
NORMA CUBANA

NC

ISO 11290-2: 2015
(Publicada por la ISO en 1998)

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL — MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y EL RECuento DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* — PARTE 2: MÉTODO DE RECuento
(ISO 11290-2: 1998/AM 1: 2004, IDT)**

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 2: Enumeration method

ICS: 07.100.30

1. Edición Junio 2015
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261, El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 7830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

NC-ISO 11290-2: 2015

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC) es el Órgano Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 61 de Microbiología, integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Dirección Nacional de Salud Ambiental -Ministerio de Salud Pública (DNSA-MINSAP)
 - Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM-MINSAP)
 - Laboratorio Nacional de Higiene de los Alimentos (LNHA-IMV-MINAG)
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
 - Laboratorio de Cubacontrol S.A. (MINCEX)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
 - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-IFAL-MES)
 - Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE- MINSAP)
 - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA-MES)
 - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP-MINAL)
 - Laboratorio Central de Calidad (CID-CI. MINCIN)
 - ALIMPORT (MINCEX)
 - Escuela de Hotelería y Turismo (MINTUR)
 - Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia (IIIA-MINAL)
 - Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN-CITMA)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la versión en inglés de la ISO 11290-2: 1998 con la Modificación 1: 2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method - Amendment 1: Modification of the isolation media.
- Se aplicará para todos los alimentos para consumo humano y de animales.
- Consta de 2 Anexos Normativos y 1 Anexo Informativo

© NC, 2015

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

Índice

0 INTRODUCCIÓN	4
1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN.....	5
2 REFERENCIAS NORMATIVAS	5
3 TÉRMINOS Y DEFINICIONES	6
4 PRINCIPIO	6
5 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	6
6 APARATOS Y CRISTALERÍA	7
7 TOMA DE MUESTRA.....	8
8 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	8
9 PROCEDIMIENTO	8
10 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS (VÉASE LA NORMA NC-ISO 7218).....	13
11 PRECISIÓN.....	15
12 CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	15
13 INFORME DEL ENSAYO	15
ANEXO A (NORMATIVO)	16
ANEXO B (NORMATIVO)	17
ANEXO C (INFORMATIVO)	26
BIBLIOGRAFÍA	27

0 Introducción

Debido a la gran variedad de alimentos para alimentación humana y animal, puede que este método horizontal no resulte adecuado en todos los detalles, para algunos productos. En tal caso se pueden utilizar otros métodos diferentes, específicos para estos productos si resulta absolutamente necesario por razones técnicas justificadas. No obstante, se debería intentar por todos los medios aplicar este método horizontal en todo lo posible.

En la próxima revisión de esta norma cubana, se tendrá en cuenta toda la información disponible en ese momento en cuanto a la utilización de este método horizontal y las razones de posibles desviaciones del mismo en caso de productos específicos.

La armonización de los métodos de análisis no puede ser inmediata y por ello es posible que existan normas internacionales o nacionales que no cumplen con este método horizontal para ciertos grupos de productos. Es de esperar que cuando dichas normas se revisen, se modifiquen para cumplir con esta Norma Cubana para que llegue un momento donde sólo existan desviaciones a este método, necesarias por razones técnicas bien justificadas.

ADVERTENCIA- Con objeto de salvaguardar la salud del personal del laboratorio, se recomienda firmemente que las pruebas para detectar *Listeria monocytogenes* se realicen en laboratorios equipados convenientemente, bajo el control de un microbiólogo experimentado, y se aconseja, especial cuidado con los desechos de material incubado. En particular, es especialmente recomendable que las mujeres embarazadas no manipulen cultivos de *Listeria monocytogenes*.

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL – MÉTODO
HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y EL RECuento DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.
PARTE 2: MÉTODO DE RECuento.**

1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Cubana describe un método horizontal para el recuento de *Listeria monocytogenes* viables.

Teniendo en cuenta las limitaciones puestas de manifiesto en la introducción, esta parte de la norma NC-ISO 11290 es aplicable a los productos destinados al consumo humano o a la alimentación animal.

En general (véase la nota del apartado 9.2.1), el límite inferior de recuento de este método es de 10 *L. monocytogenes* por mililitro de muestra para los productos líquidos, y de 100 *L. monocytogenes* por gramo de muestra para el resto de los productos.

2 REFERENCIAS NORMATIVAS

Las normas que a continuación se indican son indispensables para la aplicación de esta norma. Para las referencias con fecha, solo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha se aplica a la última edición de la norma (incluyendo cualquier modificación de esta)

-NC-ISO 6887-1- Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y las diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.

-ISO 6887-2- Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y las diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 2: Reglas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos.

-ISO 6887-3- Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y las diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescado y productos de la pesca.

-ISO 6887-4- Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y las diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 4: Reglas específicas para la preparación de productos distintos a leche y productos lácteos, carne y productos cárnicos y pescado y productos de la pesca.

-NC-ISO 7218 - Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reglas generales para los exámenes microbiológicos.

-NC-ISO 11133-1-2013 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. Parte 1: Guías generales en el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.

-NC-ISO 11133-2: 2013- Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. Parte 2: Guías prácticas para las pruebas de desempeño de los medios de cultivo.

3 TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Para los propósitos de esta Norma Cubana se aplican los siguientes términos y definiciones.

3.1

Listeria monocytogenes

Microorganismos que forman colonias características en medios sólidos selectivos especificados y que presentan las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas descritas en esta parte de la NC-ISO 11290

3.2

recuento de *Listeria monocytogenes*

determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Listeria monocytogenes* en una cantidad, peso o volumen dado de producto, cuando se realizan los ensayos de acuerdo con esta parte de la norma

4 PRINCIPIO

En el marco de esta parte de la norma, el recuento de *Listeria monocytogenes* requiere seis etapas sucesivas (véase esquema en Anexo A).

4.1 Preparación de la suspensión inicial en uno de los dos disolventes descritos según se requiera.

4.2 Revivificación durante 1 h a 20 °C.

4.3 Siembra en placa, en una superficie de medio de cultivo sólido selectivo dispuesto sobre dos placas de Petri, de una cantidad especificada de la muestra de ensayo en el caso de los productos líquidos, o de la suspensión inicial para el resto de los productos.

Preparación de otras placas, bajo iguales condiciones, empleando diluciones decimales de la muestra de ensayo o de la suspensión inicial

4.4 Incubación de las placas a 37 °C y análisis tras 24 h y 48 h.

4.5 Confirmación de las supuestas colonias de *Listeria monocytogenes* a través de los ensayos descritos.

4.6 Cálculo del número de *Listeria monocytogenes* por gramo o mililitro de muestra de ensayo a partir del número de colonias confirmadas.

5 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

En lo que se refiere a las prácticas habituales de laboratorio, véase la Normas NC-ISO 7218, NC-ISO 11133-1 y NC-ISO 11133-2 para la preparación, producción y evaluación del desempeño de los medios de cultivo.

NOTA: Debido al gran número de medios de cultivo y reactivos, se ha considerado preferible, en favor de una mayor claridad del texto, indicar su composición y preparación en el anexo B.

6 APARATOS Y CRISTALERÍA

El equipamiento microbiológico habitual (véase la Norma NC-ISO 7218) y en particular los siguientes.

6.1 Aparato para esterilización en seco (horno) o esterilización húmeda (autoclave)

Véase la Norma NC-ISO 7218.

6.2 Cabina de secado o incubadora que pueda mantener la temperatura entre $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ y $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$

6.3 Incubadoras, para mantener los medios inoculados, placas y tubos en los siguientes rangos de temperatura

a) $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (opcional)

b) $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (opcional)

c) $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$

6.4 Baño de agua, que pueda mantenerse entre 44 °C y 47 °C .

6.5 Asas, de platino-iridio o de níquel-cromo, de un diámetro aproximado de 3 mm, y agujas de siembra por punción del mismo material, o asas y agujas de siembra desechables estériles equivalentes.

6.6 Extensores de siembra de vidrio o de plástico estériles

6.7 pH-metro con una resolución de 0.01 unidades de pH a 25 °C , permitiendo que las medidas realizadas tengan una precisión de $\pm 0,1$ unidades de pH.

6.8 Tubos de ensayo o frascos, de capacidad adecuada, para la esterilización y almacenamiento de los medios de cultivo y la incubación de los medios líquidos.

6.9 Pipetas graduadas de vaciado total, de capacidad nominal de 1 mL y 10 mL, graduadas en divisiones de 0,1 mL y 0,5 mL respectivamente.

6.10 Placas de Petri, de diámetro entre 90 mm y 140 mm.

6.11 Jarras, adecuadas para la incubación microaeróbica (opcional)

6.12 Mezcla de gases (opcional), de composición específica para incubación microaeróbica: 5 % a 12% CO_2 , 5 % a 15 % O_2 y N_2 hasta el 100 %.

6.13 Equipo para la prueba de iluminación de Henry (opcional). Véase Anexo C

6.14 Microscopio, preferentemente de contraste de fases, con porta y cubre-objetos.

7 TOMA DE MUESTRA

La toma de muestra no constituye una parte del método especificado en esta Norma Cubana. Si no existe una norma para la toma de muestras del producto en cuestión, se recomienda que las partes interesadas adopten un acuerdo sobre este punto.

Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea verdaderamente representativa y que no haya sufrido daños o cambios durante el transporte o el almacenamiento (véase la NC-ISO 7218).

8 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Preparar la muestra de acuerdo a la Norma Internacional específica que corresponda al producto. Si no existiera Norma Internacional específica, se recomienda que las partes implicadas lleguen a un acuerdo con respecto a este punto.

9 PROCEDIMIENTO

9.1 Porción para ensayo y suspensión inicial

Véase la Norma ISO 6887 o cualquier Norma Internacional específica apropiada para el producto.

Como disolvente de la suspensión inicial se empleará bien disolución tamponada de peptona (B.1) o bien base de caldo Fraser media concentración (B.2).

El caldo Fraser media concentración **sin la adición de agentes de selección** puede utilizarse como disolvente para las muestras de alimentos o de preparados tanto en el método de detección (véase la NC-ISO 11290-1) como en este método de recuento. se realizan sobre una misma muestra de ensayo. Este procedimiento sirve para evitar preparar dos suspensiones iniciales; los agentes de selección se añaden a la suspensión una vez se ha utilizado la porción de ensayo para el recuento.

Se deja reposar la suspensión inicial durante $1\text{h} \pm 5\text{ min}$ a $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ para revivir a los microorganismos lesionados.

Si se va a preparar una serie de diluciones ésta se prepara tras la revivificación.

9.2 Inoculación e incubación

9.2.1 Se trasvasan, utilizando una pipeta estéril (6.9), 0,1 mL de la suspensión inicial (9.1) a dos placas de agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti (ALOA) (B.3), secadas previamente en la incubadora (6.2) si fuera necesario.

Si es necesario, se repite el procedimiento utilizando diluciones decimales adicionales.

NOTA - Cuando, para determinados productos, sea necesario estimar números bajos de *Listeria monocytogenes*, el límite de recuento puede reducirse según un factor de 10 si se examina 1,0 mL de la suspensión inicial. Se distribuye el mL del inóculo bien sobre la superficie del medio de agar de una placa Petri grande (140 mm) o bien sobre la superficie del medio de agar de tres placas Petri pequeñas (90 mm) empleando un extensor de siembra estéril (6.6). En ambos casos, se prepararán duplicados utilizando dos placas grandes o seis placas pequeñas.

9.2.2 Se extiende el inóculo cuidadosamente y tan rápidamente como sea posible sobre la superficie de la placa de agar, evitando tocar las paredes de la placa con el extensor de siembra. Se utilizará un extensor de siembra estéril nuevo para cada placa¹. Se dejan las placas cerradas a temperatura ambiente durante unos 15 min para que el agar absorba el inóculo.

9.2.3 Se invierten las placas preparadas según el apartado 9.2.2 y se colocan en la incubadora [6.3 c)] a 35 °C.

9.3 Recuento de colonias características

9.3.1 Tras una incubación de 24 h, seguida de otras 18 h a 24 h si el crecimiento ha sido pequeño o si no se observan colonias tras 24 h de incubación, se examina en las placas la presencia (9.3.2) de colonias, que presumiblemente serán de especies de *Listeria*.

9.3.2 Se consideran como *L. monocytogenes* las colonias verde-azuladas rodeadas de un halo opaco (colonias típicas). Si el crecimiento es escaso, o si no se observan colonias o, si no hay colonias típicas después de 24 h \pm 3 h de incubación, se vuelven a incubar las placas durante 24 h \pm 3 h más.

NOTA - Algunas cepas de *L. monocytogenes* presentan un halo muy débil (incluso sin halo) en los casos de estrés, particularmente en el caso de estrés ácido.

NOTA - Algunas cepas de *L. monocytogenes* se caracterizan por una actividad lenta de la PIPLC (fosfolipasa C fosfatidil inositol). Dichas bacterias se detectan cuando la duración total de la incubación es más de, por ejemplo, cuatro días. Algunas de estas cepas podrían ser patógenas (véase la referencia [1]).

9.3.3 Se cuentan todas las colonias características que se supone son de las especies de *Listeria* (9.3.2) en todas las placas que contengan menos de 150 colonias tanto características como no características.

9.4 Confirmación de las especies de *Listeria*

9.4.1 Selección de las colonias para la confirmación

9.4.1.1 Tras el período de incubación (9.3.1), se guardan las placas que contengan menos de 150 colonias que se suponen son de las especies de *Listeria* a todas las diluciones y, si es posible, a dos diluciones consecutivas.

Se escogen cinco de las colonias supuestas de cada una de las placas que se conservan. En el caso de que haya menos de cinco supuestas colonias en una placa, se escogerán todas las colonias supuestas para su confirmación.

¹ Puede utilizarse el mismo extensor de siembra para una muestra dada, si se empieza por la dilución superior.

9.4.1.2 Se siembran formando líneas las colonias escogidas sobre la superficie de placas de agar triptona soya/extracto de levadura (TSYEA) previamente secadas (B.4) para permitir el desarrollo de colonias perfectamente aisladas.

Se introducen las placas en la incubadora [6.3 c)] a 35 °C durante 18 h a 24 h o hasta un crecimiento satisfactorio.

Las colonias características tienen un diámetro de entre 1 mm y 2 mm, son convexas, incoloras y opacas con un borde definido. Si las colonias no quedan bien separadas, se picará una colonia característica de las especies de *Listeria* en otra placa de TSYEA. A partir de las colonias de un cultivo puro en TSYEA se realizarán los siguientes ensayos.

NOTA - Si es necesario, puede realizarse el ensayo de iluminación de Henry (véase el anexo C y la nota del apartado B.4.2). En ese caso, las colonias aparecen azuladas con superficie granulosa.

9.4.2 Reacción de la catalasa. Se coge una colonia aislada según el apartado 9.4.1.2 y se suspende en una gota de la disolución de peróxido de hidrógeno (B.10) puesta en un portaobjetos. La formación inmediata de burbujas de gas indica una reacción positiva (véase la Norma NC-ISO 7218).

9.4.3 Tinción de Gram. La tinción de Gram se lleva a cabo con una colonia aislada según el apartado 9.4.1.2 (véase la Norma NC-ISO 7218). Las especies de *Listeria* aparecen como bacilos cortos y estrechos Gram positivos de un tamaño aproximado de entre 0,4 mm y 0,5 mm de diámetro y entre 1 mm y 2 mm de longitud.

9.4.4 Prueba de motilidad (si es necesario)². Se coge una colonia aislada según el apartado 9.4.1.2 y se suspende en un tubo que contenga TSYEB (B.5).

Se incuba en incubadora [6.3 b)] a 25 °C entre 8 h y 24 h hasta observar turbidez en el medio.

Se deposita una gota del cultivo anterior sobre un portaobjetos de vidrio limpio utilizando un asa de siembra (6.5). Se coloca un cubreobjetos en la parte superior y se examina al microscopio (6.14).

Las especies de *Listeria* aparecen como bacilos delgados y cortos con movimientos semejantes a volteretas

Los cultivos crecidos a temperaturas superiores a los 25 °C pueden carecer de este tipo de movimiento. Siempre se compararán con un cultivo conocido. Los cocos, los bacilos largos o los bacilos con movimiento natatorio no son especies de *Listeria*.

Como prueba de movilidad alternativa, se picará agar de motilidad (B.8) con una colonia característica en TSYEA (9.4.1.2) empleando una aguja de inoculación (6.5). Se incuba durante 48 h en la incubadora [6.3 b)] a 25 °C.

Se examina el crecimiento alrededor del punto de picado. Las especies de *Listeria* son móviles, dando un patrón de crecimiento típico, en forma de paraguas, situadas inmediatamente por debajo de la superficie del agar. Si no ha habido suficiente crecimiento, se incubará durante un período adicional de hasta cinco días, examinando el cultivo durante este tiempo.

² Este examen no es necesario en todos los casos si el análisis lo realiza un microbiólogo que trabaja de forma regular en la detección de *Listeria monocytogenes*.

9.5 Confirmación de *L. monocytogenes*

9.5.1 Ensayo de hemólisis

9.5.1.1 Si las características morfológicas y fisiológicas y la reacción de la catalasa son indicativas de las especies de *Listeria*, se determinará la reacción de hemólisis en placas de agar sangre de oveja (B.6).

Antes de ser utilizado, se seca a conciencia la superficie del agar sangre, y se marca a continuación en cuadrados. Se coge una colonia aislada según el apartado 9.4.1.2 para cada cultivo y se pica uno de los cuadrados marcados empleando una aguja (6.5) También se picarán cultivos de controles positivo (*L. monocytogenes*) y negativo (*L. innocua*).

Tras una incubación a 37 °C durante 24 h ± 2 h, se examinan las cepas ensayadas y los controles. *L. monocytogenes* presenta áreas estrechas, claras y limpias de β-hemólisis³; *L. innocua* no presenta un área clara alrededor del punto de picado. *L. seeligeri* presenta un área de β-hemólisis débil. *L. ivanovii* suele presentar áreas de β-hemólisis anchas, claramente definidas. Las placas se examinarán por transparencia para comparar los cultivos de ensayo con los controles.

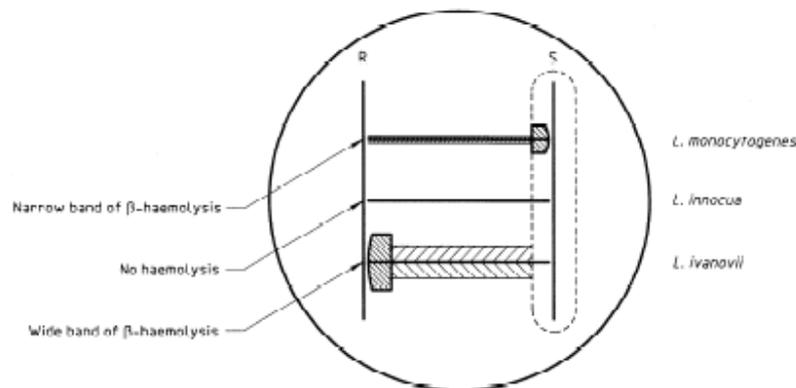
9.5.1.2 La reacción de hemólisis también puede realizarse utilizando el ensayo CAMP (9.5.3) o empleando eritrocitos en suspensión como se indica a continuación. Se dispersa la colonia en 150 mL de TSYEB (B.5); se incuba a 37 °C durante 2 h. Se añaden 150 mL de una suspensión de eritrocitos de sangre de oveja (B.12). Se incuba a 37 °C de 15 min a 60 min, y a continuación se enfría a +3 °C ± 2 °C durante unas 2 h. Se examina la presencia o ausencia de β-hemólisis. Si la reacción no es definitiva, se dejará el cultivo a 3 °C ± 2 °C hasta un máximo de 24 h.

9.5.2 Utilización de carbohidratos. Se inocula cada uno de los caldos para el uso de carbohidratos (B.7) con los cultivos en TSYEB (9.4.4) utilizando un asa de siembra (6.5). Se incuba a 37 °C durante un tiempo de hasta cinco días. Las reacciones positivas [formación de ácido(s)] se manifiestan por la evolución del color púrpura a amarillo y ocurren mayoritariamente entre las 24 h y las 48 h.

9.5.3 Ensayo CAMP. Extender sendos cultivos de *Staphylococcus aureus* y de *Rhodococcus equi* (B.9.4) en forma de líneas individuales sobre una placa de agar sangre de oveja (B.6 ó B.9.3) de manera que los dos cultivos queden paralelos y diametralmente opuestos (véase la figura 1). Se requiere un inóculo fino y homogéneo. Esto puede conseguirse utilizando un asa de inoculación o aguja (6.5) mantenido en un ángulo recto respecto al agar.

Se extiende la cepa de ensayo aislada según el apartado 9.4.1.2 siguiendo el mismo procedimiento, en un ángulo recto respecto a los cultivos anteriores de forma que el cultivo de ensayo y los cultivos de *S. aureus* y *R. equi* no se toquen sino que en sus puntos más cercanos queden separados por una distancia de entre 1 mm y 2 mm. Pueden extenderse varias cepas de ensayo en una misma placa.

³ El área de β-hemólisis se observa más fácilmente cuando se retiran todas las colonias que hayan crecido en la superficie del agar alrededor de la zona del inóculo.



NOTAS

1 Se inocularán placas finas de agar sangre (B.6 o B.9.3) según se indica en el diagrama. Las líneas verticales representan las estrias de *S. aureus* (S) y *R. equi* (R). Las líneas horizontales representan las estrias de los cultivos de ensayo. Las áreas sombreadas indican la posición de zonas de hemólisis incrementada.

2 La región punteada muestra la zona de influencia del cultivo de *S. aureus*.

Fig. 1 - Inoculación e interpretación de las placas del ensayo CAMP

Simultáneamente, se extienden cultivos control de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*. Si se emplea Agar Sangre (B.6), se incubarán las placas a 37 °C entre 18 h y 24 h. Si se utilizan placas de dos capas (B.9.3), se incubarán a 37 °C entre 12 h y 18 h.

Un área de β -hemólisis incrementada en la intersección entre la cepa de ensayo y los cultivos de *S. aureus* y *R. equi* se considerará como reacción positiva.

La reacción positiva con *R. equi* se muestra como un área de hemólisis ancha (de 5 mm a 10 mm) con forma en punta de flecha. Se considerará que la reacción es negativa si se forma un área pequeña de hemólisis débil que, aproximadamente, se extiende solamente 1 mm en la intersección entre la cepa de ensayo y el área de difusión del cultivo de *R. equi*.

La reacción positiva con *S. aureus* se presenta como un área pequeña de hemólisis incrementada extendiéndose solamente entre unos 3 mm y 4 mm, contados a partir de la cepa de ensayo y dentro de la zona de hemólisis débil correspondiente al crecimiento del cultivo de *S. aureus*. No aparecen áreas grandes de β -hemólisis en las proximidades de las áreas entre *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

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

Todas las especies de *Listeria spp.* son bacilos pequeños Gram-positivos móviles (véase el apartado 9.4.4). Si se observan bajo iluminación de Henry, aparecen como azulados y con una superficie granular. Por lo general, son catalasa (positivos).

L. monocytogenes se distingue de otras especies por las características que se indican en la tabla 1.

Tabla 1 Reacciones para la identificación de *Listeria* spp.

Especies	Hemólisis	Producción de ácido		Ensayo de Camp	
		Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-

V: Reacción variable
 (+): Reacción débil
 +: > 90 % de reacciones positivas
 -: sin reacción

NOTA – Existen algunas cepas poco frecuentes de *L. monocytogenes* que no muestran β- hemólisis ni reacción positiva al ensayo de CAMP en las condiciones descritas en esta parte de la Norma NC-ISO 11290.

9.7 Confirmación definitiva

Las cepas que hayan sido consideradas como *L. monocytogenes* (9.6) pueden enviarse a un laboratorio de referencia reconocido para *Listeria* para su tipificación serológica y, si es posible, lisogénica o mediante algún otro método de tipificación molecular de confianza. El envío deberá ir acompañado de cuanta información referente a la(s) cepa(s) sea posible.

10 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS (véase la Norma NC-ISO 7218)

10.1 Recuento de las colonias de *L. monocytogenes*

Se calculará para cada placa el número **a** de colonias presentes de *L. monocytogenes*, utilizando la siguiente fórmula:

$$a = b / A \times C$$

donde:

b es el número de colonias que cumplen los criterios de identificación (9.6);

A es el número de colonias sembradas para su confirmación (9.4.1.1);

C es el número total de colonias características contadas en la placa (9.3.4).

El valor de **a** se redondeará a un número entero.

10.2 Método de cálculo

10.2.1 Placas que contengan menos de 150 colonias de *L. monocytogenes*, una de las cuales contenga al menos 15 colonias de *L. monocytogenes*. El número **N** de *L. monocytogenes* presentes en 1 mL o en 1 g de producto se calcula utilizando la fórmula siguiente:

$$N = \Sigma a / V (n_1 + 0,1 n_2) \times d$$

donde:

Σa es la suma de colonias de *L. monocytogenes* calculada tras la confirmación, en todas las placas conservadas a dos diluciones sucesivas, al menos una de las cuales contendrá como mínimo 15 colonias identificadas;

V es el volumen del inóculo puesto en cada placa en mililitros;

n_1 es el número de placas conservadas en la primera dilución;

n_2 es el número de placas conservadas en la segunda dilución;

d es el factor de dilución correspondiente a la primera de las diluciones conservadas.

Los resultados obtenidos se redondearán a dos cifras significativas (véase la Norma NC-ISO 7218).

Se tomará como resultado el número de *L. monocytogenes* por mililitro (para productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos), expresado como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia de 10 apropiada.

NOTA - Véase la Norma NC-ISO 7218 para consultar un ejemplo.

10.2.2 Estimación para números bajos

10.2.2.1 Si las dos placas de la suspensión inicial contienen menos de 15 colonias de *L. monocytogenes*, se calculará el número de colonias confirmadas en cada placa utilizando la fórmula indicada en el apartado 10.1. Se calculará la media aritmética **y** de las colonias contadas en las dos placas.

El resultado se expresará como se indica a continuación:

N_E : número estimado de *L. monocytogenes* por gramo o por mililitro

$$N_E = y / d \times V$$

donde:

y es la media aritmética de las colonias contadas en las dos placas

d es el factor de dilución de la suspensión inicial

V es el volumen del inóculo de cada placa

10.2.2.2 Si las dos placas de la suspensión inicial no contienen ninguna colonia, el resultado se expresará como se indica a continuación:

- **menos de $1 / d \times V$** *L. monocytogenes* por gramo o por mililitro

donde:

d es el factor de dilución de la suspensión inicial;

V es el volumen del inóculo en cada placa.

11 PRECISIÓN

Véase la Norma ISO 7218.

12 CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Dado que no existe todavía una norma general sobre este punto, se comprobará la capacidad de los medios de cultivo para permitir el crecimiento selectivo de *L. monocytogenes* de la siguiente manera. En un matraz de control con medio de enriquecimiento básico selectivo (véase el apartado 9.2), se introduce una dilución del cultivo de referencia de cepas aisladas recientemente de *L. monocytogenes*, así como cepas de control negativo (por ejemplo *Lactobacillus spp*, *Streptococcus*).

Añadir entre 10 células y 100 células de *L. monocytogenes* o de los controles negativos por matraz.

Se operará con los matraces de control igual que con los cultivos de ensayo para demostrar que se recuperan los cultivos positivos de control.

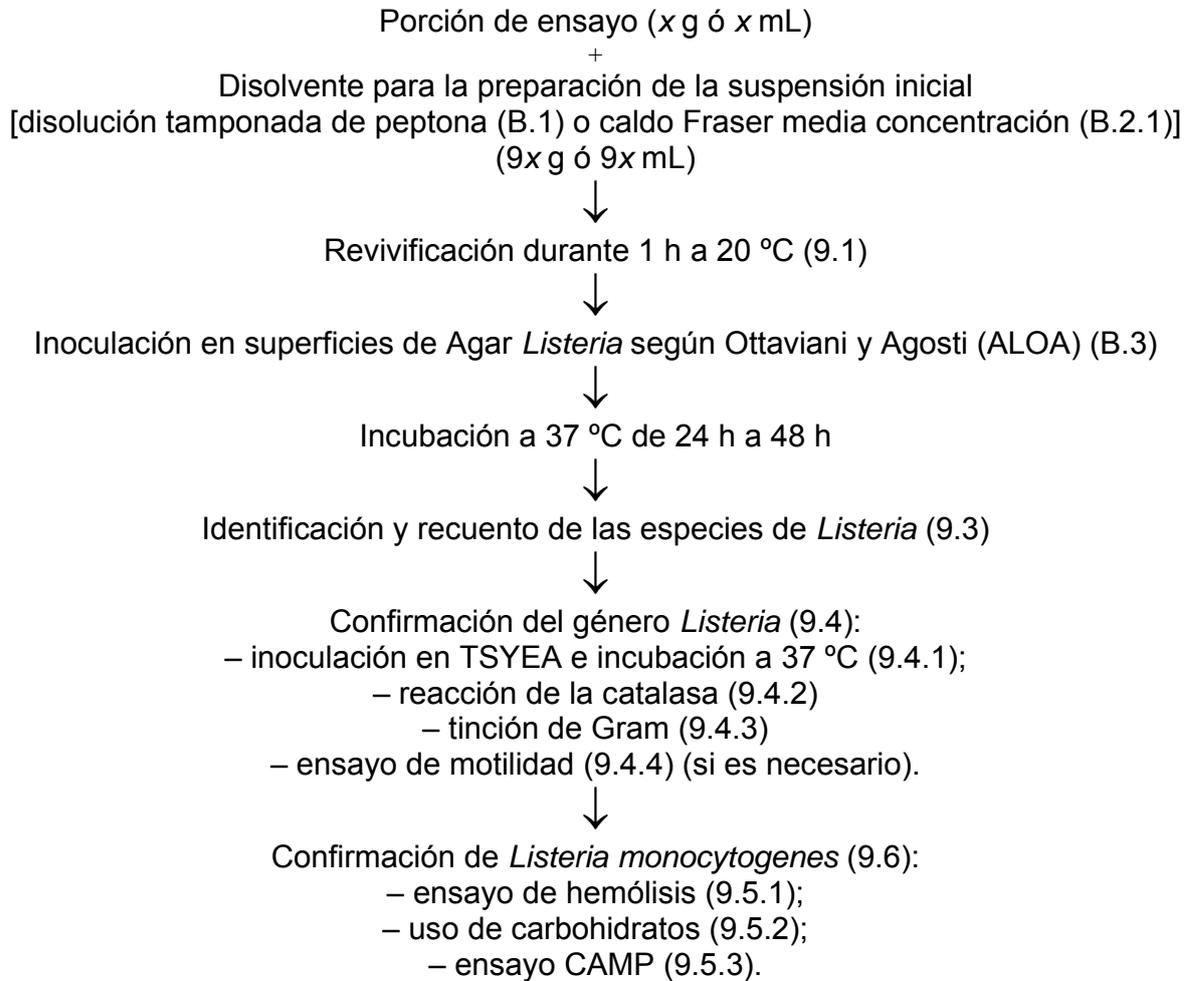
13 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo deberá especificar el método empleado, la temperatura de incubación y los resultados obtenidos. Deberá mencionar también todos los detalles operativos no especificados en esta parte de la Norma NC-ISO 11290, o considerados opcionales, junto con los detalles de todo tipo de incidencias que pudieran haber influido sobre los resultados.

El informe del ensayo deberá contener toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra.

ANEXO A
(Normativo)

DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO



ANEXO B
(Normativo)

COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS Y REACTIVOS

B.1 Disolución tamponada de peptona

B.1.1 Composición

Peptona de carne (digerido péptico de tejido animal)	10,0 g
Cloruro sódico (NaCl)	5,0 g
Fosfato de hidrógeno disódico dodecahidrato (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	9,0 g
Fosfato de dihidrógeno potásico (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Agua	1 000 mL

B.1.2 Preparación

Se disuelven en agua los componentes, calentando si es necesario.

Se ajusta el pH [con el pH-metro (6.7)] si es necesario, de tal manera que tras la esterilización sea de 7,0 ± 0,2 a 25 °C.

Se vierte el medio en matraces (6.8) de capacidades adecuadas para obtener alícuotas apropiadas para el ensayo (véase el apartado 9.1).

Se esteriliza en el autoclave (6.1) a 121 °C durante 15 min.

B.2 Medio base para el caldo Fraser media concentración con citrato de amonio hierro (III)
(véase la Norma ISO 11290-1).

B.2.1 Medio base para el caldo Fraser media concentración

B.2.1.1 Composición

Peptona de carne (digerido péptico de tejido animal)	5,0 g
Triptona (digerido péptico de caseína)	5,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Cloruro sódico (NaCl)	20,0 g
Fosfato de hidrógeno disódico dihidrato (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	12,0 g
Fosfato de dihidrógeno potásico (KH ₂ PO ₄)	1,35 g
Esculina	1,0 g
Agua	1 000 mL

B.2.1.2 Preparación. Se disuelven los componentes o la base completa deshidratada en agua, calentando si es necesario.

Se ajusta el pH si es necesario, de tal manera que tras la esterilización sea de 7,2 ± 0,2 a 25 °C.

Se vierte el medio base en matraces (6.8) de capacidades adecuadas para obtener alícuotas apropiadas para el ensayo (véase el apartado 9.1).

Se esteriliza en el autoclave (6.1) a 121 °C durante 15 min.

B.2.2 Disolución de citrato de amonio hierro (III)

B.2.2.1 Composición

Citrato de amonio y hierro (III)	5,0 g
Agua	100 mL

B.2.2.2 Preparación. Se disuelve el citrato de amonio y hierro (III) en el agua. Se esteriliza mediante filtración.

B.2.3 Preparación del medio

Se añade 1,0 ml de la disolución de citrato de amonio y hierro (III) (B.2.2) a cada una de las alícuotas del medio base del caldo Fraser media concentración (B.2.1) inmediatamente antes de su uso.

B.3 Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti (ALOA⁴)

B.3.1 Medio base

B.3.1.1 Composición

Peptona de carne (digerido péptico de tejido animal)	18,0 g
Triptona (digerido péptico de caseína)	6,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Piruvato sódico	2,0 g
Glucosa	2,0 g
Glicerofosfato magnésico	1,0 g
Sulfato magnésico (anhidro)	0,5 g
Cloruro sódico	5,0 g
Cloruro de litio	10,0 g
Hidrógeno fosfato disódico(anhidro)	2,5 g
5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucopiranosido	0,05 g
Agar	12 g a 18 g ^a
Agua	930mL ^b

^a Dependiendo de la capacidad de gelificación del agar
^b 925 mL si se emplea disolución de Amfotericina B (véase el apartado B.3.5.2)

⁴ ALOA es un ejemplo de un medio apropiado disponible comercialmente. Esta información se da para comodidad de los usuarios de esta parte de la Norma ISO 11290 y no supone un aval de este producto por parte de ISO. Se permite el empleo de otros medios con la misma formulación.

B.3.1.2 Preparación. Se disuelven los componentes deshidratados, o el medio base completo deshidratado en agua mediante ebullición. Ajustar el pH si es necesario para que después de la esterilización sea de $7,2 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esterilizar durante 15 min en autoclave regulado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.3.2 Disolución de ácido nalidíxico

B.3.2.1 Composición

Sal sódica de ácido nalidíxico	0,02 g
Solución de hidróxido de sodio 0,05 mol/L	5 mL

B.3.2.2 Preparación. Se disuelve la sal sódica de ácido nalidíxico en 5 mL de hidróxido de sodio y se esteriliza por filtración.

B.3.3 Disolución de ceftazidima

B.3.3.1 Composición

Ceftazidima	0,02 g
Agua	5 mL

B.3.3.2 Preparación. Se disuelve la ceftazidima en 5 mL de agua y se esteriliza por filtración a través de una membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

B.3.4 Disolución de polimixina B

B.3.4.1 Composición

Sulfato de polimixina B	76 700 UI
Agua	5 mL

B.3.4.2 Preparación. Se disuelve la polimixina B en 5 mL de agua y se esteriliza por filtración a través de una membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

B.3.5 Suplemento antibiótico

B.3.5.1 Disolución de cicloheximida

Cicloheximida	0,05 g
Etanol	2,5 mL
Agua	2,5 mL

Se disuelve la cicloheximida en 2,5 mL de etanol y se añaden luego 2,5 mL de agua. Se esteriliza por filtración a través de una membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

B.3.5.2 Disolución de Amfotericina B (como alternativa a la disolución de cicloheximida)

Amfotericina B	0,01 g
HCl (1 mol/L)	2,5 mL
Dimetilformamida (DMF)	7,5 mL

Se disuelve la amfotericina en la disolución HCl/DMF. Se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,45 µm.

ATENCIÓN- La disolución HCl/DMF es tóxica, manipúlese con cuidado.

B.3.6 Suplemento

Se disuelven 2 g de L-α-fosfatidilinositol (Sigma P 6636⁵) en 50 mL de agua fría.

Agitar por 30 min hasta obtener una suspensión homogénea.

Se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 min y enfriar entre 48 °C y 50 °C.

B.3.7 Medio completo**B.3.7.1 Composición**

Medio Base (B.3.1)	930 mL ^a
Solución de ácido nalidíxico (B.3.2)	5 mL
Solución de Ceftazidime(B.3.3)	5 mL
Disolución de polimixina B (B.3.4)	5 mL
Disolución de cicloheximida (B.3.5.1) o	5 mL
Disolución de Amfotericina B (B.3.5.2)	10 mL
Suplemento (B.3.6)	50 mL
^a 925 mL si se emplea disolución de Amfotericina B	

B.3.7.2 Preparación. Se añaden las disoluciones al agar base fundido a unos 50 °C, mezclando bien entre cada adición.

El pH del medio completo debe ser de 7,2 ± 0,2 a 25°C.

El medio debe ser opaco de manera homogénea.

B.3.7.3 Preparación de las placas de agar. Se añaden de 15 mL a 20 mL del medio completo recién preparado a cada placa Petri y se deja solidificar.

⁵ Sigma P 6636 es una marca registrada de un producto suministrado por Sigma. Esta información se brinda para conveniencia de los usuarios de esta parte de la ISO 11290 y no constituye un respaldo de ISO para este producto. Productos equivalentes pueden ser usados si demuestran que brindan resultados similares.

B.4 Medio de cultivo sólido: Agar triptona soya/extracto de levadura (TSYEA)**B.4.1 Composición**

Triptona (digerido péptico de caseína)	17,0 g
Digerido enzimático de soya	3,0 g
Cloruro sódico (NaCl)	5,0 g
Fosfato de hidrógeno dipotásico (K ₂ HPO ₄)	2,5 g
D-Glucosa	2,5 g
Extracto de levadura	6 g
Agar	9 g a 18 g ¹⁾
Agua	1 000 ml

1) Dependiendo de la capacidad gelificante del agar.

B.4.2 Preparación

Se disuelven los componentes o el medio completo deshidratado en el agua mediante ebullición.

Se ajusta el pH si es necesario, de manera que tras la esterilización sea de $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C.

Se vierte el medio en tubos de capacidad adecuada para obtener alícuotas apropiadas para el ensayo.

Se esteriliza en el autoclave a 121 °C durante 15 min.

Se deja sedimentar en posición inclinada.

Para la preparación de placas de agar, se vierten sobre placas Petri estériles, alícuotas del medio adecuadas para el ensayo. Se deja solidificar.

NOTA - Si se va a realizar el ensayo de iluminación de Henry, es importante que la capa del medio de agar sea fina (aproximadamente 12 mL para una placa de 90 mm de diámetro).

B.5 Medio de cultivo líquido: Caldo de triptona soya/extracto de levadura (TSYEB)**B.5.1 Composición**

Triptona (digerido péptico de caseína)	17,0 g
Digerido enzimático de soya	3,0 g
Cloruro sódico (NaCl)	5,0 g
Fosfato de hidrógeno dipotásico (K ₂ HPO ₄)	2,5 g
D-Glucosa	2,5 g
Extracto de levadura	6 g
Agua	1 000 ml

B.5.2 Preparación

Se disuelven los componentes o el medio completo deshidratado en el agua, calentando si es necesario.

Se ajusta el pH si es necesario, de manera que tras la esterilización sea de $7,3 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se vierte el medio en matraces o en tubos de capacidad adecuada para obtener alícuotas apropiadas para el ensayo.

Se esteriliza en el autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

B.6 Agar sangre de carnero

B.6.1 Base

B.6.1.1 Composición

Peptona de carne (digerido péptico de tejido animal)	15 g
Digerido enzimático de hígado	2,5 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sódico (NaCl)	5 g
Agar	9 g a 18 g ¹⁾
Agua	1 000 mL
1) Dependiendo de la capacidad gelificante del agar.	

B.6.1.2 Preparación. Se disuelven los componentes o el medio completo deshidratado en el agua por ebullición.

Se ajusta el pH si es necesario, de manera que tras la esterilización sea de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C .

Se vierte el medio en matraces de capacidad adecuada para obtener alícuotas apropiadas para el ensayo.

Se esteriliza en el autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

B.6.2 Base completa

B.6.2.1 Composición

Base (B.6.1)	100 mL
Sangre de carnero desfibrinada	De 5 mL a 7 mL

B.6.2.2 Preparación. Se añade la sangre sobre la base previamente enfriada a unos $47\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se mezcla bien.

Se vierte el medio sobre placas Petri estériles en alícuotas apropiadas para el ensayo. Se deja solidificar.

B.7 Caldo para el uso de carbohidratos (ramnosa y xilosa)**B.7.1 Base****B.7.1.1 Composición**

Peptona de carne (digerido péptico de tejido animal)	10 g
Extracto de carne	1 g
Cloruro sódico (NaCl)	5 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agua	1 000 mL

B.7.1.2 Preparación. Se disuelven los componentes en el agua, calentando si es necesario.

Se ajusta el pH si es necesario, de manera que tras la esterilización sea de $6,8 \pm 0,2$ a 25°C .

Se vierte el medio en tubos de capacidad adecuada para obtener alícuotas apropiadas para el ensayo.

Se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 min.

B.7.2 Disoluciones de carbohidratos**B.7.2.1 Composición**

Carbohidrato ¹⁾	5 g
Agua	100 mL
¹⁾ L-Ramnosa o D-Xilosa.	

B.7.2.2 Preparación. Se disuelve por separado cada carbohidrato en 100 mL de agua. Se esteriliza mediante filtración.

B.7.3 Medios completos

Se añaden aseptícamente para cada carbohidrato x mL de la disolución del apartado B.7.2 a 9 x mL de la base (B.7.1).

B.8 Agar de motilidad**B.8.1 Composición**

Triptona (digerido péptico de caseína)	20,0 g
Peptona de carne (digerido péptico de tejido animal)	6,1 g
Agar	3,5 g
Agua	1 000 mL

B.8.2 Preparación

Se disuelven los componentes en el agua por ebullición.

Se ajusta el pH si es necesario, de manera que tras la esterilización sea de $7,3 \pm 0,2$ a 25°C .

Se vierten cantidades de unos 5 ml de medio en tubos.

Se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 min.

B.9 Medio y cepas de ensayo CAMP (Christie, Atkins, Munch-Paterson)

Se pueden emplear placas de agar de sangre (B.6) para este ensayo, pero es preferible utilizar placas de agar de doble capa con una capa muy fina de medio de sangre de carnero (véase el apartado B.9.3).

B.9.1 Base

Véase el apartado B.6.1.

B.9.2 Medio de sangre de carnero

Véase el apartado B.6.2.

B.9.3 Medio completo

Se vierte el medio base (B.9.1) en placas Petri estériles, en cantidades de unos 12 mL por cada placa Petri de 90 mm de diámetro, y se deja solidificar. Se deposita de forma homogénea una capa muy fina de medio de sangre de carnero (B.9.2) empleando cantidades no superiores a los 3 mL por placa. Se deja solidificar.

Si se añade el medio de sangre sobre placas que contengan la base preparada con antelación, puede ser necesario calentar las placas colocándolas en una incubadora a 35°C o 37°C durante unos 20 min antes de volcar la capa de medio de sangre.

B.9.4 Cepas de reacción CAMP

Se necesitan una cepa b-hemolítica de *S. aureus* (por ejemplo NCTC 1803 o ATCC 25923), una cepa de *R. equi* (por ejemplo NCTC 1621 o ATCC 6939) y una cepa de *L. monocytogenes* (por ejemplo NCTC 11994) para realizar el ensayo CAMP. No todas las cepas de *S. aureus* ni de *L. monocytogenes* son adecuadas para el ensayo CAMP.

Se mantienen los cultivos patrón de *S. aureus*, *R. equi*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii* mediante la inoculación en tubos con TSYEA inclinados (B.4), incubando a 37°C entre 24 h y 48 h, o hasta que haya habido crecimiento, y almacenándolos a $+ 3^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$ en la nevera. Se subcultivarán al menos una vez al mes, confirmando su pureza por siembra en estrías en placas de TSYEA (B.4).

B.10 Disolución de peróxido de hidrógeno

Se utilizará una disolución al 3 % (*m/m*), es decir de 10 volúmenes.

B.11 Salino tamponado con fosfato (PBS) (opcional)

B.11.1 Composición

Fosfato de hidrógeno disódico dihidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8,98 g
Fosfato de dihidrógeno sódico (NaH_2PO_4)	2,71 g
Cloruro sódico (NaCl)	8,5 g
Agua	1 000 mL

B.11.2 Preparación

Se disuelven los componentes en el agua.

Se ajusta el pH si es necesario, de manera que tras la esterilización sea de $7,2 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se esteriliza en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

B.12 Suspensión de eritrocitos de sangre de carnero (opcional)

Se mantienen las células de la sangre de carnero a $+3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de su uso.

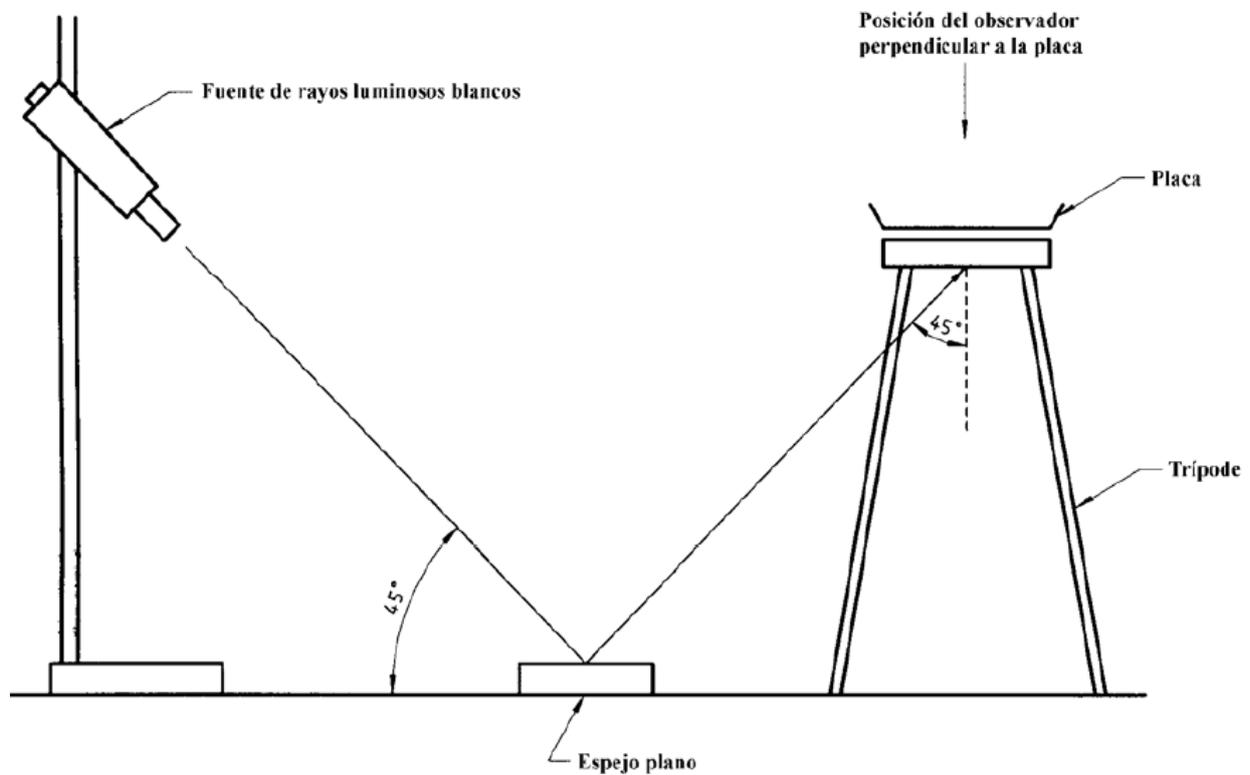
Se examina la presencia de señales de hemólisis (enrojecimiento) en la capa superior de suero antes de su uso.

Si no aparece hemólisis, se añaden 2 mL de la capa inferior de eritrocitos sobre 98 mL de tampón PBS (B.11).

Si se ha producido hemólisis, se suspenden unos 4 mL de la capa de células rojas en 10 mL de tampón PBS y se mezcla suavemente, centrifugando a continuación. Si el sobrenadante es visiblemente rojo debido a una hemólisis muy significativa, no se utilizará y se descartará la suspensión inicial. Si no es así, se decanta el sobrenadante y se añaden 2 mL de esta suspensión de células a 98 mL de tampón PBS. La suspensión puede guardarse hasta 5 días a $+3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si aparece hemólisis, se desechará.

**ANEXO C
(Informativo)****PRUEBA DE ILUMINACIÓN DE HENRY**

Examinar las placas utilizando una fuente de rayos luminosos blancos de suficiente potencia para iluminar bien las placas, incidiendo dicho haz lumínico con un ángulo de 45° con respecto al fondo de la placa (véase figura C.1). Al ser examinadas bajo esta luz oblicua desde una posición perpendicular a la placa (iluminación de Henry) las colonias de *Listeria* spp. exhiben un color azulado y una superficie granulada.

**Fig C.1 – Examen de colonias sospechosas en placas**

Bibliografia

[1] 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*, 57, 2004, pp. 251-258.