

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: 37
Número de emissão: 1.0
Data de emissão: Janeiro de 2020
Código(s) do produto: LIS-0096S; LIS-0480S
Organismo de certificação: AOAC





A execução deste método foi analisada pelo AOAC Research Institute e foi considerado que se encontra em conformidade com as especificações do fabricante.

Este método foi avaliado no Programa AOAC® *Performance Tested Methods*SM quanto à detecção de *Listeria* spp. em alface romana em saco, cachorros quentes, camarão cru congelado, salmão fumado, queijo de pasta mole (Brie), superfícies ambientais de poliestireno e aço inoxidável.

O método Solus *Listeria* ELISA foi comparado com os métodos de referência 8.09 do MLG do USDA-FSIS e o Capítulo 10 do BAM da FDA, conforme aplicável às matrizes. (Licença de AOAC® *Performance Tested*SM n.º **041601**).

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 9.

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 25 g da amostra a testar, se necessário por homogeneizador, em 225 ml de caldo Half Fraser e incube durante 22-26 horas a 30±1 °C.

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

- 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 30-35 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 de todos os outros resultados. 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.

As amostras com $DO_{450} \geq 0,200$ são consideradas presumivelmente positivas 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

De acordo com o estudo de validação AOAC-PTM, todas as amostras identificadas como positivas quanto a *Listeria* pelo ensaio Solus *Listeria* ELISA têm de ser confirmadas pelos seguintes testes:

- Coloque 100µl da amostra não inativada pelo calor na placa de ágar seletivo de *Listeria* MOX. As colónias típicas de *Listeria* spp formam colónias pretas rodeadas por um halo preto. Realize um teste de catalase e coloração de Gram nas colónias típicas isoladas das placas de ágar (o teste de catalase é positivo e as células bacterianas apresentam uma morfologia de bacilo Gram-positivo) e, em seguida, penetre em placas de ágar sangue de carneiro (SBA). Incube o SBA durante 18-24 horas a 35 ± 2 °C antes da leitura dos resultados da hemólise. Como uma alternativa à placa de SBA, as colónias podem ser caracterizadas bioquimicamente através de testes de galerias de identificação com bioquímicos específicos para as espécies de *Listeria*.
- Como alternativa, a confirmação do resultado pode ser realizada de acordo com os protocolos de confirmação dos respetivos métodos de referência, seja o Método 8.09 "Isolation and Identification of *Listeria* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples" do MLG do USDA/FSIS ou o Capítulo 10 "Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods" do BAM da FDA.

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 PARA UM ÓTIMO DESEMPENHO

- 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

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 – Folheto informativo 24 – Emissão 4 – 11/18 (AOAC) e Solus Listeria ELISA – Folheto informativo 25 – Emissão 3 – 11/18 (AOAC)

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

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



Para obter uma lista completa dos nossos escritórios globais, visite www.perkinelmer.com/ContactUs