

# SOLUS *LISTERIA* ELISA

Sistema de Testes Baseados em Imunoensaio para  
a Detecção de *Listeria* spp.  
em Amostras Ambientais e de Alimentos

**Número do folheto informativo:** 36  
**Número de emissão:** 1.0  
**Data de emissão:** Janeiro de 2020  
**Código(s) do produto:** LIS-0096S; LIS-0480S  
**Organismo de certificação:** AFNOR





SOL 37/02-06/13  
MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA O AGRONEGÓCIO  
<http://nf-validation.afnor.org/en>

Este método está certificado pela AFNOR para a deteção de *Listeria* spp. em todos os produtos alimentares para humanos (através da realização de ensaios de validação num vasto conjunto de alimentos) e amostras ambientais da produção (n.º de ref. de validação **SOL 37/02-06/13**).

## 1. INTRODUÇÃO

O Solus *Listeria* ELISA proporciona um resultado negativo ou presumivelmente positivo de 2 etapas de enriquecimento no período de 44 a 52 horas, incluindo a duração do ensaio.

## 2. FINALIDADE

O Solus *Listeria* ELISA é utilizado para a detecção de *Listeria* spp. em amostras ambientais da produção e de alimentos selecionados. O método de ensaio é fácil de realizar, mas requer instalações laboratoriais e pessoal com qualificação e formação adequada. Para aqueles que o utilizem pela primeira vez, recomenda-se que obtenham uma formação básica fornecida pela Solus Scientific Solutions Ltd.

A utilização do método inclui o cumprimento das boas práticas de laboratório (consulte a EN ISO 7218).

## 3. REAGENTES FORNECIDOS

A maioria dos componentes do kit são fornecidos estabilizados e prontos para utilizar na concentração de atuação, com o concentrado de tampão de lavagem a ser o único que requer diluição. Cada kit possui material suficiente para 1 (LIS-0096S) ou 5 (LIS-0480S) x 93 determinações, além dos controlos. A data de validade do kit encontra-se no rótulo de cada produto.

Componente	Aspetto	Volume		Comentários
		LIS-0096S	LIS-0480S	
Placa de ensaio	Microplaca de 96 poços com formato de tira amovível	1	5	Poços revestidos com anticorpos contra <i>Listeria</i> spp.
Controlo negativo	Líquido laranja pálido. Rótulo verde.	3 ml	10 ml	Concentração de atuação. Contém diluente com conservante.
Controlo positivo	Líquido preto. Rótulo vermelho.	3 ml	10 ml	Concentração de atuação. Contém <i>Listeria</i> inativada pelo calor em diluente com conservante.
Conjugado	Líquido incolor/de cor palha muito pálida. Rótulo laranja.	11 ml	60 ml	Concentração de atuação. Contém conjugado de anticorpo de peroxidase de rábano em diluente com conservante.
Substrato	Líquido incolor/azul muito pálido. Rótulo azul.	11 ml	60 ml	Concentração de atuação. Contém 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrogénio e estabilizadores.
Solução de paragem	Líquido incolor. Rótulo amarelo.	11 ml	60 ml	Concentração de atuação. Contém 0,2 M de ácido sulfúrico.
Concentrado de tampão de lavagem	Líquido incolor/amarelo/laranja. Rótulo branco.	10 ml x 6	60 ml x 5	Concentrado. Diluir antes de utilizar.

## 4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS QUE NÃO SÃO FORNECIDOS

Frigorífico a 2-8 °C	Temporizador
Água desionizada ou destilada (DI)	Incubadora a 37±1 °C
Caldo Half Fraser	Incubadora a 30±1 °C
Caldo seletivo RELM	Tubos para ebulição de amostras (p. ex., tubos sem aro de 5 ml de polipropileno, 12x75 mm)
Amostras de esponja e zaragatoas impregnadas em tampão de neutralização adequado (p. ex., caldo Lethen ou tampão de alta capacidade)	Aparelho para aquecimento (p. ex., incubadora de calor) com capacidade para aquecer a 85-100 °C
Provetas graduadas para diversos volumes (p. ex., 250 ml, 1 L)	Pipetas e pontas (1 ml; 0,1 ml)
Tubos de ensaio esterilizados de 10 ml adequados para enriquecimento seletivo	Dynex DS2 ou lavadora de microplacas e leitor de microplacas com filtro de 450 nm
Homogeneizador (ou aparelho similar) e bolsas	Autoclave para descontaminação de amostras
Pipetas de transferência de 3 ml (esterilizadas)	Placas de ágar e equipamento de teste de confirmação padrão.
Agitador vórtex	Consulte os pormenores na secção 10.

## 5. PREPARAÇÃO DE REAGENTES

### 5.1 Tampão de lavagem:

Prepare o seguinte num recipiente limpo.

LIS-0096S	LIS-0480S
Adicione 10 ml (1 garrafa) do concentrado de tampão de lavagem em 240 ml de água desionizada (DI) e agite para misturar.	Adicione 60 ml (1 garrafa) do concentrado de tampão de lavagem em 1440 ml de água desionizada (DI) e agite para misturar.

### 5.2 Caldo de cultura (meio de crescimento):

- Prepare o caldo Half Fraser de acordo com as instruções do fabricante. Deixe arrefecer até à temperatura ambiente (18-25 °C) antes de utilizar nos testes.
- Prepare caldo RELM de acordo com as instruções do fabricante e transfira para tubos esterilizados de 10 ml. Deixe arrefecer até à temperatura ambiente (18-25 °C) antes de utilizar nos testes.

## 6. PREPARAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE AMOSTRAS - método padrão

### 6.1 Pré-enriquecimento (todas as amostras exceto as superfícies ambientais)

- Homogeneíze X g da amostra a testar, se necessário por homogeneizador, em 9\*X ml de caldo Half Fraser e incube durante 22-26 horas a 30±1 °C. No contexto da NF VALIDATION, não foram testadas tomas de ensaio com um peso superior a 25 g.

### 6.2 Pré-enriquecimento para superfícies ambientais

- Utilize esponjas ou zaragatoas esterilizadas, pré-humedecidas em caldo neutralizante. Obtenha uma amostra da superfície ambiental e, em seguida, enriqueça a zaragatoa em 10 ml, ou a esponja em 100 ml, de caldo Half Fraser durante 22-26 horas a 30±1 °C.

### 6.3 Enriquecimento seletivo

- Transfira 0,2 ml da amostra enriquecida para 10 ml de caldo RELM e incube durante 22-26 horas a 30±1 °C.

Certifique-se de que o tempo de processamento em bancada das amostras é reduzido ao mínimo e que a transferência para a incubadora de 30 °C é realizada assim que possível. Isto é importante para evitar o amplo crescimento de organismos concorrentes.

## 7. INATIVAÇÃO PELO CALOR APÓS ENRIQUECIMENTO

- 7.1. Quando o período de incubação da amostra estiver concluído, transfira 1-2 ml de alíquota (evitando as partículas) para um tubo para ebulição da amostra (p. ex., tubo de polipropileno de 5 ml).
- 7.2. Aqueça a alíquota a 85-100 °C durante 15-20 minutos no tubo. Após o aquecimento, deixe a amostra arrefecer até à temperatura ambiente (18-25 °C). Isto poderá ser acelerado ao colocar os tubos sob água fria da torneira durante aprox. 5 minutos.

As amostras não inativadas pelo calor devem ser preservadas para verificação até à obtenção dos resultados do teste ELISA. Estas amostras devem ser mantidas a 30±1 °C se o teste ELISA for realizado no prazo de 2 horas. Se isto não for possível, mantenha os caldos a 2-8 °C durante um período de até 72 horas antes do teste ELISA.

## 8. PROCEDIMENTO DE ENSAIO ELISA

### Procedimento manual

- 8.1. Retire o kit de teste do local de armazenamento, pelo menos, uma hora antes de o utilizar para permitir que os componentes atinjam a temperatura ambiente (18-25 °C). Determine o número de poços necessários para o teste. Retire a quantidade necessária de tiras da bolsa e coloque-as no suporte fornecido. As tiras não utilizadas devem ser colocadas novamente na bolsa e armazenadas a 2-8 °C.
- 8.2. Prepare tampão de lavagem conforme detalhado na secção 5.1 para o tamanho do kit utilizado.
- 8.3. Deixe o primeiro poço na tira vazio para ser utilizado como um "espaço vazio" para a medição da absorvância do substrato.
- 8.4. Pipete 0,1 ml de controlo negativo (rótulo verde) no segundo poço.
- 8.5. Pipete 0,1 ml de controlo positivo (rótulo vermelho) no terceiro poço.
- 8.6. Pipete 0,1 ml de cada amostra inativada pelo calor de forma separada em poços consecutivos na tira. Se sobrarem poços no final de uma tira de teste, os controlos positivos ou negativos poderão ser repetidos. †
- 8.7. Incube a placa (que tenha as tiras) a 37±1 °C durante 30-35 minutos.
- 8.8. Após a incubação, aspire os conteúdos dos poços, removendo a maior quantidade possível de líquido. Lave os poços 5 vezes com tampão de lavagem, garantindo o enchimento e esvaziamento completo dos poços em cada ciclo de lavagem. A técnica de lavagem é fundamental para a execução do ensaio e, por conseguinte, recomenda-se a utilização de um instrumento de lavagem de microplacas.
- 8.9. Pipete 0,1 ml de conjugado (rótulo laranja) em todos os poços, salvo no que é utilizado como "espaço vazio".
- 8.10. Incube a placa a 37±1 °C durante 30-35 minutos.
- 8.11. Repita os ciclos de lavagem conforme detalhado na secção 8.8
- 8.12. Pipete 0,1 ml de substrato (rótulo azul) em todos os poços, incluindo o poço que é utilizado como "espaço vazio".
- 8.13. Incube a placa à temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos no escuro.
- 8.14. Após a incubação, pare a reação ao adicionar 0,1 ml de solução de paragem (rótulo amarelo) em todos os poços, incluindo o poço que é utilizado como "espaço vazio". A solução de paragem fará com que qualquer cor azul nos poços mude para amarelo.

- 8.15. Leia as densidades óticas dos poços em 10 minutos num leitor de placas com um filtro de 450 nm. Antes da leitura, inspecione se existem bolhas de ar nos poços e, se houver, rebente-as com uma agulha. O leitor deve ser colocado a zeros através do poço utilizado como "espaço vazio" antes da leitura dos outros poços. Não utilize o filtro de referência. É preferível utilizar equipamento automático ELISA que deve ser configurado e validado de acordo com este protocolo.

† Se utilizar o instrumento Dynex, deve tomar cuidado para impedir o surgimento de bolhas na amostra e nos tubos de reagente, ou a formação de camadas ao longo do tubo acima do nível do líquido. Antes de avançar, é fundamental confirmar se o sistema pipetou com sucesso amostras para a placa de ensaio.

## 9. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados são apresentados como medições de densidade ótica ( $DO_{450}$ ) através de um leitor de microplacas.

Critérios de aceitação:

Controlo negativo $DO_{450}$	< 0,100
Controlo positivo $DO_{450}$	> 0,500

O valor do poço vazio (normalmente o A1 quando o processamento é realizado manualmente) deve ser sempre subtraído. Se o valor dos controlos negativo ou positivo não cumprir estes critérios, o teste não será considerado válido e terá de ser realizado novamente.

As amostras com leituras de  $DO_{450} < 0,200$  são consideradas negativas, sendo que neste caso a análise está concluída, os resultados poderão ser comunicados e as respetivas amostras não inativadas pelo calor poderão ser eliminadas de acordo com os regulamentos/diretrizes locais.

Os poços da amostra com  $DO_{450} \geq 0,200$  são considerados presumivelmente positivos quanto a *Listeria*. Os resultados presumivelmente positivos têm de ser verificados através de um método de cultura reconhecido.

## 10. CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS POSITIVOS DO LISTERIA ELISA

No contexto da NF VALIDATION, todas as amostras identificadas como positivas pelo método alternativo têm de ser confirmadas por um dos seguintes testes:

- Ao utilizar os testes convencionais descritos nos métodos normalizados pela CEN ou ISO, incluindo a etapa de purificação. A etapa de confirmação tem de começar pelo caldo RELM não inativado pelo calor armazenado a 30 °C ou 2-8 °C.
- Utilize a técnica de riscado com o RELM (10µL) numa placa de ágar (formulação ISO de OAA, Palcam ou Oxford). Incube os ágares conforme especificado pelo protocolo cultural padrão de *Listeria* e, em seguida, realize os testes de confirmação: coloração de Gram e catalase. É possível realizar diretamente os testes de confirmação (sem purificação prévia) se as colónias estiverem devidamente isoladas. Devem ser testadas uma a cinco colónias para confirmação.

No caso de haver resultados discordantes (o resultado presumivelmente positivo do teste ELISA não confirmado por um dos meios supramencionados), o laboratório tem de seguir os passos necessários para garantir a validade do resultado obtido. Por exemplo, realizar um riscado adicional na cultura do caldo retido e possivelmente um novo teste da amostra do alimento original para assegurar a qualidade do resultado.

## 11. ARMAZENAMENTO E VALIDADE DO KIT

O kit e quaisquer componentes não utilizados do kit devem ser armazenados a 2-8 °C. NÃO CONGELAR. A data de validade do kit está indicada na caixa do kit, assim como em todos os componentes do kit que se encontram no interior da caixa. Qualquer tampão de lavagem diluído não utilizado pode ser armazenado ao longo de até 10 dias se for mantido a 2-8 °C. Quaisquer tiras de microplacas não utilizadas devem ser colocadas novamente na bolsa de alumínio com a saqueta de dessecante e o fecho hermético completamente fechados e, depois, armazenadas a uma temperatura de 2-8 °C.

## 12. SEGURANÇA

Embora os procedimentos apresentados sejam simples e fáceis de realizar, requerem instalações laboratoriais com pessoal qualificado com formação para o manuseamento de organismos potencialmente patogénicos. Para aqueles que o utilizem pela primeira vez, recomenda-se que obtenham uma formação fornecida pela Solus Scientific Solutions Ltd.

- A solução de paragem contém ácido sulfúrico, o qual é corrosivo. Lave imediatamente com água em abundância se a solução entrar em contacto com a pele ou mucosas.

Como orientação, devem ser tomadas pelo menos as seguintes precauções:

- Deve ser usado vestuário de proteção, incluindo bata de laboratório, óculos de proteção, máscara e luvas, conforme adequado.
- Não pipetar com a boca.
- Evitar o contacto com a pele.
- Não comer, beber nem aplicar cosméticos no laboratório.
- Seguir todos os regulamentos locais, estatais/provinciais e/ou nacionais aplicáveis quanto à eliminação de resíduos biológicos.

## 13. PRECAUÇÕES

- Os reagentes são fornecidos com uma concentração de atuação fixa. Haverá uma redução da excelente sensibilidade e especificidade se os reagentes forem modificados ou não forem armazenados sob as condições recomendadas.
- Não misture diferentes lotes de reagentes.
- Evite a contaminação microbiana das garrafas de reagente abertas.
- Certifique-se de que não ocorre contaminação cruzada entre os poços.
- Para a realização correta do teste é fundamental não permitir que o anticorpo conjugado com enzima contamine outros reagentes e equipamento.
- Certifique-se de que os componentes do kit não são expostos a temperaturas superiores a 40 °C.
- Não devem ser utilizadas soluções que contenham azida de sódio para a limpeza do equipamento, principalmente dispositivos de lavagem (a enzima peroxidase utilizada no kit é inativada pela azida de sódio).
- Não utilize para fins de diagnóstico de amostras médicas.

## 14. INFORMAÇÃO DAS MSDS

Existem fichas de dados de segurança (MSDS) relativas a este teste disponíveis mediante pedido.

## 15. GARANTIA

A precisão dos resultados depende da utilização do kit de forma correta e com cuidado de acordo com as instruções de utilização. Se o desempenho do kit não estiver de acordo com as especificações, entre em contacto com:

**Solus Scientific Solutions Ltd**

9 Mansfield Networkcentre

Millennium Business Park

Concorde Way

Mansfield

Nottinghamshire

NG19 7JZ

Tel. - +44 (0)1623 429701

Fax - +44 (0)1623 620977

Email: [info@solusscientific.com](mailto:info@solusscientific.com)



## Informação de direitos de autor

O presente documento, incluindo todas as fotografias e ilustrações, contém informações exclusivas que se encontram protegidas por direitos de autor. Nenhuma parte da presente publicação pode ser de alguma forma reproduzida ou traduzida para qualquer idioma sem a autorização prévia por escrito da PerkinElmer. ©2020 PerkinElmer, Inc. Todos os direitos reservados.

## Marcas comerciais

A PerkinElmer é uma marca comercial registada da PerkinElmer, Inc. Todas as outras marcas comerciais são da propriedade dos respetivos proprietários.

## Resumo de alterações

Data da alteração	Número de emissão	Resumo da alteração
Jan2020	1	Reformulação e combinação de Solus Listeria ELISA – QCF 18 – Emissão 1.4 – 08/17 e Solus Listeria ELISA – QCF 19 – Emissão 1.6 – 08/17

NOTA: As pequenas alterações (p. ex., formatação, gramática, correção de erros tipográficos) não estão incluídas no resumo de alterações.

Para obter mais informações, visite [www.solusscientific.com](http://www.solusscientific.com)

### Fabricado em:

#### **Solus Scientific Solutions Ltd.**

9 Mansfield Networkcentre,  
Millennium Business Park, Concorde Way,  
Mansfield, Nottinghamshire  
NG19 7JZ  
Reino Unido  
Tel. - +44 (0)1623 429701

### **PerkinElmer, Inc**

940 Winter Street,  
Waltham, MA 02451 EUA  
T: (800) 762-4000 ou  
(+1) 203-925-4602  
[www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)



Para obter uma lista completa dos nossos escritórios globais, visite [www.perkinelmer.com/ContactUs](http://www.perkinelmer.com/ContactUs)