

Contacto CONAMER

JCR- LCF- AMMD -AMB- B000213718

De: Microbiólogos de Alimentos <microbiologosdealimentos@gmail.com>
Enviado el: sábado, 27 de noviembre de 2021 02:09 p. m.
Para: rfs@cofepris.gob.mx; Contacto CONAMER
Asunto: Comentarios al Proyecto de Modificación NOM-210 (4)
Datos adjuntos: Copia de Comentarios a la modificación de la NORMA-210 (1).pdf

Con relación a la publicación del PROYECTO de modificación de los incisos 5.3, 6.7, 7.1, 7.2, 9.1 y 9.5; así como de diversos incisos de los apéndices normativos A, B, C, G, H, I y J, de la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Nos permitimos compartir con ustedes una tercer ronda de comentarios.

Reiteramos nuestra respetuosa solicitud de una copia del documento "Propuestas para la Modificación NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos." Indicado como anexo al AIR mirs/52253 (<https://cofemersimir.gob.mx/mirs/52253>) pero no disponible en el Sistema de Manifestación de Impacto Regulatorio

Nos mantenemos atentos a su atención, y reiteramos nuestro interés en participar en las mesas de trabajo que sean necesarias para la implementación de las modificación a la NORMA.

Atentamente
Microbiólogos de análisis de alimentos.



Contacto CONAMER

De: Microbiólogos de Alimentos <microbiologosdealimentos@gmail.com>
Enviado el: sábado, 27 de noviembre de 2021 02:17 p. m.
Para: rfs@cofepris.gob.mx; Contacto CONAMER
Asunto: Re: Comentarios al Proyecto de Modificación NOM-210 (4)

En alcance a nuestro correo anterior compartimos las referencias que justifican el texto propuesto.

- [1] ISO 16140 (all parts), Microbiology of the food chain — Method validation
- [2] ISO 18593, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs
- [3] ISO/TS 17728, Microbiology of the food chain — Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples
- [4] Barrow G.I., & Feltham R.K.A. eds. Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, Great Britain, Third Edition, 1993
- [5] Bertsch D., Rau J., Eugster M.R., Haug M.C., Lawson P.A., Lacroix C., Meile L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013 Feb, 63 pp. 526–532
- [6] Beumer R.R., & Hazeleger W.C. Chromogenic media for the detection and/or enumeration of *Listeria monocytogenes* Results of trials performed by a working group of the International Organization for Standardization – ISO/TC 34/SC 9. *Arch. Lebensmittelhyg.* 2007, 58 pp. 47–50
- [7] Corry J.E.L., Curtis G.D.W., Baird R.M. eds. In: Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. (Publishing R.S.C.) Third Edition, 2012
- [8] Garrity G.M. (editor in chief), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, 2005
- [9] Greenwood M., Willis C., Doswell P., Allen G., Patack K. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 99 pp. 1340–1345
- [10] Graves L.M., Helsel L.O., Steigerwalt A.G., Morey R.E., Daneshvar M.I., Roof S.E. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010, 60 pp. 1280–1288
- [11] Johnson J., Jinneman K., Stelma G., Smith B.G., Lye D., Messer J., Ulaszek J., Evsen L., Gendel S., Bennett R.W., Swaminathan B., Pruckler J., Steigerwalt A., Kathariou S., Yildirim S., Volokhov D., Rasooly A., Chizhikov V., Wiedmann M., Fortes E., Duvall R.E., Hitchins A.D. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70 pp. 4256–4266
- [12] Lang Halter E., Neuhaus K., Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* of a German fresh water pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013 Feb, 63 pp. 641–647
- [13] Leclercq A. Colonial atypical morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. *J. Microbiol. Methods.* 2004, 57 pp. 251–258
- [14] Leclercq A., Clermont D., Bizet C., Grimont P.A., Le Flèche-Matéos A., Roche S.M. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010, 60 pp. 2210–2214
- [15] Liu D., Lawrence M.L., Wiedmann M., Gorski L., Mandrell R.E., Ainsworth A.J. et al. *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44 pp. 4229–4233
- [16] Ottaviani F., Ottaviani M., Agosti M., Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings, P6 ADRIA Quimper, France, 16-18 June, 1997
- [17] Ottaviani F., Ottaviani M., Agosti M. Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *L. mono*. *Industrie Alimentari*, 1997
- [18] Roberts A., Nightingale K., Jeffers G., Fortes E., Kongo J.M., Wiedmann M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology.* 2006, 152 pp. 685–693
- [19] Willis C., Baalham T., Greenwood M., Presland F. Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of *Listeria* in food. *J. Appl. Microbiol.* 2006, 101 pp. 711–717

- [21] Augustin J.-C., Kalmokoff M., Ells T., Favret S., Desreumaux J., Decourseulles Brasseur E. and Gnanou Besse N Modeling the behavior of *Listeria monocytogenes* during enrichment in half Fraser broth - Impact of pooling and the duration of enrichment on the detection of *L. monocytogenes* in food. *Food Microbiol.* 2016, 60 pp. 131–136
- [22] Jagadeesan B., Bastic Schmid V., Klijn A., Mc Mahon W. Validation of Test Portion Pooling for the Detection of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in Dairy Products. Poster presented at: IAFP 2016, St. Louis, Jul 29 - Aug 3
- [23] Angelidis A.S., Kalamaki M.S., Georgiadou S.S. Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a β -D-glucosidase-positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA). *Int. J. Food Microbiol.* 2015, 193 pp. 114–129
- [24] Carpentier B, & Barre L. Guidelines on Sampling the Food Processing Area and Equipment for the Detection of *Listeria monocytogenes*. *Listeria EURL*, 2012
- [25] Barre L., Angelidis A.S., Boussaid D., Decourseulles Brasseur E., Manso E. gnanou besse N. Applicability of the ISO 11290-1 Standard Method for *Listeria monocytogenes* detection in the presence of new *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 238 pp. 281–287
- [26] Henk C., Warchocki S., Emily M., Adam F., Clyde M., Kephart D and Weidmann M Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov., *L. aquatic* sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov., *L. riparia* sp. nov. and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014, 64 pp. 1882–1889
- [27] Weller D., Andrus A., Wiedmann M., Bakker H. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015, 65 pp. 286–292
- [28] ISO 17468, Microbiology of the food chain — Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method
- [29] Gnanou Besse N., Favret S., Desreumaux J., Decourseulles Brasseur E., Kalmokoff M. Evaluation of reduction of Fraser incubation by 24h in the EN ISO 11290-1 standard on detection and diversity of *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 224 pp. 16–21
- [30] ISO 16140:2003,3) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods

El sáb, 27 de nov. de 2021 a la(s) 14:09, Microbiólogos de Alimentos (microbiologosdealimentos@gmail.com) escribió:

Con relación a la publicación del PROYECTO de modificación de los incisos 5.3, 6.7, 7.1, 7.2, 9.1 y 9.5; así como de diversos incisos de los apéndices normativos A, B, C, G, H, I y J, de la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Nos permitimos compartir con ustedes una tercer ronda de comentarios.

Reiteramos nuestra respetuosa solicitud de una copia del documento "Propuestas para la Modificación NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos." Indicado como anexo al AIR mirs/52253 (<https://cofemersimir.gob.mx/mirs/52253>) pero no disponible en el Sistema de Manifestación de Impacto Regulatorio

Nos mantenemos atentos a su atención, y reiteramos nuestro interés en participar en las mesas de trabajo que sean necesarias para la implementación de las modificaciones a la NORMA.

Atentamente
Microbiólogos de análisis de alimentos.

<p>Apéndice C Normativo. Método de referencia para el aislamiento de <i>L. monocytogenes</i>.</p>	<p>Todo el apéndice C debe ser actualizado para adecuarse a la Norma Internacional ISO 11290 Vigente.</p> <p>La NORMA 210 en el numeral 9.4 declara que la norma es equivalente con la ISO 11290 (de 1996, sin embargo la versión vigente de la ISO es 2017 y por lo tanto el texto del apéndice C normativo debería ser actualizarse para seguir siendo equivalente.</p> <p>El método actualmente descrito en la NOM-210 y cuyo objeto es la identificación de <i>L. monocytogenes</i> adolece de no contar con un medio de cultivo diferencial para <i>L. monocytogenes</i> respecto del resto de las listerias. Esta deficiencia técnica es un riesgo grave a la salud de los consumidores pues su falta de selectividad podría estar causando una sub-identificación del microorganismo objetable.</p> <p>El apéndice actual solo se limita a los alimentos y excluye las superficies (que sí están incluidas en el apéndice A normativo), y que este tipo de muestras es de relevancia en la industria.</p> <p>La norma de referencia también incluye en su alcance otro tipo de productos como los piensos.</p>
	<p>Considerando lo anterior se recomienda se propone el siguiente texto:</p>
<p>Microbiología de la cadena alimentaria - Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Listeria monocytogenes</i> y de <i>Listeria spp.</i></p> <p>Método de detección</p> <p>ADVERTENCIA - Para salvaguardar la salud del personal de laboratorio, es fundamental que las pruebas de detección de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria spp.</i> sólo se llevan a cabo en laboratorios debidamente equipados, bajo el control de un microbiólogo capacitado y se debe tener cuidado en la eliminación de todos los materiales incubados. Las personas que utilicen este documento deben estar familiarizadas con las prácticas normales de laboratorio.</p> <p>Este documento no pretende abordar todos los aspectos de seguridad, si los hay, asociados con su uso. Es responsabilidad del usuario establecer prácticas adecuadas de seguridad y salud. En particular, se recomienda que las pruebas para detectar <i>L. monocytogenes</i> se realicen en laboratorios que ofrezcan condiciones de nivel 2 de bioseguridad. Se recomienda encarecidamente que el personal de laboratorio femenino sea consciente del riesgo particular que presenta la infección para el feto en desarrollo de la madre a través de la exposición a <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria spp.</i>, y que el personal gestante y las personas con afecciones o enfermedades subyacentes reconocidas que deterioran la inmunidad mediada por células no manipulan cultivos de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria spp.</i></p> <p>Alcance</p> <p>Este documento especifica un método general para la detección de <i>L. monocytogenes</i> y la detección de <i>Listeria spp.</i> (incluida <i>L. monocytogenes</i>). Este documento es aplicable a: productos destinados al consumo humano y para la alimentación de animales y a muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos. Es posible que algunas especies de <i>Listeria</i> descritas adicionalmente no sean detectadas o confirmadas por este</p>	

método. [5], [10], [12], [14],
[25], [26], [27].

Detección de *Listeria monocytogenes*

Determinación de la detección / no detección de *Listeria monocytogenes* (3.1), en una masa o volumen de producto determinado o en una superficie determinada, cuando las pruebas se lleven a cabo de conformidad con este documento

Principio

General

Las especies de Listeria pueden estar presentes en pequeñas cantidades y a menudo van acompañadas de cantidades considerablemente mayores de otros microorganismos, por lo que es necesario un enriquecimiento selectivo. También es necesario detectar *Listeria spp* y el medio de enriquecimiento selectivo primario, con una concentración reducida de inhibidor, cumple al menos parte de esta función.

NOTA: La presencia de *L monocytogenes* puede estar enmascarada por la presencia de otras especies de *Listeria*, en particular *L innocua* o *L ivanovii*.

Dentro de los límites de este documento, la detección de *L monocytogenes* y de *Listeria spp* requiere cuatro etapas sucesivas, como se describe en el diagrama de flujo.

Enriquecimiento primario en un medio de enriquecimiento líquido selectivo con concentración reducida de agentes selectivos (caldo Demi Fraser)
Inoculación de un medio de enriquecimiento primario selectivo que contiene la mitad de las concentraciones de acriflavina y ácido nalidíxico (medio caldo Fraser), que también se utiliza como líquido de dilución para la porción de ensayo. Incubación de la suspensión inicial a 30 ° C durante 24 a 26 h.

Enriquecimiento secundario es realizado en un medio de enriquecimiento líquido selectivo con concentración total de agentes selectivos (caldo Fraser).
Inoculación de medio de enriquecimiento líquido secundario sin diluir (caldo Fraser) a partir del enriquecimiento primario.

Incubación del caldo Fraser a 37 ° C durante 24 h.

Placas e identificación

De los del enriquecimiento primario y secundario, sembrar en 2 medios sólidos selectivos:

- Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti (ALOA) (véanse las referencias [16] y [17]);
- Cualquier otro medio sólido selectivo a elección del laboratorio complementario a Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti, utilizando un sustrato y / o principio diferente al utilizado en agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti

Incubación del Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti a 37 ° C durante un total de 48 h. Si las colonias son presuntivas *L. monocytogenes* o *Listeria spp.* son evidentes a las 24 h, la incubación puede detenerse en esta etapa. Incubación del segundo medio selectivo a la temperatura apropiada y examen después del

tiempo apropiado.

Confirmación

Subcultivo de las colonias presuntivas *L monocytogenes* o *Listeria spp*, En placa como se describe con anterioridad, y confirmación mediante pruebas morfológicas y / o bioquímicas apropiadas.

Medios de cultivo y reactivos

Para conocer las prácticas de laboratorio actuales, consulte la norma ISO 11133 vigente u otra referencia reconocida.

Equipo y consumibles

- Equipo común de laboratorio y en particular, lo siguiente:
- Aparato para esterilización en seco (horno) o esterilización en húmedo (autoclave).
- Incubadora, capaz de mantenerse entre 25 ° C y 50 ° C.
- Incubadoras, capaces de funcionar a 30 ° C ± 1 ° C, 37 ° C ± 1 ° C y a 25 ° C ± 1 ° C (opcional).
- Baño de agua, capaz de funcionar entre 47 ° C y 50 ° C.
- Asas estériles de aproximadamente 3 mm de diámetro o 10 µl y asa recta inoculación.
- Potenciómetro, capaz de leerse con una precisión de 0,01 unidades de pH a 25 ° C, lo que permite realizar mediciones con una precisión de ± 0,1 unidades de pH.
- Pipetas graduadas o pipetas automáticas, de capacidades nominales de 1 ml y 10 ml.
- Placas de Petri, por ejemplo de 90 mm de diámetro.
- Microscopio, preferiblemente con contraste de fases, y con portaobjetos y cubreobjetos.
- Refrigerador, capaz de funcionar a 5 ° C ± 3 ° C.

Muestreo

El muestreo no forma parte del método especificado en este documento. Si no existe una Norma específica que se ocupe del muestreo del producto en cuestión, se recomienda que las partes interesadas lleguen a un acuerdo sobre este tema.

Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea verdaderamente representativa y que no haya sido dañada o cambiada durante el transporte o almacenamiento.

Preparación de la muestra de prueba

Prepare la muestra de prueba de acuerdo con la NOM-110-SSA1-1994

Procedimiento

Porción de prueba y suspensión inicial

Para la preparación de la suspensión inicial, utilice como líquido de dilución el medio de enriquecimiento primario selectivo (medio caldo Fraser). En general, para preparar la suspensión inicial, añadir una porción de ensayo de 25 g o 25 ml a 225 g o 225 ml del medio de enriquecimiento primario selectivo, para obtener una dilución diez veces mayor y homogeneizar. Precalente el medio de enriquecimiento primario selectivo a temperatura ambiente antes de usarlo.

Este documento ha sido validado para porciones de prueba de 25 g o mL. Se puede utilizar una porción de prueba más pequeña, sin necesidad de validación / verificación adicional, siempre que se mantenga la misma proporción entre el caldo de enriquecimiento primario y la porción de prueba.

Enriquecimiento primario

Incubar el medio de enriquecimiento primario (caldo demi Fraser), a 30 °C durante 25 h ± 1 h.

NOTA 1 Puede desarrollarse una coloración negra durante la incubación.

NOTA 2 Es posible almacenar a 5 °C la muestra preenriquecida después de la incubación antes de transferirla al caldo Fraser por un máximo de 72 h.

Enriquecimiento secundario

Tras la incubación de la suspensión inicial (enriquecimiento primario) durante 25 h ± 1 h, transferir 0,1 ml del cultivo obtenido en (independientemente de su color) a un tubo o botella que contenga 10 ml de caldo Fraser.

Incubar el medio inoculado durante 24 h ± 2 h a 37 °C

NOTA: En el caso de *Listeria* spp. además de la detección de *Listeria monocytogenes*, una incubación adicional de 24 h puede permitir la recuperación de más especies.

Selección e identificación

General.

A partir del cultivo de enriquecimiento primario incubado durante 25 h ± 1 ha 30 °C, inocular, mediante un asa, la superficie del primer medio de siembra selectiva, Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti, para obtener colonias bien separadas.

Proceda de la misma manera con el segundo medio de aislamiento selectivo de su elección.

NOTA: El caldo demi fraser y el caldo Fraser se pueden refrigerar a 5 °C antes del aislamiento en agar selectivo durante un máximo de 72 h. [20]

A partir del medio de enriquecimiento secundario incubado durante 24 h ± 2 ha 37 °C, repita el procedimiento descrito con los dos medios de selectivos.

Invierta las placas de Petri obtenidas y colóquelas en una incubadora a 37 ° C para Agar Listeria de acuerdo con Ottaviani y Agosti. Para el segundo medio selectivo, siga las instrucciones del fabricante.

Para agar Listeria de acuerdo con Ottaviani y Agosti incubar durante un total de 48 h ± 2 h. Si a las 24 horas las colonias de *L. monocytogenes* y *Listeria sp* son evidentes, la incubación puede detenerse en esta etapa. Para el segundo agar selectivo incubar durante el tiempo apropiado. Examine las placas para detectar la presencia de presuntas colonias de *L. monocytogenes* o *Listeria spp*.

NOTA Después de la incubación, las placas se pueden refrigerar a 5 ° C durante un máximo de 48 h antes de la lectura.

Agar Listeria según Ottaviani y Agosti

Considere colonias presuntivas para *L.monocytogenes* las colonias azul verdosas rodeadas por un halo opaco (colonias típicas). Las colonias de *L. ivanovii* también son azul verdosas y están rodeadas por un halo opaco. Considere como presunta *Listeria spp.* las colonias azul verdosas con o sin halo opaco.

NOTA 1 Algunas cepas de *L. monocytogenes* expuestas a condiciones de estrés, particularmente estrés ácido, pueden mostrar un halo muy débil (o incluso ningún halo).

NOTA 2 Algunas cepas *L. monocytogenes* raras se caracterizan por una actividad lenta de PIPLC (fosfatidil inositol fosfolipasa C). Estas bacterias se detectan cuando la duración total de la incubación es superior, por ejemplo, a cuatro días. Algunas de estas cepas podrían ser patógenas. [13] No se han descrito cepas de *L. monocytogenes* como negativas para PIPLC.

NOTA 3 Algunos organismos distintos de *Listeria spp.* puede producir colonias azules en este medio. Véanse el anexo C y la referencia [23].

Segundo medio selectivo

Transcurrido el tiempo apropiado, examine las placas para detectar la presencia de colonias que se consideren presuntas de *Listeria spp.* o *L. monocytogenes*, según sus características para el tipo de medio utilizado.

Confirmación de *Listeria monocytogenes* o *Listeria spp.*

Selección de colonias para confirmación

Para confirmar la presunta *L. monocytogenes*, tome al menos una colonia que sea sospechosa para *L. monocytogenes* . Un aislado confirmado por muestra es suficiente. Si la primera colonia es negativa, tome otras colonias sospechosas para *L. monocytogenes* del medio selectivo (hasta un máximo de cinco colonias de cada placa de cada medio selectivo).

Separe las colonias seleccionadas sobre la superficie de placas presecadas de un agar no selectivo, por ejemplo, agar sangre, agar nutriente, agar con extracto de levadura de triptona soja (ASTEL), de una manera que permita que las colonias aisladas se dispersen. desarrollar.

El uso de agar sangre para cultivo puro permite interpretar la hemólisis, cuando es positiva, ya en esa etapa. Si el estriado en agar sangre no muestra hemólisis, la prueba de hemólisis se realizará mediante punción o en medio líquido.

Coloque las placas en la incubadora a 37 ° C durante 18 a 24 horas o hasta que el crecimiento sea satisfactorio.

Si las colonias no están aisladas, elija una colonia típica de *L. monocytogenes* en otra placa de agar no selectiva. Realizar las siguientes pruebas a partir de colonias de un cultivo puro en agar no selectivo.

Para la confirmación de colonias presuntivas de *Listeria spp.*, Tome al menos una colonia que se presume que es *Listeria spp* Un aislado confirmado por muestra es suficiente. Si la primera colonia es negativa, tome otras colonias que se presume que son *Listeria spp.* de medio selectivo (hasta un máximo de cinco colonias de cada placa de cada medio selectivo).

Para la confirmación de *Listeria spp.* Utilice placas de ASTEL.

Separe las colonias seleccionadas en la superficie de las placas pre-secadas de ASTEL, de una manera que permita el desarrollo de colonias aisladas.

Coloque las placas en la incubadora a 37 ° C durante 18 a 24 horas o hasta que el crecimiento sea satisfactorio.

Colonias típicas de *Listeria spp.* en ASTEL son de 1 mm a 2 mm de diámetro, convexas, incoloras y opacas con un borde completo. Cuando las placas se mantienen a la luz (artificial o natural) en un ángulo de aproximadamente 45 grados, las colonias exhiben un color gris azulado y una superficie granular.

Si las colonias no están aisladas, elija una típica *Listeria spp.* colonia en otra placa de agar no selectivo.

Realice las siguientes pruebas a partir de colonias típicas de un cultivo puro en ASTEL.

1. Confirmación de *L. monocytogenes*

1. General

Realice las pruebas de confirmación para *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 se enumeran (en negrita) en la Tabla 1.

Tabla 1 — Pruebas de confirmación para *L. monocytogenes*

Prueba	<i>L. monocytogenes</i> confirmation tests	Resultados
Obligatoria	Microscopic aspecta Beta-haemolysis L-Rhamnose D-Xylose	Bacilos cortos delgados o cocobacilos + + -

Opcional	Catalase Motility at 25°C CAMP test	+ + +
<p>^a Microscopic aspect is optional for Agar <i>Listeria</i> according to Ottaviani and Agosti and for the second medium if it allows distinction between pathogenic and non-pathogenic <i>Listeria</i> spp.</p>		

NOTA Se puede utilizar un procedimiento alternativo para confirmar el aislamiento como *Listeria monocytogenes*, siempre que se verifique la idoneidad del procedimiento.

Si se demuestra que son fiables, se pueden utilizar galerías miniaturizadas para la identificación bioquímica de *Listeria monocytogenes*. Las cepas raras de *L. monocytogenes* no muestran beta-hemólisis ni una reacción positiva a la prueba CAMP en las condiciones descritas en este documento. Si las colonias típicas de Agar Listeria según Ottaviani y Agosti con actividad PIPLC, incluso si es baja, son negativas para la hemólisis, se recomienda realizar pruebas adicionales (por ejemplo, tinción de Gram, catalasa, movilidad, prueba CAMP, PCR), con el fin de determinar si este aislado es un *L. monocytogenes* no hemolítico.

Reacción de catalasa (opcional)

Tomar una colonia aislada obtenida en y suspenderla en una gota de solución de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos. La formación inmediata de burbujas de gas indica una reacción positiva.

NOTA Una reacción de catalasa realizada a partir de una colonia que se origina en un agar sangre a veces puede dar lugar a resultados falsos positivos.

Prueba de movilidad (opcional)

Tomar una colonia aislada obtenida y suspenderla en un tubo que contenga un medio líquido nutriente no selectivo.

Incubar en la incubadora a 25 ° C durante 8 a 24 h hasta que el medio se vuelva turbio.

Tome una gota del cultivo anterior usando un asa en un portaobjetos de microscopio de vidrio limpio. Coloque un cubreobjetos encima y examínelo con un microscopio.

Listeria spp (incluyendo *L. monocytogenes*) aparecen como bastoncillos delgados y cortos con movilidad giratoria.

Los cultivos que crecen a temperaturas superiores a 25 ° C pueden no mostrar este movimiento. Compárelos siempre con una cepa control de Listeria. Los cocos, bacilos grandes o los bacilos con movilidad de rotatorio rápida no son *Listeria* spp.

Como prueba alternativa de movilidad, utilizando una aguja de inoculación, diluir en agua estéril (u otro diluyente apropiado) un fragmento de colonia aislada obtenido en agar no selectivo. *Listeria* spp. (incluyendo *L. monocytogenes*) aparecen como bastoncillos delgados y cortos con movilidad giratoria.

Como otra prueba alternativa de movilidad, utilizando una asa recta, inocule el agar de movilidad (B.7) con un cultivo tomado de una colonia típica Incubar a 25 ° C durante 48 h ± 2 h.

Examine el crecimiento alrededor de la punción. *Listeria spp* son móviles, dando un patrón de crecimiento típico en forma de paraguas. Si el crecimiento no es suficiente, incube hasta cinco días más y observa el área de inoculación nuevamente.

NOTA Algunas especies nuevas de *Listeria* se han aislado recientemente. [5], [10], [12], [14], [25], [26], [27] La mayoría de ellas no son móviles en el agar de movilidad.

Aspecto microscópico (opcional en el caso de uso de agar específico para *Listeria spp*. Patógena)

Haga una preparación microscópica (por ejemplo, la tinción de Gram, microscopía húmeda) en una colonia bien aislada de *Listeria spp*. (incluyendo *L. monocytogenes*) aparecen como Gram positivos (si se realiza esta tinción), bastoncillos delgados, cortos o cocobacilos, con movilidad giratoria cuando se originan en un cultivo fresco.

Pruebas de hemólisis

General

Elija una de las pruebas de hemólisis descritas a continuación

NOTA Existen raras cepas de *L. monocytogenes* que no muestran b-hemólisis o una reacción positiva a la prueba CAMP en las condiciones descritas en este documento.

Hemólisis en agar sangre

Si las características morfológicas y fisiológicas son indicativas de *Listeria spp*, Inocular placas de agar sangre (B.8) para determinar la reacción hemolítica. Seque bien la superficie del agar antes de usar. Tome una colonia aislada usando un asa, luego pinche una sección de agar. Repita para cada cultivo. En la misma placa, si es posible, inocule los cultivos de control positivos (*L. monocytogenes*) y negativos (*L. innocua*). Por ejemplo, se pueden utilizar *L. monocytogenes* 4b WDCM 00021 o *L. monocytogenes* 1 / 2a WDCM 00109 y *L. innocua* WDCM 00017.

Después de la incubación a 37 ° C durante 24 h ± 2 h, examinar las cepas de prueba y los controles. *L. monocytogenes* muestra zonas claras, estrechas y claras de hemólisis; *L. innocua* no muestra una zona clara alrededor de la estría. *L. seeligeri* muestra principalmente una zona débil de hemólisis. *L. ivanovii* suele mostrar zonas de hemólisis amplias y claramente delimitadas. Examine las placas con una luz brillante para comparar los cultivos de prueba con los controles.

NOTA 1 La reacción de hemólisis se ve más fácilmente eliminando cualquier crecimiento de colonia en la superficie del agar alrededor de la marca del inóculo. NOTA 2 La prueba de hemólisis se puede realizar pinchando la placa de agar sangre utilizada para la prueba CAMP.

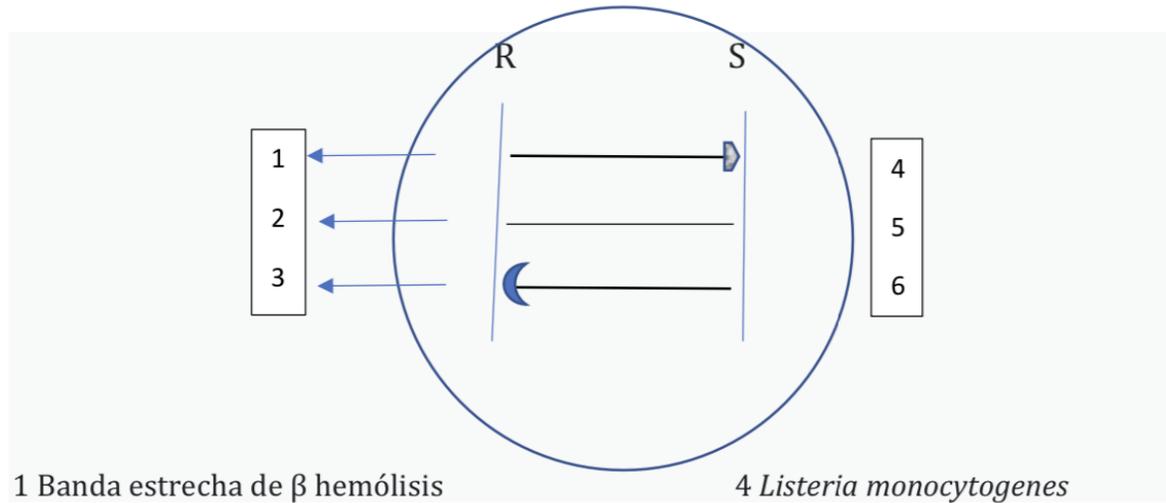
Reacción de hemólisis con glóbulos rojos

La reacción hemolítica también se puede llevar a cabo usando glóbulos rojos de la siguiente manera. Dispersar la colonia en 150 µl de un medio nutritivo líquido no selectivo, incubar a 37 ° C durante 2 h. Añadir 150 µl de suspensión de glóbulos rojos. Incubar a 37 ° C durante 15 min a 60 min, luego refrigerar a 5 ° C durante aproximadamente 2 h. Examine la actividad hemolítica. Si la reacción es dudosa, dejar a 5 ° C hasta 24 h ± 2 h. Una sedimentación de

glóbulos rojos (formación de un punto rojo en la parte inferior de los tubos) indica una reacción negativa.
Incluya controles positivos y negativos.

Prueba CAMP (opcional)

Si el resultado de la prueba de hemólisis es difícil de interpretar, se recomienda la prueba CAMP para demostrar claramente que la hemólisis se debe a la actividad de la listeriolisina. Se requiere una cepa β -hemolítica de *Staphylococcus aureus* (p. Ej., WDCM 00034) y una cepa de *Rhodococcus equi* (p. Ej., WDCM 0028) para realizar la prueba CAMP. No todas las cepas de *S aureus* son adecuadas para la prueba CAMP. Separe cada uno de los cultivos de *S aureus* y *R equi* en líneas simples a lo largo de la placa de agar sangre de modo que los dos cultivos sean paralelos y diametralmente opuestos (ver Figura). Se requiere un inóculo ligero y uniforme. Esto se puede obtener usando un asa de inoculación o un alambre sostenido en ángulo recto con el agar. Separe una colonia bien aislada de la cepa bajo prueba de una manera similar en ángulo recto con estos cultivos para que el cultivo de prueba y los cultivos de *S. aureus* y *R. equi* no se toquen, pero en su punto más cercano midan aproximadamente 1 mm. a 2 mm de distancia. Se pueden estriar varias cepas de prueba en la misma placa.



2 no hemólisis

5 *Listeria innocua*

3 Banda ancha de β hemólisis

6 *Listeria ivanovii*

Figura 1. Interpretación de la inoculación de la prueba de CAMP

Figura 1. Interpretación de la inoculación de la prueba de CAMP

Las líneas verticales en la Figura 1 representan rayas de *S aureus* (S) y *R equi* (R). Las líneas horizontales representan rayas de los cultivos de prueba. Las áreas sombreadas indican las ubicaciones de la hemólisis mejorada. El área punteada indica la zona de influencia del cultivo de *S aureus*.

Simultáneamente, cultivos de control de estrias de *L monocytogenes*, *L innocua* y *L ivanovii*. Por ejemplo, se pueden utilizar *L monocytogenes* 4b WDCM 00021, *L monocytogenes* 1 / 2a WDCM 00109, *L innocua* WDCM 00017 y *L ivanovii* WDCM 00018. Mantener cultivos madre como se especifica en ISO 11133.

Si se utiliza agar sangre, incube las placas a 37 ° C durante 18 a 24 h. Si se utilizan placas de doble capa, incube a 37 ° C durante 12 a 18 h.

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

Una reacción positiva con *S aureus* aparece como una pequeña zona de hemólisis potenciada que se extiende solo unos 2 mm desde la cepa de prueba y dentro de la zona débilmente hemolítica debido al crecimiento del cultivo de *S aureus*.

No se producen grandes zonas de hemólisis en el área de *S aureus* y *L monocytogenes*.

1. Utilización de carbohidratos

Utilizando un asa, inocular cada uno de los caldos de utilización de carbohidratos con los cultivos obtenidos del agar no selectivo. Incubar a 37 ° C. Las reacciones positivas (formación de ácido) están indicadas por un color amarillo y ocurren principalmente dentro de las 24 a 48 horas para los tubos de micro volúmenes y hasta 5 días para los tubos de macro volúmenes. La L-ramnosa y la D- xilosa se utilizan para la confirmación de *L monocytogenes*, que es L-ramnosa positiva y D-xilosa negativa.

NOTA Existen raras cepas de *L monocytogenes* que no fermentan la L-Ramnosa. [15], [18]

Para micro volúmenes, las reacciones son más rápidas. El nivel de inoculación en comparación con el volumen total es un factor importante. Para cada protocolo elegido, es importante verificar el tiempo necesario para obtener una coloración amarilla. Se aconseja utilizar controles. Por ejemplo, se pueden utilizar *L monocytogenes* 4b WDCM 00021, *L innocua* WDCM 00017 y *L ivanovii* WDCM 00018..

Confirmación de *Listeria* spp.

General

Realizar las pruebas de confirmación para *Listeria* spp. de una colonia típica. Se utilizarán cepas de control positivas y negativas adecuadas para cada una de las pruebas de confirmación.

Realice como mínimo las pruebas obligatorias que se enumeran (en negrita) en la Tabla 2.

Para más pruebas, si se requiere la identificación de especies de *Listeria*, consulte el Anexo D.

Tabla 2 - Pruebas de confirmación para *Listeria spp.*

Prueba	<i>Listeria spp</i>	Resultados
Obligatoria		
Microscopic aspecta (9.5.2.4)		
Catalasa (9.5.2.2)		Bacilos cortos delgados o cocobacilos
		+
Opcional		
Prueba VP (9.5.3.5)		
Motility at 25°C (9.5.2.3)		+
		+

NOTA 1 Se puede utilizar un procedimiento alternativo para confirmar el aislamiento como *Listeria spp.*, Siempre que se verifique la idoneidad del procedimiento relevante.

NOTA 2 Es posible que algunas especies nuevas de *Listeria* aisladas recientemente no correspondan a este esquema, en particular para la movilidad, la prueba de VP y el crecimiento a 37 ° C (véanse, por ejemplo, las referencias [4], [10], [25], [26] y [27]).

Reacción de Voges - Proskauer (VP) (opcional)

Utilizando un asa, inocular un tubo que contenga 3 ml del medio VP.

Incubar a 37 ° C durante 24 h ± 2 h. Después de la incubación, añadir 0,6 ml de solución de α-naftol al 5% y 0,2 ml de solución de hidróxido de potasio al 40% (B.13.3). Agite bien, incline el tubo (para aumentar el área del aire interfaz líquida). Examinar después de 15 min y 1 h. Una reacción positiva está indicada por un color rojo intenso. *Listeria spp* son VP positivos.

NOTA Algunas especies nuevas de *Listeria* se han aislado recientemente. [5], [10], [12], [14], [25], [26], [27] La mayoría de ellas son VP negativas.

Interpretación de las propiedades morfológicas y fisiológicas y de las reacciones bioquímicas

Todas las especies de *Listeria*. son pequeños bacilos grampositivos o cocobacilos que dan una reacción positiva en la prueba de catalasa. *L. monocytogenes* se confirman de acuerdo con las pruebas enumeradas en la Tabla 1 y *Listeria spp* se confirman de acuerdo con las pruebas enumeradas en la Tabla 2.

Caracterización adicional de cepas aisladas (opcional)

Los aislados que se consideran *L. monocytogenes* pueden enviarse para su caracterización adicional a un Laboratorio de Referencia de *Listeria* nacional o regional reconocido. El envío irá acompañado de toda la información posible sobre la cepa o cepas.

Expresión de resultados

De acuerdo con la interpretación de los resultados, informar si se detecta o no *L monocytogenes* y / o si se detecta *Listeria spp* se detecta o no en la muestra de ensayo especificando la masa en gramos, el volumen en mililitros de la muestra analizada, la superficie en centímetros cuadrados o por dispositivo de muestra.

Informe de prueba

El informe de la prueba deberá especificar el método utilizado y los resultados obtenidos y cumplir con lo indicado en la ISO 17025

Figura A1 Diagrama de flujo

Diagram of procedure

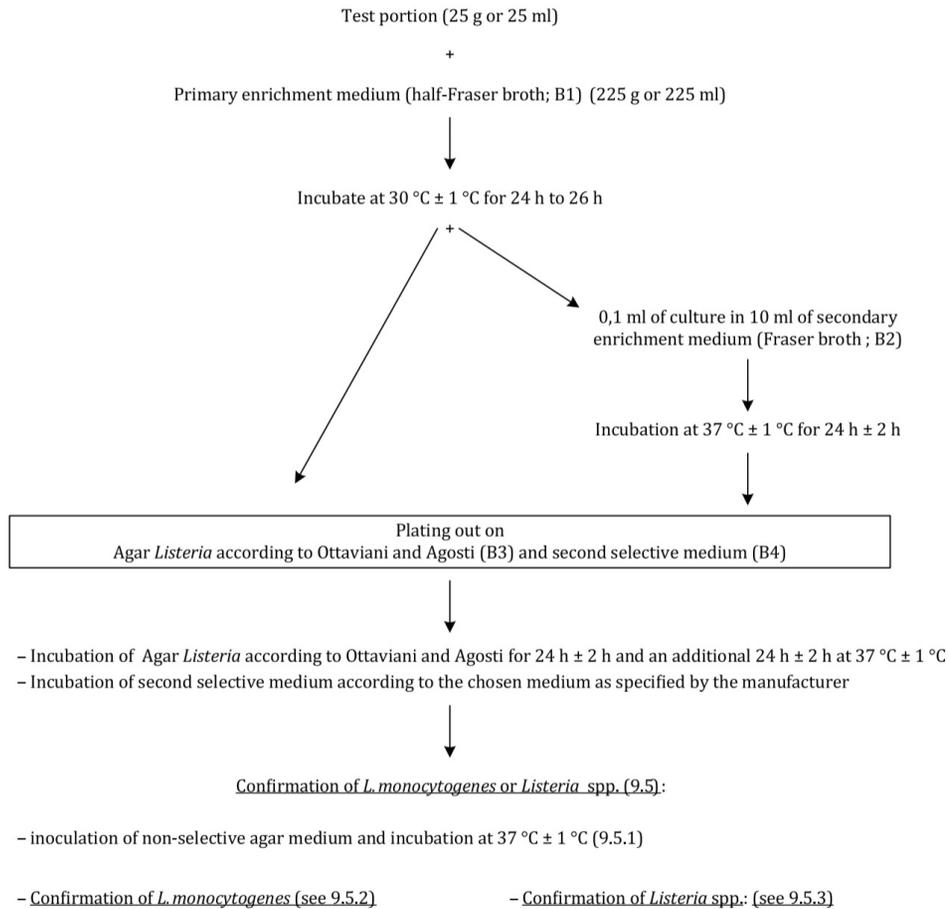


Figure A.1 — Diagram of procedure

