

ALOA®

Только для микробиологического контроля

Селективная питательная среда для *Listeria monocytogenes* и *Listeria spp*

AES 10/5-09/06

Метод ALOA® COUNT (Подсчет)
АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ
АГРОПРОМЫШЛЕННОГО АНАЛИЗА
 Сертификат AFNOR
 www.afnor-validation.org

Для всех продуктов питания, предназначенных для потребления человеком.
 Дата окончания срока действия сертификации NF VALIDATION указана в сертификате.



AES 10/3-09/00

ALOA® ONE DAY (обнаружение)
АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ
АГРОПРОМЫШЛЕННОГО АНАЛИЗА
 Сертификат AFNOR
 www.afnor-validation.org

Для всех продуктов питания, предназначенных для потребления человеком и образцов окружающей среды.
 Дата окончания срока действия сертификации NF VALIDATION указана в сертификате.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

ALOA® является селективной питательной средой, используемой для обнаружения микроорганизмов *Listeria monocytogenes* и *Listeria spp.* в продуктах питания и образцах окружающей среды. Она позволяет также определить количество *L. monocytogenes* в продуктах питания (методами, сертифицированными посредством валидации согласно Национальному формуляру: ALOA® ONE DAY и ALOA® COUNT – см. приложенные протоколы). Данная питательная среда используется также для обнаружения и определения количества *L. monocytogenes* в продуктах питания и кормах для животных в рамках стандартных протоколов ISO 11290 (1,2,3,4,5).

ПРИНЦИП

На этой питательной среде микроорганизмы *Listeria* растут в виде сине-зеленых колоний правильной круглой формы (обнаружение бета-глюкозидазы с использованием специфического хромогенного субстрата). *Listeria monocytogenes* образуют также непрозрачный ореол, что позволяет четко их дифференцировать от других видов *Listeria*. Этот ореол является результатом деятельности фосфолипазы, вовлеченной в цикл инфицирования патогенными микроорганизмами *Listeria*. Селективность обеспечивается комбинацией хлорида лития, противомикробных и противогрибковых компонентов в питательной среде.

СОСТАВ НАБОРА**Готовая к использованию среда**

AEB520080 : Упаковка из 20 чашек 90 мм
AEB520079 : Упаковка из 120 чашек 90 мм
AEB120082 : Упаковка из 10 чашек 140 мм

ALOA*

AEB620088 Kit ALOA® Count
 5 x AEB620088B 200 мл флакон
 5 x AEB620088SS⁽ⁱ⁾ (Леофилизата, реконструировать)
 5 x AEB620088ES (8 мл)

(*) : НАПЕЧАТАНО НА КАЖДОМ КОНТЕЙНЕРЕ

Сухая питательная среда (Свяжитесь с нами)

AEB150072⁽ⁱⁱ⁾ 500 г флакон
AEB150073⁽ⁱⁱ⁾ 5 кг флакон
AEB684420 6 количество достаточное для подготовки 500 мл
 6 x AEB684420SS⁽ⁱ⁾ (Леофилизата, реконструировать)
 6 x AEB684420ES (20 мл)
AEB484204 4 количество достаточное для подготовки 4л
 4 x AEB484204SS⁽ⁱ⁾ (Леофилизата, реконструировать)
 4 x AEB484204ES (160 мл)

СОСТАВ**Расчетная формула.**

Состав данной среды можно изменить и/или дополнить в соответствии с требуемыми рабочими характеристиками:

Ферментативный перевар животное ткани	18,00 г
Казеиновый ферментативный перевар	6,00 г
Дрожжевой экстракт	10,00 г
Пируват натрия	2,00 г
Глюкоза	2,00 г
Магния глицерофосфат	1,00 г
Магния сульфат	0,50 г
Хлорид натрия	5,00 г
Хлорид лития	10,00 г
Динатрия гидрофосфат безводный	2,50 г
X-глюкозид	0,05 г
Агар	13,50 г
Дистиллированная вода	1000 мл
Налидиксовая кислота ^(a)	0,02 г
Цефтазидим ^(a)	0,02 г
Полимиксин В ^(a)	76700 Ед
Амфотерицин В ^(b)	0,01 г
Фосфатидилинозитол ^(b)	2,00 г

pH 7,2

(a) Реагенты селективной добавки ALOA® (AEB620088SS / AEB684420SS / AEB484204SS)

(b) Реагент обогащающей добавки ALOA® (AEB620088ES / AEB684420ES / AEB484204ES).

(i) Реагент, содержащий субстанцию в высокой концентрации считается опасным: Налидиксовую кислоту (<8%); цефтазидим: (<8%) ; полимиксин В сульфат <4,5% ; Амфотерицин (<4%) .

СИГНАЛЬНОЕ СЛОВО: ОПАСНО



H334 / H317

P261 / P280 / P302+P352 / P333+P313 / P342+P311

Обозначение опасности:

H334 : При вдыхании может вызвать аллергическую реакцию (астму или затрудненное дыхание).

H317 : При контакте с кожей может вызывать аллергическую реакцию.

Меры предосторожности:

P261 : Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/ тумана/паров/аэрозолей.

P280 : Использовать перчатки и средства для защиты глаз/лица... (тип указывается изготовителем).

P302+P352 : ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промыть большим количеством воды с мылом.

P333+P313 : При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.

P342+P311 : При появлении респираторных симптомов: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу-специалисту/терапевту.

Дополнительную информацию см. в паспорте безопасности материала (MSDS).

(ii) Реагент, содержащий субстанцию в высокой концентрации считается опасным: Хлорид лития (<15%).

СИГНАЛЬНОЕ СЛОВО: **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**



H315 / H319

P280/ P305+P351+P338 / P337+P313 / P302+P352

Обозначение опасности:

H315 : При попадании на кожу вызывает раздражение.

H319 : При попадании в глаза вызывает выраженное раздражение.

Меры предосторожности:

P280 : Использовать перчатки и средства для защиты глаз/лица... (тип указывается изготовителем).

P305+P351+P338 : ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.

P337+P313 : Если раздражение глаз продолжается: обратиться к врачу.

P302+P352 : Если раздражение глаз продолжается: обратиться к врачу.

Дополнительную информацию см. в паспорте безопасности материала (MSDS).

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В НАБОР

Материалы :

- Бактериологический инкубатор
- Стерильные или обеззараженные чашки Петри
- Водяная баня (кипящая)
- Терморегулируемая водяная баня

Реактивы :

- Бульон Фразера половинной концентрации (например : флаконы Ref.: 42048 и 42615 ; пакеты Ref.: 42627; минипакеты Ref.: 42727)
- Бульон Фразера (Ref: 42073 или 414956)
- Забуференная пептонная вода (например: флаконы Ref. 42043)

Для подтверждения *Listeria monocytogenes* :

- ALOA® Confirmation (Ref. AEB120100)
- RAPIDEC® Lmono (Ref. 03700)
- API Listeria (Ref. 10300)
- Fast Rhamnose (Ref. 415078)
- AccuProbe *Listeria monocytogenes* (Ref. 39500)
- VIDAS® LMO2 (Ref. 30704)
- Tryptone sel (Ref. например: AEB111499)

Для подтверждения *Listeria spp* :

- VNI бульон (Ref. AEB110101)
- *Listeria species* Confirmation Strips (Свяжитесь с нами)

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАКТИВЫ

- Агар PALCAM (Ref. AEB522050 / AEB522049)
- Агар OXFORD (Ref. AEB522000)
- Агар TSYE (Ref. AEB522865)
- Кровяной агар (Ref. AEB120650)

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- **Только для микробиологического контроля.**
- **Только для профессионального использования.**
- Набор содержит продукты животного происхождения. Сертификат о происхождении и/или санитарном состоянии животных полностью не гарантирует отсутствия возбудителей трансмиссивных заболеваний. По этой причине рекомендуется считать эти продукты потенциально инфекционными и при обращении с ними соблюдать обычные меры предосторожности и технику безопасности (не принимать внутрь и не вдыхать).
- Все образцы, культуры микроорганизмов и инокулированные чашки следует считать инфекционными и требуют обращения с ними должным

образом. На протяжении всей процедуры исследования необходимо соблюдать правила асептики и обычные меры предосторожности при обращении с исследуемой группой бактерий. См. «CLSI® M29-A, Защита персонала лаборатории от инфицирования в процессе работы», утвержденное руководство — действующая версия. Дополнительную информацию о мерах предосторожности при обращении см. в документе «Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях — Центр контроля и профилактики заболеваний (CDC)/Национальные институты здравоохранения (NIH) — последнее издание» или действующих нормативах в стране использования.

- Не следует использовать питательную среду как производственный материал или источник компонентов.
- Не используйте реактивы после истечения срока их годности.
- Не используйте реактивы, если упаковка повреждена.
- Не используйте контаминированные чашки или чашки, содержащие конденсат.
- Не используйте флаконы\пробирки, в которых отмечаются признаки роста микрофлоры.
- Не используйте сухие среды, если они не однородные (содержат комки).
- При вскрытии флакона убедитесь в целостности пробки.
- При работе следуйте инструкции. Любые изменения описанной процедуры могут привести к искажению результатов.

ХРАНИЕНИЕ

- Храните чашки/наборы/добавки в предназначенном для них контейнере при температуре 2-8°C до истечения срока годности.
- Храните флаконы с сухими средами при температуре 1-30°C до истечения срока годности. Берегите от сырости.
- Беречь от света
- ALOA® чашки, приготовленные из сухой среды и добавок должны храниться при температуре 2- 8°C в запечатанном пакете или упакованные в пленку. Срок годности таких чашек 2 недели.
- ALOA® чашки, приготовленные из набора, должны храниться при температуре 2°C - 8°C в закрытом контейнере или запечатанной упаковке. При этих условиях чашки могут хранить до 1 недели.

ОБРАЗЦЫ

Следуйте рекомендациям действующих стандартов при выполнении отбора и предварительной подготовки образцов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ

Из ALOA® Count набора:

1. Доводят флакон с основой ALOA® (AEB620088B) до жидкого состояния на кипящей водяной бане (100°C). **НЕ ПЕРЕГРЕВАТЬ.** Охлаждают питательную среду до 44-47°C.
2. Обогательную добавку ALOA® (AEB620088ES) нагревают до 44–47°C.
3. Содержимое селективной добавки ALOA® (AEB620088SS) растворяют в 2 мл 50%-ного раствора этанола (в стерильной очищенной воде).
4. К 200 мл агаровой основы ALOA® добавляют хорошо гомогенизированные добавки (обогательную и селективную). Хорошо перемешивают. Питательная среда должна быть гомогенной, слегка опалесцирующей. Готовую питательную среду можно использовать для приготовления заранее залитых чашек или для определения количества микроорганизмов методом глубинного посева в соответствии с методом ALOA® COUNT.

Из сухой среды :

- Суспендируйте 70,6 г порошка в 1 литре очищенной или переработанной воды равноценного качества .
 - Необходима непрерывная гомогенизация для однородной дисперсии порошка.
 - Доведите pH до $7,2 \pm 0,2$ при 25°C .
 - Стерилизуйте 15 минут при 121°C .
 - Охладите до $48-50^{\circ}\text{C}$.
 - Добавьте необходимые количества регенерированной селективной добавки (SS) и готовой к использованию обогащающей добавки (ES), предварительно нагретой до $44-47^{\circ}\text{C}$.
- (ii) АЕВ684420 (SS): Добавьте 5 мл смеси стерильной очищенной воды-этанола (1:1).
- (iii) АЕВ484204 (SS): добавьте 40 мл смеси стерильной очищенной воды-этанола (1:1)
- Разлейте среду ALOA® из расчета **18 мл ± 1 мл** в чашки диаметром 90 мм или 60 ± 3 мл в чашки диаметром 140 мм.
 - После застывания агара поместите чашки вверх дном на плоскую поверхность.
 - Храните подготовленные чашки в холодильнике ($2-8^{\circ}\text{C}$) вверх дном.

ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**Обнаружение и определение количества *Listeria monocytogenes* стандартными методами :**

См. стандарты EN ISO 11290-1 или -2, поправку 1 (2004)(5).

Обнаружение *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* альтернативными методами сертифицированными посредством валидации согласно НФ: см. страницы 3 - 6 и приложения I и II.

СЕРТИФИЦИРОВАННЫЙ ПОСРЕДСТВОМ ВАЛИДАЦИИ СОГЛАСНО НФ МЕТОД ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ *Listeria monocytogenes* И *Listeria spp* : ALOA® One Day**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

Из образца, обогащенного в течение 24 часов ± 2 часа при температуре $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ в бульоне ФРАЗЕР половинной концентрации, 0,1 мл распределяют или изолируют на поверхности чашек ALOA® диаметром 90 мм (см. приложение I «ALOA® ONE DAY: утвержденный протокол валидации согласно НФ»). Инкубируют при $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ и снимают показания с чашек по прошествии от 24 до 48 часов. Результат получают через 24 часа инкубации, однако можно продлить срок снятия показаний до 48 часов (например, из-за организационных особенностей работы лаборатории).

В контексте валидации согласно НФ, после инкубации обогатительные бульоны ФРАЗЕР половинной концентрации перед проведением посева на агар ALOA® можно поместить в условия $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ на срок до 72 часов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

✓ **Обнаружение *Listeria monocytogenes* :**
***Listeria monocytogenes*: колонии синего или сине-зеленого цвета, правильной круглой формы, с непрозрачным ореолом, диаметром 1-2 мм.**

Штаммы *Listeria monocytogenes* разрастаются как типичные колонии в течение 24 часов.

В рамках сертификации посредством валидации согласно НФ все положительные результаты должны быть подтверждены одним из следующих методов:

1 – Согласно классическим тестам, описанным в методах, стандартизованных ISO или CEN, для характерных колоний, выделенных на чашках ALOA®. Изолированные колонии необходимо подвергнуть предварительной очистке. Методы подтверждения, используемые в рамках

стандартных методов, приведены в последней версии стандарта EN ISO 7218 (6).

2а - Метод ALOA® Confirmation (см. инструкцию по применению ALOA® Confirmation).

2б - Тест RAPIDEC® L mono (см. рекомендации по RAPIDEC® L mono, приведенные в инструкции по применению).

2в – Стрипы API® Listeria (см. API® Listeria инструкцию по применению).

2а-2б-2в : Прямую идентификацию предположительных колоний можно провести, когда они хорошо изолированы и имеют характерный для *Listeria monocytogenes* внешний вид. Если типичные колонии изолированы недостаточно хорошо, то перед проведением идентификационных тестов выполняют очистку путем пересева на новом агаре ALOA®, кровяном агаре или триптон-соевом агаре (TCA). Необходимо подтвердить, что предметом идентификационных тестов на выбранной питательной среде для субкультивирования являются характерные колонии, образующиеся на ALOA®.

2г – Тест AccuProbe *Listeria monocytogenes* характерных колоний, изолированных или не изолированных на ALOA®.

2д – Тест VIDAS LMO2 характерных колоний, изолированных или не изолированных на ALOA®.

Подготовьте суспензию из колонии, взятой бактериологической петлей в 2 мл пептонной воды. Перенесите 0.5 мл подготовленной суспензии в лунку для образца стрипа VIDAS® LMO2 и начните тест VIDAS®. Положительный результат подтверждает присутствие *L. monocytogenes*.

2е –Тест Fast Rhamnose (см. fast Rhamnose инструкцию по применению)

3- Любым другим методом, сертифицированным посредством валидации согласно НФ, принцип которого отличается от метода ALOA® ONE DAY.

Необходимо следовать всей процедуре этого второго утвержденного метода. Если этот метод имеет общие стадии с методом ALOA® ONE DAY, процедуру следует начинать с последней общей для обоих методов стадии (например, бульон Фразера половинной концентрации).

При наличии положительного результата, полученного посредством метода ALOA® ONE DAY, нет необходимости проводить новые подтверждающие тесты, если в образце уже установлено наличие *Listeria monocytogenes* на стадии определения количества методом ALOA® Count.

✓ Обнаружение *Listeria spp* :

***Listeria spp*: колонии синего или сине-зеленого цвета, правильной круглой формы, диаметром 1-2 мм, с непрозрачным ореолом или без него.**

В рамках сертификации посредством валидации согласно НФ все положительные результаты должны быть подтверждены одним из следующих методов:

1 - Согласно классическим тестам, описанным в методах, стандартизованных ISO или CEN, для характерных колоний, выделенных на чашках ALOA®. Изолированные колонии необходимо подвергнуть предварительной очистке. Методы подтверждения, используемые в рамках стандартных методов, приведены в последней версии стандарта EN ISO 7218 (6).

2 – ALOA® One Day *Listeria* spp – специфическая подтверждающая процедура наличия *Listeria* spp:

Вариант 1: Протокол 5 часов – при помощи иммунохроматографического теста *Listeria* species Confirmation Strip из хорошо изолированной характерной колонии на ALOA® (см. инструкцию по применению стрипов для подтверждения наличия *Listeria* –*Listeria* species Confirmation Strip).

Вариант 2: Протокол 24 часа – посредством нанесения в виде точки (или пятна) на агаре Palcam из хорошо изолированной характерной колонии на ALOA® и инкубации при 37°C ± 1°C в течение 24 часов ± 2 часа. Возможность нанесения до 12 точек/пятен на каждую чашку Palcam. После 24 часов инкубации появляются колонии *Listeria* spp зеленоватого цвета (серый блеск), окруженные черным ореолом.

3 – Любым другим методом, сертифицированным посредством валидации согласно НФ, принцип которого отличается от метода ALOA® ONE DAY. Необходимо следовать всей процедуре этого второго утвержденного метода. Если этот метод имеет общие стадии с методом ALOA® ONE DAY, процедуру следует начинать с последней общей для обоих методов стадии (например, бульон ФРАЗЕР половинной концентрации).

При наличии положительного результата, полученного посредством метода ALOA® ONE DAY, нет необходимости проводить новые подтверждающие тесты, если в образце уже установлено наличие *Listeria* spp. на стадии определения количества методом ALOA® Count.

СЕРТИФИЦИРОВАННЫЙ ПОСРЕДСТВОМ ВАЛИДАЦИИ СОГЛАСНО НФ МЕТОД ДЛЯ ПОДСЧЕТА *Listeria monocytogenes* И *Listeria* spp : ALOA® Count

ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

В рамках метода ALOA® COUNT первичный раствор можно приготовить следующим образом:

- в бульоне ФРАЗЕР половинной концентрации с селективными реагентами без инкубации;

- или в бульоне ФРАЗЕР половинной концентрации без селективных реагентов с инкубацией в течение 1 часа ± 5 минут при температуре 20°C ± 2°C;

- или в забуференной пептонной воде (BPW) с инкубацией или без нее в течение 1 часа ± 5 минут при 20°C ± 2°C.

0,1 мл первичного разбавленного раствора и(или), при необходимости, его десятикратные разведения наносят на поверхность чашки ALOA® диаметром 90 мм, либо 1 мл при использовании метода глубинного посева (см. приложение II «ALOA COUNT®: утвержденный протокол валидации согласно НФ»). Для протокола определения количества с использованием распределения по поверхности и в случае оценки небольших количеств можно наносить 1 мл инокулята на поверхность чашки Петри диаметром 140 мм или разделить это количество по трем чашкам Петри диаметром 90 мм.

Инкубацию проводят при температуре 37°C ± 1°C. Окончательный результат определения количества получают спустя 48 ± 3 часа. Первый подсчет можно провести после 24 часов инкубации, чтобы как можно быстрее обнаружить образцы с высоким уровнем загрязнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

✓ **Определение количества *Listeria monocytogenes*:**

***Listeria monocytogenes*: колонии синего или сине-зеленого цвета, правильной круглой формы, с непрозрачным ореолом, диаметром 1-2 мм.**

В рамках сертификации посредством валидации согласно НФ все положительные результаты должны быть

подтверждены (от 1 до 5 колоний, если с первой колонией получен отрицательный результат, идентифицируйте остальные 4 колонии) одним из следующих методов:

1 – согласно классическим тестам, описанным в методах, стандартизованных ISO или CEN, из характерных колоний, изолированных на чашках ALOA®. Выделенные колонии необходимо подвергнуть предварительной очистке.

Методы подтверждения, используемые в рамках стандартных методов, приведены в последней версии стандарта EN ISO 7218 (6).

2a - Метод ALOA® Confirmation (см. технический паспорт ALOA® Confirmation).

2б - Тест RAPIDEC® L mono (см. рекомендации по RAPIDEC® L mono, приведенные в инструкции по применению).

2в – Стрипы API® *Listeria* (см. API® *Listeria* инструкцию по применению).

2а-2б-2в : Прямую идентификацию предположительных колоний можно провести, когда они хорошо изолированы и имеют характерный для *Listeria monocytogenes* внешний вид. Если типичные колонии изолированы недостаточно хорошо, то перед проведением идентификационных тестов выполняют очистку путем пересева на новом агаре ALOA®, кровяном агаре или триптон-соевом агаре (ТСА). Необходимо подтвердить, что предметом идентификационных тестов на выбранной питательной среде для субкультивирования являются характерные колонии, образующиеся на ALOA®.

2г – Тест AccuProbe *Listeria monocytogenes* характерных колоний, изолированных или не изолированных на ALOA®.

2д – Тест VIDAS LMO2 характерных колоний, изолированных или не изолированных на ALOA®.

Подготовьте суспензию из колонии, взятой бактериологической петлей в 2 мл пептонной воды. Перенесите 0.5 мл подготовленной суспензии в лунку для образца стрипа VIDAS® LMO2 и начните тест VIDAS®. Положительный результат подтверждает присутствие *L. monocytogenes*.

2е –Тест Fast Rhamnose (см. fast Rhamnose инструкцию по применению)

Процесс вычисления и предоставления результатов описан в стандарте NF EN ISO 7218 (6).

При наличии положительного результата, полученного посредством метода подсчета ALOA® Count, нет необходимости проводить новые подтверждающие тесты, если в образце уже установлено наличие *Listeria monocytogenes* при детекции методом ALOA® ONE DAY.

Факт не выполнения подтверждения на 5 колониях может привести к риску переоценки в связи с наличием характерных признаков у колоний, не являющихся *Listeria monocytogenes*.

✓ **Определение количества *Listeria* spp:**

***Listeria monocytogenes*: колонии синего или сине-зеленого цвета, правильной круглой формы, с непрозрачным ореолом или без него, диаметром 1-2 мм.**

В рамках сертификации посредством валидации согласно НФ все положительные результаты должны быть подтверждены (от 1 до 5 колоний, если с первой колонией получен отрицательный результат, идентифицируйте остальные 4 колонии) одним из следующих методов:

1 - Согласно классическим тестам, описанным в методах, стандартизованных ISO или CEN, для характерных колоний, выделенных на чашках ALOA®. Изолированные колонии необходимо подвергнуть предварительной очистке. Методы подтверждения, используемые в рамках стандартных методов, приведены в последней версии стандарта NF EN ISO 7218 (6).

2 – ALOA® One Day *Listeria* spp – специфическая подтверждающая процедура наличия *Listeria* spp:

Вариант 1: Протокол 5 часов – при помощи иммунохроматографического теста *Listeria* species Confirmation Strip из хорошо изолированной характерной колонии на ALOA® (см. технический паспорт стрипа для подтверждения наличия *Listeria* –*Listeria* species Confirmation Strip).

Вариант 2: Протокол 24 часа – посредством нанесения в виде точки (или пятна) на агаре Palcam из хорошо изолированной характерной колонии на ALOA®, и инкубации при 37°C ± 1°C в течение 24 часов ± 2 часа. Возможность нанесения до 12 точек/пятен на каждую чашку Palcam. После 24 часов инкубации появляются колонии *Listeria* spp зеленоватого цвета (серый блеск), окруженные черным ореолом.

Процесс вычисления и предоставления результатов описан в стандарте NF EN ISO 7218 (6).

При наличии положительного результата, полученного посредством метода подсчета ALOA® Count, нет необходимости проводить новые подтверждающие тесты, если в образце уже установлено наличие *Listeria* spp. при детекции методом ALOA® ONE DAY.

Факт не выполнения подтверждения на 5 колониях может привести к риску переоценки в связи с наличием характерных признаков у колоний, не являющихся *Listeria* spp.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Соблюдайте требования надлежащей лабораторной практики, (например см. действующую версию стандарта NF EN ISO 7218(6)).
 - В случае получения несоответствующих результатов (положительные для альтернативного метода, но не подтвержденные выбранным методом валидации), лаборатория должна выполнить достаточный объем исследований для обеспечения надежности результатов.
- В рамках отметки о валидации согласно НФ для метода ALOA® ONE DAY проведено тестирование только образцов массой до 25 г.
- В рамках метода ALOA® ONE DAY для сильно загрязненных образцов рекомендуется делать посев на чашки ALOA® путем изоляции.
 - В рамках метода ALOA® COUNT первое считывание результатов можно проводить через 24 часа для более быстрого обнаружения сильно загрязненных образцов.
- В случае наличия большого количества колоний считывание результатов можно упростить путем сравнения помутнения агара в центре чашек и на их периферии (см. протокол) или путем сравнения с чашкой ALOA®, на которой посев не был выполнен
- Наличие *L.monocytogenes*, даже в большом количестве, характеризуется интенсивным помутнением питательной среды. Это позволяет легко отличить чашки с *L.monocytogenes* (мутная питательная среда) от чашек, на которых эти микроорганизмы отсутствуют (прозрачная питательная среда). В случае сомнений следует выполнить пересев на вторую чашку ALOA®.
 - После 24-часовой инкубации некоторые штаммы *Listeria ivanovii* могут дать очень слабый ореол. Спустя 48 часов инкубации штаммы *Listeria ivanovii* могут проявить такие же характеристики, что и *Listeria monocytogenes*. В этих двух случаях

подтверждающие тесты позволяют надежно различить два вида микроорганизмов.

- Чашки с ALOA® после инкубации можно поместить в холодильник на 48 часов. При таких низких температурах ореол и цвет колоний не изменятся. В рамках сертификации метода ALOA® COUNT посредством валидации согласно НФ чашки ALOA® после инкубации можно поместить в холодильник на 72 часа. Ореол и цвет колоний не изменится.
- Некоторые штаммы *Bacillus cereus* могут расти в виде плоских, шероховатых колоний с неровным контуром, неоднородного белого или голубого цвета, с широким интенсивным ореолом.
- Просмотр колоний раньше времени или слишком короткий период инкубации могут приводить к неподходящему использованию подтверждающих тестов таких как системы идентификации в стрипах.
- При использовании наборов ALOA® COUNT (основа + добавки) флакон с разжиженной основой без добавок можно охладить и довести до жидкого состояния вторично без изменения питательных и селективных свойств среды.
- Основу ALOA® с добавками можно хранить в разжиженном состоянии при температуре 44-47°C до 7 часов перед использованием.
- СЛЕДУЕТ ИЗБЕГАТЬ ПЕРЕГРЕВА ОСНОВЫ ALOA®.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ALOA® разработана и внедрена согласно строгим требованиям качества.

Результаты исследований, полученные при тестировании штаммов при контроле за бактериологической активностью, приведены в сертификате качества для каждой партии, доступном на нашем сайте (www.biomerieux.com).

УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Неиспользованные опасные реактивы должны быть утилизированы с соблюдением правил для опасных химических отходов.

Неиспользованные неопасные реагенты могут считаться неинфекционными и утилизироваться соответствующим образом.

Утилизируйте использованные реактивы, а также контаминированные материалы, в соответствии с требованиями, предъявляемыми для утилизации инфекционных материалов.

Сотрудники лаборатории несут ответственность за утилизацию отходов в соответствии с типом и классом опасности, согласно действующим нормам и положениям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. (1997) Differential agar Medium for *Listeria monocytogenes*. In "Quimper froid. Symposium proceedings" P6 A.D.R.I.A. Quimper (F) 16-18 June, 1997.
- Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. (1997) Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari
- Vlaemynck, G., Lafarge, V., Scotter, S. (2000) Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. Journal of Applied Microbiology, 88 : 430-441.
- Artault, S., Bind, J.L., Delaval, Y., Gaillard, N. Validation AFNOR de la méthode ALOA pour la détection de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires. Colloque Société Française de Microbiologie, 19-20 octobre 2000.
- NF EN ISO 11290 parts 1 and 2 – Amendment 1 (2004) : Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Amendment 1.
- NF EN ISO 7218 : Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.

ТАБЛИЦА СИМВОЛОВ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Символ	Обозначение
	Номер по каталогу
	Произведено
	Температурные ограничения
	Использовать до
	Номер партии
	Перед использованием прочтите инструкцию
	Содержимого достаточно для <n> тестов
	Беречь от света
	Сертификат контроля качества – Партия соответствует действующему протоколу контроля качества
	Беречь от влаги
	Дата изготовления

ИСТОРИЯ ПЕРЕСМОТРОВИзменение категорий типа

Н/П

Корректурa

Технические изменения

Административные изменения

Примечание:

Не применимо (первое издание)

Исправление ошибок в документации

Добавление, пересмотр и/или удаление касающейся продукта информации

Введение изменений нетехнического характера, заслуживающих внимания пользователя

Незначительные типографские, грамматические изменения и изменения в форматировании в историю пересмотров не включены.

Дата выпуска	Номер раздела	Тип изменений	Обзор изменений
2015/05	520080Z	Административные изменения	Создание таблицы история пересмотров.
		Технические изменения	Комплект Меры предосторожности Таблица символов и обозначений

BIOMERIEUX, голубой логотип, VIDAS, API и RAPIDEC являются используемыми, зарегистрированными и/или находящимися в процессе регистрации торговыми марками, принадлежащими компании bioMérieux, одной из дочерних или входящих в ее группу компаний.

ALOA торговая марка принадлежащая Biolife Italiana S.r.l.

CLSI является торговой маркой, принадлежащей Институту клинических лабораторных стандартов.

Другие названия и торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.



 **bioMérieux SA**
376 Chemin de l'Orme
69280 Marcy-l'Etoile - France

673 620 399 R.C.S LYON
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com

Обнаружение *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria spp* в продуктах питания и образцах окружающей среды

Метод ALOA® One Day

Д 0:

Обогащение

Во время сертификации метода ALOA® ONE DAY посредством валидации согласно НФ проводилось тестирование только образцов с массой до 25 г ($\pm 5\%$).



X г или X мл образца

+ 9 X мл бульона Фразер в

половинной концентрации

Инкубация 24 ± 2 часа при 30 ± 1 °C

Д + 1:

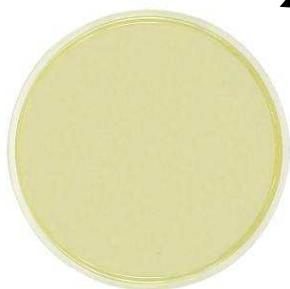
Инокуляция

Распределение или изоляция 0,1 мл на ALOA®
Инкубация 24 часа при 37 ± 1 °C
Инкубацию можно продлить до 48 часов

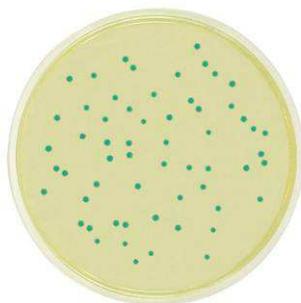
Рекомендация: Не засевайте чашки на периферии, чтобы при сливном росте непрозрачный ореол был лучше виден (контраст центра и периферии)

Д + 2:

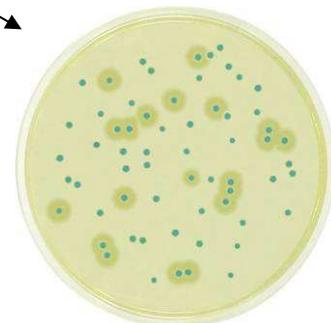
Результаты



Отсутствие типичных колоний *Listeria spp*
Отсутствие *Listeria spp*



Наличие типичных колоний *Listeria spp*, отличных от *L. monocytogenes*
Отсутствие типичных колоний *Listeria monocytogenes*
Предположительное* наличие *Listeria spp* (отличных от *L. monocytogenes*)
Отсутствие *Listeria monocytogenes*



Наличие типичных колоний *Listeria monocytogenes* и *Listeria spp* (отличных от *L. monocytogenes*)
Предположительное* наличие *Listeria monocytogenes* и *Listeria spp* (отличных от *L. monocytogenes*)



AES 10/3 – 09/00

METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE

Certified by AFNOR Certification

www.afnor-validation.org

Подтверждение

* В контексте валидации согласно НФ любой положительный результат, полученный альтернативным методом обнаружения патогенных микроорганизмов, должен быть подтвержден.

Подтверждение присутствия *Listeria monocytogenes* Метод ALOA® One Day

1 –КЛАССИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ
(Протокол EN ISO 11290)

5 изолированных предположительно положительных колоний субкультивируют на агаре TSYE

Инкубация в течение 18-24 часов при 37 ± 1°C

Подтверждение рода *Listeria* spp

- Каталаза: положительная реакция (каталаза +)
- Окрашивание по Граму: мелкие грамположительные бациллы
- Подвижность (при необходимости): подвижные бактерии
- Агар для определения подвижности или наблюдение при помощи микроскопа (в бульоне TSYE)

Подтверждение наличия вида *L.monocytogenes*

- Гемолиз: положительный гемолиз (гемолиз +) на агаре со свежей бараньей кровью
- Биохимическая идентификация: Рамноза +, Ксилроза –

- Camp test :

S. aureus + (например: ATCC® 25923™)

R. equi - (например: ATCC® 6939™)

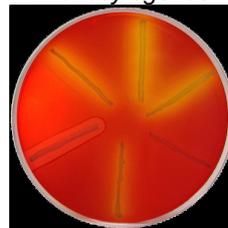
L.monocytogenes (например: ATCC® 13932™)

L.innocua (например: ATCC® 33090™)

L.ivanovii (например: ATCC® 19119™)

2a – ALOA® CONFIRMATION

Только для подтверждения наличия *Listeria monocytogenes*



Из 1 характерной колонии, изолированной на ALOA®, выполните пересев (единичный мазок) на питательную среду ALOA® CONFIRMATION

Инкубация: 24 ± 2 часа при 37 ± 1°C

- ✓ Бета-глюкозидаза +
- + Фосфолипаза +
- + Рамноза +
- = *Listeria monocytogenes*

2б – тест RAPIDEC® L.mono

2в – стрип API® Listeria

2г – тест AccuProbe L.mono

2д – тест VIDAS LMO2

2е – тест Fast Rhamnose

3 – ЛЮБОЙ ДРУГОЙ МЕТОД с сертификатом AFNOR

по принципу отличный от метода ALOA® One Day

Подтверждения присутствия видов *Listeria spp* Метод ALOA® One Day

1 – КЛАССИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ (Протокол EN ISO 11290)

5 изолированных
предположительно
положительных колоний
субкультивируют на
агаре TSYE

**Инкубация в течение 18–24
часов при 37 ± 1°C**

Подтверждение рода *Listeria spp*

- Каталаза: положительная реакция (каталаза +)
- Окрашивание по Граму: мелкие грамположительные бациллы
- Подвижность (при необходимости): подвижные бактерии
- Агар для определения подвижности или наблюдение при помощи микроскопа (в бульоне TSYE)

Дополнительная идентификация (не обязательна для родового подтверждения *Listeria spp*):

- Гемолиз на агаре с бараньей кровью
- Биохимическая идентификация

**3 – ЛЮБОЙ ДРУГОЙ МЕТОД с
сертификатом AFNOR,
по принципу отличный от
метода ALOA® ONE DAY**

2 – СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДТВЕРЖДЕНИЯ

ВАРИАНТ 1 :

ПРОТОКОЛ 5 ЧАСОВ

1 характерную колонию,
изолированную на ALOA®, высевают
на 1 мл бульона с **СЕРДЕЧНО-
МОЗГОВОЙ ВЫТЯЖКОЙ**
(AEB110101 – упаковка из 20
пробирок по 1 мл)

**Инкубация в течение 5 часов при
температуре 30 ± 1°C.**

**Можно продлить инкубацию до 24
часов**

Стрип ***Listeria species Confirmation***

Strip для подтверждения наличия
видов *Listeria* погружают прямо в
пробирку. Результат считывают
спустя 10-20 минут после контакта.



Отрицательный тест Положительный

1 линия = отсутствие *Listeria spp*

2 линия = наличие *Listeria spp*

ВАРИАНТ 2 :

ПРОТОКОЛ 24 ЧАСА

1 характерную колонию,
изолированную на ALOA®,
высевают точкой (или пятном) на
агар **PALCAM** (до 12 точек/пятен на
чашке диаметром 90 мм)

Инкубация: 24 часа при 37 ± 1°C

- ✓ Зеленоватые колонии
(серый блеск), окруженные
черным ореолом: эскулин +

= *Listeria spp*

BIOMERIEUX, голубой логотип, VIDAS, API и RAPIDEC являются используемыми, зарегистрированными и/или находящимися в процессе регистрации торговыми марками, принадлежащими компании bioMérieux, одной из дочерних или входящих в ее группу компаний. ALOA торговая марка принадлежащая Biolife Italiana S.r.l. CLSI является торговой маркой, принадлежащей Институту клинических лабораторных стандартов. Другие названия и торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.

Определение количества *Listeria monocytogenes* или *Listeria spp.* Метод ALOA® Count

Разбавление
X г или X мл образца
+ 9 X мл забуференной пептонной воды^{1,2}
или бульона Фразера половинной концентрации без селективных агентов (cf EN ISO 11290)²
или бульоном Фразера половинной концентрации с селективными агентами¹

Прямой посев¹ или после инкубации² в течение 1 часа ± 5 минут максимум при 20 ± 2°C
При необходимости можно осуществить последующие разбавления

МЕТОД РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПО ПОВЕРХНОСТИ

0,1 мл* распределяют на поверхности 1 просушенной чашки агара ALOA® диаметром 90 мм.
С целью повышения точности определения количества 1 мл* распределяют на поверхности просушенной чашки агара ALOA® диаметром 140 мм (Вариант: 1 мл* посевного материала распределяют по 3 чашкам диаметром 90 мм)

Инкубация в течение 48 ± 3 часа при температуре 37 ± 1°C.

МЕТОД ГЛУБИННОГО ПОСЕВА

Посев 1 мл* на стерильную чашку диаметром 90 мм и добавление приблизительно 15 мл агара ALOA®, охлажденного до 44-47°C.

Инкубация в течение 48 ± 3 часа при температуре 37 ± 1°C.

* : Первичный раствор инкубируют (или нет) и при необходимости выполняют ту же операцию с десятикратными разбавлениями.



AES 10/5 – 09/06

METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE

Certifié par AFNOR Certification

www.afnor-validation.org

Примечание: С целью более быстрого обнаружения сильно загрязненных образцов показания с чашек можно снимать уже через 24 часа. Однако окончательный результат получают при подсчете через 48 часов.

Подтверждение присутствия *Listeria monocytogenes* Метод ALOA® COUNT

1 – КЛАССИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ
(Протокол EN ISO 11290)

5 изолированных предположительно положительных колоний субкультивируют на агаре TSYE

Инкубация в течение 18–24 часов при 37 ± 1°C

Подтверждение рода *Listeria* spp

- Каталаза: положительная реакция (каталаза +)
- Окрашивание по Граму: мелкие грамположительные бациллы
- Подвижность (при необходимости): подвижные бактерии
- Агар для определения подвижности или наблюдение при помощи микроскопа (в бульоне TSYE)

Подтверждение наличия вида *L.monocytogenes*

- Гемолиз: положительный гемолиз (гемолиз +) на агаре со свежей бараньей кровью
- Биохимическая идентификация: Рамноза +, Ксилоза –

- Смп-тест:

S. aureus + (например: ATCC® 25923™)

R. equi - (например: ATCC® 6939™)

L.monocytogenes (например: ATCC® 13932™)

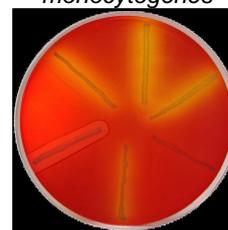
L.innocua (например: ATCC® 33090™)

L.ivanovii (например: ATCC® 19119™)

Процесс подсчета и представления результатов описан в стандарте EN ISO 7218.

2a – ALOA® CONFIRMATION

Только для подтверждения наличия *Listeria monocytogenes*



Из 1 характерной колонии, изолированной на ALOA®, выполните пересев (единичный мазок) на питательную среду ALOA® CONFIRMATION

Инкубация: 24 ± 2 часа при 37 ± 1°C

- ✓ Бета-глюкозидаза +
- + Фосфолипаза +
- + Рамноза +
- = *Listeria monocytogenes***

2б – Тест RAPIDEC® L.mono

2в – Стрип API® Listeria

2г – Тест AccuProbe L.mono

2д – Тест VIDAS LMO2

2е – Тест Fast Rhamnose

Подтверждение присутствия *Listeria spp* Метод ALOA® COUNT

1 – КЛАССИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ
(Протокол EN ISO 11290)
5 изолированных
предположительно
положительных колоний
субкультивируют на **агаре TSYE**
Инкубация в течение 18–24
часов при 37 ± 1 °C

Подтверждение рода *Listeria spp*
- Каталаза: положительная реакция (каталаза +)
- Окрашивание по Граму: мелкие
грамположительные бациллы
- Подвижность (при необходимости): подвижные
бактерии
→ Агар для определения подвижности или
наблюдение при помощи микроскопа (в бульоне
TSYE)
**Дополнительная идентификация (не
обязательна для родового подтверждения
Listeria spp):**
- Гемолиз на агаре с бараньей кровью
- Биохимическая идентификация

**Процесс подсчета и представления
результатов описан в стандарте EN ISO 7218.**

2 – СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДТВЕРЖДЕНИЯ

ВАРИАНТ 1 : **ПРОТОКОЛ 5Ч**

1 характерную колонию,
изолированную на ALOA®, высевают
на 1 мл бульона с **СЕРДЕЧНО-
МОЗГОВОЙ ВЫТЯЖКОЙ**
(АЕВ110101 – упаковка из 20
пробирок по 1 мл)
**Инкубация в течение 5 часов при
температуре 30 ± 1 °C.**
**Можно продлить инкубацию до 24
часов**
Стрип ***Listeria species Confirmation***
Strip для подтверждения наличия
видов *Listeria* погружают прямо в
пробирку. Результат считывают
спустя 10-20 минут после контакта.



Отрицательный тест Положительный
1 линия = отсутствие *Listeria spp*
2 линии = наличие *Listeria spp*

ВАРИАНТ 2 : **ПРОТОКОЛ 24Ч**

1 характерную колонию,
изолированную на ALOA®,
высевают точкой (или пятном) на
агар PALCAM (до 12 точек/пятен на
чашке диаметром 90 мм)
Инкубация: 24 часа при 37 ± 1 °C
✓ Зеленоватые колонии
(серый блеск), окруженные
черным ореолом: эскулин +
= *Listeria spp*

BIOMERIEUX, голубой логотип, VIDAS, API и RAPIDEC являются используемыми, зарегистрированными и/или находящимися в процессе регистрации торговыми марками, принадлежащими компании bioMérieux, одной из дочерних или входящих в ее группу компаний.
ALOA торговая марка принадлежащая Biolife Italiana S.r.l.
CLSI является торговой маркой, принадлежащей Институту клинических лабораторных стандартов.
Другие названия и торговые марки являются собственностью соответствующих владельцев.