

Listeriový chromogenní agar podle Ottavianiho a Agostiho (ALOA)

LC1345

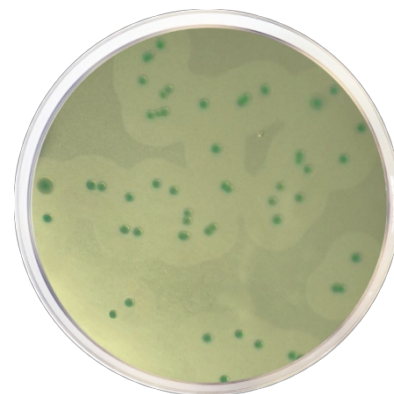
 Selektivní médium pro detekci a stanovení počtu *Listeria monocytogenes*.

Praktické informace

Aplikace	Kategorie
Selektivní výčet	Listerie
Detekce	Listerie

Odvětví aplikace: Klinická medicína / Potravinářský průmysl

Předpisy: ISO 11133 / ISO 11290 / BAM



Principy a použití

Listeriový chromogenní agar podle Ottavianiho a Agostiho (*Listeria Chromogenic Agar Base* by Ottaviani and Agosti (ALOA)) je selektivní médium pro presumptivní izolaci a identifikaci *Listeria monocytogenes* a *Listeria spp.* v potravinách a klinických vzorcích. Používá se ke konfirmaci po použití *Listeria Enrichment Broth Base Fraser* (LC1120). Toto médium je rovněž doporučeno normou ISO 11290-1 pro detekci a stanovení počtu *Listeria monocytogenes*.

Enzymatický rozklad živočišných tkání a enzymatický rozklad kaseinu poskytují dusík, vitamíny, minerály a aminokyseliny nezbytné pro růst. Kvasničný extrakt je zdrojem vitaminů, zejména skupiny B. Chlorid sodný dodává elektrolyty nezbytné pro transport a osmotickou rovnováhu. Pyruvát sodný je zdrojem energie pro metabolismus bakterií a napomáhá resuscitaci stresovaných organismů. Glukóza je zkvasitelný sacharid poskytující uhlík a energii. Glycerofosforečnan hořečnatý je pufovací sloučenina. Síran hořečnatý je hořečnatý iont potřebný pro velké množství enzymatických reakcí, včetně replikace DNA. Rozdílná aktivita média je způsobena dvěma faktory. Chlorid lithný v základním médiu a doplňkové antimikrobiální sloučeniny ceftazidim, polymyxin, kyselina nalidixová a cykloheximid zajišťují selektivitu média. Bakteriologický agar je zpevňující činidlo.

Přítomnost chromogenní složky X-glukosidu, substrátu pro detekci enzymu β -glukosidázy, je společná všem druhům listerií a dodává koloniím modrou barvu. Ostatní organismy, které mají tento enzym, například enterokoky, jsou inhibovány selektivními látkami v médiu a selektivním doplňkem. Rozdílnou aktivitu má také substrát lipáza C, na který působí specifický enzym pro *L. monocytogenes*. Lipáza je zodpovědná za neprůhlednou bílou aureolu, která obklopuje *L. monocytogenes*.

Kombinace obou substrátů umožňuje odlišit kolonie *Listeria monocytogenes* od ostatních *Listeria spp.*, protože ačkoli jsou všechny modře zbarvené, *L. monocytogenes* mají kolem sebe neprůhlednou bílou aureolu.

Bylo zjištěno, že některé kmeny *Listeria ivanovii*, většinou patogenní pro zvířata, i když některé způsobily infekce u lidí, mají také lipázovou aktivitu.

Složení v g/l

Enzymatický rozklad kaseinu	6	Glukóza	2
Bakteriologický agar	13,5	Síran hořečnatý	0,5
Chlorid sodný	5	Hydrogenfosforečnan sodný	2,5
Pyruvát sodný	2	Kvasničný extrakt	10
Enzymatický rozklad živočišných tkání	18	Chlorid lithný	10
Glycerofosforečnan hořečnatý	1	5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glukopyranosid	0,05

Typické složení v g/l * Upraveno a/nebo doplněno podle potřeby tak, aby splňovalo kritéria účinnosti.

Příprava

Suspendujte 35,275 g média ve 470 ml destilované vody. Dobře promíchejte a rozpouštějte zahříváním za častého míchání. Vařte po dobu jedné minuty, do úplného rozpuštění. Sterilizujte v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Pro přípravu většího množství 500 ml se doporučuje sterilizovat při 115 °C po dobu 10 minut. Ochlaďte na 47-50 °C a asepticky přidejte jednu lahvičku doplňku *Listeria Lipase C Supplement* (24 ml) (LC6031) a jednu lahvičku *Listeria Chromogenic Selective Supplement* (LC6040). Jemně homogenizujte a rozdělte do Petriho misek.

Návod k použití

Odběr a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* a *Listeria spp.* podle ISO 11290:

Metoda detekce:

- Odvažte 25 g (nebo 25 ml) vzorku a přidejte 225 ml bujónu Half Fraser (LC1183). Homogenizujte a inkubujte při 30 °C po dobu 25 ± 1 hodiny.
- Naočkejte 0,1 ml inkubované kultury z poloviny Fraserova bujónu (bez ohledu na její barvu) do 10 ml Fraserova bujónu (LC1182). Inkubujte při 37 °C po dobu 24 ± 2 hodin v aerobních podmínkách.
- Z primární obohacené kultury naočkejte povrch agaru *Listeria* podle Ottavianiho a Agostiho a další selektivní médium podle výběru laboratoře, abyste získali dobře oddělené kolonie.
- Ze sekundární obohacené kultury opakujte postup, naočkejte povrch agaru *Listeria* podle Ottavianiho a Agostiho a další selektivní médium.
- Pro agar *Listeria* podle Ottavianiho a Agostiho inkubujte celkem 48±2 h.
- Vyberte předpokládané kolonie a proveďte konfirmační testy na *L. monocytogenes* nebo *Listeria spp.*

Výčtová metoda:

- Připravte počáteční suspenzi vzorku a pufrované peptonové vody v poměru 1:10 pro analýzu. Jako ředidlo lze použít bujón *Listeria* 1/2 Fraser (LC1183), pokud se postupy detekce a stanovení počtu provádějí současně.
- Na povrch *Listeria* Chromogenic Agar naočkejte 0,1 ml podle Ottavianiho a Agostiho.
- Inkubujte při teplotě 37 °C po dobu 24 ± 2 hodin. V případě, že není zjištěn žádný mikrobiální růst, inkubujte dalších 24 hodin.
- Vyberte předpokládané kolonie a proveďte konfirmační testy na *L. monocytogenes* nebo *Listeria spp.*
- Z potvrzených kolonií vypočítejte počet kolonií *L. monocytogenes* nebo *Listeria spp.*

Kontrola kvality

Rozpuštěnost	Vzhled	Barva dehydratovaného média	Barva připraveného média	Konečné pH (25°C)
bez zbytků	Jemný prášek	Béžová	Jantarový lehce opalizující	7,2 ± 0,2

Mikrobiologický test

Podle normy ISO 11133:

Inkubační podmínky: Produktivita, selektivita a specifičnost (37±1 °C / 48±4 h).

Podmínky očkování: Min. 50 CFU) / Kvalitativní produktivita (10³-10⁴ CFU) / Selektivita (10⁴-10⁶ CFU) / Specifičnost (10³-10⁴ CFU).

Referenční média: TSA

Mikroorganismy	Specifikace	Charakteristická reakce
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b ATCC 13932	Dobrý růst (2) >50 %	Modrozelené kolonie s neprůhledným halo
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Celková inhibice (0)	
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090		Modrozelené kolonie bez neprůhledného halo
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a ATCC 35152	Dobrý růst (2) >50 %	Modrozelené kolonie s neprůhledným halo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Celková inhibice (0)	

Skladování

Teplota Min.: 2 °C

Teplota Max.: 25 °C

Bibliografie

Ottaviani, F., Ottaviani, M. a Agosti, M (1987) Quimper Froid Symposium Proceedings, P6 A.D.R.I.A Quimper (F) 16-18 June.
ISO 11290 Horizontální metoda detekce a stanovení počtu *Listeria monocytogenes*.