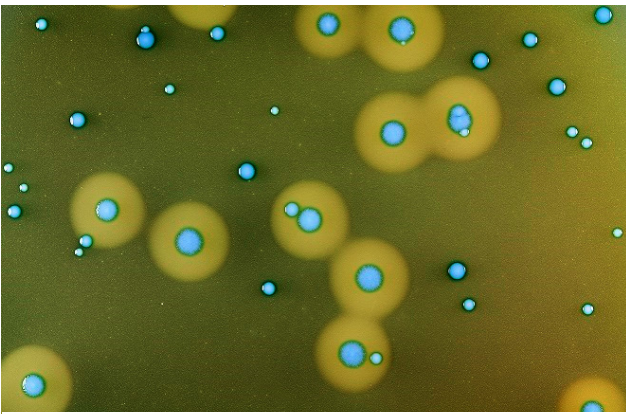


ChromArt

ALOA[®]**AGAR LISTERIA ACC. TO OTTAVIANI & AGOSTI
ALOA[®] ENRICHMENT-SELECTIVE SUPPLEMENTS****Terreno in polvere, supplemento selettivo, arricchimento e terreno pronto all'uso in piastra e flacone per la determinazione ed il conteggio di *L.monocytogenes* e *Listeria spp.*****RISPOSTA CULTURALE**ALOA[®]:colonie di *L.monocytogenes* con alone opaco
e colonie di *L. innocua* senza alone.**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* e di *Listeria spp.* nei campioni della filiera alimentare. Il terreno ALOA è raccomandato dalla norma ISO 11290-1:2017 (determinazione di *L.monocytogenes* e *Listeria spp.*) e dalla norma ISO 11290-2:2017 (enumerazione di *L.monocytogenes* e *Listeria spp.*); il terreno è citato da FDA BAM e da altri enti di normazione internazionali.

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, polimixina 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 β -glucosidasi, comune a tutte le specie di *Listeria*. L'azione differenziale specifica è ottenuta con un substrato per la fosfolipasi C (PIPLC:phosphatidyl inositol phospholipase C), 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.

DESCRIZIONE

ALOA è un terreno cromogenico e selettivo per la ricerca ed il conteggio *L. monocytogenes* e *Listeria spp.* per la sua capacità di differenziare *L.monocytogenes* 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 (1,8,10,11,16) che rispetto ad altri terreni cromogenici (3, 9).

Il terreno ALOA è raccomandato dalle norme ISO 11290-1 e ISO 11290-2 (5a, 5b) sia per la procedura di ricerca che per quella di conteggio di *L.monocytogenes* e *Listeria spp.*; il terreno ALOA è inoltre citato dall'FDA-BAM (15).

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.

FORMULE TIPICHE
ALOA® (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

ALOA® SELECTIVE SUPPLEMENT (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

ALOA® ENRICHMENT SUPPLEMENT (contenuto della fiala 500 ml)

L-α- fosfatidilinositolo	1,0 g
--------------------------	-------

ALOA® SELECTIVE SUPPLEMENT (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

ALOA® ENRICHMENT SUPPLEMENT (contenuto della fiala da 200 ml)

L-α- fosfatidilinositolo	0,4 g
--------------------------	-------

ALOA®, 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	0,050
Polimixina B solfato	76700 UI

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 47-50 °C, aggiungere il contenuto di una fiala di ALOA Enrichment Supplement, preriscaldato a 47-50 °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.

ALOA FLASKS KIT: PREPARAZIONE

Sciogliere il contenuto (200 ml) di un flacone di terreno ALOA in bagnomaria a 100 °C. Raffreddare a 47-50 °C, aggiungere il contenuto di una fiala di ALOA Enrichment Supplement, preriscaldato a 47-50 °C ed il contenuto di una fiala di ALOA Selective Supplement ricostituito con 2 ml di una miscela alcool etilico/acqua distillata sterile (1:1). Mescolare bene e distribuire in piastre sterili.

CARATTERISTICHE CHIMICO FISICHE

Aspetto del terreno in polvere: polvere fine, omogenea di colore beige

Aspetto del terreno in piastra: giallo chiaro opalescente

Aspetto del terreno in flacone: giallo chiaro opalescente

Aspetto del supplemento selettivo: pastiglia bianca alta compatta, soluzione incolore e limpida dopo ricostituzione

Aspetto del supplemento di arricchimento: sospensione torbida, gialla con un lieve fondo

pH finale del terreno completo a 20-25°C: 7,2 ± 0,2

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

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

Note

- È possibile conservare a 5°C per non più di 72 ore il pre-arricchimento in half Fraser broth, prima della sub-coltura nel brodo di secondo arricchimento (Fraser broth).
- Half-Fraser broth e Fraser broth possono essere conservati a 5 °C per non più di 72 ore prima della semina su piastra.

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

- Preparare una sospensione del campione in Buffered Peptone Water o in altro brodo d'arricchimento in accordo alla norma ISO 6887 (tutte le parti); nel caso si esegua sia la determinazione che il conteggio in accordo alle parti 1 e 2 della norma ISO 11290, la sospensione del campione può essere fatta in half-Fraser broth (con o senza l'aggiunta del supplemento selettivo).
- Inoculare 0,1 ml della sospensione del campione e 0,1 ml delle diluizioni successive su piastre da 90 mm di terreno ALOA.
- In presenza di campioni con sospette cariche basse, inoculare 1 ml della sospensione del campione e 1 ml delle diluizioni successive su piastre da 140 mm di terreno ALOA.
- Esaminare dopo incubazione a 37°C per 24 ± 2 ore e, se non vi fosse crescita o non vi fossero colonie tipiche, re-incubare per altre 24 ± 2 ore.
- Contare le colonie di *L.monocytogenes* e le colonie di *Listeria* spp. nelle piastre in cui vi siano meno di 150 colonie (piastre diametro 90 mm) o 360 colonie (piastre da 140 mm), in accordo a quanto descritto nel capitoletto "lettura ed interpretazione dei risultati".
- Confermare le colonie tipiche con i test indicati in ISO 11290-2, previa purificazione delle colonie in Tryptic Glucose Yeast Agar.

Lettura dei risultati

Terreno ALOA.

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

Secondo terreno di semina.

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

Nota

I test di conferma per *L.monocytogenes*, obbligatori secondo la norma ISO 11290 ed impiegando il terreno ALOA, sono: β-emolisi (+), utilizzo di L-ramnosio (+), utilizzo di D-xilosio (-). I test di conferma opzionali per *L.monocytogenes* sono: esame microscopico (corti e stretti bastoncini o coccobacilli), catalasi (+), mobilità a 25°C (+). I test di conferma obbligatori per *Listeria* spp. sono: esame microscopico (corti e stretti bastoncini o coccobacilli), catalasi (+); quelli facoltativi sono: VP (+), mobilità a 25°C (+).

Se ritenute affidabili (ISO 7218), i test sopra indicati possono essere sostituiti dalle gallerie d'identificazione biochimica.

CONTROLLO QUALITÀ

E' responsabilità dell'utilizzatore eseguire il controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO-METODO DI SEMINA		INCUBAZIONE	SPECIFICHE
		T° / t / ATM	
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC 13932	37°C /24- 48h A	colonie verdi-azzurre con alone opaco A/C ≥ 0,5
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC 7973	37°C /24- 48h A	colonie verdi-azzurre con alone opaco A/C ≥ 0,5
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	37°C /24- 48h A	colonie verdi-azzurre, senza alone
<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119	37°C /24- 48h A	colonie verdi-azzurre, con o senza alone
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	37°C / 48h A	nessuna crescita (100% inibizione)
<i>E. faecalis</i>	ATCC 19433	37°C / 48h A	nessuna crescita (100% inibizione)

A: INCUBAZIONE IN AEROBIOSI;

A/C (Rapporto di Produttività): UFC SUL TERRENO IN ESAME / UFC SU TRYPTIC SOY AGAR

LIMITI DEL METODO

- 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.
- L.ivanovii* alle 24 ore e soprattutto dopo 48 ore di incubazione, presenta colonie verde-blu con alone opaco. In questi casi i test di conferma consentiranno un'identificazione corretta.
- 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.
- È stato riportato (1a) che alcune specie di 6 generi di batteri gram positivi possono crescere su ALOA e talvolta generare colonie blu o bluastrre: *Bacillus* spp. (*B.circulans*, *B.clausii*, *B.licheniformis*, *B.oleronius*), *Cellulosimicrobium funkei*, *Enterococcus* spp. (*E. faecalis*, *E. faecium/durans*), *Kocuria kristinae*, *Marinilactibacillus psychrotolerans*, *Rothia terrae*, *Staphylococcus* spp. (*S. sciuri*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus/xylosus*), *Streptococcus*.
- 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). Nessun ceppo di *L.monocytogenes* è stato mai descritto come PIPLC-negativo.
- Rari ceppi di *L.monocytogenes* possono non presentare la β-emolisi. Nel caso che colonie tipiche su ALOA fossero β-emolisi negative, si raccomanda di eseguire test di conferma supplementari (Gram, catalasi, mobilità, CAMP test, PCR).

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.

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: prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.

Supplemento selettivo liofilo: il preparato qui descritto contiene cicloeximide. 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.

Piastre pronte all'uso e flaconi di ALOA Kit: i preparati non sono classificati come pericolosi ai sensi della legislazione vigente.

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

- 1a- Angelidis A.S., Kalamaki M.S., Georgiadou S.S. Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a β -D-glucosidase-positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA). *Int. J. Food Microbiol.* 2015, 193 pp. 114–129
- 1b- 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- 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.
- 5b- 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.
- 6-Gracieux P., Roche S.M., Pardon P., Velge P. (2003) Hypovirulent *L.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., Miglioranzi, 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-Shaw S., Nundy D. and Blais B.: Performance of the ALOA medium in the detection of hemolytic *Listeria* species in food and environmental samples. Laboratory Services Division, Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario, Canada K1A 0C6.
- 14 Stess, I B., Luf W., Wagner M., Schoder D. (2009) Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 2009 Feb;106(2):651-9.
- 15-U.S. Department of Health and Human Services, F.D.A. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 10, Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods, revision March 2017.
- 16-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

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Agar <i>Listeria</i> acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA®)	Terreno in polvere	4016052	500 g (7,1 L)
Agar <i>Listeria</i> acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA®)	Terreno in polvere	4016054	5000 g (71 L)
ALOA® Enrichment Selective Supplements	Supplemento	423501	4+4 flaconi, ciascuno per 500 ml di terreno
ALOA® Enrichment Selective Supplements	Supplemento	423505	5+5 flaconi, ciascuno per 200 ml di terreno
ALOA® -Agar <i>Listeria</i> acc. to Ottaviani & Agosti	Piastre pronte all'uso (Ø90mm)	541605	20 piastre
ALOA® -Agar <i>Listeria</i> acc. to Ottaviani & Agosti	Piastre pronte all'uso (Ø150mm)	501605P	5 piastre
ALOA® Flasks Kit	Kit terreno pronto in flacone +supplementi	511605K3	4 x 200 ml

Su richiesta del cliente sono disponibili i supplementi liquidi e l'arricchimento concentrati per grandi volumi di terreno di base.



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

©: ALOA è un marchio registrato di Biolife Italiana Srl