

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
3718:2001**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN
DE *Listeria monocytogenes*
EN ALIMENTOS**



PRÓLOGO

La presente norma fue elaborada de acuerdo a las directrices del Comité Técnico de Normalización **CT10 Productos Alimenticios**, por el Subcomité Técnico **SC3 Microbiología de Alimentos** y aprobada por **FONDONORMA** en la reunión del Consejo Superior **N° 2001-12** de fecha **19/12/2001**.

En la elaboración de esta norma participaron las siguientes entidades: Ministerio de Salud y Desarrollo Social; Instituto Nacional de Higiene; Universidad Simón Bolívar; Laboratorios Brolab; Semitech, C.A.; Parmalat; Productos EFE-POLAR; Universidad Central de Venezuela; Tecnología de Alimentos; PARMALAT; Fundación CIEPE.

**NORMA VENEZOLANA
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN
DE *Listeria monocytogenes*
EN ALIMENTOS**

**COVENIN
3718:2001**

1 OBJETO

Esta Norma Venezolana contempla el método de ensayo para el aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

2 REFERENCIAS NORMATIVAS

Las siguientes normas contienen disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Venezolana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación y como toda norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos con base en ellas, que analicen la conveniencia de usar las ediciones más recientes de las Normas citadas seguidamente.

COVENIN 1126-89 Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta Norma Venezolana COVENIN se aplica la siguiente definición:

3.1 *Listeria monocytogenes*

Bacilo corto, Gram positivo, no esporulado, catalasa positiva, fermenta maltosa y ramnosa, pero no xilosa, exhibe una movilidad "rodante" en forma de "tumbos" o "volteretas" cuando se incubaba a 25 °C.

4 PRINCIPIO DEL ENSAYO

Para el aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* se precisa de etapas sucesivas debido a que el microorganismo se encuentra algunas veces debilitado por los procesos tecnológicos a que son sometidos los alimentos o por la presencia de un número mayor de otros microorganismos de otras familias. Las etapas a considerar son las siguientes:

4.1 Enriquecimiento

Consiste en recuperar las células fisiológicamente dañadas, permitiendo la multiplicación de las mismas y a la vez inhibiendo la flora competitiva.

4.2 Aislamiento e identificación

A partir del caldo de enriquecimiento inocular sobre medios sólidos selectivos, los cuales luego de ser incubados a las temperaturas y tiempos adecuados son examinados para observar la presencia de colonias, que por sus características sean consideradas presuntivas de *Listeria monocytogenes*.

4.3 Confirmación

Determinación de las características bioquímicas y serológicas a las colonias presuntivas de *Listeria monocytogenes*.

5 EQUIPOS

5.1 Equipos para la preparación de muestras (véase Norma Venezolana COVENIN N° 1126).

5.2 Tubos de ensayo de 200 x 25 mm.

- 5.3 Placas de petri 100 x 10 mm.
- 5.4 Homogeneizador o licuadora
- 5.5 Incubadoras reguladas a 30 y 35° C \pm 2 ° C
- 5.6 Autoclave.
- 5.7 Horno eléctrico.
- 5.8 Balanza semianalítica con apreciación de 0,1 g.
- 5.9 Equipos de uso común en el Laboratorio.

6 MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS

6.1 Medios de cultivo (véase anexo 1)

- 6.1.1 Agar base sangre N° 2 (Disco).
- 6.1.2 Agar con sangre de carnero desfibrinada.
- 6.1.3 Agar LPM (Moxalactam – fenil – etanol – cloruro de litio) con esculina / hierro.
- 6.1.4 Agar tripticasa soya con 0,6 % de extracto de Levadura (ATSE),
- 6.1.5 Agar Oxford (OXA).
- 6.1.6 Agar Oxford modificado (Agar Mox).
- 6.1.7 Agar PALCAM
- 6.1.8 Agar triptosa.
- 6.1.9 Caldo nutritivo.
- 6.1.10 Caldo base para fermentación de carbohidratos.
- 6.1.11 Caldo base para fermentación de carbohidratos conteniendo soluciones al 0,5% (p/v) de dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa.
- 6.1.12 Caldo tripticasa soya con 0,6% de extracto de Levadura (BTSE).
- 6.1.13 Caldo triptosa.
- 6.1.14 Caldo de enriquecimiento para Listeria
- 6.1.15 Medio SIM, medio para movilidad (MTM) o agar cistina triptosa (CTA).

6.2 Reactivos (véase anexo 2)

- 6.2.1 Solución salina al 0,85 %
- 6.2.2 Ácido nalidixico 0,5% p/v.
- 6.2.3 Solución Acriflavina HCl.
- 6.2.4 Agua oxigenada al 3 %.
- 6.2.5 Carragenina.
- 6.2.6 Glicina anhidra.
- 6.2.7 Etanol absoluto.
- 6.2.8 Cicloheximida ó piramicina

6.2.9 Solución púrpura de Bromocresol al 1 %

6.2.10 Reactivos para la coloración de Gram.

7 PROCEDIMIENTO

Identificar y preparar la muestra según lo indicado en la Norma Venezolana COVENIN 1126 tomando en cuenta las particularidades de cada alimento.

7.1 Enriquecimiento

7.1.1 Pesar o medir 25g ó 25ml de la muestra a ensayar en una bolsa de polietileno o en un envase estéril.

7.1.2 Añadir 225 ml del medio de enriquecimiento sin los agentes selectivos, homogeneizar por 30 seg. Incubar a 30 ± 1 °C por 4 horas. Transcurrido este tiempo añadir los agentes selectivos acriflavina HCl, ácido nalidíxico y ciclohexamida o piramicina, mezclar por agitación. También puede utilizar el medio de enriquecimiento para *Listeria* con los agentes selectivos incorporados.

En caso de que se analicen varias muestras de un mismo lote, pueden prepararse una o varias muestras compuestas no mayores de 500g o 500 ml.

7.1.3 Incubar a 30° C por 44 h adicionales para un total de 48 horas.

7.2 Aislamiento e Identificación

7.2.1 A partir del caldo de enriquecimiento de 24 h y 48 h de incubación, estriar con un asa en la superficie de placas con Agar Oxford (OXA) o Agar PALCAM y otro medio selectivo para aislamiento de *Listeria*, adicional que el laboratorio seleccione entre los que se mencionan a continuación: Agar Oxford modificado (MOX) y Agar moxalactam fenil etanol cloruro de litio (LPM) más esculina / hierro.

En caso de que se analicen varias muestras de un mismo lote, previo al punto 7.2.1 se puede hacer mezclas de caldo de enriquecimiento ya incubados, para lo cual se toma 1ml de cada uno de los cultivos y se mezclan en un tubo.

7.2.2 Incubar las placas invertidas: OXA, MOX, PALCAM a $35 - 37 \pm 1$ °C por 48 ± 2 h. y LPM esculina/ hierro a 30° C por 48 horas. Las placas de agar OXA, MOX y PALCAM pueden incubarse en condiciones microaeróbicas.

7.2.3 Al final de la incubación observar las colonias presuntivas de *Listeria monocytogenes* cuyas características típicas en los medios diferenciales son las siguientes:

7.2.3.1 Agar Oxford (OXA) y Agar Oxford modificado (MOX)

Listeria monocytogenes hidroliza la esculina en esculina y forma un complejo con los iones Fe^{+3} de color negro, las colonias de *Listeria monocytogenes* se observan verde parduzco con un halo negro, un hundimiento central y 2 mm de diámetro.

7.2.3.2 Agar LPM con esculina/ hierro

Las colonias de *Listeria monocytogenes* en este medio se observan de color negro debido a la formación de un complejo con los iones Fe^{+3} y la esculina.

7.2.3.3 Agar PALCAM

Las colonias de *Listeria monocytogenes* se observan de color verde oscuro con un halo negro con un hundimiento central y un tamaño de 1,5 - 2 mm. Dejar las placas incubadas en condiciones microaeróbicas por 1 h a temperatura ambiente antes de la lectura.

7.3 Confirmación

7.3.1 Transferir con un asa tocando el centro de la colonia, 5 ó más colonias típicas de cada medio selectivo a placas o cuñas ATSE, estríe por agotamiento para obtener colonias aisladas. Utilizar un control positivo.

7.3.2 Incubar las placas invertidas a 30 ± 1 °C por 24 h - 48 h. Las colonias de *Listeria monocytogenes* crecen en ATSE coloreadas de azul grisáceo a azul claro o incoloras.

Las placas pueden ser incubadas a 35 ± 1 °C sino se van a usar para observar movilidad al fresco.

7.4 Pruebas preliminares

A partir del cultivo de 24 h en ATSE realizar: una coloración de Gram, prueba de movilidad y prueba de hemólisis.

7.4.1 Coloración de Gram Las especies de *Listeria* son bacilos cortos, Gram positivo y pueden aparecer en forma cocoide.

7.4.2 Prueba de movilidad

7.4.2.1 Realizar un montaje en fresco usando solución salina al 0,85% como medio de suspensión y observar al microscopio la movilidad en contraste de fases. Esta prueba puede realizarse a partir de las colonias del medio selectivo.

También puede escoger una colonia y colocarla en caldo tripticasa soya con 0,6% de extracto de levadura, incubar a temperatura ambiente por 6 horas, al cabo de este tiempo preparar un montaje al fresco y observar al microscopio la movilidad en contraste de fases.

Listeria spp. son bacilos cortos, delgados con un leve movimiento de rotación. Utilizar un control positivo para ésta prueba.

7.4.2.2 Alternativamente puede realizar el ensayo movilidad en medio SIM, MTM o CTA inocular por punción central, incubar a temperatura ambiente por 48 hr – hasta 7 días, las especies de *Listeria* spp. presentan una movilidad característica tipo paragua.

NOTA 1: Preparar un inóculo denso para realizar esta prueba, porque si el inóculo es débil puede dar un falso negativo.

7.4.3 Prueba de hemólisis

7.4.3.1 Con la ayuda de un filamento, sembrar por punción (sin llegar hasta el fondo) un inóculo denso, en placas previamente secas de agar sangre de caballo al 5%. Dibujar una rejilla en el fondo de la placa, con 20 a 25 cuadros, utilizar un cuadro para cada cepa y utilizar un control positivo *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri* ó *Listeria monocytogenes*; y un control negativo *Listeria innocua*. Incubar a 35° C por 48 h.

7.4.3.2 Examinar las placas de agar sangre con luz brillante; *Listeria monocytogenes* y *Listeria seeligeri* producen una zona estrecha de Beta-hemólisis, evidenciada por la aparición de zonas ligeramente claras alrededor de la punción *Listeria ivanovii* produce zonas claras bien definidas alrededor de la punción, *Listeria innocua* no muestra zona de hemólisis. En caso de duda realizar la prueba de CAMP. Si la prueba de Beta-hemólisis es negativa, no continuar con las pruebas confirmatorias. Si es positiva, continuar con la marcha.

7.4.4 Prueba de Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP)

La prueba de CAMP es útil para confirmar especies entre el género *Listeria*, particularmente cuando la prueba de hemólisis arroja resultados dudosos. Para llevar a cabo la prueba estriar un cultivo de 24h en bisel de *Staphylococcus aureus* débil beta-hemolítico ATCC 49444 ó 25923 y uno de *Rhodococcus equi* ATCC 6939 en paralelo y diametralmente opuesto uno del otro en placas de agar sangre de carnero. Estriar en forma horizontal las cepas a ensayar sin tocar los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi* (véase figura 1). Incubar a 35°C por 24-48h. Observar la presencia de Beta-hemólisis. *Listeria monocytogenes* produce resultados óptimos a las 24 horas. Utilizar un control de *Listeria monocytogenes* en una placa separada.

NOTA 2: Para obtener suficiente cultivo de *Rhodococcus equi* incubar el bisel por más de 24 horas.

La hemólisis producida por *Listeria monocytogenes* y *Listeria seeligeri* esta aumentada cerca de la estria de *Staphylococcus aureus*, por el contrario la hemólisis producida por *Listeria ivanovii* esta aumentada cerca de la estria de *Rhodococcus equi*. La prueba de CAMP diferencia *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* de *Listeria ivanovii* también puede diferenciar *Listeria seeligeri* débil hemolítica de *Listeria welshimeri* (véase tabla 1).

Las cepas que produzcan reacciones típicas para *Listeria monocytogenes* excepto la producción de hemolisina deben ser confirmadas con la prueba de CAMP.

7.5 Pruebas bioquímicas confirmatorias

*Prueba de catalasa.

*Fermentación de: Maltosa, ramnosa, xilosa, manitol, esculina y dextrosa.

También se puede utilizar el sistema Api - Listeria o la cinta ID32 STREP del sistema ATB expression.

7.5.1 Realizar la prueba de catalasa a partir de ATSE, para ello escoja una colonia típica, colocar en una lámina portaobjeto donde previamente se ha colocado un gota de solución salina, mezclar para suspender el inóculo, agregar una gota de agua oxigenada al 3%, la prueba se considera positiva si se observa la presencia de burbujas. *Listeria monocytogenes* es catalasa +.

7.5.2 Escoger una colonia típica e inocular un tubo de caldo tripticasa soya, para la realización de la prueba de fermentación de carbohidratos. Incubar a 35° C por 24 horas.

7.5.2.1 Inocular a partir del cultivo en caldo tripticasa soya en cada uno de seis tubos de caldo púrpura con los siguiente carbohidratos (0,5% p/v) dextrosa, manitol, esculina, xilosa, maltosa, ramnosa y otro sin carbohidrato como control. Incubar a 35 - 37 °C x 5 - 7 días. Color amarillo: indica resultado positivo. Color púrpura: indica resultado negativo. El tubo control debe permanecer color púrpura. *Listeria monocytogenes* es dextrosa, maltosa, esculina y ramnosa positiva, sin producción de gas, manitol y xilosa negativo. El uso del tubo de Durham es opcional.

NOTA 3: Las cepas que presenten reacciones bioquímicas típicas se pueden considerar *Listeria monocytogenes*. (véase tabla 2).

La prueba serológica es opcional.

7.6 Prueba Serológica

7.6.1 Utilizar un cultivo en caldo tripticasa soya e inocular en caldo triptosa, realizar dos transferencias sucesivas en el caldo triptosa e incubar a 35 °C por 24 h, hacer una transferencia final a 2 biseles de agar triptosa e incubar a 35 °C por 24 h, lavar ambos biseles en un volumen total de 3 ml de buffer del antisuero fluorescente, transferir a un tubo estéril de 125 x 16 mm de tapa rosca. Calentar en un baño de agua a 80 °C por 1 h, centrifugar a 1600 g por 30 min, remover de 2,2 a 2,3 ml del sobrenadante y resuspender el precipitado en el resto del buffer. Seguir las recomendaciones del fabricante para la dilución del suero y el procedimiento de aglutinación.

8 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

8.1 Según los resultados de la interpretación, indicar presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en la cantidad de muestra utilizada para el análisis (gramos o mililitros) Ejem: si se utilizan 25g para el análisis se reportará *Listeria monocytogenes* en 25g: Presente o Ausente.

8.2 Cuando se trate de una muestra compuesta formada partir de varias muestras provenientes del mismo lote, como se indica en 7.1.2, indique la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en la cantidad total pesada o medida. Ejem: si tomó porciones de 25g de cada una de 5 muestras, reporte *Listeria monocytogenes* en 125g: Presente o Ausente.

9 INFORME

El informe de ensayo debe indicar como mínimo la siguiente información:

- 9.1 Nombre y dirección del laboratorio.
- 9.2 Número de serie del informe.
- 9.3 Nombre de la institución o empresa que remite la muestra.
- 9.4 Descripción e identificación de la muestra y su fecha de recepción.
- 9.5 Método de análisis y procedimiento empleado.
- 9.6 Modificaciones del método.
- 9.7 Descripción del procedimiento de muestreo en donde sea pertinente.
- 9.8 Resultados y conclusiones
- 9.9 Firma del analista.
- 9.10 Firma del supervisor.

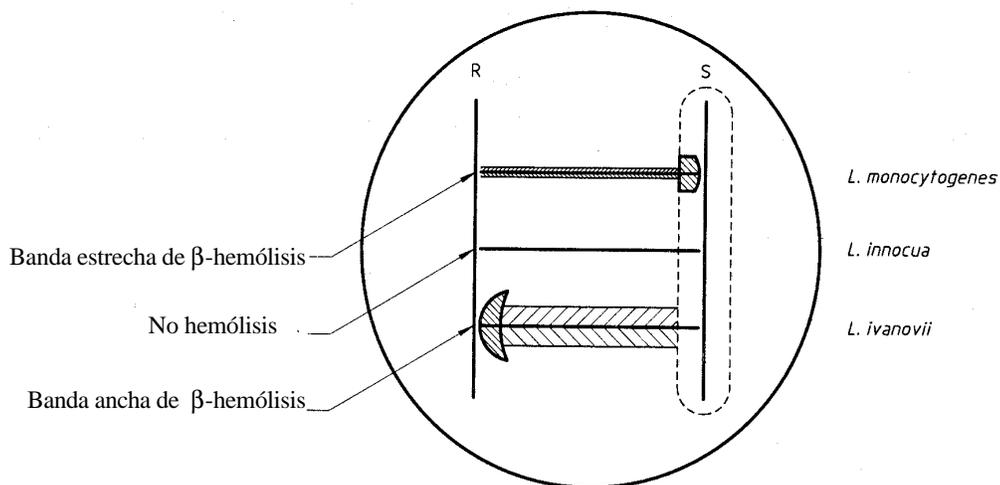
BIBLIOGRAFÍA

FDA 1995. Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration. Bureau of Foods Division of Microbiology. 8th Edition. AOAC 481 North Frederick Avenue, Suite 500, MD 20877. U.S.A.

ICMSF. Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Foods Commodities. Blackie Academic and Profesional. 1998.

Participaron en la elaboración de esta norma: Briceño, Ana Graciela; Calderón, Cristina; Estrada, Margarita; Franceschi, Olgamar; Galvis, Norma; Herrera, Josefina, Leymaya Guevara; Novoa, Maria Luisa; Sánchez, Raiza; Velazco, Nancy; Vicenza, Trombino

Figura 1 Inoculación e interpretación de la prueba de CAMP



S: *Staphylococcus aureus*

R: *Rhodococcus equi*

Tabla 1. Características de Listeria en la prueba de CAMP.

| Especies | Interacción Hemolítica | |
|-------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Rhodococcus equi</i> |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | + | - |
| <i>Listeria ivanovii</i> | - | + |
| <i>Listeria innocua</i> | - | - |
| <i>Listeria welshimeri</i> | - | - |
| <i>Listeria seeligeri</i> | + | - |

Tabla 2. Características de *Listeria monocytogenes*.

| PRUEBA | POSITIVO | NEGATIVO | RESULTADO <i>Listeria monocytogenes</i> |
|--------------------------------|--|--|--|
| Coloración de Gram | Bacilos cortos Gram (+) | Ausencia de bacilos | + |
| Movilidad al fresco | Leve movimiento de rotación | Ausencia de movimiento | + |
| Movilidad Agar SIM, MTM o CTA. | Crecimiento difuso a través de la línea de punción (tipo paragua). | No característico | + |
| βeta hemólisis. | Zona clara estrecha alrededor de la punción. | Ausencia de zonas claras alrededor de la punción | + |
| Prueba de catalasa | Presencia de burbujas. | Ausencia de burbujas. | + |
| Fermentación de maltosa | Amarillo. | Púrpura. | + |
| Fermentación de ramnosa | Amarillo. | Púrpura. | + |
| Fermentación de xilosa | Amarillo | Púrpura. | - |
| Fermentación de manitol | Amarillo. | Púrpura. | - |
| Fermentación de esculina | Amarillo. | Púrpura. | + |
| Fermentación de dextrosa | Amarillo. | Púrpura. | + |

ANEXOS (Informativo)

ANEXO 1

Fórmulas y preparación de los medios de cultivo requeridos para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos

1 Agar base sangre N° 2 (Difco)

| | |
|----------------------|---------|
| Proteosa – peptona | 15g |
| Hígado digerido | 2,5g |
| Extracto de levadura | 5,0g |
| Cloruro de sodio | 5,0g |
| Agar | 12,0g |
| Agua destilada | 1 litro |

Preparación:

Suspender los ingredientes en el agua y disolver mediante agitación. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. pH final 7,4 ± 0,2.

2 Agar con sangre de carnero desfibrinada

| | |
|--|--------|
| Agar base sangre N° 2 (Disco). | 950 ml |
| Sangre de carnero desfibrinada estéril | 50 ml |

Preparación:

Suspender los ingredientes excepto la sangre, mezclar hasta disolver. Esterilizar a 121°C por 15 minutos, enfriar a 45-50°C, añadir 50 ml de sangre a temperatura ambiente y mezclar. Distribuir en placa de petri estéril, pH final 6,8± 0,2.

NOTA: Para obtener sangre desfibrinada, extraer la cantidad de sangre a utilizar y colóquela en un recipiente adecuado que contenga perlas de vidrios y mezclar vigorosamente.

3 Agar LPM (Moxalactam, fenil etanol, cloruro de litio)

| | |
|--|--------|
| Agar feniletanol (Difco) | 35,5g |
| Glicina anhidra | 10,0g |
| Cloruro de sodio | 5,0g |
| Solución stock moxalactam al 1% en buffer fosfato, pH: 6 | 2,0ml |
| Agua destilada | 1litro |

Preparación:

Suspender los ingredientes excepto el Moxalactam, mezclar para disolver. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 48 - 50°C y añadir la solución de Moxalactam. Distribuir a razón de 12 - 15 ml por placa.

Solución stock Moxalactam

Disolver 1g de Moxalactam, sal sódica o amónica, en 100 ml de una solución 0,1 M de buffer fosfato de potasio, pH: 6. Esterilizar por filtración y congelar en alícuotas de 2 ml

4 Agar LPM más esculina / hierro

| | |
|-------------------------|-------|
| Esculina | 1,0 g |
| Citrato amónico férrico | 0,5 g |

Preparación:

Añadir estos ingredientes a los señalados anteriormente excepto el Moxalactam.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos, enfriar a 48 - 50°C y agregar el Moxalactam esterilizado por filtración. Distribuir a razón de 12 - 15 ml por placa.

5 Agar tripticasa soya con 0,6% de extracto de levadura (ATSE)

| | |
|-------------------------|---------|
| Agar tripticasa de soya | 40,0 g |
| Extracto de levadura | 6,0 g |
| Agua destilada | 1 litro |

Preparación:

Mezclar los ingredientes con el agua y agitar hasta disolver. Esterilizar a 121°C por 15 minutos, pH final 7,3±0,2. Distribuir en placas de petri a razón de 12 - 15 ml

6 Agar Oxford

| | |
|--------------------------|---------|
| Agar base columbia | 39,0g |
| Esculina | 1,0g |
| Citrato amoniacó férrico | 0,5g |
| Cloruro de Litio | 15,0g |
| Cicloheximide | 0,4g |
| Sulfato de colistina | 0,02g |
| Acriflavina | 0,005g |
| Cefotestan | 0,002g |
| Fosfomicina | 0,010g |
| Agua destilada | 1 litro |

Preparación:

Añadir los cuatro primeros ingredientes a 1 litro de agua destilada (Medio Basal), hervir y agitar para completa disolución, esterilice a 121°C por 15 minutos, enfríe a 50°C y asépticamente añada los suplementos, mezcle y vierta en placas de petri estériles.

Para preparar los suplementos, disuelva cicloheximida, sulfato de colistina, acriflavina, cefotestan y fosfomicina en 10 ml de una mezcla 1:1 de etanol-agua destilada. Esterilice el suplemento por filtración antes del uso.

7. **Aggar Oxford Modificado (Agar Mox)**

| | |
|-------------------------|-------|
| Agar base Columbia | 39,0g |
| Esculina | 1,0g |
| Cloruro amónico férrico | 0,5g |
| Cloruro de litio | 15,0g |
| Agar | 2,0g |

Suplemento:

| | |
|----------------------|---------|
| Sulfato de colistina | 10,0 mg |
| Moxalactam | 20,0 mg |

Preparación:

Suspender los ingredientes en 1 litro de agua y caliente para disolver el agar completamente. Esterilizar a 121°C por 10 min, enfriar a 50°C. Rehidratar el suplemento en 10 ml de agua destilada estéril, mezclar y añadir el vial a 1 litro de medio base.

8. **Agar PALCAM**

| | |
|---------------------------|--------|
| Peptona | 23,0g |
| Almidón | 1,0g |
| Cloruro de sodio | 5,0g |
| Cloruro de litio | 15,0g |
| Agar Columbia | 13,0 g |
| Dextrosa | 0,5g |
| Manitol | 10,0g |
| Esculina | 0,8g |
| Citrato de amonio férrico | 0,5g |
| Rojo fenol | 0,08g |
| Suplementos | |
| Sulfato Polimyxina B | 10 mg |
| Acriflavina | 5 mg |
| Ceftazidina | 20 mg |
| Agua Destilada | 500 ml |

Preparación

Pesar 34,4 g del medio basal y suspender en 500 ml de agua destilada. Esterilizar a 121 °C por 15 min. Disolver los suplementos por agitación y añadir al caldo base previamente temperado a 45 – 50 °C. Mezclar suavemente y verter en placas

9 Agar triptosa

| | |
|----------------------|---------|
| Bacto triptosa Disco | 20,0 g |
| Cloruro de sodio | 5,0 g |
| Dextrosa | 1,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Agua destilada | 1 litro |

Preparación:

Mezclar los ingredientes con el agua, esterilizar a 121°C por 15 minutos, pH final 7,2±0,2.

10 Caldo Nutritivo

| | |
|-------------------|---------|
| Extracto de carne | 3,0g |
| Peptona | 5,0g |
| Agua destilada | 1 litro |

Preparación:

Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar para disolver. Distribuir en porciones de 10 ml en tubos 125x16mm ó en porciones de 225ml en fiasas de 500ml. Esterilizar a 121°C por 15 minutos, pH final 6,8±0,2.

11 Caldo base para fermentación de carbohidratos

| | |
|---|--------|
| Proteosa peptona No. 3 | 10,0 g |
| Extracto de carne | 1,0 g |
| Cloruro sódico | 5,0 g |
| Púrpura de bromocresol (solución al 1%) | 0,02g |
| Agua destilada | 1litro |

Preparación:

Disolver los ingredientes mediante agitación, en un litro de agua destilada. Distribuir en porciones de 2 ml en tubos 13 x 100mm que contengan tubos de fermentación invertidos de 6 x 50mm. Esterilizar a 121°C durante 10 minutos, pH final 6,8±0,2.

12 Caldo base para fermentación de carbohidratos, conteniendo soluciones al 0,5% (p/v) de dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa.-

Preparación:

Disolver 5 g del azúcar en un litro del caldo basal. Distribuir en porciones de 2 ml en tubos de 13x100mm que contengan tubos de fermentación invertidos de 6x50mm. Esterilizar a 121° C durante 10 minutos, pH final 6,8 ±0,2.

13 Caldo tripticasa soya con 0,6% de extracto de levadura (BTSE)

| | |
|--------------------------|---------|
| Caldo tripticasa de soya | 30,0 g |
| Extracto de levadura | 6,0 g |
| Agua destilada | 1 litro |

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua, esterilizar a 121°C por 15 minutos, pH final 7,3±0,2. Distribuir en tubos tapa de rosca 125 x 16 mm a razón de 3 ml por tubo.

14 Caldo triptosa

| | |
|----------------------|---------|
| Bacto triptosa Disco | 20,0 g |
| Cloruro de sodio | 5,0 g |
| Dextrosa | 1,0 g |
| Agua destilada | 1 litro |

Preparación:

Mezclar los ingredientes con el agua y esterilizar a 121°C por 15 minutos, pH final 7,2 ± 0,2.

15 Caldo de enriquecimiento para *Listeria*

Caldo tripticasa soya mas extracto de levadura con:

| | |
|------------------------------------|----------|
| Fosfato monopotásico anhidro | 1,35g/L |
| Fosfato disódico anhidro | 9,6g/L |
| Acriflavina HCl | 10,0mg/L |
| Acido Nalidíxico, sal sódica | 40mg/L |
| Cicloheximida | 50mg/L |
| Acido pirúvico, sal sódica (sigma) | |
| Solución acuosa 10% p/v | 11,1ml/L |

Preparación:

Esterilizar el caldo de enriquecimientos sin los agentes selectivos a 121°C por 15 minutos, añadir 11,1 ml de la solución de ácido pirúvico 10% p/v esterilizada por filtración. Preparar las soluciones stock de acriflavina y ácido nalidíxico al 0,5% p/v en agua destilada y la cicloheximide al 1% p/v en una solución etanol-agua 40% v/v. Esterilizar por filtración los 3 ingredientes selectivos anteriormente señalados y añadir al medio basal, agitar para mezclar.

16 Medio SIM (BBL)

| | |
|---|-------|
| Digerido pancreático de caseina (casitona) | 20,1g |
| Digerido pancreático de tejido animal (extracto de carne) | 0,1 g |
| Sulfato amónico ferroso | 0,2 g |
| Tiosulfato de sodio | 0,2 g |
| Agar | 3,5 g |

Preparación:

Rehidratar y añadir 6 ml de medio en tubos tapa de rosca de 125x16mm. Esterilice de acuerdo a las instrucciones del fabricante, pH final 7,3 ± 0,2. No usar medio SIM Difco.

17 Medio para ensayo de movilidad, (MTM semisólido)

| | |
|--------------------|--------|
| Extracto de carne | 3,0 g |
| Peptona o gelisato | 10,0 g |
| Cloruro de sodio | 5,0 g |
| Agar | 4,0 g |
| Agua destilada | 1litro |

Preparación:

Disolver los ingredientes con ayuda del calor; hervir por 1-2 minutos para disolución completa del Agar. Distribuir en porciones de 8 ml en tubos de 150x16mm tapa de rosca. Esterilizar a 121 ° C por 15 minutos, pH final 7,4±0,2.

18 Medio para ensayo de movilidad, CTA Medium

| | |
|---------------------------------|---------|
| L – cistina | 0,5 g |
| Digerido pancreático de caseína | 20,0 g |
| Cloruro de sodio | 5,0 g |
| Agar | 2,5 g |
| Sulfito de sodio | 0,5 g |
| Rojo fenol | 0,017 g |
| Agua destilada | 1litro |

Preparación:

Disolver los ingredientes en el agua destilada y mezclar hasta disolver. Esterilizar a 121 °C por 15 min. Distribuir en tubos.

ANEXO 2

Fórmulas y preparación de los reactivos requeridos para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

1 Solución salina al 0,85 %

| | |
|----------------|---------|
| NaCl | 8,5 g |
| Agua destilada | 1 Litro |

Preparación

Disuelva el NaCl en agua y esterilice a 121 °C por 15 minutos

2 Acido nalidíxico, sal sódica 0,5% p/v

| | |
|------------------|-------|
| Acido nalidíxico | 0,5g |
| Agua destilada | 100ml |

Preparación:

Disolver el ácido nalidíxico en el agua destilada. Esterilizar por filtración

3 Solución hidrociorhídrica de acriflavina 0,5% p/v

| | |
|----------------|-------|
| Acriflavina | 0,5g |
| Agua destilada | 100ml |

Preparación:

Disolver la acriflavina en el agua destilada. Esterilizar por filtración.

4 Agua oxigenada al 3 %

Preparación:

Diluya 1:100 el agua oxigenada al 30%

5 Glicina anhidra

6 Carragenina

7 Etanol absoluto

8 Cicloheximida ó piramicina

9 Solución Púrpura de bromocresol, al 1%

| | |
|------------------------|----------|
| Púrpura de bromocresol | 1,00 g |
| Agua destilada | 100,00ml |

Preparación:

Disolver 1,00g del colorante en agua destilada estéril y completar a 100ml.

10 Reactivo para la coloración de Gram

10.1 Solución de Lugol

| | |
|-------------------|--------|
| Yodo | 1,0g |
| Yoduro de potasio | 2,0g |
| Agua destilada | 100 ml |

Preparación:

Triturar juntos el yoduro de potasio y el yodo en un mortero, agregar pequeñas cantidades de agua mientras tritura, verter la solución resultante en un matraz aforado de 100 ml, enjuagar el mortero y recoger la solución en un balón aforado y llevar a volumen con agua.

10.2 Solución violeta de genciana

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Cristal-violeta (85-90% de colorante) | 2,0g |
| Alcohol etílico | 20,0ml |
| Oxalato de amonio | 0,8g |
| Agua destilada | 80,0ml |

Preparación:

Disolver el Cristal Violeta en el alcohol y el oxalato de amonio en el agua destilada, mezclar las dos soluciones, almacenar 24 h y filtrar.

10.3 Solución de safranina al 0,25%

| | |
|-----------------|----------|
| Safranina O | 0,25g |
| Alcohol etílico | 10,00ml |
| Agua destilada | 100,00ml |

Preparación:

Disolver la safranina en el alcohol etílico y llevar a un volumen de 100ml con agua destilada.

10.4 Solución decolorante alcohol – acetona

Preparación:

Preparar mezclando partes iguales de alcohol etílico y acetona.

**COVENIN
3718:2001**

**CATEGORÍA
C**

FONDONORMA
Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12
Telf. 575.41.11 Fax: 574.13.12
CARACAS

publicación de:



I.C.S: 07.100.30

ISBN: 980-06-2803-3

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

Descriptores: Alimentos, microbiología, aislamiento, identificación, *Listeria monocytogenes*.