

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	1 de 14

Republica de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE *LISTERIA* *MONOCYTOGENES Y LISTERIA* *SPP* EN ALIMENTOS SEGUN LA NORMA INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 11290-1:2017

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	2 de 14

1. OBJETIVO

Describir la metodología llevada a cabo por el laboratorio de microbiología de alimentos para la detección de *Listeria monocytogenes*. Basados en la norma International ISO 11290-1:2017, Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la determinación y el recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* Parte 1: Método de detección.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar detección de *Listeria monocytogenes* a los alimentos que por su origen, naturaleza y composición y manipulación pueden ser susceptibles de contaminación con *Listeria monocytogenes*.

3. RESPONSABILIDADES

Será responsabilidad del profesional asignado, según cronograma de análisis de muestras, Verificar que este procedimiento se lleve a cabo según está consignado en este documento.

4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

LISTERIA MONOCYTOGENES: *L. monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, pequeño, no ramificado y anaerobio facultativo capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (1 °C a 45 °C) y una elevada concentración de sal. Es catalasa positiva y no presenta cápsula ni espora. Tiene flagelos peritricos, gracias a los cuales presenta movilidad a 30 °C o menos, pero es inmóvil a 37 °C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan.

CALDO HALF FRASER: Medio de cultivo para enriquecimiento y recuperación de *Listeria sp.* Usado como enriquecimiento primario conjuntamente con Fraser Caldo, proporciona mayores índices de recuperación del microorganismo a partir de alimentos, carnes principalmente. Debido a su menor concentración de antibióticos.

CALDO FRASER: Se utiliza como enriquecimiento selectivo de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en todos los tipos de alimentos, incluidos la leche y los productos lácteos, y las muestras ambientales.

AGAR CROMOGÉNICO PARA LISTERIA SEGÚN OTTAVIANI Y AGOSTI: medio selectivo para el presunto aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* en alimentos. Se usa para confirmación después de usar Base de Caldo para *Listeria Fraser*.

AGAR OXFORD: medio selectivo para *Listeria*, todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina a esculina, que reacciona con los iones hierro produciendo colonias negras y un ennegrecimiento del medio.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	3 de 14

AGAR PALCAM: Medio selectivo para diferenciación para el aislamiento y la detección de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* a partir de alimentos, la selectividad en el medio se logra mediante la presencia de cloruro de litio, sulfato de polimixina B, acriflavina-HCl y ceftazidima, que suprime el crecimiento de la mayoría de los organismos diferentes de las especies de *Listeria* presentes en alimentos

BIOFILMS: colonia estructurada de células bacterianas incrustadas en una matriz polimérica compuesta por expo polisacáridos, proteínas y ácido nucleicos, fabricada por ellas mismas y adheridas a la superficie. Las bacterias pueden adherirse a células y tejidos, así como a superficies sólidas, el biofilm protege a las bacterias frente a la respuesta inmunitaria del hospedador, la desecación y los biocidas (como antibióticos o desinfectantes).

5. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS

La presencia de *Listeria monocytogenes* puede ser enmascarada por la presencia de otras especies de *Listeria* en particular *L. innocua* o *L. ivanovii* y de otros microorganismos por lo cual se requiere un enriquecimiento selectivo, el procedimiento requiere de 4 etapas sucesivas y el resultado puede tardar entre 4 y 5 días

6. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Ver manual de toma y recepción de muestras de alimentos y bebidas alcohólicas laboratorio de salud pública de Santander MI-GS-MA-08, inciso 3: Toma de muestras de alimentos, Tabla 2: Método de recolección de muestras de alimentos y materias primas sólidas, líquidas, deshidratadas y congeladas e inciso 6.2 Entrega de muestras al laboratorio.

7. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se conserva de acuerdo a la naturaleza del producto manteniendo las temperaturas de almacenamiento correspondientes

8. EQUIPOS

- ✓ Cabina de Flujo laminar
- ✓ Homogeneizador de muestras
- ✓ Autoclave
- ✓ Balanza analítica
- ✓ Incubadora a 30 °C +/- 1°C y 37 °C +/- 1°C
- ✓ Incubadora a 25°C
- ✓ Cajas de Petri estériles
- ✓ Micropipetas de 1 mL
- ✓ Puntas estériles
- ✓ Asas
- ✓ Vórtex
- ✓ Tubos de vidrio estériles
- ✓ Refrigerador

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	4 de 14

9. REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA

- ✓ Agua peptona bufferada 0.1% (BPW)
- ✓ Caldo Half Fraser
- ✓ Caldo Fraser
- ✓ Agar para listeria según Ottaviani y Agosti
- ✓ Agar Oxford
- ✓ Agar Palcam
- ✓ *Listeria monocytogenes* ATCC 1911
- ✓ *Listeria ivanovii* ATCC 19119
- ✓ *Listeria innocua* ATCC 33090
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

10. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

La detección de *Listeria monocytogenes* incluye 4 etapas:

- Enriquecimiento primario
- Enriquecimiento secundario
- Siembra en placa con medios selectivos
- Confirmación de *Listeria monocytogenes* o *Listeria spp.*

10.1 ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

- Rotular las bolsas estériles con filtro con su respectivo número de muestra.
- Desinfectar con alcohol al 70% el sitio por donde se vaya a extraer la muestra
- Abrir aséptica y adecuadamente la muestra
- Preparar la muestra: macerar, picar, mezclar y pesar 25 g representativos de la muestra total, (tomando de la superficie como de su interior) en la bolsa rotulada con el mismo número de la muestra a examinar, en una balanza previamente tarada, para obtener una dilución 10^{-1}
- Adicionar 225 ml de caldo Half Fraser
- Homogenizar la muestra una vez pesada, dejar en reposo 10 minutos
- Llevar la bolsa con la muestra ya pesada y homogenizada a incubar a 30°C durante 25 horas +/-1 hora.

10.2 ENRIQUECIMIENTO SECUNDARIO

- Transferir 0.1 ml del cultivo obtenido en el enriquecimiento primario a un tubo que contenga 10 ml de medio de enriquecimiento secundario (caldo Fraser). Incubar a 37 °C por 24 horas +/- 2 horas.

NOTA: La incubación adicional de 24 horas puede permitir la recuperación de más especies diferentes a *L. monocytogenes*.

10.3 SIEMBRA EN PLACA CON MEDIOS SELECTIVOS

Se inoculan 2 medios de agar selectivo con los cultivos procedentes del enriquecimiento

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	5 de 14

primario y el enriquecimiento secundario. El primer medio de cultivo recomendado debe ser Agar selectivo para listeria según Ottaviani y Agosti y el segundo medio puede ser escogido por el laboratorio, ya sea: Agar Oxford, Agar Palcam.

Aislar por agotamiento el cultivo obtenido en caldo Half Fraser (enriquecimiento primario) utilizando un asa de siembra de 10 uL, inoculando la superficie de 1 placa de Agar selectivo para listeria según Ottaviani y Agosti, y una placa del segundo agar selectivo escogido por el laboratorio (Agar Oxford, Agar Palcam) de forma que se obtengan colonias bien aisladas.

Aislar por agotamiento el cultivo obtenido en caldo Fraser (enriquecimiento secundario) utilizando un asa de siembra de 10 uL, inoculando la superficie de 1 placa de Agar selectivo para listeria según Ottaviani y Agosti, y una placa del segundo agar selectivo escogido por el laboratorio (Agar Oxford, Agar Palcam) de forma que se obtengan colonias bien aisladas.

NOTA: Los caldos Half Fraser y Fraser pueden ser refrigerados a 5°C antes del aislamiento en agar selectivo máximo 72 horas.

Incubar las placas de Agar selectivo para listeria según Ottaviani y Agosti en posición invertida a una temperatura de 37 °C durante 48 horas +/- 2 horas. Si las colonias presuntivas de *L. monocytogenes* o *Listeria spp* son evidentes a las 24 horas +/- 2 horas de incubación puede detenerse esta etapa.

El segundo medio selectivo en placa se incuba siguiendo las indicaciones del fabricante y se examinan las cajas para detectar la presencia de *L. monocytogenes* o *Listeria spp*

Después de la incubación examinar las placas para ver la presencia de colonias típicas y atípicas de *Listeria monocytogenes*.

Agar listeria según Ottaviani y Agosti: las colonias típicas de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son verdes azuladas rodeadas por un halo opaco. Considerar como *Listeria spp* las colonias son azul- verdosas con o sin halo opaco.

NOTA 1: algunas especies de *L. monocytogenes* expuestas a condiciones de estrés en particular a los ácidos pueden mostrar un halo muy débil o incluso ningún halo

NOTA 2: algunas bacterias atípicas de *L. monocytogenes* se caracterizan por tener una actividad PIPLC (Fosfatidil inositol fosfolipasa C) lenta. Dichas bacterias se detectan cuando el tiempo de incubación es mayor a 4 días. Algunas de estas especies podrían ser patógenas. No se han descrito cepas de *L. monocytogenes* con PIPLC negativas

NOTA 3: Algunos organismos distintos de *Listeria spp* pueden producir colonias azules en este medio.

10.4 SELECCIÓN SEGUNDO MEDIO SELECTIVO

Después del tiempo apropiado, examine las cajas y observe la presencia de colonias que pueden ser consideradas como presuntas colonias de *Listeria spp.* o *L. monocytogenes*, basadas en las siguientes características de acuerdo al medio utilizado.

Agar Oxford: Las colonias típicas de *Listeria monocytogenes* son de color verde negro con

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	6 de 14

un halo negro, debido a la hidrólisis de la esculina. *L. monocytogenes*: esculina (+).

Agar Palcam: Las colonias típicas de *L. monocytogenes* son de color verde grisáceo con un halo marrón negro sobre un fondo rojo cereza, debido a la hidrólisis de la esculina y no fermentación del manitol, *Listeria monocytogenes*: esculina (+) y manitol (-) otras bacterias pueden formar halos negros pero el desarrollo de color toma más de dos días.

10.5 CONFIRMACIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES O LISTERIA SPP.

SELECCIÓN DE COLONIAS PARA CONFIRMACION

Para confirmación presuntiva de *L. monocytogenes* tome al menos una colonia que presuma puede ser *L. monocytogenes* de acuerdo a las características de las colonias anteriormente mencionadas, un aislamiento confirmado por muestra es suficiente. Si la primera colonia es negativa tome otras colonias que presuma pueden ser *L. monocytogenes* del medio selectivo hasta un máximo de 5 colonias de cada placa de cada medio selectivo

Estríe la colonia seleccionada por agotamiento en la superficie de los medios no selectivos por ejemplo agar sangre, agar nutritivo, agar Triptona soja extracto de levadura (TSYEA), en forma que permita el desarrollo aislado de las colonias.

Use el agar sangre para el cultivo puro que permite interpretar de la hemólisis, cuando es positiva, se evidenciará alrededor de la colonia. Si en las estrías de las colonias en el agar sangre no muestran hemólisis la prueba se hará por punción en medio líquido.

Incubar a 37°C por 18-24 Horas o hasta que el crecimiento sea satisfactorio.

Colocar las placas en la incubadora a 37 °C durante 18 h a 24 h o hasta que el crecimiento sea satisfactorio. Las colonias típicas de *Listeria spp.* en TSYEA tienen entre 1 y 2 mm de diámetro, son convexas, incoloras y opacas con un borde entero. Cuando las placas se sostienen a la luz (artificial o natural) en un ángulo de unos 45 grados, las colonias muestran un color gris azulado y una superficie granular. Si no se aíslan las colonias, recoger una colonia típica de *Listeria spp.* en otra placa de agar no selectivo. Realice las siguientes pruebas a partir de colonias típicas de un cultivo puro en TSYEA. Confirmación de *L. monocytogenes*. Realizar las pruebas de confirmación de *L. monocytogenes*. Se utilizarán cepas de control positivas y negativas adecuadas para cada una de las pruebas de confirmación. Realice como mínimo las pruebas obligatorias que figuran en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Pruebas para confirmación de *L. monocytogenes*

Pruebas	Pruebas de confirmación de <i>L. monocytogenes</i>	Resultados
Obligatorio	Aspecto microscópico	Bacilos cortos o delgados o cocobacilos
	Beta-hemólisis	+
	L-Rhamnosa	+

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	7 de 14
	D-Xilosa	-	
Opcional	Catalasa	+	
	Motilidad a 25°C	+	
	Prueba CAMP	+	
El aspecto microscópico es opcional para el Agar Listeria según Ottaviani y Agosti y para el segundo medio si permite distinguir entre Listeria spp. patógena y no patógena			

Los detalles de los resultados de las pruebas de confirmación se encuentran en el cuadro 3.

NOTA Se puede utilizar un procedimiento alternativo como el mencionado en la norma ISO 7218 para confirmar que el aislado es *Listeria monocytogenes*, siempre que se verifique la idoneidad del procedimiento correspondiente. Si se demuestra que son fiables, las galerías miniaturizadas para la identificación bioquímica de *Listeria monocytogenes* puede utilizarse (véase ISO 7218). Las cepas raras de *L. monocytogenes* no muestran hemólisis beta o una reacción positiva a la prueba CAMP en las condiciones descritas en este documento. Si las colonias típicas en Agar Listeria según Ottaviani y Agosti con actividad PIPLC, aunque sea baja, son negativas a la hemólisis, se recomienda realizar pruebas adicionales (por ejemplo, tinción de Gram, catalasa, motilidad, prueba CAMP, PCR), para determinar si este aislado es un *L. monocytogenes* no hemolítico.

➤ **Prueba de Catalasa (opcional):**

- Tomar una colonia aislada de los medios selectivos
- Colocar en un portaobjeto una gota de peróxido de hidrogeno al 3 % y suspender la colonia.
- Observar si se producen o no burbujas de gas: *L. monocytogenes*: catalasa (+) produce burbuja de gas.

NOTA: Una reacción de catalasa realizada a partir de una colonia procedente de un agar sangre puede dar a veces resultados falsos positivos.

➤ **Prueba de motilidad (opcional):**

Tome una colonia aislada obtenida y suspéndala en un tubo que contenga un medio líquido nutritivo no selectivo. Incubar a 25 °C durante 8 h a 24 h hasta que el medio se vuelva turbio, Tomar una gota del cultivo anterior con un asa y en un portaobjetos de vidrio limpio. Coloque un cubreobjetos encima y examínelo al microscopio. Las *Listeria spp.* (incluida *L. monocytogenes*) aparecen como bastoncillos delgados y cortos con una motilidad inestable.

Los cultivos realizados a temperaturas superiores a 25 °C pueden no mostrar este movimiento. Compárelos siempre con un cultivo de Listeria conocido. Los cocos, los bacilos grandes o los bacilos con motilidad natatoria rápida no son *Listeria spp.* Como prueba alternativa de motilidad, utilizando un asa diluir en agua estéril (u otro diluyente apropiado) una colonia aislada obtenida en agar no selectivo. Las *Listeria spp.* (incluida *L. monocytogenes*) se presentan como bastoncillos delgados y cortos con motilidad

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	8 de 14

tumultuosa Como otra prueba alternativa de motilidad, utilizar un asa el agar de motilidad con un cultivo tomado de una colonia típica obtenida. Incubar a 25 °C durante 48 h ± 2 h. Como prueba alternativa de motilidad, utilizando un asa diluir en agua estéril (u otro diluyente apropiado) un fragmento de colonia aislada obtenida en agar no selectivo. Las *Listeria spp.* (incluida *L. monocytogenes*) se presentan como bastoncillos delgados y cortos con motilidad tumultuosa.

Como otra prueba alternativa de motilidad, utilizando un asa, inocular el agar de motilidad con una colonia típica obtenida. Incubar a 25 °C durante 48 h ± 2 h.

Examine si hay crecimiento alrededor de la punción. Las listerias son móviles y presentan un patrón de crecimiento típico en forma de paraguas. Si el crecimiento no es suficiente, incubar hasta cinco días más y volver a observar. **NOTA** Recientemente se han aislado algunas especies nuevas de listeria. La mayoría de ellas no son móviles en el agar motilidad. **Aspecto**

➤ **Microscópico**

Realice una preparación microscópica (por ejemplo, la tinción de Gram, la microscopía húmeda) en una colonia bien separada obtenida. *Listeria spp.* (incluida *L. monocytogenes*) aparecen como Gram positivos, bastoncillos o cocobacilos delgados y cortos, con motilidad tumultuosa cuando proceden de un cultivo fresco.

➤ **Hemolisis:**

- Dibujar una rejilla con 20-25 cuadrículas por placa en el fondo de una caja de Petri con agar tripticosa soya adicionado con 5% de sangre de cordero
- Tomar una colonia típica y sembrarla por picadura en una de las cuadrículas
- Incubar a 37 °C +/- 2 por 24 +/- 2 horas
- Realizar controles positivo y negativo en cuanto a hemolisis
- Observar la Hemolisis:
- *L. monocytogenes* ATCC 19115 presenta ligera beta hemolisis.
- *L. ivanovii* ATCC 19119 presenta zonas bien delimitadas y amplias de hemolisis.
- *L. innocua* ATCC 33090 no muestra hemolisis.

➤ **Prueba de CAMP**

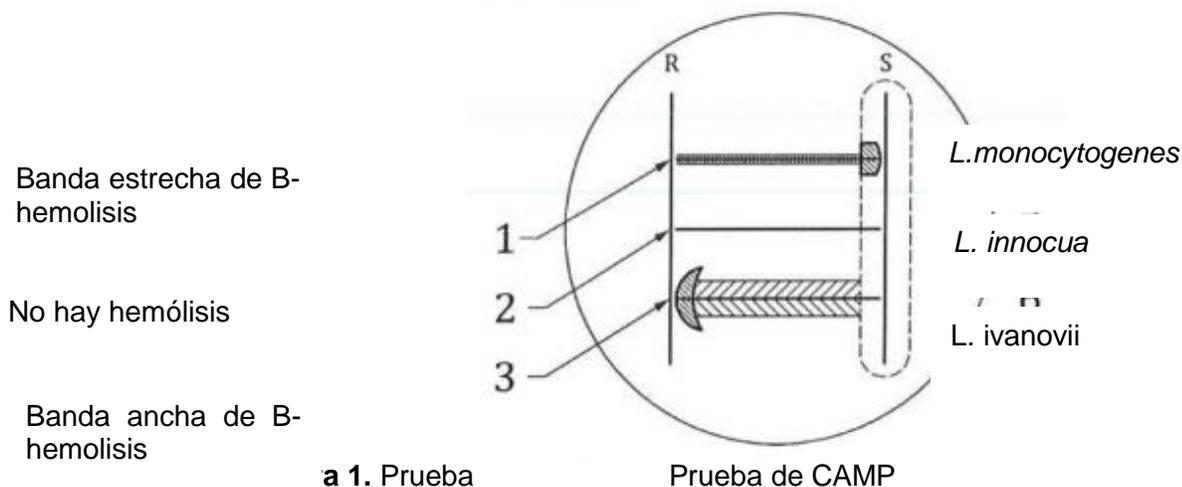
- Sembrar líneas verticales (paralelas) de cultivos frescos de *Staphylococcus aureus* beta hemolítico y *Rhodococcus equi*, sobre placas delgadas y frescas con agar tripticosa soya adicionado con 5% de sangre de cordero.
- Inocular horizontalmente (ángulo 90°) las muestras en estudio y los controles positivos y negativos para hemolisis a 1 o 2 mm de los cultivos anteriores sin tocarlos.
- Incubar a 37 °C durante 18 a 24 horas.
- Considerar una reacción positiva para CAMP cuando se presenta una zona clara de beta hemolisis en la intersección de la muestra en estudio con la cepa de *Staphylococcus aureus* o *Rhodococcus equi*.
- La reacción positiva con *R. equi* se ve como una "punta de flecha" ancha (5 mm a 10 mm) de hemólisis. La reacción se considera negativa si una pequeña zona de hemólisis

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	9 de 14

débil se extiende sólo alrededor de 1 mm en la intersección de la cepa de prueba con la zona de difusión del cultivo de *R. equi*.

- La hemólisis de *L. monocytogenes* se intensifica cerca al cultivo de *S. aureus*. La hemólisis de *L. ivanovii* se realiza cerca al cultivo de *R. equi*. La hemólisis de *L. seeligeri* se intensifica cerca al *S. aureus*. Las otras especies de *Listeria* al no ser hemolíticas presentan una reacción de CAMP negativa. Véase figura 1 u cuadro #1.
- Una reacción positiva con *S. aureus* aparece como una pequeña zona de hemólisis aumentada que se extiende sólo unos 2 mm desde la cepa de prueba y dentro de la zona débilmente hemolítica debida al crecimiento del cultivo de *S. aureus*. No se producen grandes zonas de hemólisis en la zona de *S. aureus* y *L. monocytogenes*.



Cuadro 2. Prueba de CAMP reacciones de las diferentes especies de *Listeria*

ESPECIES	Interacción Hemolítica	
	Staphylococcus aureus	Rhodococcus equi
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-

➤ **Fermentación de carbohidratos**

- Inocular con asa los tubos que contiene cada uno de los carbohidratos xilosa, ramnosa y manitol.
- Incubar a 37°C por 24 – 48 horas
- Descartar a los 7 días de incubación
- Observar el viraje del indicador, generalmente ocurre a las 48 horas.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	10 de 14

L. monocytogenes:

Xilosa (-)

M

a

n

i

t

o

l

:

(

-

)

R

a

m

n

o

s

a

(

+

)

Para la identificación pueden utilizarse también kits comerciales. Se recomienda el uso de aquellos que hayan sido aprobados y validados por AOAC u otro organismo internacional reconocido y que garantice la validez de los resultados. Usar los Kits de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Resultados de las pruebas Bioquímicas de *Listeria monocytogenes*:

Catalasa: positiva

Nitratos: Negativo

Hemólisis: Ligera Beta Hemólisis

Motilidad: Positiva en forma de Sombrilla

CAMP: Positivo con *S. aureus*

Xilosa: Negativo

Manitol: Negativo

Ramnosa: Positivo

Esculina: Positivo

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	11 de 14

Cuadro 3. Diferenciación de especies de *Listeria*

ESPECIE	Gram	Catalasa	Movilidad	Hemólisis (beta)	Reducción de nitrato	PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS A PARTIR DE:					
						Glucosa	Maltosa	Manitol	Ramnoosa	Xilosa	Esculina
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	V	-	+
<i>L. welshimeri</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	V	+	+
<i>L. seeligeri</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>L. grayi</i>	+	+	+	-	V	+	+	+	V	-	+

V= variable

Tomado del Manual de Bacteriología Analítica FDA. *Listeria monocytogenes* 2001

11. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

Los ensayos se realizarán de acuerdo con el procedimiento de aseguramiento de la calidad de técnicas y medios de Cultivo, Preparación, esterilización y control de calidad de medios de cultivo MI-GS-GI-79, y registrar los datos de preparación en el formato control de medios de cultivo preparados MI-GS-RG-113.

Verificar el crecimiento en el control positivo observando que el crecimiento sea adecuado y las colonias características.

El control negativo no debe presentar crecimiento. Las colonias no deben poder diferenciarse claramente si los medios utilizados son selectivos.

La prueba de esterilidad de los medios utilizados, no debe presentar crecimiento de ningún tipo.

12. ANÁLISIS Y EXPRESION DE RESULTADOS



Figura 2. Colonias de *L. monocytogenes* en agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	12 de 14



Figura 3. Colonias de *L. monocytogenes* en agar Oxford



Figura 4. Colonias de *L. monocytogenes* en agar Palcam

Según los resultados obtenidos, se indica la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g o ml del producto analizado. Se registra en la hoja de datos primarios MI-GS-RG-157.

12. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS

Los resultados se emiten en la plantilla que contiene información general del punto de toma, información de la muestra recibida y los análisis realizados.

13. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS

La norma ISO 11290-1:2017 no requiere exámenes complementarios sin embargo en este manual mencionamos que la identificación de *L. monocytogenes* se puede realizar por método automatizado Vitek.

14. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

International Organization for Standardization ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	13 de 14

of Listeria spp. Part 1: Detection method.

Análisis microbiológico de los alimentos, metodología analítica oficial, microorganismos patógenos

http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_i.pdf

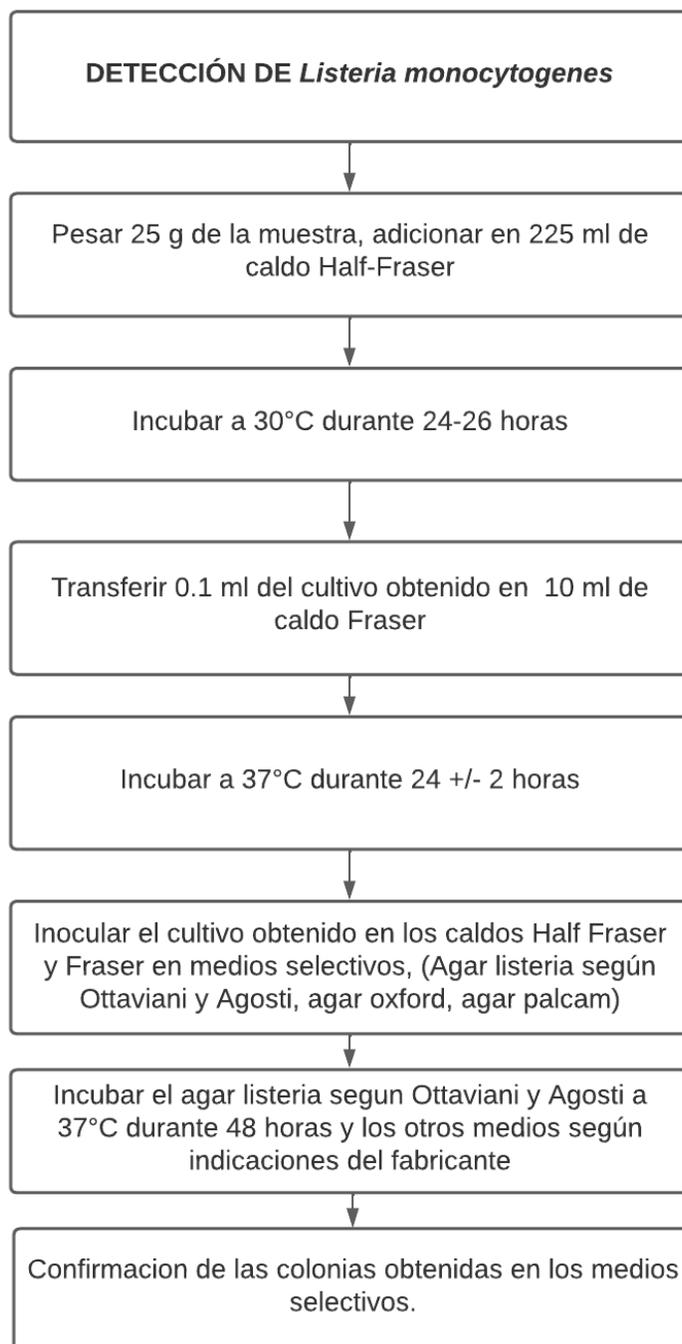
15. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	08/11/2023	Emisión inicial del documento	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP German Eduardo Marín Cárdenas Director de Salud Integral Diego Sánchez Báez Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad César Ernesto Sánchez Aranda Director de Planeación y Mejoramiento en Salud	Javier Alonso Villamizar Suarez Secretario de Salud de Santander

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y LISTERIA SPP SEGÚN ISO 11290-1:2017 LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	CÓDIGO	MI-GS-MA-95
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	08/11/2023
		PÁGINA	14 de 14

16. ANEXOS



Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Sandra Isabel Bohórquez	Ayde López	Alejandra Galvis Vargas