

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A
CRIOTECA®
PLAQUIS®
M-IDENT®

COSMETIKIT®
CHROMOSALM
KITPRO-PLUS
SEILAGUA®

DRY PLATES®
DESINFECTEST®
CROMOKIT®
SALMOQUICK

MUGPLUS
CCCNT
MBS
AIRESANO



LISTERIQUICK

Detección rápida y fiable de
Listeria monocytogenes en alimentos

INTRODUCCIÓN: El método ISO 11290 tiene como desventajas la lentitud de obtención de resultados y la no neutralización de los conservantes de la muestra, que conlleva a resultados falsamente negativos. En dicha Norma se realiza un pre-enriquecimiento revitalizador de 25 g de la muestra, 18-24 h a 30-35°C en 225 ml de Caldo Semifraser. Al día siguiente se toma una alícuota (0,1 ó 1 mL) y se incuba en un post-enriquecimiento selectivo en 10 ml de Fraser Broth otras 18-24 h. Y de ahí se estra en placas de medio cromogénico Ottaviani & Agosti (que destronó al Oxford y al Palcam, que daban excesivos falsos positivos), incubando otras 18-24 h. De modo que todas las muestras (incluso las negativas) llevan un mínimo de 3 días (72 h) de demora en la obtención de los resultados presuntivos. Se emplean en total 3 medios y 4 suplementos de los cuales dos (Semifraser y Fraser) viran presuntivamente a negro con una proporción impresionante de falsos positivos y de falsos negativos, por lo que hay que seguir hasta el final. Otro que se emplea en otros protocolos, el BPW, no inactiva los conservantes, ni los metabolitos creados por la flora acompañante, permitiendo la aparición demasiado a menudo de resultados falsamente negativos.

LISTERIQUICK ha sido diseñado por Laboratorios MICROKIT, en 4 años de estudios tras el diseño de su homólogo Salmoquick, basándose en la Norma ISO 11290 pero optimizándola; el método varía, ahorrando 2 suplementos y acortando el tiempo de obtención de resultados a menos de dos días, sólo 36 horas! En este caso se realiza el pre-enriquecimiento revitalizador (e inactivador de conservantes y de metabolitos generados por el resto de la flora acompañante, que podrían interferir en el crecimiento de *Listeria* en un sinfín de matrices alimentarias) de 25 g de la muestra en 225 ml de Agua de Peptona Tamponada Neutralizante (BPNW), 20-30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden al mismo 18 ml de LEB Broth a [x5] (una optimización del Fraser), se mezcla y se incuba el conjunto 18 h a 30-35°C, constituyéndose así en un solo paso la revitalización de las *Listeria* dañadas, la inactivación de los graves problemas que no contempla la ISO 11290 y el aumento de la selectividad para la multiplicación de las *Listeria* presentes. En este medio mixto, las muestras con *Listeria* enturbian el caldo, por lo que de entrada en las primeras 18h ya tenemos una alerta de posible presencia de *Listeria* si el caldo está turbio. Pero otras bacterias también pueden crecer, por lo que hay que continuar con el segundo paso: Al día siguiente se estra en placas de Cromocytogenes (Ottaviani & Agosti) Agar, incubando otras 18h. De modo que las muestras sin crecimientos típicos de *Listeria monocytogenes* (colonias verdes con halo) son liberadas en sólo 36h.

PRECAUCIÓN: La validación de LISTERIQUICK ha sido realizada con los medios indicados, y de la marca MICROKIT. Cualquier variación sobre los medios o la marca invalida nuestra validación, de hecho este protocolo se ha probado y ¡NO FUNCIONA con BPW, ni con Fraser, ni con LEB de otras marcas, ni con Ottaviani & Agosti Agar + suplementos de otras marcas! Verificar si todo funciona bien en muestras de pollo, ya que en la validación retrasaban 18 h los resultados (también en el método ISO).

LISTERIQUICK es una **herramienta simple, rápida y fiable**, diseñada especialmente para simplificar y agilizar al máximo el control de alimentos con contaminación por *Listeria*, que es uno de los puntos más críticos y que más retrasan la liberación del lote en la industria alimentaria.

SIMPLE: Ahorra un medio de cultivo de dudosa utilidad (Semi-Fraser) y los dos suplementos del Fraser por los más modernos y eficientes medios que no necesitan suplemento alguno (BPNW y LEB Broth).

RÁPIDA: De la muestra a la liberación del lote en sólo 36 horas (frente a las 72 h habituales).

FIABLE: Validado en base a la Norma UNE-EN-ISO 16140 por el método de pares frente a la Norma ISO 11290, con inóculos muy bajos de distintas cepas de *Listeria*, variada flora interferente, matrices de todo tipo y 100% de eficiencia (ver publicación en bibliografía). Cuidado con las muestras de pollo.

Se presenta de dos formas: como kit preparado y listo para usar y como un conjunto de los 3 medios de cultivo deshidratados y suplementos necesarios para que el mismo laboratorio se lo pueda preparar.



- a) **LISTERIQUICK-Estéril**, Ref: **KMT040**: kit listo para emplear, incluye los 3 medios necesarios para detección rápida de *Listeria* (en sólo 36h), en presentación estéril y lista para su uso. 2x20 Tubotes prepesados y estériles BPNW (Ref: KBB002, con Cad: 2 años desde fabricación) para añadir a 225 ml de agua estéril, 2x20 tubos LEB Broth 18 ml [x5] (Ref: TPL0335, con Cad: 1 año desde fabricación) para añadir 25 minutos después al anterior, 1x45 Plaquis herméticas Cromocytogenes suplementadas (Ref: PPL970, con 6 meses de caducidad el día de su envío, para analizar al menos 7 muestras/mes). Ninguno de los componentes necesita nevera. Conservar en lugar fresco y seco, con una temperatura de entre 5°C y 25°C, eso sí, al abrigo de la luz. No congelar. Kit de 40 test (Emplee las 5 plaquis que le sobran para duplicados, verificaciones... no se le han cobrado)
- b) **LISTERIQUICK-Iniciación**, Ref: **KMT041**: conjunto de los 3 medios deshidratados y doble suplemento del agar, necesarios para detección rápida de *Listeria* (en sólo 36 h), para que cada laboratorio se lo prepare: 1x 500g BPNW (Ref: DMT011, para hacerse 62 frascos o bolsas Stomacher con 225 ml), 1x500g LEB Broth (Ref: DMT070, para hacerse 154 tubos de 18 ml a [x5], 1x500g Cromocytogenes Agar Ref: DMT700 Ref: SMT700+ (para hacerse 355 placas de 20 mL ó 473 placas de 15 mL) y su doble suplemento SMT700+ (para hacerse 250 placas de 20 mL ó 33 placas de 15 mL). En conjunto es más económico (2,31 €/test) que la adquisición de cada uno de los 3 medios por separado (3,13 €/test), para que el laboratorio se inicie en este método y pueda pedir después por separado los medios conforme vaya necesitando cada uno (Para alcanzar el mínimo precio de 2,31 €/test, pida 10 botes de cada uno de los 3 medios y 10 suplementos).



MODO DE EMPLEO E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 1.- Tomar 25 g del alimento en una bolsa Stomacher o en un frasco estéril
- 2.- Añadir 225 ml de Agua Peptonada Tamponada Neutralizante (Microkit DMT011)
- 3.- Homogeneizar durante 2 minutos y dejar actuar 20-30 minutos
- 4.- Añadir 18 ml de LEB Broth (Microkit DMT070) a concentración [x5]
- 5.- Homogeneizar e incubar 18 h a 30-35°C
- 6.- Pueden leerse los resultados presuntivos desde las primeras 18 horas: la turbidez del caldo es tan presuntiva de presencia de *Listeria* como el ennegrecimiento del caldo ISO 11290; debe confirmarse con el siguiente paso:
- 7.- Estriar sobre placas de Cromocytogenes Agar (Microkit DMT700 + Suplemento SMT700+).
- 8.- Incubar las placas 18 h a 30-37°C
- 9.- La aparición de colonias verdes, es altamente presuntiva de presencia de *Listeria*. Si están rodeadas de un halo opaco, son altamente presuntivas de *L.monocytogenes* (sólo algunas cepas de *L.ivanovii* producen también halo). Las colonias verdes (con o sin halo, igual que debería hacerse en el método ISO) deben confirmarse en laboratorio mediante los kits bioquímicos e inmunológicos habituales, a elegir (X/R Broth DMT167 y sus dos suplementos DMT169 y DMT171, lo mismo en kit preparado KMT012, galerías CRYSTAL G+ 245140...). Muchas colonias presuntivas de la mayoría de medios de aislamiento de *Listeria* (Oxford, Palcam, McBride...) acaban siendo confirmadas como *Micrococcus*, *Enterococcus* o *Staphylococcus* ambientales; esto no sucede en Cromocytogenes, donde *Listeria* spp. crece con colonias verdes, *L.monocytogenes* con colonias verdes con halo y los demás no suelen crecer.



Bolsas Stomacher con 25 g de alimento, 225 ml de BPNW y 18 ml LEB Broth [x5] antes de incubar

BIBLIOGRAFÍA:

- Norma ISO 11290: Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes*.
- Sanchis, J. Doble enriquecimiento simultáneo para detección rápida de *Listeria monocytogenes* en matrices alimentarias. XXI Congreso SEM de Microbiología de los alimentos. Tarragona, IX-2018.

El usuario es el único responsable de la destrucción de los microorganismos generados en el interior del kit durante su uso, de acuerdo con la legislación medioambiental vigente. Sumerja en lejía o alcohol, o mejor autoclávalos, antes de desecharlos a la basura. Mantener fuera del alcance de los niños. No ingerir.

Si desea seguir el Reglamento UE 2-2019 que entrará en vigor en 2021 mediante el cual los lobbies del laboratorio han conseguido barrer la innovación que aporta el milagro mediterráneo (la PIME), al exigirnos a los inventores de productos/métodos para industria alimentaria, el invariable pago de cientos de miles de € a AOAC, AFNOR o similar por cada referencia innovadora; nos puede pedir los componentes por separado y seguir la ISO 11290 al pie de la letra, ya que de este modo no son métodos alternativos y por tanto ningún inspector ni auditor puede impedirle emplearlos. Pero lamentablemente perderá el valor añadido de este kit: su extraordinario ahorro de tiempo en la obtención de resultados fiables y ahorro de dinero en stock de sus fabricados. La mejor solución sería externalizar una proporción residual pero razonable de sus análisis a un lab.externo vinculante, para presentar sus informes a inspección de Sanidad, y así poder seguir usando internamente en paralelo este kit en esas y en las demás muestras, para la mejora y rapidez de sus resultados de autocontrol. A fin de cuentas, este reglamento que corta de cuajo el I+D que no provenga de multinacionales, no es nada nuevo: los kits de autocontrol nunca han servido para obtener resultados oficiales, pero ayudan a la industria a tomar las mejores decisiones para la rapidez y fiabilidad en la liberación de sus lotes.

Diseñado y fabricado en la UE por MICROKIT bajo ISO 9001, ISO 11133 y GMPs desde 3-2018, revisado en Mayo-2020.