Base de Agar Cromogénico para Listeria de Acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA) ISO

Cat. 1345

Medio selectivo para la detección y enumeración de Listeria monocytogenes

Información práctica

Aplicaciones	Categorias
Recuento selectivo	Listeria
Detección	Listeria

Industria: Clínica / Alimentación

Regulaciones: ISO 11133 / ISO 11290 / BAM



Principios y usos

La Base de Agar Cromogénico para Listeria de Acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA) es un medio selectivo para el presunto aislamiento e identificación de Listeria monocytogenes y Listeria spp. en alimentos y muestras clínicas. Se usa para confirmación después de usar Base de Caldo para Listeria Fraser (Cat. 1120). Este medio también es recomendado por ISO 11290 para la detección y enumeración de Listeria monocytogenes.

El digerido enzimático de tejido animal y digerido enzimático de caseína proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es la fuente de vitaminas, particularmente del grupo B. El cloruro de sodio suministra electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico. El piruvato de sodio es una fuente de energía para el metabolismo bacteriano y ayuda en la resucitación de organismos estresados. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable que proporciona carbono y energía. El glicerofosfato de magnesio es un compuesto tamponante. El sulfato de magnesio es un ion magnesio requerido en una gran variación de reacciones enzimáticas, incluida la replicación del ADN. La actividad diferencial del medio se debe a dos factores. El cloruro de litio en el medio base y los compuestos antimicrobianos complementarios ceftazidima, polimixina, ácido nalidíxico y cicloheximida proporcionan la selectividad del medio. El agar bacteriológico es el agente solidificante.

La presencia del componente cromogénico X-glucósido, un sustrato para la detección de la enzima ß-glucosidasa, es común a todas las especies de Listeria dando a las colonias su color azul. Otros organismos que poseen esta enzima, por ejemplo enterococos, son inhibidos por los agentes selectivos dentro del medio y por el suplemento selectivo. La actividad diferencial también se obtiene mediante el sustrato de lipasa C, sobre el cual actúa la enzima específica para L. monocytogenes. La lipasa es responsable del halo blanco opaco que rodea a L. monocytogenes.

La combinación de ambos sustratos nos permite diferenciar las colonias de Listeria monocytogenes del resto de Listeria spp. ya que, aunque todos son de color azul, los L. monocytogenes presentan un halo blanco opaco que los rodea.

Se ha observado que algunas cepas de Listeria ivanovii, principalmente patógenas para los animales, aunque algunas han causado infecciones en humanos, también poseen actividad de lipasa.

Fórmula en g/L

Digerido enzimático de caseína	6	Glucosa	2
Agar bacteriológico	13,5	Sulfato magnésico	0,5
Cloruro sódico	5	Hidrogenofosfato de sodio	2,5
Piruvato sódico	2	Extracto de levadura	10
Digerido enzimático de tejido animal	18	Cloruro de litio	10
Glicerofosfato magnésico	1	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-ß-D-glucopiranósido	0,05

Preparación

Suspender 35,275 gramos del medio en 470 ml de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto

DOMINGUEZ HUTSCHER SAS

hasta que se disuelva por completo. Esterilizar en autoclave a 121 ºC durante 15 minutos. Para preparar más cantidad de 500 ml, se recomienda esterilizar a 115 ºC durante 10 minutos. Enfriar a 47-50 ºC y añadir asépticamente un frasco de Suplemento Listeria Lipasa C (24 ml) y un vial de Suplemento Selectivo Cromogénico de Listeria (Cat. 6040). Homogenizar suavemente y dispensar en placas de Petri.

Instrucciones de uso

Detección y enumeración de Listeria monocytogenes y Listeria spp. según la ISO 11290:

Método detección:
- Pesar 25 g (o 25 ml) de la muestra y agregar 225 ml de Caldo 1/2 Fraser (Cat. 1183). Homogeneizar e incubar a 30 °C durante 25±1 horas.
- Inocular 0,1 ml de cultivo del Caldo 1/2 Fraser incubado (independientemente de su color) en 10 ml de Caldo Fraser (Cat. 1182). Incubar a 37 ºC durante 24±2 horas en condiciones aeróbicas.
- Del cultivo de enriquecimiento primario se inocula la superficie de Agar Listeria según Ottaviani y Agosti y el otro medio selectivo a elección del laboratorio, para obtener colonias bien separadas.
- A partir del cultivo de enriquecimiento secundario, repita el procedimiento, inocular la superficie del Agar Listeria de acuerdo con Ottaviani y Agosti y el otro medio selectivo. Incubar el Agar Listeria según Ottaviani y Agosti durante un total de 48±2 h.
- Seleccionar las colonias presuntivas y llevar a cabo las pruebas de confirmación para L. monocytogenes o Listeria spp.

Método de enumeración:
- Preparar la suspensión inicial 1:10 de muestra a analizar y Agua Peptonada Tamponada. El Caldo Listeria 1/2 Fraser se puede utilizar como diluyente si se lleva a cabo el método de detección y enumeración simultáneamente.
- Inocular 0,1 ml sobre la superficie de Agar Cromogénico Listeria de acuerdo a Ottaviani y Agosti.
- Incubar a 37 ºC durante 24±2 h. En caso de no detectar crecimiento incubar 24 horas más.
- Seleccionar las colonias presuntivas y llevar a cabo las pruebas de confirmación para L. monocytogenes o Listeria spp.
- A partir de las colonias confirmados calcular el número L. monocytogenes o Listeria spp.

Control de calidad

Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25ºC)
Sin restos	Polvo fino	Beige	Ámbar ligeramente opalescente	7,2 ± 0,2

Test microbiológico

De acuerdo a ISO 11133:
Condiciones de incubación: Productividad, Selectividad y Especificidad (37±1 ºC / 48±4 h).
Condiciones de inoculación: Productividad cualitativa (10^3 - 10^4 CFU) / Selectividad (10^4 - 10^6 CFU) / Especificidad (10^3 - 10^4 CFU).
Medio referencia: TSA

Microrganismos	Especificación	Reacción característica
Listeria monocytogenes 4b ATCC 13932	Buen crecimiento (2) >50%	Colonias azul verdosas con halo opaco
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Inhibición total (0)	
Listeria innocua ATCC 33090		Colonias azul verdosas sin halo opaco
Listeria monocytogenes 1/2a ATCC 35152	Buen crecimiento (2) >50%	Colonias azul verdosas con halo opaco
Escherichia coli ATCC 8739	Inhibición total (0)	

Almacenamiento

Temp. Min.:2 ºC
Temp. Max.:25 ºC

Bibliografía

Ottaviani, F., Ottaviani, M. and Agosti, M (1987) Quimper Froid Symposium Proceedings, P6 A.D.R.I.A Quimper (F) 16-18 June.
ISO 11290 Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS