

Finalidade:

Meio seletivo diferencial para isolamento de *L.monocytogenes*.

Registro ANVISA:

100.970.10-167

Apresentação:

540118 - LISTERIA-ALOA-AGAR-15mL-PL90X15-10PL

LB 172176
Rev 05 – 09/2024

1. INTRODUÇÃO

O Ágar Listeria de Ottaviani & Agosti (ALOA), incorporam dois substratos diferentes, um cromogênico, β -glicosidase, e um não cromogênico, a(s) fosfolipase(s). O ALOA foi introduzido pela ISO em 2004, através das emendas às normas ISO 11290-1:1996 e 11290-2:1998.

A Listeria é amplamente distribuída na natureza e no ambiente de produção de alimentos (solo, água, vegetação, fezes de animais saudáveis, incluindo humanos, esgotos, resíduos de abatedouros, ração animal, frango resfriado e congelado), mas a doença é transmitida primordialmente através do consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes* (McLauchlin & Rees, 2009).

O Listeria ALOA Agar é um meio de cultura cromogênico, seletivo e diferencial usado para o isolamento de *Listeria monocytogenes* e outras *Listeria* spp. O meio possui o composto cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosídeo, um substrato para a detecção de β -glicosidase. Esta enzima é comum em todas as *Listeria* spp. Quando presente no meio ALOA, as colônias de *Listeria* spp. hidrolisam o composto cromogênico e as colônias desenvolvidas se apresentam com a coloração verde-azuladas. A diferenciação de *Listeria monocytogenes* de outros *Listeria* spp. é alcançado através da produção de uma fosfolipase C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), reconhecida como um fator de virulência de *L. monocytogenes*. As cepas de *Listeria monocytogenes* hidrolisam o substrato específico purificado adicionado ao meio produzindo um halo opaco em torno das colônias. Este meio contém uma base nutricional que garante um bom desenvolvimento para uma ampla gama de bactérias devido às fontes de nutrientes, vitaminas e de energia (proveniente de peptonas, extrato de leveduras e de fontes de carbono). A adição de inibidores resulta em uma redução acentuada no crescimento de outros microrganismos não alvo tais como demais espécies de Gram positivos e Gram negativos (ácido nalidíxico, ceftazidima, polimixina) bem como bolores e leveduras (cicloeximida e anfotericina). A seletividade é obtida pela adição de cloreto de lítio, ácido nalidíxico e cicloheximida, enquanto ágar é o agente solidificante.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/ L
Digesto enzimático de tecido animal	18,0g
Digesto enzimático de caseína	6,0g
Extrato de levedura	10,0g
Piruvato de sódio	2,0g
Glicose	2,0g
Glicerofosfato de magnésio	1,0g
Sulfato de magnésio anidro	0,5g
Cloreto de sódio	5,0g
Cloreto de lítio	10,0g
Fosfato dissódico anidro	2,5g
X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicopiranosídeo)	0,05g
Ágar	12,0g
Água deionizada	1L

2.1 Suplemento

Formulação	Concentração/ L
L- α -fosfatidilinositol (50mL da solução aquosa 4%)	2g/L
Ácido nalidíxico (5mL da solução 0,4% em NaOH 0,05mol/L)	0,02g/L
Anfotericina B (10mL da solução 1 mol/L de HCL)	0,01g/L
Ceftazidima (5mL da solução aquosa 0,4%)	0,02g/L
Sulfato de polimixina B (7,67mL da solução aquosa 1%)	76.7000 unidades
Cicloeximida (5mL da solução 1%)	0,05g/L

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

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras

- Vários tipos de amostra podem ser inoculadas no Listeria ALOA, 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

- O produto destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- 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. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Estufa bacteriológica;
- Bico de Bunsen;
- Alças bacteriológicas.

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- Seguir a técnica de contagem e identificação conforme critério adotado pelo laboratório.

7. RESULTADOS

- As colônias de *Listeria* spp são pequenas, azuis claras, sem halo ao redor das colônias.
- As colônias de *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* são azuis claras, com halo opaco ao redor das colônias.
- 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 35/2015)
Os resultados falsamente positivos ou negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- O desenvolvimento de colônias com as características típicas no Listeria ALOA Ágar não é confirmatória. A identificação das colônias que se desenvolverem neste meio deve ser realizadas provas bioquímicas referenciadas.

- A maioria de *Listeria ivanovii* também produz um halo opaco ao redor das colônias após 48 horas de incubação.
- Há cepas de *Listeria monocytogenes* que, em condições de "stress" (particularmente provocado por ácidos), formam halo muito fraco ou não formam halo.
- Incubação em temperatura inadequada.
- Utilização de alça flambada não resfriada.
- 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 DE QUALIDADE

- Materiais necessários

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

- Controle de qualidade recomendado:

Parâmetros	Resultado esperado	
Produtividade qualitativa - <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	PR ≥ 0,5 - Contagem obtida em comparação ao ágar TSA. Desenvolvimento de colônias esverdeadas, com halo opaco*	Incubação 33-37°C por 48h
Especificidade qualitativa - <i>L. innocua</i> ATCC 33090	Colônias esverdeadas, sem halo opaco.	Incubação 33-37°C por 48h
Seletividade qualitativa - <i>E. coli</i> ATCC 25922	Inibição total**	Incubação 33-37°C por 48h
Seletividade qualitativa - <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Inibição total**	Incubação 33-37°C por 48h
Meio não inoculado	Meio sólido ligeiramente opalescente, com coloração âmbar claro, homogêneo, podendo apresentar precipitados ou partículas visíveis.	

* Inóculo aproximado de 100 UFC

** Inóculo aproximado de 10.000 UFC

- Periodicidade

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

- Análise dos resultados

As cepas padrão inoculadas no material devem apresentar características de crescimento esperado. Caso se constate algum problema referente a não recuperação do inóculo de cepas controle, os resultados de amostras 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.M., JONES, D. *et al.* (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Volume 3. New York: Springer. pp. 244-257.
6. SILVA, de Neusely; *et al.* Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, 5^a ed. São Paulo: Blucher, 2017.

12. PRODUTOS RELACIONADOS

530166 FRASER-CALDO-1/2 CONC.-225mL-CX 10FR
510165 FRASER-CALDO-10mL-TB 16,5X92-CX10TB
540176 PALCAM-AGAR-20mL-PL 90X15-10PL
510168 XILOSE CALDO-3mL-TB13X100-CX10TB

510167 RAMNOSE CALDO-3mL-TB13X100-CX10TB
510166 TSA-AGAR-YE-5mL-TB 16,5X92-CX 10TB
570197 PEROXIDO HIDROGENIO-10V-FR 10mL
540204 SANGUE-AGAR-SEG.ISO-20mL-PL 90X15-PC10PL
660674 S.AUREUS LB 25923-1mL-FR 1UN
510173 SIM-AGAR-H2S/IND/MOT-5mL-TB13X100-CX10TB
620520 COLORACAO GRAM-CONJ. 4x100mL



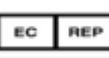
Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda

CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua Casimiro de Abreu, 521
Pinhais/PR CEP 83.321-210
Telefone 041 36619000
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 in vitro.
	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)