

Recuperación, electividad y selectividad en ALOA

- Ensayos de recuperación
- Cultivos puros de *Listeria spp* mantenidas en caldo BHI + 5% de NaCl durante una semana en refrigeración
- Cultivos puros de *Listeria spp* mantenidos en TSA durante una semana a temperatura ambiente

Recuperación, electividad y selectividad en ALOA

- Ensayos de electividad y selectividad
- Verificación del crecimiento de *L. monocytogenes* vs *Listeria spp* aisladas de alimentos sembradas por estría en agar ALOA
- Verificación del crecimiento de microorganismos competidores (no Listerias) pertenecientes a diferentes especies

Muestras Inoculadas Artificialmente

- Mezcla de *L monocytogenes* y *L innocua* en concentración de 100ufc/mL
- Matriz de prueba: Leche maternizada
- Ensayo: 25g de muestra + 225mL de Caldo Fraser concentración simple
- Temperatura de incubación: 30°C
- Tiempo de incubación : 24 horas

Muestras Inoculadas Artificialmente

- 0,1 mL del enriquecimiento primario en 10mL de Caldo Fraser doble Concentración
- Temperatura de incubación : 37°C
- Tiempo de incubación 48 horas

Aislamiento

- Siembra en Agar Palcam y Agar ALOA
- Verificación de colonias típicas en ambos medios
- Temperatura incubación del A Palcam:
- 37°C
- Tiempo incubación : 48 horas
- Temperatura incubación ALOA: 37°C
- Tiempo incubación: 24 horas

Crecimiento en los Detectores Selectivos



Crecimiento de mezcla de *Listerias spp*
en ALOA y A Palcam, a partir de
muestra contaminada artificialmente

Muestras Contaminadas Naturalmente

- Ensayo: 25g de muestra + 225mL de Caldo Fraser concentración simple
- Temperatura de incubación: 30°C
- Tiempo de incubación : 24 horas

Muestras Contaminadas Naturalmente

- 0,1 mL del enriquecimiento primario en 10mL de Caldo Fraser doble concentración
- Temperatura de incubación : 37°C
- Tiempo de incubación 48 horas

Aislamiento

- Siembra en Agar Palcam y Agar ALOA
- Verificación de colonias típicas en ambos medios
- Temperatura incubación de A Palcam: 37°C
- Tiempo incubación : 48 Horas
- Temperatura incubación ALOA: 37°C
- Tiempo incubación: 24 horas

Crecimiento en Detectores Selectivos

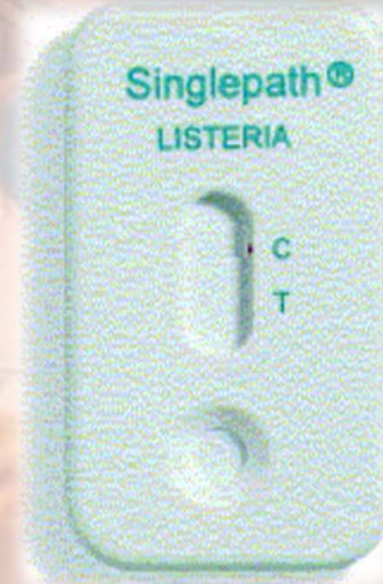


Crecimiento de mezcla de *Listerias spp* en ALOA y A Palcam, a partir de muestra contaminada naturalmente

Pruebas de Inmuprecipitación

- VIP

- SINGLEPATH



Pruebas de Inmuprecipitación

- A partir de la colonia sospechosa aislada
- y sembrada en 5mL de caldo Fraser
- Colocar 1mL en baño de agua hirviendo durante 5 minutos para lisar las células.
- Inocular en el pozo 0,1 mL y se deja correr durante 15-20 minutos.
- Leer la aparición de una línea rosada (singlepath) en la ventana de prueba y en la ventana de verificación. Confirma presencia de *Listeria spp*

Resultado prueba inmunoprecipitación



Resultado de la prueba en Single Path *Listeria*. La aparición de las 2 líneas rosadas confirma la presencia de *Listeria spp*

A partir de las colonias aislada en el ALOA se realiza la prueba de Singlepath

Prueba de CAMP

- Prueba ideada por Chistie y colaboradores, en 1944, basada en la aparición de una amplia zona de hemólisis completa en forma de llama. La bacteria en cuestión segrega un polipéptido especial (“factor CAMP”) al sembrarla en estría perpendicularmente a una estría de *S. aureus* en una placa de agar sangre, aumentando notablemente de este modo el efecto hemolítico de esta última especie.
- Para realizar la prueba con *Listeria spp*, se hacen dos estrías perpendiculares una con *S. aureus* y otra con *Rhodococcus equii*.

Prueba de CAMP



Prueba de CAMP para colonias típicas de *L.monocytogenes* tomadas de ALOA y de Agar Palcam, para confirmar la presencia de la misma a partir de muestras contaminadas natural y artificialmente.

Resultados del Ensayo de Recuperación

Los resultados se evalúan por el cálculo de la Relación de la Productividad (PR)

- Se observó un porcentaje de recuperación del 98% de las células inoculadas de *L monocytogenes* en ALOA con respecto al TSA,
- Y del 60 % en A Palcam con respecto al TSA
- **Mayor recuperación en ALOA**



Resultados del Ensayo de Electividad

Electividad en ALOA

- Todas las *Listerias spp* presentaron colonias con morfología típica de color azul turquesa de 1a 2 mm de diámetro después de 24 horas de incubación
- Las colonias de *Listeria monocytogenes* presentaron el halo opaco característico
- *L. ivanovii* presenta un halo vago después de 24 horas de incubación
- A 48 h el halo de *L. ivanovii* se puede confundir con el halo de *L. monocytogenes*

Halo



Resultados del Ensayo de Selectividad (Factor SF)

- La selectividad fue examinada cuantitativamente por siembras en agar ALOA y TSA de los siguientes microorganismos: *Bacillus sp*, *Enterococcus faecales*, *Staphylococcus aureus*
- Para todas las placas de TSA hubo crecimiento óptimo de los microorganismos
- En ALOA no creció *Staphylococcus aureus* ni *E. faecalis*
- Para *Bacillus sp* el crecimiento fue bueno. Se observaron colonias azul turquesa, con bordes irregulares y con un halo opaco vago, fácilmente distinguibles por sus características morfológicas

Resultados del Ensayo de Comparación

Recuperación de *Listeria monocytogenes* en una mezcla de microorganismos (Inoculación de 100UFC en 225mL de Caldo Fraser concentración simple)

Conteos después del primer enriquecimiento

ALOA

98

Palcam

3

Conteos después del segundo enriquecimiento

ALOA

127

Palcam

5



Resultados del Ensayo de Comparación

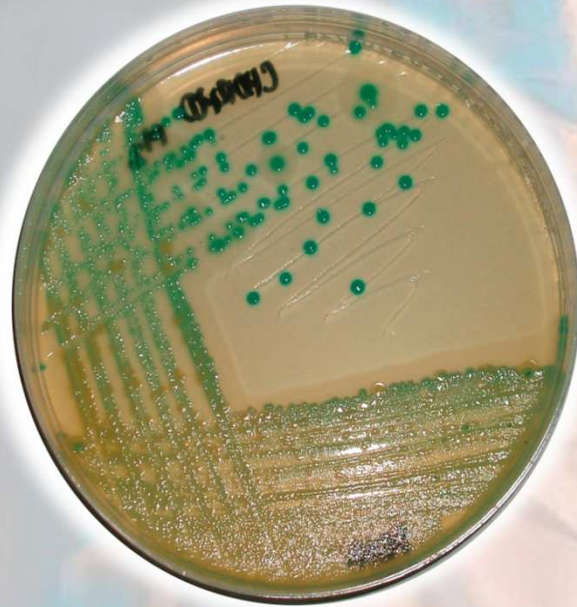
- Todas las colonias 5/5 con características morfológicas típicas: Colonias azul turquesa con halo opaco en ALOA dieron en las pruebas de inmunoprecipitación y de CAMP positivas para *L. monocytogenes*
- 3/5 colonias aisladas en A Palcam dieron positivas para *L. monocytogenes*

Resultados del Ensayo de Comparación en Muestras Contaminadas Naturalmente

- Los resultados corresponden a 4 muestras de carne analizadas, a cada una de las cuales se aisló 5 colonias típicas donde se obtuvieron
- **Positivos en ALOA** 20/20 colonias positivas para *L.monocytogenes* (las 4 muestras fueron positivas)
- Positivos en A Palcam 12/20 colonias positivas para *L.monocytogenes*
- **Concordantes** en ambos agares 3/4 muestras positivas para *L monocytogenes*



Resultados Aislamiento en ALOA – Muestra Natural



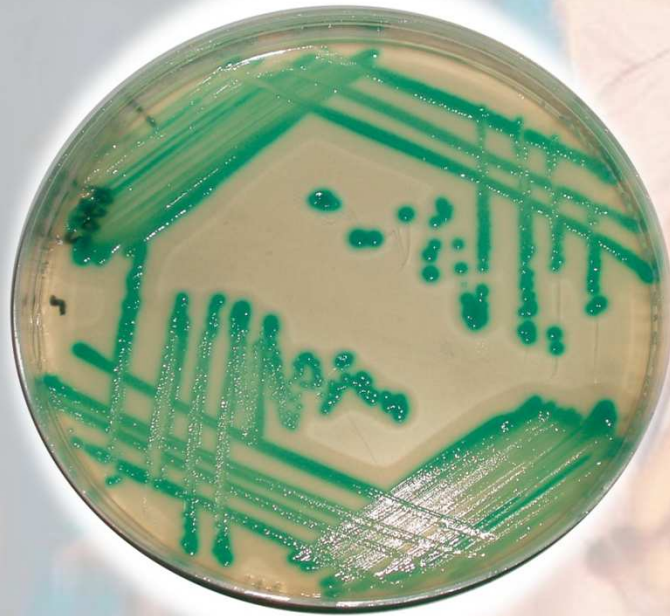
Siembra por aislamiento en ALOA a partir de 225 mL de caldo Fraser y 25 g de muestra de chorizo. Se observan 2 tipos de colonia, una azul turquesa sin halo opaco correspondiente a *L. innocua* y una colonia azul turquesa con halo opaco correspondiente a *L. monocytogenes*

Resultados del Ensayo de Comparación en Muestras Contaminadas Artificialmente

- Los resultados corresponden a 4 muestras de la matriz de prueba, a cada una de las cuales se aisló 5 colonias típicas donde se obtuvieron
- **Positivos en ALOA** 20/20 colonias positivas para *L.monocytogenes* (las 4 muestras fueron positivas)
- Positivos en A Palcam 18/20 colonias positivas para *L.monocytogenes*
- **Concordantes** en ambos agares 4/4 muestras positivas para *L monocytogenes*



Resultados Aislamiento en ALOA – Muestra Artificial



Aislamiento de *L. monocytogenes* sobre ALOA a partir de una muestra contaminada artificialmente

Resultados del Ensayo de Comparación

Resultados de las pruebas de Inmunoprecipitación

Todas las colonias presuntivas de *Listeria monocytogenes* en ALOA y de *Listeria spp* en A. Palcam fueron positivas en el ensayo de inmunoprecipitación, con lo cual se confirmó la presencia de *Listeria spp* en las 4 muestras analizadas



Resultados de la Prueba de Inmunoprecipitación



Identificación de *Listeria spp* con Singlepath *Listeria*, de cultivos presuntivos aislados de muestras contaminadas naturalmente y artificialmente.

Resultado de la prueba en SinglePath *Listeria*. La aparición de las 2 líneas confirma la aparición de *Listeria spp*

Resultados del Ensayo de Comparación

Resultados de las Pruebas de CAMP

1. Las colonias presuntivas de *L. monocytogenes* en ALOA, mostraron beta hemólisis acentuada hacia el *S aureus*, característica típica de este microorganismo. Igua resultado al control cepa ATCC de *L. monocytogenes*.
2. En el A. Palcam 8 de las 20 colonias seleccionadas a partir de las muestras naturales y 2 de las artificiales no mostraron reacción típica en esta prueba lo que indicó que no se trataban de *L.monocytogenes*



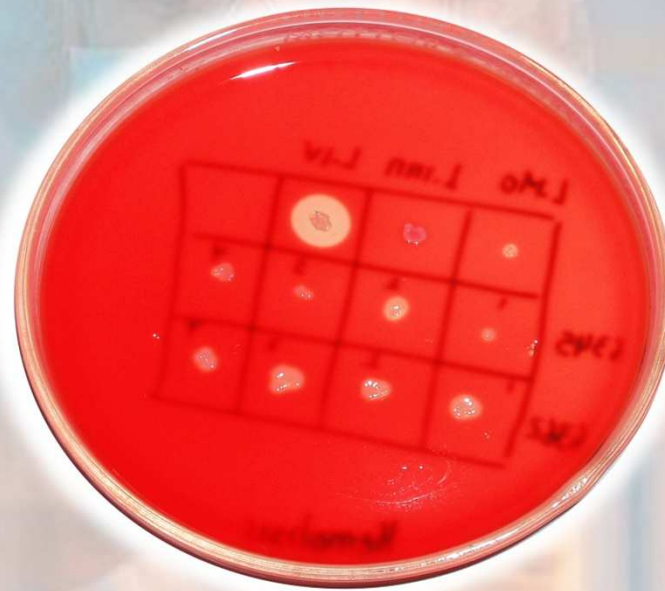
Resultados de la Prueba de CAMP



Prueba de CAMP:

- 1 línea: Control (+) *L. monocytogenes*. Hemólisis estrecha acentuada a *S. aureus*
- 2 línea: *L. innocua* No presenta hemólisis
3. línea: *L. ivanovii*. Hemólisis acentuada hacia *R. equii*
- 4-8 líneas: Muestras del ensayo

Resultados de la Prueba de Hemólisis



Pruebas de hemólisis. En el 1 cuadrante se observa el halo acentuado de *L. ivanovii* seguido de no hemólisis de *L. innocua* y un halo estrecho de *L. Monocytogenes* 2 y 3 cuadrante muestras

Conclusiones Preliminares

1. Se observa que en ALOA se diferencia claramente *L. monocytogenes* de otras *Listerias spp*
2. *L. ivanovii* produce un halo que se puede confundir con el de *L. monocytogenes* después de 48 h de incubación
3. El crecimiento de *Bacillus sp* puede ser debido a la presencia del cloruro de litio lo que permite que este microorganismo presente colonias azules.

Conclusiones Preliminares

4. Cuando está presente *L monocytogenes* y *L innocua*, es mayor la recuperación en ALOA que en A. Palcam
5. La presencia de *L monocytogenes* es más fácilmente detectada en ALOA después de 24 h de incubación y se puede tomar como positiva a 48 h

Conclusiones Preliminares

6. Las pruebas de inmunoprecipitación utilizadas y la prueba de CAMP confirmaron la presencia de *L. monocytogenes* en las muestras contaminadas natural y artificialmente
7. El medio ALOA disminuye el tiempo de identificación de *L.monocytogenes*, con respecto al método tradicional

🔍 **Análisis de laboratorio
confiables y
acreditados**

🔍 **Asesoría especializada
y enfocada**

🔍 **Investigación y mejora
de productos**

🔍 **Auditoría
interventoría e
de
proyectos**

GRACIAS



Calidad, seguridad e higiene
van de la mano

PBX: (57 1) 416 63 01

Web Page: www.iblaboratorio.com

Mail: contactenos@iblaboratorio.com