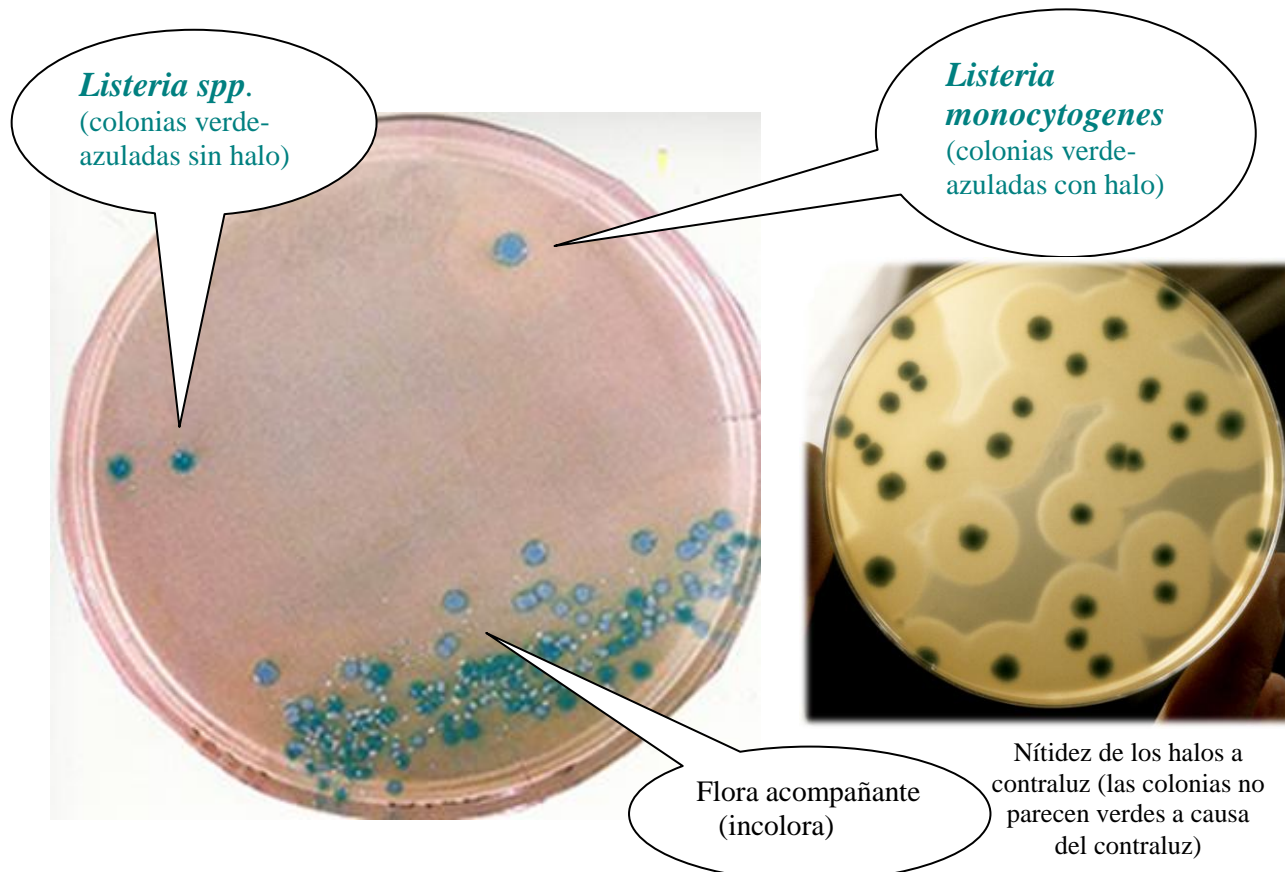


Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A	COSMETIKIT®	DRY PLATES®	MUGPLUS
CRIOTECA®	CHROMOSALM	DESINFECTEST®	CCCNT
PLAQUIS®	KITPRO-PLUS	CROMOKIT®	MBS
M-IDENT®	SEILAGUA®	SALMOQUICK	AIREANO
NEOGRAM	ENVIROCOUNT		

## **LISTERIA CHROMOCYTOGENES (Ottaviani and Agosti) AGAR**

ISO 11290-1 Amendment 1 (15-10-2004), ISO 11290-2:2000/A1:2004



Ottaviani & Agosti Agar fue desarrollado por estos dos investigadores italianos antes de que una marca francesa les comprase los derechos para prepararlo en placa; luego, al publicarse en la addenda 2004 de la Norma ISO 11290, se liberó su fabricación para cualquier otro laboratorio. Sus extraordinarias sensibilidad, especificidad, eficacia, precisión, exactitud y rapidez... respecto al Oxford o al Palcam, acabaron con los graves problemas que éstos daban, sobre todo de falsos positivos con numerosos Enterococos y Micrococos. MICROKIT fue una de las primeras marcas que fue capaz de desarrollarlo (con la marca Cromocytogenes) no sólo en placa preparada, también en otros formatos preparados y ADEMÁS, fuimos los primeros en comercializarlo en medio deshidratado (Dic-2004), cuando todo el mundo usaba (porque sólo podían usar) placas preparadas de escasa caducidad.

Actualmente los laboratorios acreditados ISO 17025 que lo emplean con marca Cromocytogenes de MICROKIT, nos dicen que recupera muchas más ufc's que las demás marcas y que nuestra extraordinaria caducidad de 3 meses a su recepción, les permite haber vuelto al uso de la placa preparada. Que una fórmula sea idéntica en diferentes marcas no significa que los resultados sean idénticos, hay más puntos débiles en la fabricación de medios de cultivo que pueden llevar a resultados tan dispares.

Agosti Listeria and Ottaviani Agar, preparado con los suplementos selectivos y diferenciales adecuados, es el más moderno, rápido, selectivo y diferencial medio de cultivo para el aislamiento e identificación presuntiva y diferencial de *Listeria monocytogenes* a partir de muestras alimentarias.

El sustrato cromogénico detecta la beta-glucosidasa, enzima común en todas las especies de *Listeria* y unas pocas cepas de *Enterococos* y *Bacilos*, provocando la aparición de colonias verde-azuladas. Un sustrato adecuado detecta la fosfolipasa propia de *L.monocytogenes*, provocando un halo de lisis/precipitación alrededor de sus colonias. La combinación de ambos sustratos permite diferenciar las colonias de *Listeria spp.* (verde-azuladas sin halo opaco) de las de *Listeria monocytogenes* (verde-azuladas rodeadas de un halo opaco). Dado que algunas cepas de *L.ivanovii* son capaces de provocar halo de fosfolipasa, se requiere confirmación de las colonias presuntivas (verdes con halo), con la simple prueba: **Rhamnosa + / Xylosa – para *L.monocytogenes* (al revés para *L.ivanovii*): Kit completo KMT012, también disponible en tubos preparados, TPL014, TPL015, y en medio deshidratado DMT167 + suplementos DMT169 y DMT171.** Ahorre el coste de las galerías de identificación y el agar sangre, que menciona la ISO 11290 porque esto se redactó antes de la addenda 2014 de dicha ISO sobre este nuevo medio cromogénico.

*Bacillus circulans* es capaz de dar falso positivo de *Listeria spp.* (colonias verdes sin halo), pero es X/R +/-

**CÓDIGO** del medio CHROMOCYTOGENES base **DMT700**. Concentración: 70,5 g/l. Ajustar a pH 7,2. Autoclavar 15 minutos a 121°C. Enfriar a 48-50°C. Se añaden una pareja de viales **SMT700** (uno de cada uno de los dos tipos) por cada 500 ml de medio BASE esterilizado y enfriado a 45°C aprox. El suplemento selectivo, que es polvo, se hidrata con 5ml de agua estéril calentada a 50 °C y filtrada por pirindola y cuando está disuelto, se añade tanto este suplemento como el fosfolipídico líquido, también precalentado a 50°C, al medio chromocytogenes agar que ya está disuelto y esterilizado previamente y atemperado a 48-50 grados.

Agitar bien y verter en placas. Plaquitas herméticas con larga caducidad **PPL970**. Placas preparadas **PPLM70** con 3 meses de caducidad a la entrega. Tubos preparados BASE **TPL700** + suplemento **SMT700**. Frascos preparados BASE **RPL700** + suplemento **SMT700**.

**MODO DE EMPLEO:** El medio final es crema opaco. Sembrar, dada su alta selectividad, incluso un inóculo concentrado en Fraser o LEB (nunca en Aguas peptonadas sin intermedio selectivo). Incubar 18-48 horas a 30-37°C aproximadamente. Confirmar sólo las colonias regulares, redondeadas, de 1-2 mm, verde-azuladas, con halo opaco. Según ISO 11290, algunas cepas estresadas (en particular por acidez) o fosfolipasa-débiles pueden generar halos estrechos, que se sólo ven bien tras 4 días de incubación. Se han reportado raras cepas de *L.monocytogenes*, especialmente procedentes de productos cárnicos, que crecen con colonias atípicas, de color blanco. **En nuestra validación de Microstick-Listeria, pudimos testificar que tras solo 18 h de enriquecimiento en LEB de MICROKIT de 8 ufc de *L.monocytogenes* con 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> ufc de flora acompañante e interferente, la siembra directa en Agar Cromocytogenes no produjo ni un solo falso negativo en 20 tipos diferentes de alimentos, lo que nos permite proponer un protocolo de detección en solo 36h con 18 h LEB + 18 h Cromocytogenes.** También hemos comprobado reiteradamente que añadiendo 18 ml de nuestro caldo LEB [x5] en 225 ml de nuestra Buffered Peptone Neutralizing Water, acortamos el enriquecimiento (revitalizador + selectivo) a sólo 18 horas y esta combinación obtiene las estrías más densas y las colonias más intensas de todas las permutaciones que hemos probado con Agua Peptonada Tamponada, Agua Peptonada Tamponada Neutralizante, LEB y Semifraser/Fraser. **El tercer mejor método que hemos detectado es pasar 1 ml de pre-enriquecimiento de 18 h en 225 ml de Agua Peptonada Tamponada, a post-enriquecimiento en 9 ml de LEB otras 18 h.** Las dos temperaturas de incubación (primero a 30 °C y luego a 35°C) mencionadas en la ISO 11290 no han mejorado nuestros resultados, incubando todo a 35°C. En todos los casos LEB de MICROKIT funciona mejor que semiFraser y Fraser.

**COMPOSICIÓN:** La composición de este medio es la aprobada en la versión 2004 de la Norma ISO 11290.

La referencia SMT700+ de suplemento cromocytogenes engloba una pareja de viales. Contiene las cantidades indicadas en la ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004 (E) de Ácido Nalidíxico, Ceftazidina, Polimixina B, Cicloheximida y L- $\alpha$ -phosphatidylinositol, que suplementan el medio base Ottaviani & Agosti DMT700- (enzimatic digest of animal tissues 18g, enzymatic digest of casein 6 g, yeast extract 10 g, sodium piruvate 2 g, glucose 2 g, magnesium glycerophosphate 1 g, magnesium sulfate anhydrous 0,5 g, sodium chloride 5 g, lithium chloride 10 g, disodium hydrogen phosphate anhydrous 2,5 g, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucopyranoside 0,05 g, Agar-agar 13,5 g en 930 ml de agua bidestilada).

#### CONTROL DE CALIDAD:

Realizado en nuestro laboratorio; es prudente repetirlo en su laboratorio siempre que varíen las condiciones (más de 3 meses sin usar, tras desinfectar laboratorio, tras conservar a alta T<sup>o</sup>, cuando adquiere aspectos extraños aunque no haya llegado la fecha de caducidad teórica de la etiqueta,...)

DESHIDRATADO: Polvo grueso, Beige PREPARADO: Estéril, Beige

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO ISO/TS 11133-2 24-48 h a 30-37 °C, aplicando el método ISO 4831, o el indicado en el Manual MICROKIT actualizado:

*Listeria monocytogenes* WDCM 00019 y WDCM 00021, Colonias verdes con halo. Con respecto a PCA estandarizado\*, recuento 277-424%, pero de forma más selectiva y diferencial. \* El que cumple con recuperación superior al 92-125%

*Listeria innocua* WDCM00017, Correcto, Colonias verde-azuladas sin halo opaco.

*Enterococcus faecalis* WDCM00087, colonias incoloras.

*Staph. aureus* WDCM00033, colonias incoloras.

*E. coli* WDCM0013, inhibido completamente, tras añadir 10<sup>3</sup> ufc, no aparece ni una sola colonia.

El usuario es el único responsable de la eliminación de los microorganismos según la legislación medioambiental vigente. Autoclavar antes de desechar a la basura.

Medio fabricado en la UE por MICROKIT desde 2004, bajo ISO 9001, ISO 11133 y GMPs, revisado en Marzo-2020