un altro terreno a del Laboratorio (es. PALCAM o Oxford)..
- Esaminare per la presenza di colonie tipiche di *L.monocytogenes* le piastre di ALOA dopo incubazione a 37°C ± 1°C per 24 ± 3 ore; se non vi fosse crescita o non vi fossero colonie tipiche, re-incubare per altre 24 ± 3 ore.
- Esaminare le piastre del secondo terreno seminato (es. PALCAM o Oxford) dopo il periodo di incubazione definito per la presenza di colonie tipiche di *Listeria* spp.
- Confermare le colonie tipiche con i test indicati in ISO 11290-1.

#### **Metodo per il conteggio di *L.monocytogenes* (ISO 11290-2)**

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

- Preparare una sospensione del campione in Buffered Peptone Water o in Fraser Broth Half Concentration (senza l'aggiunta del supplemento selettivo). Incubare a temperatura ambiente per 1 h ± 5 min a 20°C ± 2°C.
- Inoculare con 0,1 ml della sospensione del campione una piastra di terreno ALOA. Esaminare dopo incubazione a 37°C per 24 ± 3 ore e, se non vi fosse crescita o non vi fossero colonie tipiche, re-incubare per altre 24 ± 3 ore.
- Contare come *L.monocytogenes* le colonie tipiche (colonie verde-blu con alone opaco).
- Confermare le colonie tipiche con i test indicati in ISO 11290-1.

#### **CONTROLLO QUALITÀ SUGGERITO PER L'UTILIZZATORE**

<b>CEPPO</b>		<b>INCUBAZIONE</b>	<b>RISULTATI</b>
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC 13932	37°C - 48 ore	crescita con colonie verde-blu con alone opaco A/C ≥ 0,5
<i>L.innocua</i>	ATCC 33090	37°C - 48 ore	crescita con colonie verde-blu senza alone opaco
<i>E.coli</i>	ATCC 25923		crescita inibita

**A/C : UFC su ALOA/ UFC su TSA**

#### **LIMITI E PRECAUZIONI**

- La lettura delle piastre con una crescita abbondante può essere facilitata comparando l'opacità del terreno ai bordi dove può non esserci crescita con quella del centro piastra oppure comparando con una piastra non seminata. Piastre con una crescita intesa e confluyente di *L.monocytogenes* appariranno comunque intensamente opache; nel caso di crescite intense di *Listeria* spp non *monocytogenes* le piastre non si opacizzeranno. Se sussistessero dubbi procedere al re-isolamento delle colonie.
- Alcuni ceppi di *L.ivanovii* PIPLC+, alle 24 ore e soprattutto dopo 48 ore di incubazione, possono presentare colonie verde-blu con alone opaco. In questi casi i test di conferma consentiranno una corretta identificazione.
- Alcuni ceppi di *Bacillus cereus*, resistenti agli agenti selettivi del terreno, possono produrre delle colonie piatte, rugose, di colore da bianco a blu non omogeneo, con un alone largo ed intenso.
- Alcuni ceppi di *L.monocytogenes* in seguito a stress (soprattutto stress acido) possono presentare una ritardata produzione di fosfolipasi C e la formazione ritardata (o anche assente) dell'alone opaco (5).
- Alcuni ceppi di *L.monocytogenes* possono presentare una lenta produzione di fosfolipasi C e la formazione dell'alone opaco tipico anche dopo 4 giorni di incubazione (5)

**CONSERVAZIONE**

**Terreno in polvere:** conservare a +2 +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento ecc.). La data di scadenza si applica al prodotto nella sua confezione originale e conservato come indicato.

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

**Supplemento selettivo, arricchimento, piastre pronte, ALOA Flasks Kit:** conservare fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a +2 + 8°C. La data di scadenza si applica ai prodotti nella loro confezione originale e conservati come indicato. Una volta ricostituito, il supplemento liofilo deve essere usato in giornata.

**PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI**

**Terreno in polvere:** il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente ma, contenendo litio cloruro ad una concentrazione  $\geq 1\%$  (classificato come irritante), richiede la scheda di sicurezza che deve essere consultata prima dell'uso.

**Supplemento selettivo liofilo:** il preparato qui descritto contiene cicloeximide, è classificato come T+ ai sensi della legislazione vigente. Consultare la scheda di sicurezza per le precauzioni da adottare durante l'impiego.

**Arricchimento liquido:** il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni  $>1\%$ .

**Piastre pronte all'uso e flaconi di ALOA Kit:** il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente ma, contenendo litio cloruro (classificato come irritante) ad una concentrazione pari a 1%, richiede la scheda di sicurezza che deve essere consultata prima dell'uso.

I prodotti qui descritti sono solo per uso di Laboratorio. Devono essere usati da operatori adeguatamente addestrati. Operare con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni. Sterilizzare le piastre dopo il loro uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1-Artault, S., Bind, J.L., Delaval, Y., Dureuil, N., Gaillard, N. (2000) AFNOR Validation of the ALOA method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs. Colloque de la Société Française de Microbiologie, Paris, 19-20 Octobre, 2000.
- 2-Bauwens L. Vercammen F. Hertsens A. (2003) Detection of *Listeria* spp. In zoo animal faeces: use of immunomagnetic separation and a chromogenic medium. *Vet. Microbiol.* 91, 115-123
- 3-Beumer, L.L. (2001) Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes* ISO 11290-1. Change of Isolation Media. Wageningen University, The Netherlands.
- 4-Flamini, L., Rossi, I. Pondini, F. (1999) Conteggio rapido di *Listeria monocytogenes* per inclusione in terreno selettivo e differenziale (ALOA). *Industrie Alimentari*, XXXVIII, febbraio, 127.
- 5a- EN ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method- Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test and inclusion of precision data.
- 5b- EN ISO 11290-2:1998/Amd.1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method- Amendment 1: Modification of the enumeration medium.
- 6-Gracieux P., Roche S.M., Pardon P., Velge P. (2003) Hypovirulent *Listeria monocytogenes* strains are less frequently recovered than virulent strains on PALCAM and Rapid'L.mono media. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 133-145.
- 7-Leclercq A. (2004) Atypical colonial morphology and low recovery of *L. monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mon and ALOA solid media. *J. of Microbiological Methods*, 57, 252-258.
- 8-Mioni R., Grimaldi M., Bordin, P., Miglioranza, R., Ferrigno, R. (1998) Ricerca di *L.monocytogenes* negli alimenti. Valutazione di un nuovo terreno selettivo e differenziale specie-specifico e di un sistema rapido d'identificazione. *Industrie Alimentari*, XXXVII, giugno, 732.
- 9-Moroder L (2002) Comparison of alternative methods for the enumeration of *Listeria monocytogenes* in food. FEMS-Symposium on the Versatility of *Listeria* species. Izmir, October 10-11, 2002
- 10-Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. (1997) Esperienze su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. *Industrie Alimentari*, XXXVI, luglio-agosto, 888.
- 11-Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. (1997) Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. *Quimper Froid Symposium Proceedings*, P6 A.D.R.I.A. Quimper (F) 16-18 June, 1997
- 12-Sacchetti R., Bianucci F., Ambrogiani E. (2003) Detection of *L.monocytogenes* in foodstuffs using chromogenic isolation media. *New Microbiol.* 26, 269-274.
- 13-Vlaemynck, G., Lafarge, V., Scotter, S. (2000) Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *J.Appl. Microbiol.*, 88, 430.

**CONFEZIONI****DETERMINAZIONE E CONTEGGIO DI L.MONOCYTOGENES****TERRENO IN POLVERE E SUPPLEMENTO**

<b>4016052</b>	<b>Agar Listeria acc. to Ottaviani &amp; Agosti (ALOA),</b>	<b>500 g (7,1 l)</b>
<b>4016054</b>	<b>Agar Listeria acc. to Ottaviani &amp; Agosti (ALOA),</b>	<b>5 kg (71 l)</b>
<b>423501</b>	<b>ALOA Enrichment Selective Supplements,</b>	<b>4+4 flaconi, ciascuno per 500 ml</b>
<b>423505</b>	<b>ALOA Enrichment Selective Supplements,</b>	<b>5+5 flaconi, ciascuno per 200 ml</b>

**TERRENO PRONTO PER L'USO IN PIASTRA**

<b>541605</b>	<b>ALOA -Agar Listeria acc. to Ottaviani &amp; Agosti ,</b>	<b>20 piastre, diametro 90 mm</b>
<b>501605P</b>	<b>ALOA -Agar Listeria acc. to Ottaviani &amp; Agosti ,</b>	<b>5 piastre, diametro 150 mm</b>

**KIT CON TERRENO PRONTO IN FLACONE E SUPPLEMENTO**

<b>511605K3</b>	<b>ALOA Flasks Kit</b>	<b>4 x 200 ml</b>
4 flaconi da 200 ml di terreno ALOA + 4 flaconi di supplemento selettivo per 200 ml + 4 flaconi di arricchimento liquido per 200 ml		

**TEST DI CONFERMA DI L.MONOCYTOGENES****TERRENO IN POLVERE E SUPPLEMENTO**

<b>4016062</b>	<b>ALOA CONFIRMATION BASE</b>	<b>500 g (6.7 L)</b>
<b>423501</b>	<b>ALOA Enrichment Selective Supplements,</b>	<b>4+4 flaconi, ciascuno per 500 ml</b>

**PIASTRE PRONTE**

<b>541606</b>	<b>ALOA CONFIRMATION AGAR</b>	<b>20 piastre pronte all'uso diam 90 mm</b>
---------------	-------------------------------	---

ALOA® : ALOA è un marchio registrato di Biolife Italiana S.r.l.