



COMPASS Ágar *Listeria*

USO

O COMPASS Ágar *Listeria* é um meio seletivo usado para a diferenciação, isolamento e contagem de *Listeria monocytogenes* em produtos alimentícios, amostras ambientais, e amostras patológicas de origem animal independente da contaminação base. Sua formulação corresponde àquela prevista nos protocolos de detecção e contagem das normas EN ISO 11290-1 e 11290-2 incluindo a Emenda A1. O COMPASS Ágar *Listeria* é também utilizado no contexto do método alternativo rápido para a detecção de *L. monocytogenes*, em produtos alimentícios humanos e amostras ambientais, abreviado para uma etapa de pré-enriquecimento seletiva: é oficialmente licenciado pela Certificação AF NOR, sob a referência número BKR 23/2-11/02, aonde o seu período de validade vai até o dia 28 de novembro de 2014. O COMPASS Ágar *Listeria* pode também ser usado dentro do contexto do método alternativo rápido para contagem de *L. monocytogenes* para todos os alimentos humanos e amostras ambientais, por inoculação de uma placa seja na sua superfície ou em profundidade: é oficialmente licenciado pela Certificação AFNOR, sob a referência número BKR 23/05-12/07, aonde seu período de validade vai até o dia 4 de dezembro de 2011.

HISTÓRIA

Em 1991, Mengaud *et al.* identificaram uma fosfolipase específica C fosfatidil-inositol (PI-PLC) produzida por duas espécies patogênicas de *Listeria*: *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii*, sendo o primeiro o único agente patogênico humano. Eles sugeriram que esta enzima podia ser um fator de virulência nestas espécies. No mesmo ano, Notermans *et al.* desenvolveram um método de camada dupla para a detecção de PI-PLC em um meio ágar sólido usando L- α -fosfatidilinositol. Sob estas condições, as duas espécies patogênicas formam colônias rodeadas por um halo opaco, enquanto as colônias das espécies não-patogênicas não possuem esta característica. O uso de um substrato cromogênico, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicosídeo (X-glicosídeo), permitiu a substituição da esculina previamente usada nos meios Oxford e PALCAM. Desta forma, a presença da esculinase (β -glicosidase) pode ser demonstrada pela formação de um precipitado azul no centro da colônia. Um uso criterioso de antibióticos inibe com sucesso quase todas as outras bactérias contaminantes. Pela associação desses três princípios, o COMPASS Ágar *Listeria* permite a detecção de colônias azuis rodeadas por um halo opaco, típico da *Listeria monocytogenes*.

PRINCÍPIOS

- As peptonas e os fatores de crescimento (extrato de levedura, piruvato sódico e sulfato de magnésio) favorecem o excelente crescimento da *Listeria monocytogenes*.
- O extrato de levedura é também uma fonte de vitaminas do complexo B.
- O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico do meio.
- *Listeria* hidrolisa o 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicopiranosídeo (ou X- β -glicosídeo). O produto resultante é submetido a uma dimerização oxidativa que forma um precipitado azul no centro das colônias.
- O fosfatidil-inositol é usado como um substrato para a detecção da fosfolipase C da *Listeria monocytogenes*. Quando ele é degradado, um precipitado opaco é formado ao redor das colônias.
- A microflora secundária é inibida pela associação do cloreto de lítio e por uma mistura criteriosa de agentes seletivos que incluem vários antibióticos e um agente antifúngico.

PREPARAÇÃO DO MEIO COMPLETO A PARTIR DO MEIO BASE DESIDRATADO (BK192) E SUPLEMENTOS (BS070+BS071)

- Dissolver 71,9 g do meio base desidratado (BK192) em 1 litro de água destilada ou deionizada.
- Lentamente agitar até a dissolução completa.
- Dispensar em frascos de 1 L.
- Esterilizar em um autoclave a 121°C por 15 minutos
- Resfriar e manter entre 44-47°C.
- Assepticamente reconstituir o suplemento seletivo liofilizado (BS071) adicionando 10 mL de água destilada estéril.
- Para cada frasco de 1 L do meio base, primeiro adicionar assepticamente 10 mL do suplemento seletivo reconstituído, seguido por 30 mL do suplemento para enriquecimento (BS070).
- Misturar completamente após a adição de cada suplemento.
- Despejar em placas de Petri estéreis, para uso no contexto da detecção ou contagem por inoculação em superfície.
- Secar as placas em uma incubadora, com as tampas parcialmente removidas.

PREPARAÇÃO DO MEIO COMPLETO A PARTIR DO KIT BT008

- Derreter o meio base (Reagente R1, BM12800 a partir do kit BT008) uma quantidade de tempo mínima necessária a fim de atingir a liquefação total.
- Resfriar e manter entre 44-47°C.
- Assepticamente reconstituir o suplemento seletivo liofilizado (Reagente R2, BS06708 a partir do kit BT008) adicionando 2 mL de água destilada estéril.
- Para cada frasco de 200 mL do meio base, primeiro adicionar assepticamente 2 mL do suplemento seletivo reconstituído, seguido por 6 mL do suplemento para enriquecimento (Reagente R3, BS06808 a partir do kit BT008).
- Misturar completamente após a adição de cada suplemento.
- Despejar em placas de Petri estéreis, para uso no contexto da detecção ou contagem por inoculação em superfície.
- Secar as placas em uma incubadora, com as tampas parcialmente removidas.

INSTRUÇÕES PARA USO

Obedecer as Boas Práticas de Laboratório (NF EN ISO 7218).

♦ Método de detecção alternativo rápido

- Preparar uma diluição primária da amostra a ser analisada em **caldo Half Fraser** [BK133 + (BS030 ou BS032) ou BK173 + (BS059 ou BS062) ou BM016 por exemplo], tendo cuidado em respeitar a proporção inicial de 1:10 (amostra para o meio de enriquecimento).
- Incubar esta suspensão inicial a **(30 ± 1)°C por (24 ± 2) horas**.
- Inocular 100 µL da cultura acima em uma placa de **COMPASS Ágar *Listeria*** usando uma alça ou pipeta Pasteur da cultura acima.
- Incubar a **(37 ± 1)°C por (24 ± 2) horas**.

NOTA 1:

É possível prolongar a incubação por até 48 horas no caso de algumas matrizes de laticínios onde a formação do halo é lenta.

♦ Método de contagem alternativo rápido

- Preparar uma diluição primária da amostra a ser analisada em **Água Peptonada Tamponada** [BK018, BK131, BM010, BL056 ou BM057, por exemplo].
- Incubar a suspensão a **(20 ± 2)°C por (60 ± 5) minutos**.
- Transferir 0,1 mL da suspensão, e se necessário, qualquer diluição seriada para a superfície de uma única placa (uma placa por diluição) do **COMPASS Ágar *Listeria***.
- Espalhar o inóculo sobre a superfície com a ajuda de uma alça de Drigalski estéril.

ou

- Transferir 0,1 mL da suspensão, e se necessário, qualquer diluição seriada para uma placa de Petri estéril vazia (uma placa por diluição).
- Despejar aproximadamente 15 mL do meio completo fundido na placa.
- Homogeneizar bem por agitação e deixar solidificar sobre uma superfície fria.
- Incubar a **(37 ± 1)°C por (24 ± 2) horas**.
- Na ausência de colônias características (ausência de colônias ou colônias azuis com halos apenas parcialmente visíveis após 24 horas), prolongar a incubação por um período adicional de 24 horas.
- A expressão dos resultados deve ser feita conforme as recomendações estabelecidas na ISO 7218 (agosto de 2007).

NOTA 2:

O COMPASS Ágar *Listeria* pode também ser usado como meio de isolamento primário obrigatório na detecção de *Listeria monocytogenes* como descrito na norma EN ISO 11290-1/A1, assim como meio unitário para a contagem de *L. monocytogenes* segundo EN ISO 11290-2/A1.

NOTA 3:

No contexto da VALIDAÇÃO AFNOR, porções teste pesando mais que 25 g não devem ser testadas.

RESULTADOS

Colônias características de *Listeria monocytogenes* aparecem azuis ou azul-esverdeadas e são rodeadas por um halo opaco. Outras espécies de *Listeria* podem formar colônias azuis ou azul-esverdeadas, mas sem halos. Deve ser notado que certas cepas de *Listeria ivanovii* podem às vezes produzir colônias características, entretanto usualmente de tamanho muito menor.

CONFIRMAÇÃO

No contexto da VALIDAÇÃO AFNOR, todas as amostras identificadas como positivas pelo método **COMPASS Ágar *Listeria*** devem ser confirmadas por uma das seguintes maneiras:

Opção 1: De acordo com os **testes clássico descritos em métodos padronizados por CEN ou ISO (incluindo uma etapa de purificação)** a partir de colônias características isoladas do **COMPASS Ágar *Listeria***.

Para o protocolo de confirmação ver a norma NF EN ISO 7218.

Opção 2: O uso do **CONFIRM' Ágar *L. mono***.

Opção 3: O uso de outro método de Validação AFNOR, utilizando um princípio diferente daquele encontrado no COMPASS Ágar *Listeria*. Neste caso, o protocolo validado do segundo método deve ser seguido na sua totalidade, e todas as etapas anteriores a etapa intermediária a partir da qual é feita a confirmação devem ter ligações comuns entre os dois métodos (por exemplo, um enriquecimento seletivo comum com os mesmos meios). Os dois métodos validados (um para detecção, o outro para confirmação) devem,

portanto ter um procedimento comum.

No caso de resultados discordantes (positivo pelo método alternativo, sem confirmação de uma das opções mencionadas acima), o laboratório deve realizar as etapas necessárias para assegurar a validade dos resultados obtidos.

NOTA 4:

Quando a presença de *Listeria monocytogenes* já tiver sido confirmada seguindo os protocolos de detecção, é possível pular a etapa de confirmação após a realização do procedimento de contagem, no caso de resultados positivos.

FÓRMULA TÍPICA

(pode ser ajustada a fim de atingir melhores resultados)

Para 1 litro de meio:

- Peptona péptica de carne.....	18,00 g
- Triptona.....	6,00 g
- Extrato de levedura.....	10,00 g
- Piruvato sódico.....	2,00 g
- Glicose.....	2,00 g
- Glicerofosfato de magnésio.....	1,00 g
- Sulfato de magnésio, anidro.....	0,50 g
- Cloreto de sódio.....	5,00 g
- L- α -fosfatidil-inositol.....	2,00 g
- Hidrogenofosfato dissódico, anidro.....	2,50 g
- Cloreto de lítio.....	10,00 g
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicopiranosídeo.....	0,05 g
- Ácido nalidíxico.....	0,02 g
- Ceftazidima.....	0,02 g
- Polimixina B (sulfato).....	76700 IU
- Cicloheximida.....	0,05 g
- Ágar Bacteriológico.....	12,00 g

pH do meio pronto para uso a 25°C: $7,2 \pm 0,2$.

CONTROLE DE QUALIDADE

- Meio base desidratado: pó bege, de fluxo livre e homogêneo.
- Meio preparado em placas: ágar opalescente, âmbar.
- Típica resposta da cultura após 24-48 horas de incubação a 37°C:

Microrganismos		Crescimento (Índice de Produtividade P_R)	Características
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 59.53	$P_R \geq 50\%$	colônias azul-esverdeadas rodeadas por um halo opaco
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 78.31	$P_R \geq 50\%$	colônias azul-esverdeadas rodeadas por um halo opaco
<i>Listeria innocua</i>	ATCC® 33090	bom, valor 2	colônias azul-esverdeadas sem um halo
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	inibido, valor 0	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	inibido, valor 0	

ESTOCAGEM / SHELF LIFE

Meio base desidratado:

- Armazenar entre 2-30°C, ao abrigo da luz.
- A data de validade está indicada na etiqueta.

Meio preparado completo, com suplementos (valor de referência*):

- Preparado a partir de componentes do kit: 15 dias entre 2-8°C.

Meio pré-vazado em placas de Petri ou kit de reagentes:

- Armazenar entre 2-8°C, ao abrigo da luz.
- A data de validade está indicada na etiqueta.

EMBALAGEM

Código

Meio pré-vazado em placas de Petri (Ø 90 mm):

- 20 placas
- 120 placas

BM12308

BM12408

Kit para COMPASS Ágar *Listeria*:

- Composto de 6 frascos x 200 mL do meio base (R1);
6 frascos suplemento seletivo liofilizado (R2) ; e
6 frasco de suplemento para enriquecimento líquido (R3)

BT00808

Meio desidratado:

- Frasco de 500 g

BK192HA

Suplemento para Enriquecimento:

- Embalagem com 8 frascos para 1 L do meio base

BS07008

Suplemento Seletivo:

- Embalagem com 8 frascos para 1 L do meio base

BS07108

FOTO ILUSTRATIVA

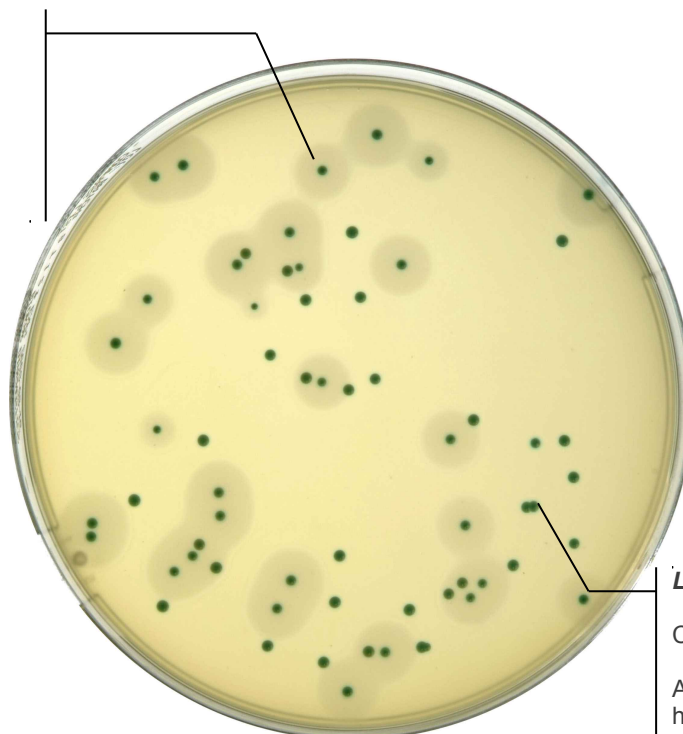
Referência do produto: BK192HA + [BS07008 + BS07108], BM12308/12408, BT00808.

Meio usado para: A diferenciação, isolamento e contagem de *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes

Colônia característica

Azul-esverdeada rodeada
por um halo opaco



Listeria sp.

Colônia característica

Azul-esverdeada sem um
halo

COMPASS Ágar *Listeria*

Ref: BM12308

Incubação por 24 horas a 37°C (superfície)

Características da *Listeria monocytogenes*: colônias azul-esverdeadas rodeadas por um halo opaco.
(hidrólise do X-β-glicosídeo e degradação do L-α-fosfatidil-inositol)

BIBLIOGRAFIA

MENGAUD, J., BRAUN-BRETON, C., and COSSART, P.. 1991. Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor ? *Molecular Microbiology*, **5(2)** : 367-372.

NOTERMANS, S.H., DUFRENNE, J., LEIMESTER-WÄCHTER, M., DOMANN, E., and CHAKRABORTY, T.. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **57(9)** : 2666-2670.

OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., AGOSTI, M.. 1997. Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. *Industrie Alimentari*, **36** : 1-3

OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., and AGOSTI, M.. 1997. Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings p6. ADRIA Quimper France. 16-18 June 1997.

NF EN ISO 16140 (V 08-103). Octobre 2003. Microbiologie des aliments. Protocole pour la validation des méthodes alternatives.

XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2). Janvier 2004. Microbiologie des aliments. Guide pour la préparation et la production des milieux de culture. Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture.

NF EN ISO 11290-1/A1 (V 08-028-1/A1). Février 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 1 : Méthode de recherche - Amendement 1 : Modification des milieux d'isolement, de la recherche de l'hémolyse et introduction de données de fidélité.

NF EN ISO 11290-2/A1 (V 08-028-2/A1). Février 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Partie 2 : Méthode de dénombrement - Amendement 1 : Modification du milieu d'isolement.

NF V45-008. Mars 2009. Poissons transformés. Méthode pour le dénombrement de *Listeria monocytogenes* aux faibles niveaux de contamination dans le saumon fumé et la truite fumée.



BKR 23/2-11/02 & BKR 23/05-12/07
MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA AGRONEGÓCIO
Licenciado pela Certificação AFNOR
www.afnor-validation.org

*O valor de referência corresponde à vida de prateleira esperada quando preparados sob condições laboratoriais normais, seguindo as instruções do fabricante. É fornecido apenas como guia e sem garantia, expressa ou implícita associada com esta informação.

As informações fornecidas na embalagem procedem de formulações ou instruções descritas neste documento.
As informações e especificações contidas nesta ficha técnica datam de 12/10/2010.
Elas estão sujeitas a alterações a qualquer momento, sem aviso prévio.
Código do documento: BM123/A/2007-05: 7.