

PORTARIA N.º 8, DE 23 DE JANEIRO DE 1995

Dispõe sobre o Método Analítico de Carcaças de Aves e Pesquisa de *Salmonella*

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA, usando da atribuição que lhe confere o Art. 78, item VII do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial N.º 212, de 21 de agosto de 1992, resolve:

Art. 1.º - Aprovar as alterações introduzidas no método analítico de carcaças de aves e pesquisa de *Salmonella*, que com esta baixa, conforme normas anexas.

Art. 2.º - Revogar os itens 2.6 e 21, constantes da parte II, da Portaria N.º 01, de 11 de agosto de 1993, publicada no Diário Oficial da União de 17 de agosto de 1993.

Art. 3.º - Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

Tânia Maria de Paula Lyra

MÉTODO ANALÍTICO DE CARCAÇAS DE AVES E PESQUISA DE *SALMONELLA* (alterações dos itens 2.6 e 21)

2.6 CARCAÇAS DE AVES

Quando congeladas, descongelar sob refrigeração por 18 horas. Pesar assepticamente, 25 gramas de pele e músculos das regiões do pescoço, cloaca e asas e homogeneizar com 225ml de água peptonada a 0,1%. Preparar as diluições subseqüentes com o mesmo diluente. Para pesquisa de *Salmonella*, pesar separadamente 25 gramas e adicionar 225 de água peptonada, 1% tamponada.

21. PESQUISA DE *Salmonella*

Os membros do gênero *Salmonella* são agentes de infecções intestinais humanas e animais. Dentre os agentes de Doenças Veiculadas por Alimentos, o gênero *Salmonella* é um dos principais responsáveis por casos fatais e de morbi-mortalidade, sua incidência no homem e animais implica em gastos significativos com medicamentos e hospitalizações.

As atividades e inspeção e fiscalização de alimentos tem, como objetivo crítico o controle e a prevenção dos membros deste grupo e das implicações de sua presença nos alimentos, assim como da observância de boas práticas de manufatura e dos programas de controle que devem incluir a certificação da adequacidade das medidas adotadas, em especial para este gênero de bactérias. Os métodos laboratoriais para a sua pesquisa incluem uma etapa de pré-enriquecimento, visando minimizar os efeitos do processo tecnológico de obtenção do alimento capaz de produzir injúria fisiológica, sem inativá-las biologicamente.

A presença de *salmonelas* é determinada em 25g ou ml da amostra sob análise, no mínimo. O resultado positivo para esta pesquisa é interpretado considerando o risco potencial que apresenta, o que significa impropriedade ao consumo do produto em questão.

21.1 MEIOS DE CULTURA

Água peptonada a 1 % tamponada

Caldotetrationato

Caldo Rappaport Vassiliadis

Caldo Selenito Cistina

Ágar RAMBACH

Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) com novobiocina

Ágar xilose lisina desoxicolato (XLD)

Ágar para enterobactérias de Hektoen

Caldo uréia

Ágar tríplice açúcar ferro

Ágar lisina ferro

Ágar SIM

Caldo malonato-fenilalanina

Caldo dulcitol

Ágar Citrato de Simmons

21.2 REAGENTES

Solução salina a 0,85% estéril;

Solução iodo-iodeto (iodo 5g, iodeto de potássio 8g, água destilada 40 ml);

Reativo de Kovacs (Paradimetilaminobenzaldeído 5,0g, álcool isoamílico 75,0 ml, ácido clorídrico concentrado 25,0 ml). Dissolver o paradimetilaminobenzaldeído em álcool isoamílico e adicionar o ácido clorídrico lentamente;

Solução aquosa de verde brilhante a 0,1% estéril;

Solução aquosa de cloreto férrico a 10%;

Acido clorídrico a 0,1N;

Solução aquosa de novobiocina a 4%, esterilizada por filtração.

21.3 TECNICA

a. PRÉ-ENRIQUECIMENTO

Pesar assepticamente 25g da amostra adicional 225ml de água peptonada a 1% tamponada. Incubar a 35 °C, por 18-24 horas.

Exceções:

1 - Para o pré-enriquecimento do leite em pó e farinhas lácteas, dissolver 25g do produto em 225ml de água peptonada a 0,1%, estéril, aquecida a 45 °C. Ajustar o pH para 6,8 - 6,9. Adicionar 5ml de solução aquosa de verde brilhante a 0,1 % estéril.

2 - No pré-enriquecimento da água de "chiller" homogeneizar e transferir 100 ml da amostra para um frasco contendo 50 ml de água peptonada a 1% tamponada, em concentração tripla.

b. ENRIQUECIMENTO SELETIVO

Pipetar alíquotas de 0,1 ml de cultura pré-enriquecida e transferir para tubos contendo 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis e, alíquotas de 1 ml para tubos contendo 10 ml de caldo tetrationato ou de caldo selenito cistina. Incubar ambos os meios a 43 °C por 24 horas em banho-maria.

c. ISOLAMENTO E SELEÇÃO

A partir dos caldos de enriquecimento seletivo, semear em placas com ágar RAMBACH e de ágar BPLS adicionado de 0,1 da solução de novobiocina a 4% por 100 ml do meio ou ágar Hektoen. Incubar todas as placas a 35°C por 24 horas.

Características das colônias de *Salmonella*:

1 - Em ágar RAMBACH as colônias de *Salmonella* apresentam-se de cor vermelha.

2 - Em ágar BPLS apresentam-se incolores ou de cor rosada, entre translúcida ou ligeiramente opacas. Quando rodeadas por microrganismos fermentadores de lactose, poderão apresentar-se de cor verde-amarelada.

3 - Em ágar Hektoen, apresentam-se de cor verde ou verde azuladas, revelando ou não a produção de ácido sulfídrico (H₂S) (centro escuro).

Para leitura e interpretação verificar os quadros a seguir:

1. AGAR TSI

Microorganismo	Base	Bisel	H ₂ S
S. typhi	Amarela	Sem alteração ou vermelho	Positivo só na parte superior da base
S. paratyphi A S. cholerae suis	Amarela com gás	Sem alteração ou vermelho	Negativo
S. pullorum	Amarela com gás	Sem alteração ou vermelho	Positivo (base preta)
S. paratyphi B S. typhimurium S. enteritidis	Amarela com gás	Sem alteração ou vermelho	Positivo (base preta)
S. gallinarum	Amarela	Sem alteração ou vermelho	Positivo (base preta)
S dysenteriae S. boydii S. flexneri *	Amarela	Sem alteração ou vermelho	Negativo
S. Sonei	Amarela	Amarelo	Negativo
E. aerogenes E. cloacae	Amarela com gás	Amarelo	Negativo
E. coli Klebsiella	Amarela com gás	Amarelo	Negativo
C. freundii	Amarela com gás	Amarelo	Positivo
P. vulgaris	Amarela c/s gás	Sem alteração ou vermelho Sem alteração ou vermelho	Positivo (verde enegrecido) Positivo (verde enegrecido)
P. rettgeri	Amarela/ vermelha	Sem alteração ou vermelho	Negativo
P.morganii P. aeruginosa	Amarela c/ s gás S/ alteração/ vermelha	Sem alteração ou vermelho Sem alteração ou vermelho	Negativo Negativo

* Sorotipo 6 – variedade Newcastle com produção de gás na base.

2. ÁGAR LISINA FERRO

Microorganismo	Base	Bisel	H ₂ S
Arizona	Violeta	Violeta	Positivo
Salmonella *	Violeta	Violeta	Positivo
P. mirabilis P. vulgaris	Amarela	Pardo Avermelhado	Positivo
P. rettgeri	Amarela	Pardo Avermelhado	Negativo
Providência	Amarela	Pardo Avermelhado	Negativo
C. freundii	Amarela	Violeta	Positivo
E. coli	Amarela	Violeta	Negativo
Shigella	Amarela/Violeta	Violeta	Negativo
K. pneumoniae	Violeta	Violeta	Negativo

Exceção: *S. paratyphi* A, coluna amarela e bisel violeta (não produz lisina descarboxilase).

3 - Caldo malonato-fenilalanina:

a. Verificar se houve ou não a degradação do malonato pela viragem do indicador. A maioria das salmonelas são malonato negativo.

b. Após leitura do malonato, adicionar algumas gotas de HCL 0,1 N até que o meio fique totalmente amarelo: acrescentar 3 a 4 gotas de cloreto férrico a 10%. A viragem para verde indica reação positiva. Enquanto que a persistência da cor amarela indica reação negativa. As salmonelas são fenilalaninas negativas.

4 - Caldo Dulcitol - 48 horas. Observar a fermentação do dulcitol pela viragem do indicador vermelho fenol para amarelo. A maioria das salmonelas são dulcitol positivo.

5 - Ágar citrato de Simmons - 96. Semear com agulha a superfície inclinada do ágar. O crescimento com conseqüente mudança de cor do meio para azul indica a utilização do citrato como única fonte de carbono (reação positiva). A maioria das salmonelas são citrato positivo.

6 - Meio SIM - Interpretar conforme o quadro 3.

3. MEIO SIM

Microorganismo	H ₂ S	INDOL	Motilidade
Escherichia	-	+	±
Enterobacter	-	-	+
Citrobacter	+	-	+
Klebsiella	-	-	-
Salmonella	+	-	+ *
Shigella	-	±	-
Proteus vulgaris	+	+	+
Proteus mirabilis	+	-	+
Morganella	-	+	+
Arizona	+	-	+
Hafnia	-	-	+
Serratia	-	-	+
Providencia	-	+	+
Edwardsiella	+	+	+
Y. enterocolitica	-	- (+)	-

Realizar o teste sorológico dos cultivos que apresentarem os seguintes resultados:

Urease-negativa

Produção de H₂S - positiva

Descarboxilação da lisina - positiva

Utilização do citrato – positiva ****

Produção de indol - negativa

Motilidade – positiva *

Assimilação do Malonato - negativo **

Fermentação de Dulcitol – positiva ***

Fenilalanina - negativa

* *S. pullorum* e *S. gallinarum*

** *S. arizonae* assimila o malonato

** *S. arizonae* não fermenta o dulcitol

*** 25% das cepas de *Salmonella* são citrato negativo.

d. TESTE SOROLÓGICO - AGLUTINAÇÃO RÁPIDA

Adicionar ao cultivo em ágar nutritivo inclinado, aproximadamente 2 ml de solução salina e 0,85%. Homogeneizar.

Com pipeta de Pasteur depositar separadamente em lâmina de vidro duas gotas de suspensão. Acrescentar 1 gota do soro anti-*Salmonella* polivalente "0" sobre uma das gotas da suspensão na lâmina e misturar e, sobre a outra, 1 gota de solução salina.

Realizar a leitura com iluminação sobre fundo escuro em 1 a 2 minutos.

Classificar a reação do seguinte modo:

POSITIVA - presença de aglutinação somente na mistura cultivo + antisoro.

NEGATIVA - ausência de aglutinação em ambas as misturas.

NÃO ESPECÍFICA - presença de aglutinação em ambas as misturas (formas rugosas).

OBS - Os cultivos com resultados positivos no teste de aglutinação com o soro anti-*Salmonella* polivalente "0" deverão ser remetidas ao Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, para sua tipificação final.

21.4 COMPOSIÇÃO E PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

a. ÁGUA PEPTONADA A 1% TAMPONADA

Peptona de carne 10,0g

Cloreto de sódio (NaCl) 5,0g

Fosfato de sódio (NaHPO₄)..... 9,0g

Fosfato de potássio (KH₂PO₄)..... 5,0g

Dissolver os componentes em 1 litro de água destilada/deionizada.

Distribuir em frascos, volumes de 225 ml e autoclavar a 121 °C, por 15 minutos.

pH final 7,2 ± 0,2

b. CALDO SELENITO CISTINA

Triptona 5,0g

L (-) cistina (C₆H₁₂N₂O₄S₂)..... 0,01g

Lactose (C₁₂H₂₂O₁₁H₂O) 4,0g

Fosfato dissódico (Na₂HPO₄ 2H₂O)..... 2,0g

Bi-selenito de sódio..... 4,0g

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual.

PH final 7,0 ± 0,2

c. CALDO RAPPAPORT VASSILIADIS

Peptona de soja.....5,0g

Cloreto de sódio (NaCl)8,0g

Fosfato monopotássico (KH₂PO₄)..... 1,6g

Cloreto de magnésio 6H₂ O40,0g

Verde malaquita0,04g

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual.

PH final 5,2 ± 0,2

d. ÁGAR VERDE BRILHANTE VERMELHO DE FENOL LACTOSE SACAROSE (BPLS)

Peptona de carne.....	5,0g
Peptona de caseína	5,0g
Extrato de levedura	3,0g
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ H ₂ O).....	10,0g
Sacarose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	10,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	2,0g
Verde brilhante (C ₂ H ₁₄ ,Br ₄ O ₅ ,S)	0,0125g
Vermelho de fenol (C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S).....	0,08g
Ágar	12,0g

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual. Antes do plaqueamento, adicionar 1 ml de sol, de novobiocina a 4% por litro de meio de cultura.

PH final 6,9 ± 0,1

e. ÁGAR PARA ENTEROBACTÉRIAS DE HEKTOEN

Proteose-peptona	12,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,00
Extrato de levedura	5,09
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ H ₂ O)	12,0g
Sacarose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	12,0g
Salicina (C ₁₃ H ₁₈ O ₇)	2,0g
Tiosulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃)	5,0g
Citrato de ferro e amônia	1,5g
Sais biliares	9,0g
Azul de bromotimol (C ₂₂ H ₂₈ Br ₂ O ₅ S).....	0,064g
Fucsina ácida	0,04g
Ágar	13,5g

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual.

PH final 7,5 ± 0,1

f. AGAR RAMBACH

Peptona.....	8,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Mícela cromogena	1,5g
Propilenoglicol	10,g
Desoxicolato de sódio (C ₂₄ H ₃₉ NAO ₄)	1,0g
Ágar	15,0g

Aditivo: 1 vial de agentes seletivos, que acompanha o meio, para cada 250 ml de ágar Rambach.

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual.

pH final 7,5 ± 0,2

g. CALDO DE URÉIA

Extrato de levedura	0,1g
Dihidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	9,5g
Uréia (H ₂ NCONH ₂)	20,0g
Vermelho de fenol (C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S)	0,1g

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual.

pH final 6,8 ± 0,1

h. AGAR LISINA FERRO (LIA)

Peptona	5,0g
Extrato de levedura.....	3,0g
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆).....	1,0g
Extrato de levedura	3,0g
L-Lisina (C ₆ H ₁₅ N ₃ O ₂)	10,0g
Citrato férrico amoniacal.....	0,5g
Tiosulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃).....	0,04g
Púrpura de bromocresol (C ₂₁ H ₁₆ Br ₂ O ₅ S)	0,02g
Ágar.....	15,0g

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual. Após autoclavação, deixar os tubos em posição inclinada de maneira a formar um bisel de aproximadamente 2 cm.

pH final 6,7 ± 0,1

i. AGAR TRÍPLICE AÇÚCAR FERRO (TSI)

Extrato de carne	3,0g
Extrato de levedura.....	3,0g
Peptona de caseína.....	15,0g
Peptona de carne.....	5,0g
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ H ₂ O)	10,0g
Sacarose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	10,0g
D(+) Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂ O)	1,0g
Citrato de ferro e amônia	0,5g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Tiosulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃)	0,3g
Vermelho de fenol (C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S)	0,024g
Ágar.....	12,0g

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual. Após autoclavação, deixar os tubos em posição inclinada de maneira a formar um bisel de aproximadamente 2 cm.

pH final 7,4 ± 0,1

j. MEIO SIM

Peptona de caseína	20,0g
Peptona de carne.....	6,6g
Citrato de amônia e ferro III.....	0,2g
Tiossulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃).....	0,2g
Ágar.....	3,0g

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual.

pH final 7,3 ± 0,1

i. AGAR CITRATO DE SIMMONS

Dihidrogenofosfato de amônio (NH ₂ PO ₄).....	1,0g
Fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄).....	1,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Citrato de sódio (C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ .2H ₂ O)	2,0g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,2g
Azul de bromotimoi (C ₂₇ H ₂₈ .Br ₂ O ₅ S)	0,08g
Ágar.....	12,0g

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual.

pH final 6,9 ± 0,1

m. CALDO MALONATO-FENILALANINA

Extrato de levedura	1,0g
Sulfato de amônio (NH ₄ .2SO ₄).....	2,0g
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄).....	0,6g
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄).....	0,4g
Cloreto de sódio (NaCl).....	2,0g
Malonato de sadio (C ₃ H ₂ Na ₂ O ₄)	3,0g
Azul de bromotimol (C ₂₇ H ₂₈ Br ₂ O ₅ S)	0,025g
Fenilalanina (C ₉ H ₁₁ NO ₂).....	1,0g

Dissolver os componentes em 1 litro de água destilada/deionizada. Distribuir em tubos volumes de 5 ml, e autoclavar a 115 °C, por 10 minutos.

pH final 6,6 ± 0,1

n. CALDO VERMELHO DE FENOL BASE

Triptona	5,0g
Peptona de carne.....	5,0g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Vermelho de feno (C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S).....	0,018g

Por tratar-se de meio desidratado, seguir rigorosamente as recomendações contidas no rótulo ou manual. Após autoclavação adicionar 0,5% de Dulcitol esterilizado por filtração e distribuir em tubos especiais

pH final 6,6 ± 0,1

