

Finalidade:

Meio seletivo e diferencial para isolamento de *Listeria* spp.

Registro ANVISA:

10097010149

Apresentação:

540176 - PALCAM-AGAR-20mL-PL 90X15-10PL

LB 172226
Rev 05 – 08/2024

1. INTRODUÇÃO

O Palcam ágar é baseado na formulação descrita por Van Netten *et al* e é recomendado para o isolamento de *Listeria monocytogenes* a partir de alimentos. Este meio está em conformidade com o padrão de formulação da ISO 11290 para a detecção e enumeração de *Listeria monocytogenes*.

O meio Palcam baseia-se na hidrólise da esculina e fermentação do manitol. Toda *Listeria* spp hidrolisa a esculina evidenciado por um escurecimento do meio. Este escurecimento por bactérias hidrolisantes de esculina resulta na formação de 6,7 dihidroxicumarina, que reage com ios férricos que estão presentes no meio, como citrato férrico amoniacal. Ocasionalmente, outros microrganismos podem crescer neste meio, tais como estafilococos ou enterococos. Manitol é o indicador de pH, o vermelho de fenol, foi adicionado para diferenciar cepas fermentadoras de manitol das espécies de *Listeria* spp, baseados na fermentação de manitol. No manitol a fermentação é demonstrada por uma mudança de cor na colônia que pode variar de vermelho à cinza para amarelo, devido à produção de ácidos. O Ágar Base Columbia fornece os nutrientes e co-fatores necessários para uma bom crescimento da *Listeria* spp. A seletividade do meio é através da presença de cloreto de lítio, sulfato de polimixina B e acriflavina HCl, presentes na Palcam Base Média e ceftazidima, fornecidas pelo suplemento antimicrobiano.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/ L
Agar columbia	39,0g
Extrato pancreático de caseína	10,0g
Peptona	5,0g
Extrato de levedura	5,0g
Infusão de coração de boi	3,0g
Amido de milho	1,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Ágar	15,0g
Manitol	10,0g
Dextrose	0,5g
Esculina	1,0g
Citrato férrico amoniacal	0,5g
Cloreto de lítio	15,0g
Vermelho de fenol	0,08g
Acriflavina	5,0mg
Sulfato de polimixina B	0,01g
Ágar	2,0g
Água deionizada	1L

Formulação	Concentração
Ceftazidima	40,0mg
Água deionizada	10mL

A fórmula pode ser ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios de desempenho.

3. AMOSTRAS

a- Tipos de amostras

- Vários tipos de amostra podem ser inoculadas no Palcam Ágar, como por exemplo, amostras de alimentos, ambientais e outros materiais não clínicos.

- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.

- Sempre considerar as necessidades específicas dos microrganismos alvos das análises, microrganismos com necessidades especiais (suplementos específicos ou ambiente controlados) podem não apresentar crescimento adequado se semeados em meio de cultura que não apresente os requisitos mínimos.

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte, o produto pode permanecer em temperatura ambiente por até 72h. No laboratório as placas devem ser armazenadas em temperatura de 2 a 8°C, condições em que se mantém estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza. O uso de refrigerador tipo *frost-free* não é recomendado para meios de cultura devido ao efeito desidratante deste tipo de equipamento.

Considerando que este produto é gelatinoso e sua composição pode apresentar até 80% de água, ao sofrer variações de temperatura (quente-frio ou frio-quente) todo meio de cultura pode gerar condensação, de pouca a muita, acumulando água na placa. Recomenda-se guardar as placas com os meios de cultura virados para cima e, quando necessário, desprezar a água acumulada e deixar o meio de cultura estabilizar a temperatura antes de sua utilização.

Conforme descrito em literatura, o laboratório deve retirar da refrigeração apenas a quantidade de produto que deverá ser utilizada em sua rotina e deixar estabilizar a temperatura, ou secar a água condensada, antes de sua utilização, em temperatura ambiente, podendo utilizar a incubação em estufa ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) para redução do tempo de secagem ou estabilização. A repetição do processo de refrigeração/estabilização não é recomendada, a constante troca de temperatura pode levar a desidratação do meio, expor o produto a contaminações ou gerar um acúmulo de água excessivo.

A água acumulada por condensação, ocasionada por alguma variação de temperatura, não influencia no desempenho do produto, desde que este não apresente ressecamento ou diminuição de espessura.

Devido à presença de substratos sensíveis, recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

b- Precauções e cuidados especiais

- Uso restrito por profissionais;

- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;

- Não inalar ou ingerir;

- Não utilizar placas com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;

- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;

- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos Detrilab.
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

5. MATERIAL NECESSÁRIO (porém não fornecido)

- Estufa bacteriológica;
- Bico de Bunsen;
- Pipetas/ ponteiros estéreis;
- Alça bacteriológica.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- a- Retirar o pacote de placas da geladeira e separar as placas a serem usadas, retornando o pacote à geladeira;
- b- Colocar as placas em estufa bacteriológica entre 35-37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura;
- c- Semear o material de acordo com técnicas estabelecidas pelo laboratório referentes ao acondicionamento, preparo e diluições;
- d- Incubar por período de tempo e temperatura exigido pela técnica adotada.
- e- Realizar leitura e identificação conforme critério adotado pelo laboratório.

7. RESULTADOS

- As colônias de *Listeria* spp são cinzentas esverdeadas circundadas por halos castanhos-escuros a pretos.
- Ocorrendo o desenvolvimento de colônias características deve ser realizada a confirmação bioquímica, conforme metodologia estabelecida pelo laboratório.

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

Os resultados falsamente positivos ou negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- A maioria da *Listeria*, com exceção de *L. grayi*, não fermentar manitol e, portanto, produzir verdes colônias.
- O ágar Palcam foi avaliado nos principais alimentos matrizes e um grande número de estirpes bacterianas. Dada a grande variedade de produtos alimentares, procedimentos e flora microbiana, recomendamos que verifique se o ágar Palcam está adequadamente adaptado à especificidade da amostra.
- O crescimento depende dos requisitos de cada microrganismo. Por conseguinte, é possível que certas espécies de *Listeria* que possuem requisitos específicos possam não se desenvolver.
- O desenvolvimento de colônias com as características típicas no Palcam Ágar não são confirmatórias. A identificação das colônias que se desenvolverem neste meio devem ser realizadas provas bioquímicas referenciadas.
- Tempo longo entre a semeadura da amostra e análise. Ao utilizar colônias isoladas em um período superior a 24 horas, o metabolismo bacteriano pode ficar comprometido e a leitura de alguns parâmetros podem consequentemente ficar defasados ou até mesmo não ocorrer. Em colônias recentes (inferior ao período de 18 horas) não se encontram com o metabolismo bem definido, e algumas provas podem não ocorrer.
- Incubação em temperatura inadequada.
- Sobrecarga de inóculo ou falta de inóculo. Placas com inóculos mais carregados podem gerar resultados falsamente positivos e inóculos em menor quantidade podem fornecer resultados falsamente negativos.
- Interpretação equivocada de resultados.
- Técnica de assepsia inadequada.
- Tempo excessivo ou insuficiente de incubação. Tempo excessivo de incubação fornece resultados falsamente positivos e tempo insuficiente fornece resultados falsamente negativos.
- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas.
- Contaminação cruzada por uso de acessórios não esterilizados corretamente ou ambiente não asséptico.
- Utilização de meios de cultura com aparência alterada.

- Não aguardar para que os materiais atinjam a temperatura ambiente no momento do uso.
- Erro na conservação do produto pode ocasionar desidratação do meio e alteração das propriedades dos componentes.

9. CONTROLE DA QUALIDADE

- *Materiais necessários*

Cepas padrão: ATCC® (*American Type Culture Collection*) ou derivadas).

- *Controle de qualidade recomendado:*

Parâmetros	Incubação	Resultado esperado
Crescimento Presuntivo <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	Inóculo aprox. 100 UFC/ Em microaerofilia 33-37°C 48h	Crescimento bom
Seletividade qualitativa <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Inóculo aprox. 10.000 UFC/ Em microaerofilia 33-37°C 48h	Inibição total
Seletividade qualitativa <i>E. coli</i> ATCC 25922	Inóculo aprox. 10.000 UFC/ Em microaerofilia 33-37°C 48h	Inibição total
Seletividade qualitativa <i>S. aureus</i> ATCC 25923	Inóculo aprox. 10.000 UFC/ Em microaerofilia 33-37°C 48h	Inibição parcial
Meio não inoculado	Meio sólido levemente opaco, com coloração avermelhada escura, ligeiramente opalescente, livre de precipitados ou partículas visíveis.	
pH	7,0 – 7,4	

- *Periodicidade*

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

- *Análise dos resultados*

As cepas inoculadas no material devem apresentar características de crescimento esperados. Caso se constate algum problema ou diferença, os resultados de amostras clínicas não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

10. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:

- O usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
 - Os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
 - Os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.
- Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 2015.
2. Difco Manual, edition 2009.
3. ISO 11133. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. 1st ed. The International Organization for Standardization, 2014.
4. ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria*

monocytogenes - Part 1: detection method, 1st ed. The International Organization for Standardization, 2017.

5. McLAUCHLIN, J. & REES, C.E.D., 2009. Genus I *Listeria* Pirie 1940. In: DeVOS, P., GARRITY, G.N., JONES, D. *et al.* (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., volume 3. New York: Springer.

6. SILVA, de Neusely; *et al.* Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 5^a ed. São Paulo: Blucher, 2017.



Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda

CNPJ 76.619.113/0001-31

Insc. Estadual 1370012926

Rua: Casemiro de Abreu, 521

Pinhais/PR CEP 83.321-210

Telefone (41) 3661-9000

www.laborclin.com.br

Responsável Técnico:

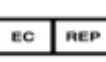
Maire Wakamori – CRF/PR-20176

Serviço de Assessoria ao Cliente

SAC 0800-0410027

sac@laborclin.com.br

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)

