
AL Agar

User Guide

Chromogenic media for the detection and enumeration of the *Listeria monocytogenes* and other species of *Listeria* in food products for human and animal consumption, and in environmental samples

Catalog #3563695, Prepared plates, 90 mm x 20 dishes
Catalog #3563965, Prepared plates, 90 mm x 120 dishes
Catalog #3555200, Bottled agar base, 237.5 ml x 6 bottles
Catalog #3564043, Dehydrated, 500 g
Catalog #3564041, Supplement 1, freeze dried, 10 vials
Catalog #3564042, Supplement 2, liquid 25 ml, 10 vials

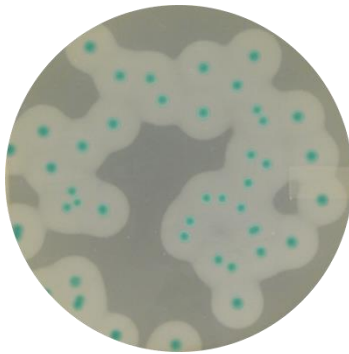


Table of Contents

Section 1	Introduction	1
Section 2	AL Agar 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
Section 7	Protocol.....	4
	Preparation of Dehydrated Medium.....	4
	Preparation of Bottled Medium	4
	Detection of <i>L. monocytogenes</i> and <i>Listeria</i> Genus.....	4
	Enumeration of <i>L. monocytogenes</i>	5
Section 8	Confirmation of Positive Results	6
Section 9	Confirmation of Other Methods.....	6
Section 10	Test Performance and Validation	7
Section 11	References.....	7
Section 12	Revision History.....	8

Section 1 Introduction

Serious outbreaks of *Listeria monocytogenes* continue to plague the food safety industry. *Listeria* is dangerous in the way that it can survive and grow, however slowly, at refrigerated temperatures in ready-to-eat processed foods. *Listeria monocytogenes* is a particularly problematic pathogen, as it can cause serious health problems and possible death, particularly in immunosuppressed individuals, newborns, and the elderly. Infection is known to cause still births and miscarriages in pregnant women. Listeriosis develops with symptoms such as fever, fatigue, nausea, vomiting, and diarrhea and has a mortality rate of 30%, which may be higher in vulnerable individuals. Approximately 90% of all reported cases of listeriosis result in hospitalization. A rapid culture method is necessary to cut down on time to results and to make sure those results are accurate.

Section 2 AL Agar Principle

The principle of AL medium (Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti) is based on the simultaneous detection of two enzyme activities: β -D-glucosidase and phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC). The β -D-glucosidase activity, common to all *Listeria*, is detected using a chromogenic substrate (X-glucoside). Hydrolysis of this substrate by the *Listeria* genus leads to the production of blue to blue-green colored colonies. PIPLC is an enzyme detected only in pathogenic *Listeria* species, *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*. AL medium contains phosphatidylinositol, which when broken down, produces an opaque halo around colonies of bacteria of these two species. This halo generally appears after 24 hr of incubation in *L. monocytogenes* and after 48 hr of incubation in *L. ivanovii*. Selectivity of the medium is achieved by the combined action of lithium chloride, antibiotics, and an antifungal. This medium may be used in standardized protocol or in an alternative validated short protocol.

Section 3 Theoretical Formula

Meat peptone	18 g
Tryptone	6 g
Yeast extract	10 g
Sodium pyruvate	2 g
Glucose	2 g
Anhydrous magnesium glycerophosphate	1 g
Anhydrous magnesium sulphate	0.5 g
Sodium chloride (NaCl)	5 g
Lithium chloride (LiCl)	10 g
Anhydrous Na ₂ HPO ₄	2.5 g
Chromogenic substrate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside)	0.05 g
Nalidixic acid	0.02 g
Ceftazidime	0.02 g
Polymyxin B sulphate	76,700 UI
Amphotericin B	0.01 g
Phosphatidylinositol	2 g
Agar	12 g
Distilled water	qsp 1,000 ml

Final pH at 25°C = 7.2 ± 0.2

Section 4 Shelf Life and Storage

- Dehydrated: 15–25°C in carefully sealed package, in a dry and dark place
- Bottled agar base and supplements: 2–8°C in a dark place
- Reconstituted supplement 1: 1 week at 2–8°C
- Pre-poured: 2–8°C in a dark place
- Plate prepared from the dehydrated base: 2 weeks 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
- Hot plate
- Scale, sensitivity of 0.1 g
- Stirrer/homogenizer
- Thermostatically-controlled incubator or incubation room, precise to $\pm 1^\circ\text{C}$
- Water bath

Supplies

- Confirmation:
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (catalog #3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (catalog #3578113)
 - RAPID'*L.mono* Agar (catalog #3563694, prepared plates, 90 mm x 20 dishes; 3563964, prepared plates, 90 mm x 120 dishes; 3555294, ready-to-use kit (for 200 ml) including bottled agar medium and supplements; 3564293, dehydrated, 500 g; 3564294, supplement 1, freeze-dried, 10 vials; 3564746, supplement 2, liquid, 10 vials)
 - PALCAM agar (for example catalog #3564754, dehydrated 500 g; 3564752, supplement, 10 vials)
 - Rhamnose Test (catalog #3553669, 1 ml x 28 vials)
- 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)
 - Buffered Peptone Water (for example, BPW Plus, catalog #3564684, dehydrated, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 bottles; 3555790, 5 L x 2 bags; 3555795, 3 L x 4 bags;

Section 6 Precautions, Limitations of Use, and Quality Control

or BPW Standard, catalog #12013259, dehydrated, 500 g; 12013258, dehydrated, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 bags)

- Enrichment medium: Half Fraser Broth (catalog #3555797, 225 ml bottles x 6; 3555794, 3 L x 4 bags; 3564604, dehydrated 500 g; 3564616, supplement, 10 vials) or Half Fraser Standard Broth (catalog #12018707 5 L x 2 bags; 12018706 dehydrated 500 g; 12018705 dehydrated 5 kg)
- Inoculating loops and spreaders
- Sterile petri dishes (90 mm)
- 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
- Allow plates to dry at 25–50°C according to ISO standard 7218 until droplets disappear from the surface of the medium. However, avoid prolonged drying, so as to not modify the efficiency of the medium. Do not dry plates in a laminar flow hood
- For heavily-loaded dishes with intensely opaque agar, reading can be facilitated by comparing opacity of the agar with a non-inoculated AL dish
- This medium may be used in standard protocols (for example, ISO or FDA BAM)
- For optimal performance of the alternative method, the use of Bio-Rad's Half Fraser broth is recommended.

Limitations of Use

- Other gram positive β -D-glucosidase positive bacteria exist without halos (for example, *Enterococcus* spp.) and with halos (for example, *Bacillus circulans*)
- Rare strains of *Enterococcus* can, within 48 hr of reading, exhibit slow phosphatidylinositol activity and ferment rhamnose like *Listeria monocytogenes*. A catalase test, directly applied to an isolated blue colony with a halo, allows differentiation between *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* (catalase positive) from *Enterococcus* spp. (catalase negative). More generally, the atypical characteristics of *Listeria* strains are cited in the standard NF EN ISO 11290-1 (Annex D)
- Sample volumes over 25 g have not been tested as part of NF VALIDATION

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.

Section 7 Protocol

Preparation of Dehydrated Medium

1. Always shake bottle before use.
2. Dissolve 34.55 g of powder in 470 ml of distilled water and mix until a homogenous suspension is obtained.
3. Heat gently, agitating frequently, then bring to a boil.
4. Sterilize by autoclaving at 121°C for 15 min.
5. Cool the medium to 44–47°C.
6. Aseptically rehydrate lyophilized supplement 1 with 5 ml sterile distilled water. Stir until completely dissolved and add to molten agar.
7. Aseptically add 1 vial of supplement 2. The temperature of the base should not exceed 50°C when adding supplement 2.
8. Mix well and pour into petri dishes. Stack dishes together (up to 5) to allow slow cooling.
9. One 500 g bottle of powder makes 7.2 L of medium.

Preparation of Bottled Medium

1. In a boiling water bath, melt the contents of the AL Agar bottle (237.5 ml).
2. Cool the bottle to 44–47°C in a water bath.
3. Aseptically rehydrate lyophilized supplement 1 with 5 ml sterile distilled water. Stir until completely dissolved.
4. Aseptically add 2.5 ml of rehydrated supplement 1 and 12.5 ml of supplement 2.
5. Mix thoroughly. Avoid frothing.
6. Pour the medium into petri dishes. Stack dishes together (up to 5) to allow slow cooling.

Detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* Genus

1. Dilute n g or n ml of sample in $9 \times n$ ml Half Fraser Broth. Homogenize with stirrer/homogenizer.
2. Ensure the environmental swab is completely immersed in the broth (at least 9 ml).
3. Ensure the environmental sponge, cloth or gauze pad is completely soaked in broth. Add broth at 9 times the weight of the moistened wiping device.
4. Incubate at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 18–28 hr.
5. After the enrichment step, the broth can be stored at $2\text{--}8^\circ\text{C}$ for 72 hr.
6. Using a sterile pipet remove 0.1 ml of sample and place drops on the outside edge of half of the agar surface.
7. Using a sterile Pasteur pipet or inoculating loop, spread sample over half the agar surface in a to-and-fro motion.
8. 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.
9. Incubate at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 hr. Incubation can be extended to 48 ± 2 hr.
10. *L. monocytogenes* form blue/blue-green colonies with a halo.
11. Other *Listeria* spp. form blue/blue-green colonies with or without a halo.
12. After the incubation step, plates can be stored at $2\text{--}8^\circ\text{C}$ for 72 hr.
13. In case of characteristic *L. monocytogenes* colonies when using the detection protocol, it is not necessary to perform a confirmation if the sample has been already confirmed as positive in the enumeration protocol.

Enumeration of *L. monocytogenes*

1. Dilute n g or n ml of sample in $9 \times n$ ml of Half Fraser Broth or BPW.
2. Spread 0.1 ml of sample or its decimal dilutions per plate or transfer 1 ml into an empty petri dish and pour 15 ml of melted ($44\text{--}47^\circ\text{C}$) AL agar
3. If estimating small numbers, spread 1 ml of sample or decimal dilutions over three plates of 90 mm diameter (~ 0.33 ml/plate) or over one plate of 140 mm diameter.
4. Incubate the upturned dishes at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 ± 3 hr. A first reading at 24h allows a more rapid detection of heavily contaminated samples. However the final result count is reached after 48 h (± 3 h)
5. Read plate and enumerate typical colonies.
6. *L. monocytogenes* form blue/blue-green colonies with a halo.
7. Other *Listeria* spp. form blue/blue-green colonies with or without a halo.

Section 8 Confirmation of Positive Results

8. After the incubation step, plates can be stored at 2–8°C for 72 hr.
9. Refer to EN ISO 7218 standard for inoculation, colony counting, calculation and expression of results.
10. In case of characteristic *L. monocytogenes* colonies when using the enumeration protocol, it is not necessary to perform a confirmation if the sample has been already confirmed as positive in the detection protocol.

Section 8 Confirmation of Positive Results

1. In the context of NF VALIDATION, all positive results must be confirmed. When following the enumeration protocol, if the first colony confirmed gives a negative result, confirmations should continue on up to five colonies. Confirming fewer than five colonies involves a risk of making an overestimation because of the presence of typical colonies that are not *L. monocytogenes*.
2. Confirmation of *L. monocytogenes* must be done in one of the following ways:
 - a. Using the conventional tests described in the ISO standard methods (including the purification step).
 - b. Using nucleic probes as described in the ISO 7218 standard (for example, iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, catalog #3578124) using isolated colonies (with or without purification step).
 - c. Confirmed using a Rhamnose Test (catalog #3553669).
 - d. Repicking and spotting at least one isolated colony on a RAPID'*L.mono* agar plate. Up to 12 colonies can be confirmed on a single RAPID'*L.mono* plate.
 - e. Using any other NF VALIDATION–certified method based on a different principle from that of AL Agar. The validated protocol of the second method must be respected in its entirety. All steps preceding the detection step used as a starting point for confirmation must be common to both methods.
3. Confirmation of *Listeria* spp. other than *L. monocytogenes* must be done in one of the following ways:
 - a. Using the conventional tests described in the ISO standard methods (including the purification step).
 - b. Using nucleic probes as described in the ISO 7218 standard (for example, iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, catalog #3578113) using isolated colonies (with or without purification step).
 - c. Repicking and streaking at least one isolated colony on a PALCAM agar plate. Up to 6 colonies can be confirmed on a single PALCAM agar plate.
 - d. Using any other NF VALIDATION–certified method based on a different principle from that of AL Agar. The validated protocol of the second method must be respected in its entirety. All steps preceding the detection step used as a starting point for confirmation must be common to both methods.


Section 9 Confirmation of Other Methods

4. In the event of discordant results (presumptive positive with AL Agar, negative with confirmation method), the laboratory must follow the necessary steps to ensure validity of the result obtained.

Section 9 Confirmation of Other Methods

Not applicable.

Section 10 Test Performance and Validations

Certification	Scope	Validation Protocol	Reference Protocol	Certificate Reference
NF VALIDATION	All human food products and production environmental samples	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 EN ISO 11290-2	 BRD 07/16-01/09 BRD 07/17-01/09 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Certified by AFNOR Certification Valid until: Refer to the certificate available on the AFNOR Certification website: http://nf- validation.afnor.org/en

Section 11 References

ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017/ADM: 2024. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions — Amendment 1: Requirements and guidance on the use of larger test portion size for qualitative method

ISO 18593:2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

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.

Section 11 References

Ottaviani F et al. (1997a). Esperienze su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari. 36, 1–3.

Ottaviani F et al. (1997b). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. June 16–18.

United States Department of Agriculture (2019). 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. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 10, 2020.

United States Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: *Listeria monocytogenes*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>, accessed August 10, 2020.

Vlaemynck G et al. (2000): Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. J. Appl Microbiol 88: 430-441.

Section 12 Revision History

Release date	Document number	Change
December 2024	10000245369 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Document number change (previous version 10000135677 Ver B)- Update of Limitations of use for rare <i>Enterococcus</i> strains- Update Reference section

Visit 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

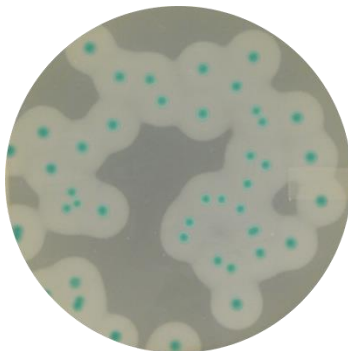
Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 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 82 080 007 7373 **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

AL Agar

Guide d'utilisation

Milieu chromogénique pour la détection et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et autres espèces de *Listeria* dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine et animale et dans les échantillons environnementaux

N° de référence 3563695, boîte préparée, 90 mm x 20 boîtes
N° de référence 3563965, boîte préparée, 90 mm x 120 boîtes
N° de référence 3555200, base gélosée en flacon, 237,5 ml x 6 flacons
N° de référence 3564043, base déshydratée, 500 g
N° de référence 3564041, Supplement 1, lyophilisé, 10 flacons
N° de référence 3564042, Supplement 2, liquide 25 ml, 10 flacons



BIO-RAD

Sommaire

Section 1	Introduction	1
Section 2	AL Agar - 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
Section 7	Protocole.....	4
	Préparation du milieu déshydraté	4
	Préparation du milieu en flacon.....	4
	Détection de <i>L. monocytogenes</i> et du genre <i>Listeria</i>	5
	Dénombrement de <i>L. monocytogenes</i>	5
Section 8	Confirmation des résultats positifs	6
Section 9	Confirmation d'autres méthodes	7
Section 10	Performance du test et validations	7
Section 11	Références.....	8
Section 12	Historique des révisions.....	8

Section 1 Introduction

De graves épidémies dues à *Listeria monocytogenes* continuent de préoccuper l'industrie alimentaire. Le genre *Listeria* est dangereux car il peut survivre et croître, quoique lentement, à des températures de réfrigération dans les aliments transformés prêts-à-consommer. *Listeria monocytogenes* est un agent pathogène particulièrement problématique ; il peut entraîner de graves problèmes de santé, voire la mort, notamment chez les personnes immunodéprimées, les nouveau-nés et les personnes âgées. Chez la femme enceinte, une infection peut causer une mortinatalité et un avortement spontané. La listériose présente les symptômes suivants : fièvre, fatigue, nausées, vomissements, diarrhée. Le taux de mortalité est de 30 % et peut être supérieur chez les personnes vulnérables. Environ 90 % de l'ensemble des cas rapportés de listériose aboutissent à une hospitalisation. Une méthode de culture rapide est nécessaire, de façon à réduire le temps d'obtention des résultats et à garantir la précision de ces résultats.

Section 2 AL Agar - Principe

Le principe du milieu AL (Agar *Listeria* selon Ottaviani et Agosti) repose sur la détection simultanée de deux activités enzymatiques : β -D-glucosidase et phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PI-PLC). L'activité β -D-glucosidase, commune à toutes les bactéries du genre *Listeria*, est mise en évidence par la présence d'un substrat chromogène (X-glucoside). L'hydrolyse de ce substrat conduit à la formation d'une coloration bleue à bleu-vert des colonies de *Listeria*. La PI-PLC est une enzyme spécifique des espèces pathogènes de *Listeria* : *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*. La dégradation du phosphatidylinositol contenu dans le milieu AL conduit à la formation d'un halo opaque autour des colonies de ces deux espèces. Ce halo apparaît généralement après 24 hr d'incubation chez *L. monocytogenes* et après 48 hr d'incubation chez *L. ivanovii*. La sélectivité du milieu est obtenue par l'action combinée du chlorure de lithium, des antibiotiques et de l'antifongique. Il est possible d'utiliser ce milieu dans un protocole normalisé ou dans un autre protocole court validé.

Section 3 Formule théorique

Peptone de viande	18 g
Tryptone	6 g
Extrait de levure	10 g
Pyruvate de sodium	2 g
Glucose	2 g
Glycérophosphate de magnésium anhydre	1 g
Sulfate de magnésium anhydre	0,5 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Chlorure de lithium (LiCl)	10 g
Na ₂ HPO ₄ anhydre	2,5 g
Substrat chromogène (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside)	0,05 g
Acide nalidixique	0,02 g
Ceftazidime	0,02 g
Sulfate de polymyxine B	76 700 UI
Amphotéricine B	0,01 g
Phosphatidylinositol	2 g
Agar	12 g
Eau distillée	q.s.p. 1 000 ml

pH final à 25 °C = 7,2 \pm 0,2

Section 4

Durée de conservation et stockage

- Base déshydratée : 15–25 °C en emballage soigneusement scellé, dans un endroit sec et à l'abri de la lumière
- Base gélosée en flacon et suppléments : 2–8 °C à l'abri de la lumière
- Supplément 1 reconstitué : 1 semaine à 2–8 °C
- Précoulé : 2–8 °C à l'abri de la lumière
- Boîte préparée à partir de la base déshydratée : 2 semaines 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
- Plaque chauffante
- Balance, sensibilité 0,1 g
- Agitateur-homogénéisateur
- Étuve ou enceinte thermostatée, précision ± 1 °C
- Bain-marie

Produits

- Confirmation :
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (n° de référence 3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (n° de référence 3578113)
 - RAPID'L.mono Agar (n° de référence 3563694, boîtes préparées, 90 mm x 20 boîtes ; 3563964, boîtes préparées, 90 mm x 120 boîtes ; 3555294, kit prêt à l'emploi (pour 200 ml) y compris milieu gélosé en flacon et suppléments ; 3564293, base déshydratée, 500 g ; 3564294, supplément 1, lyophilisé, 10 flacons ; 3564746, supplément 2, liquide, 10 flacons)
 - PALCAM Agar (par exemple n° de référence 3564754, base déshydratée 500 g ; 3564752, supplément, 10 flacons)
 - Rhamnose Test (n° de référence 3553669, 1 ml x 28 flacons)
- Diluant pour le dénombrement :
 - Tryptone-sel (n° de référence 3555754, 9 ml x 25 tubes ; 3555756, 900 ml x 6 flacons ; 3555796, 3 L x 4 poches ; 3564544, 500 g)
 - Buffered Peptone Water (BPW) (Eau peptonée tamponnée) (par exemple BPW Plus, n° de référence 3564684, base déshydratée, 500 g ; 3554179, 225 ml x 6 flacons ; 3555790, 5 L x 2 poches ; 3555795, 3 L x 4 poches ; ou BPW Standard, n° de référence 12013259, base déshydratée, 500 g ; 12013258, base déshydratée, 5 kg ; 12013260, 5 L x 2 poches)

Section 6 Précautions, limites d'utilisation et contrôle qualité

- Milieu d'enrichissement : Bouillon Fraser demi (n° de référence 3555797, flacons 225 ml x 6 ; 3555794, 3 L x 4 poches ; 3564604, base déshydratée, 500 g ; 3564616, supplément, 10 flacons) ou Half Fraser Standard Broth (n° de référence 12018707, 5 L x 2 poches ; 12018706, base déshydratée 500 g ; 12018705, base déshydratée 5 kg)
- Anses d'inoculation et étaleurs
- Boîtes de Petri stériles (Ø 90 mm)
- 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
- Laisser sécher les boîtes à 25–50 °C conformément à la norme ISO 7218, jusqu'à ce que les gouttes disparaissent de la surface du milieu. Éviter cependant un séchage prolongé afin de ne pas altérer l'efficacité du milieu. Ne pas faire sécher les boîtes sous une hotte à flux laminaire
- Pour les boîtes fortement chargées avec une opacification intense de la gélose, la lecture peut être facilitée grâce à la comparaison de l'opacité de la gélose par rapport à une boîte d'AL Agar nonensemencée
- Il est possible d'utiliser ce milieu dans les protocoles normalisés (par exemple, ISO ou FDA BAM)
- Afin de garantir les performances de la méthode alternative, l'utilisation du bouillon Fraser-demi commercialisé par Bio-Rad est recommandée

Limites d'utilisation

- Il existe d'autres bactéries à Gram positif β -D-glucosidase positives sans halo (par exemple *Enterococcus* spp.) et avec halo (par exemple, *Bacillus circulans*)
- De rares souches d'entérocoques peuvent, lorsque la lecture est faite sous 48 hr, présenter une activité lente du phosphatidylinositol et provoquer la fermentation du rhamnose, comme la souche *Listeria monocytogenes*. Un test de catalase, réalisé directement sur une colonie bleue isolée à halo, permet de différencier *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* (catalase positive) d'*Enterococcus* spp. (catalase négative). Plus généralement, les caractéristiques atypiques des souches *Listeria* sont mentionnées dans l'annexe D de la norme NF EN ISO 11290-1.
- Les volumes d'échantillon supérieurs à 25 g n'ont pas été testés dans le cadre de la marque NF VALIDATION

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

Section 7 Protocole

Préparation du milieu déshydraté

1. Toujours agiter le flacon avant utilisation.
2. Dissoudre 34,55 g de poudre dans 470 ml d'eau distillée et mélanger jusqu'à obtenir une suspension homogène.
3. Chauffer doucement en mélangeant fréquemment, puis amener à ébullition.
4. Stériliser en autoclave à 121 °C pendant 15 min.
5. Refroidir le milieu de culture à 44–47 °C.
6. Reconstituer aseptiquement le supplément 1 lyophilisé avec 5 ml d'eau distillée stérile. Mélanger jusqu'à dissolution complète et ajouter à la gélose fondue.
7. Ajouter aseptiquement 1 flacon de supplément 2. Lors de l'ajout, la température du milieu de base ne doit pas dépasser 50 °C.
8. Bien mélanger et couler en boîtes de Petri. Empiler les boîtes (maximum 5) pour permettre un refroidissement lent.
9. 500 g de poudre permettent de reconstituer 7,2 L de milieu.

Préparation du milieu en flacon

1. Dans un bain-marie à ébullition, faire fondre le contenu du flacon AL Agar (237,5 ml).
2. Faire refroidir le flacon à 44–47 °C dans un bain-marie.
3. Reconstituer aseptiquement le supplément 1 lyophilisé avec 5 ml d'eau distillée stérile. Mélanger jusqu'à dissolution complète.
4. Ajouter aseptiquement 2,5 ml de supplément 1 reconstitué et 12,5 ml de supplément 2 reconstitué.
5. Mélanger soigneusement. Éviter de faire mousser.
6. Verser le milieu dans les boîtes de Petri. Empiler les boîtes (maximum 5) pour permettre un refroidissement lent.

Détection de *L. monocytogenes* et du genre *Listeria*

1. Diluer n g ou n ml d'échantillon dans $9 \times n$ ml de bouillon Fraser demi. Homogénéiser avec un agitateur-homogénéisateur.
2. Vérifier que l'écouvillon d'échantillonnage environnemental est complètement immergé dans le bouillon (au moins dans 9 ml).
3. Vérifier que l'éponge, la lingette ou le tampon d'échantillonnage environnemental est complètement imbibé de bouillon. Ajouter 9 fois le poids du dispositif humide en bouillon dans un contenant de manière à le recouvrir entièrement.
4. Incuber à 30 ± 1 °C pendant 18–28 hr.
5. Après l'étape d'enrichissement, le bouillon peut être stocké à 2–8 °C pendant 72 hr.
6. 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.
7. À l'aide d'une pipette Pasteur stérile ou d'une anse d'inoculation, étaler l'échantillon sur la moitié de la surface gélosée dans un mouvement de va-et-vient.
8. 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.
9. Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 hr. L'incubation peut être étendue à 48 ± 2 hr.
10. Les *L. monocytogenes* forment des colonies bleues à bleu-vert avec halo.
11. Les autres *Listeria* spp. forment des colonies bleues à bleu-vert avec ou sans halo.
12. Après l'étape d'incubation, les boîtes peuvent être stockées à 2–8 °C pendant 72 hr.
13. En présence de colonies de *L. monocytogenes* caractéristiques lors du protocole de détection, il n'est pas nécessaire d'effectuer une confirmation si l'échantillon a déjà été confirmé positif lors du protocole de dénombrement.

Dénombrement de *L. monocytogenes*

1. Diluer n g ou n ml d'échantillon dans $9 \times n$ ml de bouillon Fraser demi ou d'eau peptonée tamponnée.
2. Étaler 0,1 ml d'échantillon ou ses dilutions décimales sur la surface d'une boîte ou transférer 1 ml dans une boîte de Petri vide et couler 15 ml de milieu AL fondu (44–47 °C).
3. S'il est nécessaire de procéder à l'estimation de petits nombres, étaler 1 ml de l'échantillon ou des dilutions décimales sur la surface de trois boîtes de 90 mm de diamètre (~0,33 ml/boîte) ou d'une boîte de 140 mm de diamètre.
4. Incuber les boîtes retournées à 37 ± 1 °C pendant 48 ± 3 hr. Une première lecture à 24 heures permet de détecter plus rapidement les échantillons fortement contaminés. Toutefois, le résultat final du dénombrement est obtenu après 48 hr (± 3 hr).

Section 8 Confirmation des résultats positifs

5. Procéder à la lecture des boîtes et dénombrer les colonies typiques.
6. Les *L. monocytogenes* forment des colonies bleues à bleu-vert avec halo.
7. Les autres *Listeria* spp. forment des colonies bleues à bleu-vert avec ou sans halo.
8. Après l'étape d'incubation, les boîtes peuvent être stockées à 2–8 °C pendant 72 hr.
9. Consulter la norme EN ISO 7218 pour obtenir des informations sur l'inoculation, le comptage des colonies, les calculs et l'expression des résultats.
10. En présence de colonies de *L. monocytogenes* caractéristiques lors du protocole de dénombrement, il n'est pas nécessaire d'effectuer une confirmation si l'échantillon a déjà été confirmé positif lors du protocole de détection.

Section 8 Confirmation des résultats positifs

1. Dans le contexte de la marque NF VALIDATION, tous les résultats positifs doivent être confirmés. Dans le cadre du protocole de dénombrement, si la première colonie confirmée donne un résultat négatif, il convient de poursuivre les confirmations jusqu'à cinq colonies. Confirmer moins de cinq colonies comporte un risque de surestimation dû à la présence de colonies typiques qui ne seraient pas *L. monocytogenes*.
2. La confirmation de la présence de *L. monocytogenes* doit être effectuée de l'une des façons suivantes :
 - a. À l'aide des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées ISO (y compris l'étape de purification).
 - b. À l'aide de sondes nucléiques comme décrit dans la norme ISO 7218 (par exemple, iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, n° de référence 3578124), avec des colonies isolées (avec ou sans étape de purification).
 - c. À l'aide d'un test Rhamnose (n° de référence 3553669).
 - d. Repiquage par spot d'au moins une colonie isolée sur une boîte gélosée RAPID'*L.mono*. Jusqu'à 12 colonies peuvent être confirmées sur une seule boîte de milieu RAPID'*L.mono*.
 - e. À l'aide de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION fondée sur un principe différent de celui de AL Agar. Le protocole validé de cette seconde méthode doit être suivi dans sa totalité. Toutes les étapes antérieures à l'étape de détection utilisée comme point de départ pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.
3. La confirmation de la présence de *Listeria* spp. autres que *L. monocytogenes* doit être effectuée de l'une des façons suivantes :
 - a. À l'aide des tests classiques décrits dans les méthodes normalisées ISO (y compris l'étape de purification).
 - b. À l'aide de sondes nucléiques comme décrit dans la norme ISO 7218 (par exemple, iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, n° de référence 3578113) avec des colonies isolées (avec ou sans étape de purification).


Section 9 Confirmation d'autres méthodes

- c. Repiquage et striation d'au moins une colonie isolée sur une boîte gélosée PALCAM. Jusqu'à 6 colonies peuvent être confirmées sur une seule boîte gélosée PALCAM.
 - d. À l'aide de toute autre méthode certifiée NF VALIDATION fondée sur un principe différent de celui de AL Agar. Le protocole validé de cette seconde méthode doit être suivi dans sa totalité. Toutes les étapes antérieures à l'étape de détection utilisée comme point de départ pour la confirmation doivent être communes aux deux méthodes.
4. En cas de résultats discordants (préssumé positif avec AL Agar, négatif avec la méthode de confirmation), le laboratoire doit suivre les étapes nécessaires pour garantir la validité du résultat obtenu.

Section 9 Confirmation d'autres méthodes

Sans objet.

Section 10 Performance du test et validations

Certification	Domaine	Protocole de validation	Protocole de référence	Référence de certificat
NF VALIDATION	Tous les échantillons de produits alimentaires destinés à la consommation humaine et les échantillons environnementaux de production	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 EN ISO 11290-2	 BRD : 07/16-01/09 BRD : 07/17-01/09 MÉTHODES ANALYTIQUES ALTERNATIVES POUR LE SECTEUR AGRO- ALIMENTAIRE Certifié par AFNOR Certification Fin de validité : se reporter au certificat disponible sur le site Web AFNOR Certification : http://nf- validation.afnor.org/en

Section 11 Références

ISO 7218:2024. Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations pour les examens microbiologiques

ISO 6887-1:2017/ADM: 2024. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales — Amendement 1 : Exigences et recommandations sur l'utilisation d'une taille de prise d'essai plus grande pour les méthodes qualitatives

ISO 18593:2018. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthodes horizontales pour les prélèvements de surface

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 et al. (1997a). Esperienze su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari. 36, 1–3.

Ottaviani F et al. (1997b). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. June 16–18.

United States Department of Agriculture (2019). 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. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 10, 2020.

United States Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: *Listeria monocytogenes*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>, accessed August 10, 2020.

Vlaemynck G et al. (2000): Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. J. Appl Microbiol 88: 430-441.

Section 12 Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Décembre 2024	10000245369 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Modification du numéro de document (version précédente 10000135677 Ver B)- Mise à jour des limites d'utilisation pour les souches rares d'entérocoques- Mise à jour de la section de référence

Visitez 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
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

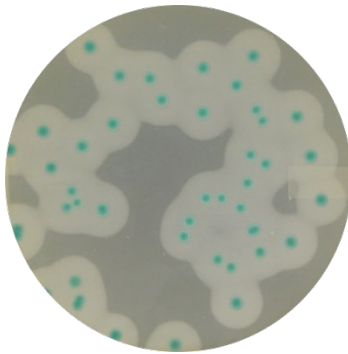
Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 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 82 080 007 7373 **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

AL Agar

Anwenderhandbuch

Chromogenes Medium für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* und anderen *Listeria*-Spezies in Nahrungsmittelprodukten für den menschlichen Verzehr, in Tierfuttermitteln und in Umgebungsproben

Katalog-Nr. 3563695, gebrauchsfertige Agarplatten, 20 Agarplatten x 90 mm
Katalog-Nr. 3563965, gebrauchsfertige Agarplatten, 120 Agarplatten x 90 mm
Katalog-Nr. 3555200, Basisagar in Flaschen, 6 Flaschen x 237,5 ml
Katalog-Nr. 3564043, dehydriert, 500 g
Katalog-Nr. 3564041, Supplement 1, gefriergetrocknet, 10 Fläschchen
Katalog-Nr. 3564042, Supplement 2, flüssig, 10 Fläschchen x 25 ml



BIO-RAD

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt 1	Einleitung	1
Abschnitt 2	Funktionsprinzip des AL Agars	1
Abschnitt 3	Theoretische Zusammensetzung.....	1
Abschnitt 4	Haltbarkeit und Lagerung	2
Abschnitt 5	Zusätzlich benötigtes Material	2
	Geräte.....	2
	Zubehör	2
Abschnitt 6	Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle	3
Abschnitt 7	Protokoll.....	4
	Vorbereitung des dehydrierten Mediums.....	4
	Zubereitung des in Flaschen abgefüllten Agars.....	4
	Nachweis von <i>L. monocytogenes</i> und der Gattung <i>Listeria</i>	5
	Zählung von <i>L. monocytogenes</i>	5
Abschnitt 8	Bestätigung positiver Ergebnisse.....	6
Abschnitt 9	Bestätigung anderer Methoden.....	7
Abschnitt 10	Testleistung und Testvalidierungen.....	7
Abschnitt 11	Literatur.....	8
Abschnitt 12	Revisionshistorie	8

Abschnitt 1 Einleitung

In der Lebensmittelindustrie kommt es immer wieder zu sicherheitsrelevanten Ausbrüchen von *Listeria monocytogenes*. Listerien stellen ein Gesundheitsrisiko dar, weil sie bei gekühlten Temperaturen in verzehrfertig verarbeiteten Nahrungsmitteln überleben und sich, wenngleich langsam, vermehren können. *Listeria monocytogenes* ist ein besonders problematischer Erreger, da er schwerwiegende Erkrankungen verursachen und auch zum Tod führen kann, insbesondere bei immungeschwächten Personen, Neugeborenen und älteren Menschen. Bei schwangeren Frauen kann eine Infektion zur Totgeburt oder Fehlgeburt führen. Eine Listeriose äußert sich durch Symptome wie Fieber, Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall und ist mit einer Sterberate von 30 % verbunden, die bei besonders anfälligen Personen noch höher liegt. Ungefähr 90 % aller gemeldeten Fälle von Listeriose erfordern eine stationäre Behandlung. Eine schnelle und korrekte Befundung hängt von der Verfügbarkeit einer schnellen Kulturmethode ab.

Abschnitt 2 Funktionsprinzip des AL Agars

Das Prinzip des AL Agars (*Listeria*-Agar nach Ottaviani und Agosti) basiert auf dem gleichzeitigen Nachweis von zwei Enzymaktivitäten: der β -D-Glucosidase und der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PIPLC). Die allen Listerien gemeinsame β -D-Glucosidase-Aktivität wird mit einem chromogenen Substrat (X-Glucosid) nachgewiesen. Die Hydrolyse dieses Substrats durch die Gattung *Listeria* führt zur Bildung von blau bis blaugrün gefärbten Kolonien. PIPLC kommt nur bei den pathogenen *Listeria*-Spezies *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* vor. Der AL Agar enthält Phosphatidylinositol, das, wenn es abgebaut wird, einen opaken Hof um Kolonien dieser beiden Bakterienspezies erzeugt. Dieser Hof bildet sich bei *L. monocytogenes* üblicherweise nach 24-stündiger Inkubation und bei *L. ivanovii* nach 48-stündiger Inkubation. Die Selektivität des Mediums wird durch die kombinierte Wirkung von Lithiumchlorid, Antibiotika und einem Antimykotikum erzielt. Dieses Medium kann im Rahmen eines standardisierten Protokolls oder eines alternativen validierten Kurzprotokolls verwendet werden.

Abschnitt 3 Theoretische Zusammensetzung

Pepton aus Fleisch	18 g
Trypton	6 g
Hefeextrakt	10 g
Natriumpyruvat	2 g
Glukose	2 g
Wasserfreies Magnesiumglycerophosphat	1 g
Wasserfreies Magnesiumsulfat	0,5 g
Natriumchlorid (NaCl)	5 g
Lithiumchlorid (LiCl)	10 g
Wasserfreies Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Chromogenes Substrat (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucopyranosid)	0,05 g
Nalidixinsäure	0,02 g
Ceftazidim	0,02 g
Polymyxin-B-Sulfat	76.700 IE
Amphotericin B	0,01 g
Phosphatidylinositol	2 g
Agar	12 g
Destilliertes Wasser	qsp 1.000 ml

Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,2 ± 0,2

Abschnitt 4 Haltbarkeit und Lagerung

- Dehydriert: Trocken und lichtgeschützt in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 15–25°C.
- In Flaschen abgefüllter Agar und die Supplemente: Lichtgeschützt bei 2–8°C
- Rekonstituiertes Supplement 1: 1 Woche bei 2–8°C
- Gebrauchsfertige Agarplatten: Lichtgeschützt bei 2–8°C
- Aus dehydriertem Basisagar hergestellte Agarplatten: 2 Wochen bei trockener und lichtgeschützter Lagerung in der sorgfältig verschlossenen Packung bei 2–8°C

Abschnitt 5 Zusätzlich benötigtes Material

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- 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:
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (Katalog-Nr. 3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (Katalog-Nr. 3578113)
 - RAPID'L.mono Agar (Katalog-Nr. 3563694, gebrauchsfertige Agarplatten, 20 Agarplatten x 90 mm; 3563964, gebrauchsfertige Agarplatten, 120 Agarplatten x 90 mm; 3555294, gebrauchsfertiges Kit (für 200 ml) mit in Flaschen abgefülltem Agar und Supplementen; 3564293, dehydriert, 500 g; 3564294, Supplement 1, gefriergetrocknet, 10 Fläschchen; 3564746, Supplement 2, flüssig, 10 Fläschchen)
 - PALCAM-Agar (z. B. Katalog-Nr. 3564754, dehydriert, 500 g; 3564752, Supplement, 10 Fläschchen)
 - Rhamnose Test (Katalog-Nr. 3553669, 28 Fläschchen x 1 ml)
- 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, dehydriert, 500 g)
 - Gepuffertes Peptonwasser (GPW; Buffered Peptone Water, z. B. BPW Plus, Katalog-Nr. 3564684, dehydriert, 500 g; 3554179, 6 Flaschen x 225 ml; 3555790, 2 Beutel x 5 L;

Abschnitt 6 Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

3555795, 4 Beutel x 3 L; oder BPW Standard, Katalog-Nr. 12013259, dehydriert, 500 g; 12013258, dehydriert, 5 kg; 12013260, 2 Beutel x 5 L)

- 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) oder Halb Fraser Standard Broth (Katalog-Nr. 12018707 2 Beutel x 5 L; 12018706 dehydriert 500 g; 12018705 dehydriert 5 kg)
- Impfösen und Impfspatel
- Sterile Petrischalen (90 mm)
- Sterile Pipetten
- Sterile Probenbeutel

Abschnitt 6

Vorsichtsmaßnahmen, Anwendungsbeschränkungen und Qualitätskontrolle

Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (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 Nahrungsmittelproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und gemäß den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen zu entsorgen.
- Die Platten gemäß ISO-Norm 7218 bei 25–50°C trocknen, bis die Tröpfchen von der Mediumoberfläche verschwunden sind. Ein längeres Trocknen jedoch vermeiden, um die Effizienz des Mediums nicht zu verändern. Die Platten nicht in einem Laminar-Flow-Abzug trocknen lassen.
- Bei Schalen mit hohem Keimwachstum und stark opakem Agar kann das Ablesen erleichtert werden, indem die Opazität des Agars mit einer nicht inokulierten AL-Schale verglichen wird.
- Dieses Medium kann in Standardprotokollen verwendet werden (z. B. ISO oder FDA BAM).
- Um die besten Ergebnisse mit der alternativen Methode zu erzielen, wird die Verwendung von Halb Fraser Nährbouillon empfohlen

Anwendungsbeschränkungen

- Es gibt andere grampositive β -D-Glucosidase-positive Bakterien mit oder ohne Bildung eines Hofes (*Enterococcus* spp. bzw. *Bacillus circulans*).
- Seltene *Enterococcus*-Stämme können innerhalb der Ablesezeit von 48 Stunden eine langsame Phosphatidylinositol-Aktivität aufweisen und Rhamnose wie *Listeria monocytogenes* fermentieren. Durch einen Katalasetest, der direkt auf einer isolierten blauen Kolonie mit einem Halo aufgetragen wird, können *Listeria monocytogenes* und *Listeria ivanovii* (katalase-positiv) von *Enterococcus* spp.

(katalase-negativ) unterschieden werden. Im Allgemeinen werden die atypischen Eigenschaften von *Listeria*-Stämmen in der Norm NF EN ISO 11290-1 (Anhang D) genannt

- Im Rahmen der NF-Validierung wurden keine Probenvolumina über 25 g getestet.

Qualitätskontrolle

- Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einer umfassenden Qualitätssicherung. 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 Unterlagen zur Produktion und Qualitätskontrolle jeder Charge werden archiviert.
- Das Sicherheitsdatenblatt und das Analysezertifikat für das Produkt sind im Internet auf www.bio-rad.com erhältlich.

Abschnitt 7 Protokoll

Vorbereitung des dehydrierten Mediums

1. Die Flasche vor jedem Gebrauch schütteln.
2. 34,55 g Pulver werden in 470 ml destilliertem Wasser gelöst und zu einer homogenen Suspension gemischt.
3. Unter ständigem Rühren vorsichtig erhitzen und zum Kochen bringen.
4. In einem Autoklaven 15 min bei 121°C sterilisieren.
5. Das Medium auf 44–47°C abkühlen lassen.
6. Das lyophilisierte Supplement 1 mit 5 ml sterilem, destilliertem Wasser unter sterilen Bedingungen rehydratisieren. Rühren, bis es sich vollständig aufgelöst hat, und dem geschmolzenen Agar zugeben.
7. 1 Fläschchen Supplement 2 unter sterilen Bedingungen zugeben. Die Temperatur des Mediums sollte bei der Zugabe von Supplement 2 nicht höher sein als 50°C.
8. Gut mischen und in Petrischalen gießen. Die Petrischalen stapeln (bis zu 5), um das Abkühlen zu verlangsamen.
9. 500 g Pulver ergeben 7,2 L Medium.

Zubereitung des in Flaschen abgefüllten Agars

1. In einem kochenden Wasserbad den Inhalt der Flasche mit AL-Agar schmelzen lassen (237,5 ml).
2. Die Flasche in einem Wasserbad auf 44–47°C abkühlen lassen.

Abschnitt 7 Protokoll

3. Das lyophilisierte Supplement 1 mit 5 ml sterilem, destilliertem Wasser unter sterilen Bedingungen rehydratisieren. Rühren, bis es sich vollständig aufgelöst hat.
4. 2,5 ml rehydriertes Supplement 1 und 12,5 ml Supplement 2 unter sterilen Bedingungen zugeben.
5. Gründlich mischen. Schaumbildung vermeiden.
6. Das Medium in Petrischalen gießen. Die Petrischalen stapeln (bis zu 5), um das Abkühlen zu verlangsamen.

Nachweis von *L. monocytogenes* und der Gattung *Listeria*

1. n g oder n ml Probe in $9 \times n$ ml Halb Fraser Bouillon verdünnen. Mit dem Rührer/Homogenisator homogenisieren.
2. Darauf achten, dass Tupfer mit einer Umgebungsprobe vollständig in die Nährbouillon (mindestens 9 ml) eingetaucht sind.
3. Darauf achten, dass Schwämme, Tücher oder Mullstücke mit der Umgebungsprobe vollständig mit Nährbouillon getränkt werden. Nährbouillon zugeben. Das Volumen muss dem 9-fachen Gewicht der getränkten Wischprobe entsprechen.
4. Bei $30 \pm 1^\circ\text{C}$ für 18–28 hr inkubieren.
5. Nach der Anreicherung kann die Bouillon 72 hr bei $2\text{--}8^\circ\text{C}$ gelagert werden.
6. 0,1 ml Probe mit einer sterilen Pipette entnehmen und auf den äußeren Rand der Hälfte der Agaroberfläche tropfen.
7. Die Probe mit einer sterilen Pasteurpipette oder einer Impföse in einer Hin- und Herbewegung auf einer Hälfte der Agaroberfläche verteilen.
8. 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.
9. Bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ für 24 ± 2 hr inkubieren. Die Inkubation kann auf 48 ± 2 hr verlängert werden.
10. *L. monocytogenes* bildet blaue/blaugrüne Kolonien mit einem Hof.
11. Andere *Listeria* spp. bilden blaue/blaugrüne Kolonien mit oder ohne Hof.
12. Nach der Inkubation können die Platten für 72 hr bei $2\text{--}8^\circ\text{C}$ gelagert werden.
13. Wenn sich bei Einhaltung des Nachweisprotokolls charakteristische *L. monocytogenes*-Kolonien bilden, ist keine Bestätigung erforderlich, wenn sich die Probe bereits im Protokoll für die Zählung als positiv erwiesen hat.

Zählung von *L. monocytogenes*

1. n g oder n ml Probe in $9 \times n$ ml Halb Fraser Bouillon oder GPW verdünnen.
2. Auf jeder Platte 0,1 ml der Probe oder einer Dezimalverdünnung ausstreichen oder 1 ml in eine leere Petrischale geben und 15 ml geschmolzenen AL Agar ($44\text{--}47^\circ\text{C}$) darauf gießen.

Abschnitt 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

3. Wenn die zu erwartende Keimzahl gering ist, 1 ml der Probe oder einer Dezimalverdünnung auf drei Agarplatten mit 90 mm Durchmesser (~0,33 ml/Agarplatte) oder in einer Agarplatte mit 140 mm Durchmesser verteilen.
4. Die Platten umdrehen und 48 ± 3 hr bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubieren. Ein erstes Ablesen nach 24 hr ermöglicht einen schnelleren Nachweis stark kontaminierter Proben. Die Zählung des Endergebnisses kann jedoch erst nach 48 hr (± 3 hr) stattfinden.
5. Die Platten ablesen und die Anzahl der typischen Kolonien zählen.
6. *L. monocytogenes* bildet blaue/blaugrüne Kolonien mit einem Hof.
7. Andere *Listeria* spp. bilden blaue/blaugrüne Kolonien mit oder ohne Hof.
8. Nach der Inkubation können die Platten für 72 hr bei $2-8^\circ\text{C}$ gelagert werden.
9. Die Norm EN ISO 7218 enthält Informationen zum Beimpfen, Zählen von Kolonien sowie zum Berechnen und Angeben der Ergebnisse.
10. Wenn sich bei Einhaltung des Protokolls für die Zählung charakteristische *L. monocytogenes*-Kolonien bilden, ist keine Bestätigung erforderlich, wenn sich die Probe bereits im Nachweisprotokoll als positiv erwiesen hat.

Abschnitt 8 Bestätigung positiver Ergebnisse

1. Im Rahmen der NF-Validierung müssen alle positiven Ergebnisse bestätigt werden. Wenn bei Einhaltung des Protokolls für die Zählung die erste Kolonie im Bestätigungstest ein negatives Ergebnis liefert, sollte die Bestätigungen mit bis zu fünf Kolonien fortgesetzt werden. Die Bestätigung von weniger als 5 Kolonien birgt das Risiko einer überschätzten Bewertung, da es sich um typische Kolonien anderer Keime als *L. monocytogenes* handeln könnte.
2. Die Bestätigung von *L. monocytogenes* muss mit einer der folgenden Methoden erfolgen:
 - a. Mit den in den ISO-Normen beschriebenen herkömmlichen Tests (einschließlich des Reinigungsschritts).
 - b. Durch Verwendung von Nukleinsonden wie in der Norm ISO 7218 beschrieben (z. B. iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, Katalog-Nr. 3578124) unter Verwendung von Einzelkolonien (mit oder ohne Reinigungsschritt).
 - c. Durch einen Rhamnose Test (Katalog-Nr. 3553669).
 - d. Durch erneutes Picken und Aufbringen von mindestens einer isolierten Kolonie auf einer RAPID'*L.mono* Agarplatte. Auf einer Platte mit RAPID'*L.mono* Agar können bis zu 12 Kolonien bestätigt werden.
 - e. Durch Verwendung einer anderen NF VALIDATION-zertifizierten Methode, die auf einem anderen Testprinzip als dem von AL Agar beruht. Das validierte Protokoll dieser zweiten Methode muss ohne Abwandlungen durchgeführt werden. Alle Schritte vor dem Nachweisschritt als Ausgangspunkt für die Bestätigung müssen in beiden Methoden identisch sein.


Abschnitt 9 Bestätigung positiver Ergebnisse

3. Die Bestätigung von anderen *Listeria* spp. als *L. monocytogenes* muss mit einer der folgenden Methoden erfolgen:
 - a. Mit den in den 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. Real-Time PCR Detection Kit, Katalog-Nr. 3578113) unter Verwendung von Einzelkolonien (mit oder ohne Reinigungsschritt).
 - c. Durch erneutes Picken und Ausstreichen von mindestens einer isolierten Kolonie auf einer PALCAM Agarplatte. Auf einer Platte mit PALCAM Agar können bis zu 6 Kolonien bestätigt werden.
 - d. Durch Verwendung einer anderen NF VALIDATION-zertifizierten Methode, die auf einem anderen Testprinzip als dem von AL Agar beruht. Das validierte Protokoll dieser zweiten Methode muss ohne Abwandlungen durchgeführt werden. Alle Schritte vor dem Nachweisschritt als Ausgangspunkt für die Bestätigung müssen in beiden Methoden identisch sein.
4. Bei nicht übereinstimmenden Ergebnissen (vermutlich positiv auf AL Agar, negativ mit der Bestätigungsmethode) muss das Labor die erforderlichen Schritte ausführen, um die Validität des erhaltenen Ergebnisses sicherzustellen.

Abschnitt 9 Bestätigung anderer Methoden

Nicht zutreffend

Abschnitt 10 Testleistung und Testvalidierungen

Zertifizierungsstelle	Umfang	Validierungsprotokoll	Referenzprotokoll	Zertifikat-Referenz
NF VALIDATION	Alle Lebensmittelproben und Umgebungsproben aus dem Bereich Produktion	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 EN ISO 11290-2	 BRD: 07/16-01/09 BRD: 07/17-01/09 ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS Zertifiziert durch die AFNOR-Zertifizierungsstelle Gültig bis: Entsprechend den Angaben auf dem Zertifikat auf der Website von AFNOR Certification: http://nf- validation.afnor.org/en

Abschnitt 11 Literatur

ISO 7218:2024. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen

ISO 6887-1:2017/AMD: 2024. Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen – Teil 1: Allgemeine Regeln für die Vorbereitung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen – Änderung 1: Anforderungen und Leitlinien für die Verwendung größerer Prüfmengen bei qualitativen Verfahren

ISO 18593:2018. Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontale Verfahren für Probenahmen von Oberflächen

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: Zählverfahren.

Ottaviani F et al. (1997a). Esperienze su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari. 36, 1–3.

Ottaviani F et al. (1997b). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. June 16–18.

United States Department of Agriculture (2019). 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. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 10, 2020.

United States Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: *Listeria monocytogenes*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>, accessed August 10, 2020.

Vlaemynck G et al. (2000): Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. J. Appl Microbiol 88: 430-441.

Abschnitt 12 Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
Dezember 2024	10000245369 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Änderung der Dokumentnummer - vorhergehende Version 10000135677 Ver B)- Aktualisierung der Verwendungsbeschränkungen bei seltenen <i>Enterococcus</i>-Stämmen- Aktualisierung Abschnitt Referenzen

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

BIO-RAD ist eine Marke der 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
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

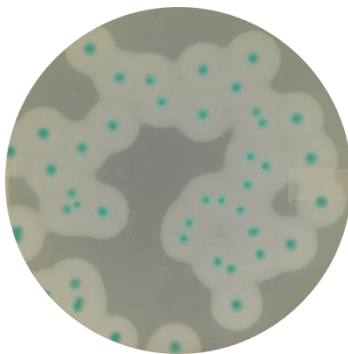
Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 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 82 080 007 7373 **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

AL Agar

Istruzioni per l'uso

Terreno cromogenico per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* e altre specie di *Listeria* in prodotti alimentari destinati al consumo umano e animale e nei campioni ambientali

Numero catalogo 3563695, piastre preparate, 90 mm x 20 piastre
Numero catalogo 3563965, piastre preparate, 90 mm x 120 piastre
Numero catalogo 3555200, flacone di base agar, 237,5 ml x 6 flaconi
Numero catalogo 3564043, in forma disidratata, 500 g
Numero catalogo 3564041, Supplement 1, liofilizzato, 10 fiale
Numero catalogo 3564042, Supplement 2, liquido 25 ml, 10 fiale



BIO-RAD

Indice

Sezione 1	Introduzione	1
Sezione 2	Principio di AL Agar	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
Sezione 7	Protocollo	4
	Preparazione del terreno disidratato	4
	Preparazione del terreno in flacone	4
	Rilevazione del genere <i>L. monocytogenes</i> e <i>Listeria</i>	5
	Enumerazione di <i>L. monocytogenes</i>	5
Sezione 8	Conferma dei risultati positivi	6
Sezione 9	Conferma di altri metodi.....	7
Sezione 10	Performance del test e validazioni	7
Sezione 11	Riferimenti.....	7
Sezione 12	Cronologia delle revisioni.....	8

Sezione 1 Introduzione

Gravi focolai di *Listeria monocytogenes* continuano a minare la sicurezza dell'industria alimentare. Il pericolo della *Listeria* deriva dal modo in cui questi batteri riescano, seppur lentamente, a sopravvivere e crescere a basse temperature in alimenti cotti pronti al consumo. La *Listeria monocytogenes* è un agente patogeno particolarmente aggressivo, poiché può essere responsabile di gravi problemi di salute e di possibile morte, soprattutto negli individui immunodepressi, nei neonati e nelle persone anziane. Nelle donne in gravidanza l'infezione è spesso causa di morte endouterina fetale e aborti spontanei. La listeriosi si manifesta con sintomi quali febbre, affaticamento, nausea, vomito e diarrea con un tasso di mortalità del 30% che potrebbe essere superiore negli individui vulnerabili. Circa il 90% dei casi segnalati di listeriosi richiede l'ospedalizzazione. Per ottenere risultati accurati in tempi più brevi, è necessario eseguire un metodo di coltura rapido.

Sezione 2 Principio di AL Agar

Il principio del terreno di AL (Agar *Listeria* secondo Ottaviani e Agosti) è basato sulla rilevazione simultanea di due attività enzimatiche: la β -D-glucosidasi e la fosfolipasi C (PIPLC). L'attività della β -D-glucosidasi, comune a tutte le *Listeria*, viene rilevata utilizzando un substrato cromogenico (X-glucoside). L'idrolisi di questo substrato mediante il gene *Listeria* porta alla produzione di colonie blu/blu-verdi. La PIPLC è un enzima rilevato solo in specie patogene di *Listeria*, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. Il terreno di AL contiene fosfatidilinositolo che, una volta scisso, produce un alone opaco attorno alle colonie di batteri di entrambe le specie. Nelle specie *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* questo alone compare rispettivamente dopo 24 e 48 hr di incubazione. La selettività del terreno è ottenuta dall'azione combinata del cloruro di litio, degli antibiotici e di un antimicotico. Questo terreno può essere utilizzato nel protocollo standard o in un alternativo protocollo breve convalidato.

Sezione 3 Formula teorica

Meat peptone	18 g
Tryptone	6 g
Estratto di lievito	10 g
Piruvato di sodio	2 g
Glucosio	2 g
Magnesio glicerofosfato anidro	1 g
Magnesio solfato anidro	0,5 g
Cloruro di sodio (NaCl)	5 g
Cloruro di litio (LiCl)	10 g
Na ₂ HPO ₄ anidro	2,5 g
Substrato cromogenico (5-bromo-4-cloro-3-indolo- β -D-glucopiranosio)	0,05 g
Acido nalidixico	0,02 g
Ceftazidime	0,02 g
Polimixina B solfato	76.700 UI
Amfotericina B	0,01 g
Fosfatidilinositolo	2 g
Agar	12 g
Acqua distillata	qsp 1.000 ml

pH finale a 25°C = 7,2 ± 0,2

Sezione 4

Durata e conservazione

- In forma disidratata: 15-25°C in una confezione accuratamente sigillata, in un luogo asciutto e buio
- Flacone di base agar e supplementi: 2-8°C in un luogo buio
- Supplemento ricostituito 1: 1 settimana a 2-8° C
- Preparato: 2-8°C in un luogo buio
- Piastra preparata da base disidratata: 2 settimane a 2-8°C in una confezione accuratamente sigillata, in un luogo asciutto e buio

Sezione 5

Materiali necessari ma non forniti

Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- 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:
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (numero catalogo 3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (numero catalogo 3578113)
 - Agar RAPID'*L.mono* (numero catalogo 3563694, piastre preparate, 90 mm x 20 piastre; 3563964, piastre preparate, 90 mm x 120 piastre; 3555294, kit pronto per l'uso (per 200 ml) che comprende flacone di base agar e supplementi; 3564293, in forma disidratata, 500 g; 3564294, supplemento 1, liofilizzato, 10 fiale; 3564746, supplemento 2, liquido, 10 fiale)
 - Agar PALCAM (ad esempio numero catalogo 3564754, in forma disidratata 500 g; 3564752, supplemento, 10 fiale)
 - Rhamnose test (numero catalogo 3553669, 1 ml x 28 fiale)
- Diluente per l'enumerazione:
 - Sale triptone (numero catalogo 3555754, 9 ml x 25 provette; 3555756, 900 ml x 6 flaconi; 3555796, 3 L x 4 sacche; 3564544, 500 g)

Sezione 6 Precauzioni, limitazioni d'uso e controllo qualità

- Acqua peptonata tamponata APT (ad esempio, BPW Plus, numero catalogo 3564684, in forma disidratata, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 flaconi; 3555790, 5 L x 2 sacche; 3555795, 3 L x 4 sacche; o BPW Standard, numero catalogo 12013259, in forma disidratata, 500 g; 12013258, in forma disidratata, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 sacche)
- Terreno di arricchimento: Half Fraser Broth (numero catalogo 3555797, 225 ml x 6 flaconi; 3555794, 3 L x 4 sacche; 3564604, in forma disidratata, 500 g; 3564616, supplemento, 10 fiale) o Half Fraser Standard Broth (catalogo #12018707, 5 L x 2 sacche; 12018706 in forma disidratata, 500 g; 12018705 in forma disidratata 5 kg)
- Anse per inoculazione e spatole
- Piastre di Petri sterili (90 mm)
- Pipette sterili
- Sacchi per pesata sterili con filtro

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
- Lasciare asciugare le piastre a 25–50°C conformemente alla norma ISO 7218 fino alla scomparsa delle goccioline dalla superficie del terreno. Evitare, tuttavia, un'essiccazione prolungata per non compromettere l'efficacia del terreno. Non asciugare le piastre in una cappa a flusso laminare
- Per le piastre pesantemente caricate con agar molto opaco, la lettura può essere facilitata confrontando l'opacità dell'agar con una piastra di AL non inoculata.
- Questo terreno può essere utilizzato nei protocolli standard (ad esempio, ISO o FDA BAM)
- Per performance ottimali del metodo è consigliato l'uso del brodo Half Fraser Bio-Rad

Limitazioni d'uso

- Tra i batteri Gram positivi che possiedono la β -D-glucosidasi ne esistono alcuni senza alone (ad esempio, *Enterococcus* spp.) e alcuni con alone (ad esempio, *Bacillus circulans*)
- Rari ceppi di *Enterococcus* possono, entro 48 ore dalla lettura, mostrare una lenta attività del fosfatidilinositolo e ramnosio fermentato come *Listeria monocytogenes*. Un test della catalasi, applicato direttamente a una colonia isolata di colore blu con un alone, consente la differenziazione fra *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* (positiva alla catalasi) da *Enterococcus* spp. (negativo alla catalasi). Più in generale, le caratteristiche atipiche dei ceppi di *Listeria* sono citati nella normativa NF EN ISO 11290-1 (Allegato D).
- Nell'ambito della VALIDAZIONE NF, non sono stati analizzati 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.

Sezione 7 Protocollo

Preparazione del terreno disidratato

1. Agitare sempre il flacone prima dell'uso.
2. Dissolvere 34,55 g di polvere in 470 ml di acqua distillata e miscelare fino ad ottenere una sospensione omogenea.
3. Riscaldare lentamente, agitando spesso, quindi portare a ebollizione.
4. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.
5. Raffreddare il terreno a 44–47°C.
6. Reidratare in condizioni asettiche il supplemento liofilizzato 1 con 5 ml di acqua distillata sterile. Agitare fino al completo scioglimento e aggiungere all'agar fuso.
7. Aggiungere in condizioni asettiche 1 flacone di supplemento 2. Con l'aggiunta del supplemento 2, la temperatura della base non deve superare i 50°C.
8. Miscelare accuratamente e versare nelle piastre di Petri. Unire le piastre (fino a 5) per consentire un lento processo di raffreddamento.
9. Un flacone di polvere da 500 g produce 7,2 L di terreno.

Preparazione del terreno in flacone

1. Raffreddare il contenuto del flacone AL Agar (237,5 ml) a bagnomaria bollente.
2. Raffreddare il flacone a 44–47°C a bagnomaria.
3. Reidratare in condizioni asettiche il supplemento liofilizzato 1 con 5 ml di acqua distillata sterile. Agitare fino al completo scioglimento.
4. Aggiungere in condizione asettiche 2,5 ml di supplemento reidratato 1 e 12,5 ml di supplemento 2.
5. Miscelare accuratamente. Evitare la formazione di schiuma.
6. Versare il terreno nelle piastre di Petri. Unire le piastre (fino a 5) per consentire un lento processo di raffreddamento.

Rilevazione del genere *L. monocytogenes* e *Listeria*

1. Diluire n g o n ml di campione in $9 \times n$ ml Half Fraser Broth. Omogeneizzare con un agitatore/omogeneizzatore.
2. Assicurarsi che il tampone ambientale sia immerso completamente nel brodo (almeno 9 ml).
3. Assicurarsi che la spugna ambientale, il panno o la garza siano completamente imbevuti nel brodo. Aggiungere il brodo in una quantità pari a 9 volte il peso dell'oggetto inumidito utilizzato per la pulizia.
4. Incubare a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18–28 hr.
5. Al termine della fase di arricchimento, il brodo può essere conservato a $2-8^\circ\text{C}$ per 72 hr.
6. Rimuovere 0,1 ml di campione con una pipetta sterile e posizionare le gocce sul bordo esterno di metà della superficie di agar.
7. Con una pipetta Pasteur sterile o un'ansa per inoculazione, distribuire il campione su metà della superficie di agar con un movimento alternativo.
8. 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.
9. Incubare a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 hr. Il tempo di incubazione può essere esteso a 48 ± 2 hr.
10. Le *L. monocytogenes* formano colonie blu/blu-verdi circondate da un alone.
11. Altre *Listeria* spp. formano colonie blu/blu-verdi che possono essere circondate o meno da un alone.
12. Al termine della fase di incubazione, le piastre possono essere conservate a $2-8^\circ\text{C}$ per 72 hr.
13. Se con il protocollo di rilevazione sono state individuate caratteristiche colonie di *L. monocytogenes*, non è necessario eseguire una conferma se il campione è stato già confermato come positivo nel protocollo di enumerazione.

Enumerazione di *L. monocytogenes*

1. Diluire n g o n ml di campione in $9 \times n$ ml di Half Fraser Broth o di BPW.
2. Distribuire 0,1 ml di campione o le sue diluizioni decimali su ciascuna piastra o trasferirne 1 ml su una piastra di Petri vuota e versare 15 ml di AL Agar fuso ($44-47^\circ\text{C}$).
3. Se è necessario stimare numeri ridotti, distribuire 1 ml di campione o le sue diluizioni decimali su tre piastre da 90 mm (~0,33 ml/piastra) o su una piastra da 140 mm.
4. Incubare le piastre capovolte a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ± 3 hr. Effettuando una prima lettura a 24 hr, è possibile rilevare più rapidamente campioni altamente contaminati. Il numero definitivo viene tuttavia raggiunto dopo 48 hr (± 3 h)
5. Leggere la piastra ed enumerare le colonie tipiche.
6. Le *L. monocytogenes* formano colonie blu/blu-verdi circondate da un alone.
7. Altre *Listeria* spp. formano colonie blu/blu-verdi che possono essere circondate o meno da un alone.

Sezione 8 Conferma dei risultati positivi

8. Al termine della fase di incubazione, le piastre possono essere conservate a 2–8°C per 72 hr.
9. Fare riferimento alla norma EN ISO 7218 per l'inoculazione, la conta delle colonie, il calcolo e l'espressione dei risultati.
10. Se con il protocollo di enumerazione sono state individuate caratteristiche colonie di *L. monocytogenes*, non è necessario eseguire una conferma se il campione è stato già confermato come positivo nel protocollo di rilevazione.

Sezione 8 Conferma dei risultati positivi

1. Nell'ambito del marchio VALIDAZIONE NF, tutti i risultati positivi devono essere confermati. Se seguendo il protocollo di enumerazione la prima colonia confermata genera un risultato negativo, è necessario continuare a eseguire il processo di conferma fino a cinque colonie. Confermare meno di cinque colonie comporta il rischio di sovrastima a causa della presenza di colonie tipiche che potrebbero non essere *L. monocytogenes*.
2. La conferma di *L. monocytogenes* deve essere eseguita in base a uno dei seguenti metodi:
 - a. Utilizzando i test convenzionali descritti nei metodi standard ISO (inclusa la fase di purificazione).
 - b. Mediante sonde nucleiche, come descritto nella norma ISO 7218 (ad esempio, l'iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, numero catalogo 3578124) utilizzando colonie isolate (con o senza fase di purificazione).
 - c. Utilizzando il Rhamnose test (numero catalogo 3553669)
 - d. Prelevando nuovamente ed eseguendo l'inoculazione spot di almeno una colonia isolata su una piastra di agar RAPID'*L.mono*. È possibile confermare fino a 12 colonie su una singola piastra di agar RAPID'*L.mono*.
 - e. Utilizzando qualsiasi altro metodo certificato VALIDAZIONE NF basato su un principio diverso rispetto a quello di AL Agar. Il protocollo validato del secondo metodo deve essere rispettato interamente. Tutte le fasi che precedono la fase di ricerca usata come punto di inizio per la conferma devono essere comuni a entrambi i metodi.
3. La conferma di *Listeria* spp. diversa da *L. monocytogenes* deve essere eseguita in base a uno dei seguenti metodi:
 - a. Utilizzando i test convenzionali descritti nei metodi standard ISO (inclusa la fase di purificazione).
 - b. Mediante sonde nucleiche come descritto nella norma ISO 7218 (ad esempio, l'iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, numero catalogo 3578113) utilizzando colonie isolate (con o senza fase di purificazione).
 - c. Prelevando nuovamente e strisciando almeno una colonia isolata su una piastra di agar PALCAM. È possibile confermare fino a 6 colonie su una singola piastra di agar PALCAM.
 - d. Utilizzando qualsiasi altro metodo certificato VALIDAZIONE NF basato su un principio diverso rispetto a quello di AL Agar. Il protocollo validato del secondo metodo deve essere

Sezione 9 Conferma di altri metodi


rispettato interamente. Tutte le fasi che precedono la fase di ricerca usata come punto di inizio per la conferma devono essere comuni a entrambi i metodi.

4. In caso di risultati discordanti (presunto positivo con AL Agar, negativo con metodo di conferma), il laboratorio deve seguire le fasi necessarie per garantire la validità del risultato ottenuto.

Sezione 9 Conferma di altri metodi

Non applicabile.

Sezione 10 Performance del test e validazioni

Certificazione	Ambito di applicazione	Protocollo di validazione	Protocollo di riferimento	Riferimento al certificato
VALIDAZIONE NF	Tutti i prodotti alimentari destinati al consumo umano e i campioni ambientali di produzione	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 EN ISO 11290-2	 BRD: 07/16-01/09 BRD: 07/17-01/09 METODI ANALITICI ALTERNATIVI PER IL SETTORE AGROALIMENTARE Certificato mediante certificazione AFNOR Periodo di validità: Fare riferimento al certificato disponibile sul sito web di AFNOR: http://nf- validation.afnor.org/en

Sezione 11 Riferimenti

ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017/ADM: 2024. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions - Amendment 1: Requirements and guidance on the use of larger test portion size for qualitative method

ISO 18593:2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

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.

Sezione 12 Cronologia delle revisioni

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 et al. (1997a). Esperienze su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari. 36, 1–3.

Ottaviani F et al. (1997b). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. June 16–18.

United States Department of Agriculture (2019). 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.

<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 10, 2020.

United States Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: *Listeria monocytogenes*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>, accessed August 10, 2020.

Vlaemyneck G et al. (2000): Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. J. Appl Microbiol 88: 430-441.

Sezione 12 Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero di documento	Modifica
Dicembre 2024	10000245369 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Modifica al numero di documento (versione precedente 10000135677 Ver B)- Aggiornamento delle Limitazioni d'uso per ceppi rari di <i>Enterococcus</i>- Aggiornamento della sezione Riferimento

Per ulteriori informazioni sulla nostra gamma completa di terreni cromogenici RAPID, visitare il sito 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
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

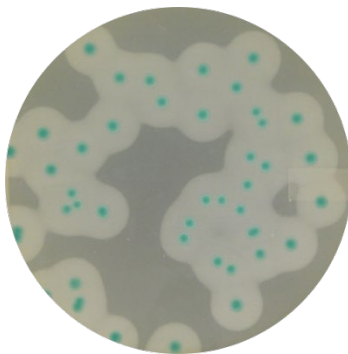
Website *bio-rad.com* **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **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 82 080 007 7373 **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

AL Agar

Guia do usuário

Meios cromogênicos para a detecção e enumeração de *Listeria monocytogenes* e outras espécies de *Listeria* em produtos alimentícios para consumo humano e animal e em amostras ambientais

- N° do catálogo 3563695, Meios de cultura preparados, 90 mm x 20 placas
- N° do catálogo 3563965, Meios de cultura preparados, 90 mm x 120 placas
- N° do catálogo 3555200, base de ágar engarrafado, 237,5 ml x 6 frascos
- N° do catálogo 3564043, Desidratado, 500 g
- N° do catálogo 3564041, Supplement 1, congelado a seco, 10 ampolas
- N° do catálogo 3564042, Supplement 2, líquido 25 ml, 10 ampolas



BIO-RAD

Índice

Seção 1	Introdução	1
Seção 2	Princípio AL Agar	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
Seção 7	Protocolo.....	4
	Preparação do Meio Desidratado	4
	Preparação de Meio Engarrafado	4
	Detecção dos Gêneros <i>L. monocytogenes</i> e <i>Listeria</i>	5
	Contagem de <i>L. monocytogenes</i>	5
Seção 8	Confirmação de Resultados Positivos.....	6
Seção 9	Confirmação de outros métodos	7
Seção 10	Desempenho e validação do teste	7
Seção 11	Referências.....	7
Seção 12	Histórico de Revisão.....	8

Seção 1 Introdução

Surtos graves de *Listeria monocytogenes* continuam a atormentar a indústria de segurança alimentar. A *Listeria* é perigosa porque pode sobreviver e crescer, ainda que lentamente, em temperaturas refrigeradas em alimentos processados prontos para o consumo. A *Listeria monocytogenes* é um patógeno particularmente problemático, pois pode causar sérios problemas de saúde e possível morte, particularmente em indivíduos imunossuprimidos, recém-nascidos e idosos. A infecção é conhecida por causar natimortos e abortos espontâneos em mulheres grávidas. A listeriose se desenvolve com sintomas como febre, fadiga, náuseas, vômitos e diarreia e tem uma taxa de mortalidade de 30%, que pode ser maior em indivíduos vulneráveis. Aproximadamente 90% de todos os casos notificados de listeriose resultam em hospitalização. Um método de cultura rápido é necessário para reduzir o tempo de obtenção dos resultados e garantir que esses resultados sejam precisos.

Seção 2 Princípio AL Agar

O princípio do meio AL (Agar *Listeria* de acordo com Ottaviani e Agosti) é baseado na detecção simultânea de duas atividades enzimáticas: β -D-glucosidase e fosfolipase C específica de fosfatidilinositol (PIPLC). A atividade da β -D-glucosidase, comum a todas as *Listeria*, é detectada usando um substrato cromogênico (X-glucosídeo). A hidrólise desse substrato pelo gênero *Listeria* leva à produção de colônias de cor azul a verde-azulada. A PIPLC é uma enzima detectada apenas em espécies patogênicas de *Listeria*, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. O meio AL contém fosfatidilinositol que, quando decomposto, produz um halo opaco ao redor das colônias de bactérias dessas duas espécies. Este halo geralmente aparece após 24 hr de incubação em *L. monocytogenes* e após 48 hr de incubação em *L. ivanovii*. A seletividade do meio é obtida pela ação combinada de cloreto de lítio, antibióticos e um antifúngico. Este meio pode ser usado em protocolo padronizado ou em um protocolo alternativo validado.

Seção 3 Fórmula Teórica

Peptona de carne	18 g
Triptona	6 g
Extrato de levedura	10 g
Piruvato de sódio	2 g
Glicose	2 g
Glicerofosfato de magnésio anidro	1 g
Sulfato de magnésio anidro	0,5 g
Cloreto de sódio (NaCl)	5 g
Cloreto de lítio (LiCl)	10 g
Na ₂ HPO ₄ anidro	2,5 g
Substrato cromogênico (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosídeo)	0,05 g
Ácido nalidíxico	0,02 g
Ceftazidima	0,02 g
Sulfato de polimixina B	76.700 UI
Anfotericina B	0,01 g
Fosfatidilinositol	2 g
Ágar	12 g
Água destilada	qsp 1.000 ml

pH Final a 25°C = 7,2 \pm 0,2

Seção 4

Prazo de validade e armazenamento

- Desidratado: 15–25°C em embalagem cuidadosamente vedada, em um ambiente seco e arejado
- Base de ágar engarrafado e suplementos: 2–8°C em local escuro
- Suplemento reconstituído 1: 1 semana a 2–8°C
- Pré-distribuído: 2–8°C em local escuro
- Meio de cultura preparado a partir da base do desidratado: 2 semanas 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
- Placa de aquecimento
- Escala, sensibilidade de 0,1 g
- Misturador/homogeneizador
- Incubadora ou sala de incubação controlada termostaticamente, com precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$
- Banho-maria

Suprimentos

- Confirmação:
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (nº do catálogo 3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (nº do catálogo 3578113)
 - RAPID'L.mono Agar (nº do catálogo 3563694, placas preparadas, 90 mm x 20 placas; 3563964, placas preparadas, 90 mm x 120 placas; 3555294, kit pronto para uso (para 200 ml) incluindo meio de ágar engarrafado e suplementos; 3564293, desidratado, 500 g; 3564294, Supplement 1, liofilizado, 10 ampolas; 3564746, Supplement 2, líquido, 10 ampolas)
 - Agar PALCAM (por exemplo, nº do catálogo 3564754, desidratado 500 g; 3564752, suplemento, 10 ampolas)
 - Teste de Rhamnose (nº do catálogo 3553669, 1 ml x 28 ampolas)
- Diluente para enumeração:
 - Sal de triptona (nº do catálogo 3555754, 9 ml x 25 tubos; 3555756, 900 ml x 6 frascos, 3555796, sacos de 3 x 4 L, 3564544, 500 g)

Seção 6 Precauções, limitações de uso e controle de qualidade

- Água Peptonada Tamponada (por exemplo, BPW Plus, nº do catálogo 3564684, desidratado, 500 g, 3554179, 225 ml x 6 frascos, 3555790, 5 L x 2 sacos, 3555795, 3 L x 4 sacos, ou BPW Standard, nº do catálogo 12013259, desidratado, 500 g, 12013258, desidratado, 5 kg, 12013260, 5 L x 2 sacos)
- Meio de enriquecimento: Meio Caldo Fraser (nº do catálogo 3555797, frascos de 225 ml x 6; 3555794, 3 L x 4 sacos; 3564604, desidratado 500 g; 3564616, suplemento, 10 ampolas) ou Caldo Half Fraser Standard (nº do catálogo 12018707 5 L x 2 sacos; 12018706 500 g desidratados; 12018705 5 kg desidratados)
- Inoculação de loops e espalhadores
- Placas de Petri estéreis (90 mm)
- 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
- Deixe secar as placas a 25–50°C de acordo com a norma ISO 7218 até que as gotículas desapareçam da superfície do meio. Entretanto, evite a secagem prolongada, de modo a não modificar a eficiência do meio. Não seque placas em uma tampa de fluxo laminar
- Para placas muito carregadas com ágar intensamente opaco, a leitura pode ser facilitada comparando a opacidade do ágar com uma placa AL não inoculada
- Este meio pode ser usado em protocolos padrão (por exemplo, ISO ou FDA BAM)
- Para melhor performance do método alternativo, o uso do caldo Half Fraser da Bio-Rad é recomendado

Limitações de uso

- Outras bactérias gram-positivas β -D-glucosidase positivas existem sem halos (por exemplo, *Enterococcus* spp.) e com halos (por exemplo, *Bacillus circulans*)
- Cepas raras de *Enterococcus* podem, dentro de 48 hr após a leitura, apresentar atividade lenta de fosfatidilinositol e fermentar ramnose como a *Listeria monocytogenes*. Um teste de catalase, aplicado diretamente a uma colônia azul isolada com um halo, permite a diferenciação entre *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* (catalase positiva) e *Enterococcus* spp. (catalase negativa). Em geral, as características atípicas das cepas de *Listeria* são citadas na norma NF EN ISO 11290-1 (Anexo D)
- Volumes de amostra acima de 25 g não foram testados como parte da NF VALIDATION

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.

Seção 7 Protocolo

Preparação do Meio Desidratado

1. Agite sempre a garrafa antes de usar.
2. Dissolva 34,55 g de pó em 470 ml de água destilada e misture até obter uma suspensão homogênea.
3. Aqueça delicadamente, agitando com frequência, e deixe ferver.
4. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min.
5. Resfrie o meio até 44–47°C.
6. Reidrate assepticamente o suplemento liofilizado 1 com 5 ml de água destilada estéril. Mexa até a completa dissolução e adicione ao ágar derretido.
7. Adicione assepticamente 1 ampola de Suplemento 2. A temperatura da base não deve exceder 50°C ao adicionar o suplemento 2.
8. Misture bem e despeje em placas de Petri. Empilhe as placas (até 5) para permitir um resfriamento lento.
9. Um frasco de 500 g de pó produz 7,2 L de meio.

Preparação de Meio Engarrafado

1. Em banho-maria fervente, derreta o conteúdo do frasco de AL Agar (237,5 ml).
2. Resfrie o frasco até 44–47°C em um banho-maria.
3. Reidrate assepticamente o suplemento liofilizado 1 com 5 ml de água destilada estéril. Mexa até a completa dissolução.
4. Adicione assepticamente 2,5 ml de suplemento reidratado 1 e 12,5 ml de suplemento 2.
5. Misture cuidadosamente. Evite espumar.
6. Despeje o meio em placas de Petri. Empilhe as placas (até 5) para permitir um resfriamento lento.

Detecção dos Gêneros *L. monocytogenes* e *Listeria*

1. Dilua n g ou n ml de amostra em $9 \times n$ ml de Meio Caldo Fraser. Uniformize com o misturador/homogeneizador.
2. Certifique-se de que o cotonete ambiental esteja completamente imerso no caldo (pelo menos 9 ml).
3. Certifique-se de que a esponja, pano ou gaze ambiental esteja completamente embebida no caldo. Adicione caldo a 9 vezes o peso do dispositivo de limpeza umedecido.
4. Incubar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18–28 hr.
5. Após o passo de enriquecimento, o caldo pode ser armazenado a uma temperatura entre $2\text{--}8^\circ\text{C}$ por 72 hr.
6. Usando uma pipeta estéril, remova 0,1 ml da amostra e coloque as gotas na borda externa da metade da superfície do ágar.
7. Usando uma pipeta Pasteur estéril ou um loop inoculante, espalhe a amostra pela metade da superfície de ágar em um movimento de vai-e-vem.
8. Na outra metade da superfície de ágar, estrie o depósito em faixas relativamente próximas sobre todo o prato a partir da borda da distribuição anterior.
9. Incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 hr. A incubação pode ser estendida para 48 ± 2 hr.
10. A *L. monocytogenes* forma colônias azuis/verde-azuladas com um halo.
11. Outras *Listeria* spp. formam colônias azul/verde-azulada com ou sem halo.
12. Após o passo de incubação, as placas podem ser armazenadas a $2\text{--}8^\circ\text{C}$ por 72 hr.
13. No caso de colônias características de *L. monocytogenes* ao usar o protocolo de detecção, não é necessário realizar uma confirmação se a amostra já foi confirmada como positiva no protocolo de enumeração.

Contagem de *L. monocytogenes*

1. Dilua n g ou n ml de amostra em $9 \times n$ ml de Meio Caldo Fraser ou BPW.
2. Espalhe 0,1 ml de amostra ou suas diluições decimais por placa ou transfira 1 ml para uma placa de Petri vazia e despeje 15 ml de AL Agar derretido ($44\text{--}47^\circ\text{C}$)
3. Se estimar números pequenos, espalhe 1 ml de amostra ou diluições decimais sobre três placas de 90 mm de diâmetro ($\sim 0,33$ ml/placa) ou sobre uma placa de 140 mm de diâmetro.
4. Deixe incubar as placas viradas ao contrário a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 hr. Uma primeira leitura em 24h permite uma detecção mais rápida de amostras altamente contaminadas. No entanto, a contagem do resultado é alcançada após 48 hr (± 3 hr)
5. Leia a placa e enumere as colônias típicas.
6. A *L. monocytogenes* forma colônias azuis/verde-azuladas com um halo.

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

7. Outras *Listeria* spp. formam colônias azul/verde-azulada com ou sem halo.
8. Após o passo de incubação, as placas podem ser armazenadas a 2–8°C por 72 hr.
9. Consulte a norma EN ISO 7218 para inoculação, contagem de colônias, cálculo e expressão de resultados.
10. No caso de colônias características de *L. monocytogenes* ao usar o protocolo de enumeração, não é necessário realizar uma confirmação se a amostra já foi confirmada como positiva no protocolo de detecção.

Seção 8 Confirmação de Resultados Positivos

1. No contexto do NF VALIDATION, todos os resultados positivos devem ser confirmados. Ao seguir o protocolo de enumeração, se a primeira colônia confirmada der um resultado negativo, as confirmações devem continuar em até cinco colônias. Confirmar menos de cinco colônias envolve o risco de fazer uma superestimativa devido à presença de colônias típicas que não são *L. monocytogenes*.
2. A confirmação de *L. monocytogenes* deve ser feita de uma das seguintes maneiras:
 - a. Usando os testes convencionais descritos nos métodos padrão ISO (incluindo a etapa de purificação).
 - b. Usando sondas nucleicas conforme descrito no padrão ISO 7218 (por exemplo, kit de detecção de PCR em tempo real iQ-Check *L. monocytogenes* II, nº do catálogo 3578124) usando colônias isoladas (com ou sem etapa de purificação).
 - c. Confirmado usando um teste de Rhamnose (nº do catálogo 3553669).
 - d. Recoleta e inoculação de pelo menos uma colônia isolada em uma placa de ágar RAPID'*L.mono*. Até 12 colônias podem ser confirmadas em uma única placa de RAPID'*L.mono*.
 - e. Usando qualquer outro método certificado por NF VALIDATION baseado em um princípio diferente daquele do AL Agar. O segundo protocolo de método validado deve ser completamente respeitado. Todas as etapas anteriores à etapa de detecção utilizada como ponto de partida para a confirmação devem ser comuns a ambos os métodos.
3. A confirmação de *Listeria* spp. diferente de *L. monocytogenes* deve ser feita de uma das seguintes maneiras:
 - a. Usando os testes convencionais descritos nos métodos padrão ISO (incluindo a etapa de purificação).
 - b. Usando sondas nucleicas conforme descrito no padrão ISO 7218 (por exemplo, iQ-Check *Listeria* spp. kit de detecção de PCR em tempo real, nº do catálogo 3578113) usando colônias isoladas (com ou sem etapa de purificação).
 - c. Recoletando e estriando pelo menos uma colônia isolada em uma placa de ágar PALCAM. Até 6 colônias podem ser confirmadas em uma única placa de ágar PALCAM.


Seção 9 Confirmação de outros métodos

4. Usando qualquer outro método certificado por NF VALIDATION baseado em um princípio diferente daquele do AL Agar. O segundo protocolo de método validado deve ser completamente respeitado. Todas as etapas anteriores à etapa de detecção utilizada como ponto de partida para a confirmação devem ser comuns a ambos os métodos. No caso de resultados discordantes (presumivelmente positivos com AL Agar, negativos com método de confirmação), o laboratório deve seguir as etapas necessárias para garantir a validade do resultado obtido.

Seção 9 Confirmação de outros métodos

Não se aplica.

Seção 10 Desempenho e validação do teste

Certificação	Escopo	Protocolo de Validação	Protocolo de Referência	Referência de Certificado
NF VALIDATION	Todas as amostras ambientais de produtos e produção para alimentação humana	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 EN ISO 11290-2	 BRD: 07/16-01/09 BRD: 07/17-01/09 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO Certificado pela certificação AFNOR Válido até: Consulte o certificado disponível no site da Certificação AFNOR: http://nf- validation.afnor.org/en

Seção 11 Referências

ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017/ADM: 2024. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1 : general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions - Amendment 1: Requirements and guidance on the use of larger test portion size for qualitative method

ISO 18593:2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and

Seção 12 Referências

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 et al. (1997a). Esperienze su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. *Industrie Alimentari*. 36, 1–3.

Ottaviani F et al. (1997b). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. June 16–18.

United States Department of Agriculture (2019). 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. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 10, 2020.

United States Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: *Listeria monocytogenes*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>, accessed August 10, 2020.

Vlaemyneck G et al. (2000): Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *J. Appl Microbiol* 88: 430-441.

Seção 12 Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Dezembro de 2024	10000245369 Ver A	- Modifica al numero di documento (versione precedente 10000135677 Ver B) - Aggiornamento delle Limitazioni d'uso per ceppi rari di <i>Enterococcus</i> - Aggiornamento della sezione Riferimento

Visite 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

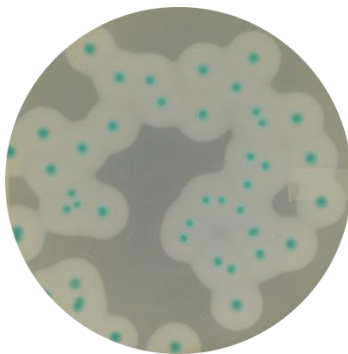
Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23
Brazil 4003 0399 **Canada** 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23
Finland 00 800 00 24 67 23 **France** 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 82 080 007 7373 **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

AL Agar

Manual del usuario

Medio cromogénico para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en productos alimentarios para consumo humano y animal, así como en muestras ambientales

Referencia #3563695, placas preparadas, placas de 90 mm x 20
Referencia #3563965, placas preparadas, placas de 90 mm x 120
Referencia #3555200, base de agar embotellada, 237,5 ml x 6 frascos
Referencia #3564043, deshidratado, 500 g
Referencia #3564041, Supplement 1, liofilizado, 10 viales
Referencia #3564042, Supplement 2, líquido 25 ml, 10 viales



BIO-RAD

Tabla de contenidos

Apartado 1	Introducción	1
Apartado 2	Principio de AL Agar	1
Apartado 3	Fórmula teórica	1
Apartado 4	Vida útil y almacenamiento	2
Apartado 5	Instrumentos necesarios, no suministrados	2
	Equipamiento	2
	Fungibles	2
Apartado 6	Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad	3
Apartado 7	Protocolo.....	4
	Preparación del medio deshidratado.....	4
	Preparación de medio embotellado.....	4
	Detección de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria Genus</i>	5
	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	5
Apartado 8	Confirmación de los resultados positivos	6
Apartado 9	Confirmación de otros métodos	7
Apartado 10	Aplicaciones del ensayo y validaciones	7
Apartado 11	Referencias.....	7
Apartado 12	Historial de revisiones	8

Apartado 1 Introducción

Graves brotes de *Listeria monocytogenes* siguen asolando la industria de la seguridad alimentaria. La *Listeria* es peligrosa por la manera en que puede sobrevivir y crecer, aunque sea lentamente, a temperaturas de refrigeración en alimentos procesados listos para el consumo. *Listeria monocytogenes* es un patógeno especialmente preocupante, ya que puede causar graves problemas de salud y potencialmente la muerte, sobre todo en personas inmunodeprimidas, recién nacidos y ancianos. Además, se sabe que la infección provoca muerte perinatal y abortos espontáneos en mujeres embarazadas. La listeriosis se manifiesta con síntomas como fiebre, fatiga, náuseas, vómitos y diarrea, y tiene una tasa de mortalidad del 30 %, que puede ser mayor en personas vulnerables. Cerca del 90 % de todos los casos notificados de listeriosis acaban en hospitalización. Es necesario disponer de un método de cultivo rápido para reducir el tiempo empleado en la obtención de resultados y asegurarse de que estos sean precisos.

Apartado 2 Principio de AL Agar

El procedimiento del medio AL (Agar *Listeria*, según Ottaviani y Agosti) se basa en la detección simultánea de dos actividades enzimáticas: la β -D-glucosidasa y la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PIPLC). La actividad β -D-glucosidasa, común a todas las *Listeria*, se detecta empleando un sustrato cromogénico (X-glucósido). La hidrólisis de este sustrato por el género *Listeria* produce colonias de color azul a azul verdoso. La PIPLC es una enzima detectada únicamente en las especies patógenas de *Listeria*, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. El medio AL contiene fosfatidilinositol, que al descomponerse produce un halo opaco alrededor de las colonias de bacterias de estas dos especies. Este halo suele aparecer tras 24 hr de incubación en *L. monocytogenes* y tras 48 hr de incubación en *L. ivanovii*. La selectividad del medio se obtiene por la acción combinada de cloruro de litio, antibióticos y un antifúngico. Este medio puede utilizarse en un protocolo estandarizado o en un protocolo corto alternativo validado.

Apartado 3 Fórmula teórica

Peptona de carne	18 g
Triptona	6 g
Extracto de levadura	10 g
Piruvato de sodio	2 g
Glucosa	2 g
Glicerofosfato de magnesio anhidro	1 g
Sulfato de magnesio anhidro	0,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Cloruro de litio (LiCl)	10 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	2,5 g
Sustrato cromogénico (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosido)	0,05 g
Ácido nalidíxico	0,02 g
Ceftazidima	0,02 g
Sulfato de polimixina B	76.700 UI
Anfotericina B	0,01 g
Fosfatidilinositol	2 g
Agar	12 g
Agua destilada	c.s.p. 1.000 ml

pH final a 25°C = 7,2 ± 0,2

Apartado 4

Vida útil y almacenamiento

- Deshidratado: 15–25 °C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro
- Base de agar embotellada y suplementos: 2 – 8 °C en un lugar oscuro
- Suplemento reconstituido 1: 1 semana a 2–8 °C
- Preparado: 2 – 8 °C en un lugar oscuro
- Placa preparada a partir de medio deshidratado: 2 semanas a 2–8 °C en un paquete cuidadosamente sellado, en un lugar seco y oscuro

Apartado 5

Instrumentos necesarios, no suministrados

Equipamiento

- Todo el instrumental habitual del laboratorio
- Placa calefactada
- Balanza, sensibilidad de 0,1 g
- Agitador/homogeneizador
- Incubador o sala de incubación controlada por termostato, con una precisión de $\pm 1^\circ \text{C}$
- Baño termostático

Fungibles

- Confirmación:
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (referencia #3578124), iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (referencia #3578113)
 - RAPID'*L.mono* Agar (referencia #3563694, placas preparadas, 90 mm x 20 placas; 3563964, placas preparadas, 90 mm x 120 placas; 3555294, kit listo para usar (para 200 ml) incluyendo medio de agar embotellado y suplementos; 3564293, deshidratado, 500 g; 3564294, Supplement 1, liofilizado, 10 viales; 3564746, Supplement 2, líquido, 10 viales)
 - PALCAM agar (por ejemplo referencia #3564754, deshidratado 500 g; 3564752, suplemento, 10 viales)
 - Rhamnose Test (referencia #3553669, 1 ml x 28 viales)
- 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)
 - Agua de Peptona Tamponada (por ejemplo, BPW Plus, referencia #3564684, deshidratado, 500 g; 3554179, 225 ml x 6 frascos; 3555790, 5 L x 2 bolsas; 3555795, 3 L x 4 bolsas; o BPW Standard, referencia #12013259, deshidratado, 500 g; 12013258, deshidratado, 5 kg; 12013260, 5 L x 2 bolsas)

Apartado 6 Precauciones, limitaciones de uso y control de calidad

- Caldo de enriquecimiento: caldo Half Fraser (referencia #3555797, 225 ml frascos x 6; 3555794, 3 L x 4 bolsas; 3564604, deshidratado, 500 g; 3564616, suplemento, 10 viales) o Half Fraser Standard Broth (n.º de referencia 12018707 5 L x 2 bolsas; 12018706 deshidratado 500 g; 12018705 deshidratado 5 kg)
- Asas de siembra y asas de Digralsky
- Placas de Petri estériles (90 mm)
- 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
- Antes de usar las placas, déjelas secar a 25–50 °C hasta que las microgotas desaparezcan de la superficie del medio, de conformidad con la norma ISO 7218. No obstante, se debe evitar un secado prolongado, para no modificar la eficiencia del medio. No secar las placas en una campana de flujo laminar.
- Para placas muy cargadas, con agar intensamente opaco, la lectura se puede facilitar comparando la opacidad del agar con una placa de AL sin inocular
- Este medio puede utilizarse en protocolos estandarizados (p. ej. ISO o FDA BAM)
- Para un desempeño óptimo del método alternativo, se recomienda la utilización del medio de cultivo Half Fraser de Bio-Rad

Limitaciones de uso

- Existen otras bacterias Gram-positivas y β -D-glucosidasa positivas que se desarrollan sin halos (por ejemplo, *Enterococcus* spp.) y con halos (p. ej., *Bacillus circulans*)
- Las cepas raras de *Enterococcus* pueden, a las 48 hr de la lectura, mostrar una actividad lenta del fosfatidilinositol y fermentar la ramnosa como la *Listeria monocytogenes*. Una prueba de catalasa, aplicada directamente a una colonia azul aislada con un halo, permite diferenciar entre *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii* (catalasa positiva) de *Enterococcus* spp. (catalasa negativa). De forma más general, las características atípicas de las cepas de *Listeria* se citan en la norma NF EN ISO 11290-1 (anexo D)
- No se han analizado volúmenes de muestra superiores a 25 g como parte de NF VALIDATION.

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 solo se comercializa si cumple los criterios de aceptabilidad. La documentación relativa a la producción y el control de calidad de cada lote se mantiene archivada.
- Para más información sobre la seguridad de los productos en las fichas de datos de seguridad y el certificado de análisis, visite www.bio-rad.com.

Apartado 7 Protocolo

Preparación del medio deshidratado

1. Agite siempre el frasco antes de usar.
2. Disuelva 34,55 g de polvo en 470 ml de agua destilada y mezcle hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Caliente suavemente, agitando frecuentemente, y luego lleve a ebullición.
4. Esterilice en autoclave a 121 °C durante 15 min.
5. Enfríe el medio a 44–47 °C.
6. Rehidrate asépticamente el Supplement 1 (liofilizado) con 5 ml de agua destilada estéril. Agite hasta que se disuelva completamente y añada al agar fundido.
7. Asépticamente, agregue 1 vial del Supplement 2. La temperatura del medio base no debe superar los 50 °C al añadir el suplemento 2.
8. Mezcle bien y vierta en las placas de Petri. Apile las placas (hasta 5) para permitir un enfriamiento lento.
9. Un frasco de 500 g de medio deshidratado permite obtener 7,2 L de medio.

Preparación de medio embotellado

1. En un baño de agua a temperatura de ebullición, funda el contenido del frasco de AL Agar (237,5 ml).
2. Enfríe el frasco a 44 – 47 °C en un baño de agua.
3. Rehidrate asépticamente el Supplement 1 (lío-filizado) con 5 ml de agua destilada estéril. Agite hasta que se disuelva completamente.
4. Añada asépticamente 2,5 ml de Supplement 1 rehidratado y 12,5 ml de Supplement 2.
5. Mezcle bien. Evite la formación de espuma.
6. Vierta el medio en placas de Petri. Apile las placas (hasta 5) para permitir un enfriamiento lento.

Detección de *L. monocytogenes* y *Listeria* Genus

1. Diluya n g o n ml de muestra en $9 \times n$ ml de caldo Half Fraser. Homogeneice con agitador/homogeneizador.
2. Asegúrese de que el hisopo ambiental esté completamente sumergido en el caldo (al menos 9 ml).
3. Asegúrese de que la esponja ambiental, el paño o la gasa estén completamente empapados de caldo. Añada caldo en una proporción de 9 veces el peso del tejido humedecido.
4. Incube la placa a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18–28 hr.
5. Después de la etapa de enriquecimiento, el caldo se puede conservar a $2-8^\circ\text{C}$ durante 72 hr.
6. Usando una pipeta estéril, recoja 0,1 ml de muestra y dispense gotas en el borde exterior de la mitad de la superficie del agar.
7. 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.
8. En la otra mitad de la superficie de agar, aisle esparciendo el depósito en estrías relativamente cercanas sobre toda la placa desde el borde del esparcido anterior.
9. Incube la placa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 hr. La incubación puede prolongarse hasta 48 ± 2 hr.
10. *L. monocytogenes* forma colonias de color azul/verde azulado con halo.
11. Otras *Listeria* spp. forman colonias de color azul/verde azulado con o sin halo.
12. Tras la etapa de incubación, las placas pueden almacenarse a $2-8^\circ\text{C}$ durante 72 hr.
13. En caso de obtener colonias características de *L. monocytogenes*, al utilizar el protocolo de detección no es necesario realizar una confirmación si la muestra ya ha sido confirmada como positiva en el protocolo de recuento.

Recuento de *L. monocytogenes*

1. Diluya n g o n ml de muestra en $9 \times n$ ml de caldo Half Fraser o APT.
2. Esparza 0,1 ml de muestra o de sus diluciones decimales por placa o transfiera 1 ml a una placa de Petri vacía y vierta 15 ml de AL agar fundido ($44 - 47^\circ\text{C}$)
3. Para la estimación de bajas concentraciones, esparza 1 ml de muestra o de diluciones decimales en tres placas de 90 mm de diámetro ($\sim 0,33$ ml/placa) o en una placa de 140 mm de diámetro.
4. Incube las placas invertidas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 hr. Una primera lectura a las 24 hr permite una detección más rápida de aquellas muestras que estén muy contaminadas. Sin embargo, el recuento del resultado final se alcanza después de 48 h (± 3 h)
5. Lea la placa y haga un recuento de colonias típicas.
6. *L. monocytogenes* forma colonias de color azul/verde azulado con halo.
7. Otras *Listeria* spp. forman colonias de color azul/verde azulado con o sin halo.

Apartado 8 Confirmación de los resultados positivos

8. Tras la etapa de incubación, las placas pueden almacenarse a 2-8 °C durante 72 hr.
9. Consulte en la norma EN ISO 7218 la inoculación, el recuento de colonias, el cálculo y la expresión de los resultados.
10. En caso de colonias características de *L. monocytogenes*, al utilizar el protocolo de recuento no es necesario realizar una confirmación si la muestra ya ha sido confirmada como positiva en el protocolo de detección.

Apartado 8 Confirmación de los resultados positivos

1. Según NF VALIDATION, todas las muestras identificadas como positivas deben confirmarse. Al seguir el protocolo de recuento, si la primera colonia confirmada arroja un resultado negativo, las confirmaciones deben continuar hasta cinco colonias. La confirmación de menos de cinco colonias implica el riesgo de realizar una sobreestimación debido a la presencia de colonias típicas que no correspondan a *L. monocytogenes*.
2. La confirmación de *L. monocytogenes* tiene que hacerse aplicando uno de los siguientes métodos:
 - a. Empleando las pruebas convencionales descritas en los métodos normalizados ISO (incluida la fase de purificación).
 - b. Utilizando sondas nucleicas como se describe en la norma ISO 7218 (por ejemplo, iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit, referencia #3578124) sobre colonias aisladas (con o sin fase de purificación).
 - c. Usando el Rhamnose Test (referencia #3553669).
 - d. Subcultivando por técnica de spot al menos una colonia aislada en una placa de agar RAPID'*L.mono*. Se pueden confirmar hasta 12 colonias en una única placa de RAPID'*L.mono*.
 - e. Usando cualquier otro método certificado NF VALIDATION basado en un principio diferente al de AL Agar. El protocolo validado de este segundo método debe ser seguido en su totalidad. Todos los pasos que preceden al paso de detección utilizado como punto de partida para la confirmación deben ser comunes para ambos métodos.
3. La confirmación de *Listeria* spp. que no sean *L. monocytogenes* tiene que hacerse aplicando uno de los siguientes métodos:
 - a. Empleando las pruebas convencionales descritas en los métodos normalizados ISO (incluida la fase de purificación).
 - b. Utilizando sondas nucleicas como se describe en la norma ISO 7218 (por ejemplo, iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit, referencia #3578113) sobre colonias aisladas (con o sin fase de purificación).
 - c. Re-sembrando al menos una colonia aislada en una placa de agar PALCAM. Se pueden confirmar hasta 6 colonias en una única placa de agar PALCAM.
 - d. Usando cualquier otro método certificado NF VALIDATION basado en un principio diferente al de AL Agar. El protocolo validado de este segundo método debe ser seguido en su

Apartado 9 Confirmación de otros métodos


totalidad. Todos los pasos que preceden al paso de detección utilizado como punto de partida para la confirmación deben ser comunes para ambos métodos.

4. En caso de producirse resultados discordantes (supuestos positivos con AL Agar, negativos con el método de confirmación), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.

Apartado 9 Confirmación de otros métodos

No aplicable.

Apartado 10 Aplicaciones del ensayo y validaciones

Certificación	Alcance	Protocolo de validación	Protocolo de referencia	Referencia de certificado
NF VALIDATION	Todos los productos alimentarios humanos y muestras ambientales de producción	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 EN ISO 11290-2	 BRD: 07/16-01/09 BRD: 07/17-01/09 MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA Certificado mediante certificación AFNOR Válido hasta: consulte el certificado disponible en el sitio web de AFNOR Certification: http://nf- validation.afnor.org/en

Apartado 11 Referencias

ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017/ADM: 2024. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1 : general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions - Amendment 1: Requirements and guidance on the use of larger test portion size for qualitative method

ISO 18593:2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

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.

Apartado 12 Historial de revisiones

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 et al. (1997a). Esperienze su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari. 36, 1–3.

Ottaviani F et al. (1997b). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. June 16–18.

United States Department of Agriculture (2019). 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.

<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 10, 2020.

United States Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: *Listeria monocytogenes*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>, accessed August 10, 2020.

Vlaemyneck G et al. (2000): Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. J. Appl Microbiol 88: 430-441.

Apartado 12 Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Diciembre 2024	10000245369 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Cambio en el número de documento (versión anterior 10000135677 Ver B)- Actualización de las limitaciones de uso para cepas raras de <i>Enterococcus</i>- Actualizar sección de Referencias

Visite www.bio-rad.com/rapidmedia para más información sobre nuestra gama completa de medios cromógenos 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 aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Life Science
Group*

Website 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 82 080 007 7373 **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

AL Agar

用户指南

用于检测和计数供人类和动物食用的食品以及环境样品中的*单核细胞增生李斯特菌*和其他*李斯特菌属*的显色培养基

目录 #3563695, 即用型平板, 90 mm x 20 个培养皿

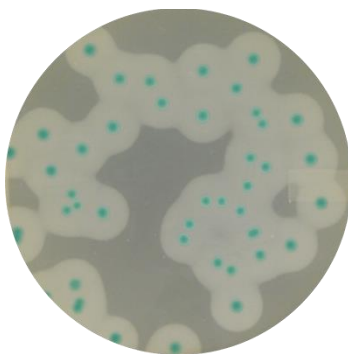
目录 #3563965, 即用型平板, 90 mm x 120 个培养皿

目录 #3555200, 瓶装培养基基质, 237.5 ml x 6瓶

目录 #3564043, 干粉, 500 g

目录 #3564041, 添加剂 1, 冻干, 10 小瓶

目录 #3564042, 添加剂 2, 液体 25 ml, 10 小瓶



BIO-RAD

目录

第 1 部分 简介	1
第 2 部分 AL 琼脂原理	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	3
第 6 部分 预防措施、使用限制和质量控制	3
第 7 部分 操作流程	4
干粉培养基的制备	4
瓶装培养基的准备	5
检测单核细胞增生李斯特菌和李斯特菌属	5
单核细胞增生李斯特菌计数	5
第 8 部分 阳性结果的确认	6
第 9 部分 其他方法的确认	7
第 10 部分 测试性能和验证	7
第 11 部分 参考资料	7
第 12 部分 修订记录	1

第 1 部分

简介

第 1 部分

简介

*单核细胞增生李斯特菌*的严重爆发持续困扰着食品安全行业。*李斯特菌*的危险性在于，它可以在冷藏温度下，在即食加工食品中存活和生长，但生长缓慢。*单核细胞增生李斯特菌*是一种极易造成问题的病原菌，因为它可能导致严重的健康问题甚至死亡，特别是在免疫抑制的个体、新生儿和老年人中。众所周知，感染会导致孕妇死胎和流产。*李斯特菌*病发病时出现发烧、疲倦、恶心、呕吐和腹泻等症状，死亡率为 30%，易感人群的死亡率可能更高。在所有报告的*李斯特菌*病例中，约 90% 患者需要住院治疗。为缩短得出结果的时间并确保这些结果的准确性，有必要采用快速培养方法。

第 2 部分

AL 琼脂原理

AL 培养基（根据 Ottaviani 和 Agosti 的*李斯特菌*琼脂）的原理是基于同时检测两种酶的活性： β -D-葡萄糖苷酶和磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C (PIPLC)。所有*李斯特菌*共有的 β -D-葡萄糖苷酶活性是用一种显色底物（X-葡萄糖苷）检测的。*李斯特菌*属对这种底物的水解导致产生蓝色至蓝绿色的菌落。PIPLC 是一种仅在致病性*李斯特菌*、*单核细胞增生李斯特菌*和*伊万诺维李斯特菌*中检测到的酶。AL 培养基含有磷脂酰肌醇，当它被分解时，会在这两个菌属的菌落周围产生不透明的光晕。这种光晕一般在*单核细胞增生李斯特菌*培养 24 小时后出现，在*伊万诺维李斯特菌*培养 48 小时后出现。培养基的选择性是通过氯化锂、抗生素和一种抗真菌的联合作用实现的。这种培养基可用于标准化的操作流程，也可用于另一种经过验证的简要操作流程。

第 3 部分

理论配方

肉蛋白胨	18 g
胰蛋白胨	6 g
酵母抽提物	10 g
丙酮酸钠	2 g
葡萄糖	2 g
无水甘油磷酸镁	1 g
无水硫酸镁	0.5 g
氯化钠 (NaCl)	5 g
氯化锂 (LiCl)	10 g
无水 Na ₂ HPO ₄	2.5 g
显色底物	

第 4 部分

保质期及储存条件

(5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷)	0.05 g
萘啶酸	0.02 g
头孢他啶	0.02 g
多粘菌素 B 硫酸盐	76,700 UI
两性霉素 B	0.01 g
磷脂酰肌醇	2 g
琼脂	12 g
蒸馏水	qsp 1,000 ml

25°C 时的最终 pH 值 = 7.2 ± 0.2

第 4 部分

保质期及储存条件

- 干粉：在 15–25°C 下妥善密封包装，置于干燥避光处
- 瓶装培养基基质和添加剂：2–8°C 避光处
- 复苏添加剂 1：2–8°C 下 1 周
- 预先浇注：2–8°C 避光处
- 由干粉基料制备的平板：在 2–8°C 下妥善密封包装，干燥避光处储存 2 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
- 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

第 6 部分

预防措施、使用限制和质量控制

试剂和耗材

- 确认：
 - iQ-Check *Listeria monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit (目录 #3578124)、iQ-Check *Listeria* spp. Real-Time PCR Detection Kit (目录 #3578113)
 - RAPID'*L.mono* Agar (目录 #3563694)，即用型平板，90 mm x 20 个培养皿；3563964，即用型平板，90 mm x 120 个培养皿；3555294，即用型试剂盒（用于 200 ml），包括瓶装琼脂培养基和添加剂；3564293，干粉，500 g；3564294，添加剂 1，冻干，10 小瓶；3564746，添加剂 2，液体，10 小瓶
 - PALCAM 培养基（例如，目录 #3564754，干粉 500 g；3564752，添加剂，10 小瓶）
 - Rhamnose Test (鼠李糖试验, 目录 #3553669，1 ml x 28 小瓶)
- 计数稀释剂：
 - 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）
 - Tryptone Salt, (缓冲蛋白胍水, 例如，BPW Plus，目录 #3564684，干粉，500 g；3554179，225 ml x 6 瓶；3555790，5 L x 2 袋；3555795，3 L x 4 袋；或 BPW 标准版，目录 #12013259，干粉，500 g；12013258，干粉，5 kg；12013260，5 L x 2 袋)
- 培养基：Half Fraser Broth (半弗雷泽肉汤, 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) 或半弗雷泽肉汤（目录 #12018707，5 L x 2 袋；12018706，干粉 500 g；12018705，干粉 5 kg）
- 接种环和涂布器
- 无菌培养皿 (90 mm)
- 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
- 根据 ISO 标准 7218，让平板在 25–50°C 下烘干，直到液滴从培养基表面消失。但是，避免长时间烘干，以免改变培养基的效用。请勿在层流安全柜中烘干平板
- 对于具有高度不透明琼脂的培养皿，可以通过比较平板与未接种的 AL 培养皿的不透明度来方便读数

第 7 部分

操作流程

- 这种培养基可用于标准操作流程（例如 ISO 或 FDA BAM）。
- 为获得替代方法的最佳性能，推荐使用 Bio-Rad公司的 Half Fraser肉汤

使用限制

- 其他革兰氏阳性 β -D-葡萄糖苷酶阳性细菌存在时没有光晕（例如*肠球菌属*）和有光晕（例如*环状芽孢杆菌*）
- 罕见*肠球菌*菌株在读数后 48 小时内，可表现出缓慢的磷脂酰肌醇活性，并像*单核细胞增生单增李斯特菌*一样发酵鼠李糖。过氧化氢酶试验可以直接应用于带有光晕的蓝色菌落，用于将*单核细胞增生单增李斯特菌*和*伊氏李斯特菌*（过氧化氢酶阳性）与*肠球菌属*（过氧化氢酶阴性）相区分。标准 NF EN ISO 11290-1（附录 D）对*李斯特菌*菌株的非典型特性进行了更为概括性的引述。
- 超过 25 g 的样品量尚未作为 NF 验证的一部分进行测试

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。与每批次的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。

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 34.55 g 粉末溶解在 470 ml 蒸馏水中，并进行搅拌，直到得到均匀的悬浮液。
3. 缓慢加热，不断搅拌，然后煮沸。
4. 121°C 高压灭菌 15 分钟。
5. 冷却培养基至 44-47°C。
6. 用 5 ml 无菌蒸馏水在无菌条件下再水化冻干添加剂 1。搅拌至完全溶解，并加入到融化的培养基中。
7. 在无菌条件下添加 1 瓶添加剂 2。添加添加剂 2 时，基质的温度不应超过 50°C。
8. 搅拌均匀，倒入培养皿中。将培养皿叠在一起（最多 5 个），以便慢慢冷却。
9. 一瓶 500 g 粉末可制成 7.2 L 培养基。

第 7 部分

操作流程

瓶装培养基的准备

1. 在沸水浴中，融化 AL 琼脂瓶 (237.5 ml) 中的内容物。
2. 在水浴中将琼脂瓶冷却到 44-47°C。
3. 用 5 ml 无菌蒸馏水在无菌条件下再水化冻干添加剂 1。搅拌直到完全溶解。
4. 在无菌条件下加入 2.5 ml 再水化添加剂 1 和 12.5 ml 添加剂 2。
5. 充分搅拌。避免起泡。
6. 将培养基倒入培养皿中。将培养皿叠在一起（最多 5 个），以便慢慢冷却。

检测单核细胞增生李斯特菌和李斯特菌属

1. 在 9 x n ml 半弗雷泽肉汤中稀释 ng 或 n ml 样品。用搅拌器/均质器进行均质处理。
2. 确保采样棉签完全浸泡在肉汤中（至少 9 ml）。
3. 确保采样海绵、布或纱布垫完全浸泡在肉汤中。按湿润的擦拭装置重量的 9 倍加入肉汤。
4. 在 30±1°C 环境下培养 18-28 小时。
5. 增菌步骤后，增菌液可在 2-8°C 下储存 72 小时。
6. 用无菌移液管取出 0.1 ml 的样品，滴在一半培养基表面的外缘。
7. 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。
8. 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。
9. 在 37±1°C 下培养 24±2 小时。培养时间可延长至 48±2 小时。
10. 单核细胞增生李斯特菌形成带有光晕的蓝色/蓝绿色菌落。
11. 其他李斯特菌属形成有或无光晕的蓝色/蓝绿色菌落。
12. 培养结束后，平板可以在 2-8°C 下储存 72 小时。
13. 当在使用检测方案时出现特征性单核细胞增生李斯特菌菌落，如果样品在计数方案中已被确认为阳性，则不必再进行确认。

单核细胞增生李斯特菌计数

1. 在 9 x n ml 半弗雷泽肉汤或 BPW 中稀释 ng 或 n ml 样品。
2. 将 0.1 ml 样品或其十分之一稀释液涂抹在每块平板上，或将 1 ml 转移到一个空的培养皿中，倒入 15 ml 融化的 (44-47°C) AL 琼脂。
3. 如果估计数量较少，请将 1 ml 样品或其十分之一稀释液涂抹在三个直径为 90 mm 的平板上（~0.33 ml/板）或一个直径为 140 mm 的平板上。
4. 将翻转的培养皿在 37±1°C 下培养 48±3 小时。在 24 小时内的第一次读数可以更快速检测出严重污染

第 8 部分

阳性结果的确认

的样品。然而，最终结果计数在 48 小时（±3 小时）后达到

5. 读取平板并对典型菌落进行计数。
6. *单核细胞增生李斯特菌*形成带有光晕的蓝色/蓝绿色菌落。
7. 其他 *李斯特菌属*形成有或无光晕的蓝色/蓝绿色菌落。
8. 培养结束后，平板可以在 2–8°C 下储存 72 小时。
9. 关于接种、菌落计数、计算和结果表达，请参考 EN ISO 7218 标准。
10. 当在使用计数方案时出现特征性 *单核细胞增生李斯特菌*菌落，如果样品在检测方案中已被确认为阳性，则不必再进行确认。

第 8 部分

阳性结果的确认

1. 在 NF 验证的背景下，所有的阳性结果都必须得到确认。在遵循计数方案时，如果第一个确认的菌落为阴性结果，则应继续确认多达五个菌落。确认少于 5 个菌落时，由于存在非 *单核细胞增生李斯特菌*的典型菌落，有可能出现高估的情况。
2. 必须通过以下方式之一确认 *单核细胞增生李斯特菌*：
 - a. 使用 ISO 标准方法中描述的常规测试（包括纯化步骤）。
 - b. 使用 ISO 7218 标准中描述的核酸探针（例如 iQ-Check *L. monocytogenes* II Real-Time PCR Detection Kit，目录 #3578124）、使用分离的菌落（有或无纯化步骤）。
 - c. 采用鼠李糖试验（目录 #3553669）进行确认。
 - d. 在 RAPID'*L.mono* 平板上重新挑取和点选至少一个分离的菌落。一个 RAPID'*L.mono* 平板上最多可以确认 12 个菌落。
 - e. 使用任何其他与 AL 培养基不同原理的 NF 验证认证的方法。必须完全遵循第二种方法的验证方案。用作确认起点的检测步骤之前的所有步骤必须对两种方法通用。
3. 必须通过以下方式之一确认除 *单核细胞增生李斯特菌*以外的 *李斯特菌属*：
 - a. 使用 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. Real-Time PCR Detection Kit，目录 #3578113）、使用分离的菌落（有或无纯化步骤）。
 - c. 在 PALCAM 平板上重新选取和划线至少一个分离的菌落。一个 PALCAM 平板上最多可以确认 6 个菌落。
 - d. 使用任何其他与 AL 培养基不同原理的 NF 验证认证的方法。必须完全遵循第二种方法的验证方案。用作确认起点的检测步骤之前的所有步骤必须对两种方法通用。
4. 如果出现不一致的结果（用 AL 培养基法推定为阳性，用确认法推定为阴性），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

第 9 部分
其他方法的确认

不适用。

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
NF 验证	所有人类食品及生产环境样品	EN ISO 16140-2	EN ISO 11290-1 EN ISO 11290-2	 BRD : 07/16-01/09 BRD : 07/17-01/09 农业企业的替代分析方法 通过 AFNOR 认证 有效期至: 请参考 AFNOR 认证网站上提供的证书: http://nf-validation.afnor.org/en

第 11 部分
参考资料

ISO 7218:2024. Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations

ISO 6887-1:2017/ADM: 2024. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1 : general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions - Amendment 1: Requirements and guidance on the use of larger test portion size for qualitative method

ISO 18593:2018. Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling

第 12 部分

修订记录

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 et al. (1997a). Esperienze su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari. 36, 1–3.

Ottaviani F et al. (1997b). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. June 16–18.

United States Department of Agriculture (2019). 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.
<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/mlg-8.pdf?MOD=AJPERES>, accessed August 10, 2020.

United States Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10: *Listeria monocytogenes*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>, accessed August 10, 2020.

Vlaemynck G et al. (2000): Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. J. Appl Microbiol 88: 430-441.

第 12 部分

修订记录

发布日期	文件编号	变更
2024 年 12 月	10000245369 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- 文件编号变更（先前版本 10000135677 版本 B）- 更新了罕见肠球菌菌株的使用限制- 更新了参考部分

请访问 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
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website 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 82 080 007 7373 **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
