

# MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

## SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA.

PORTARIA Nº 126, DE 03 DE NOVEMBRO DE 1995.

Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (S. Enteritidis, S. Gallinarum, S. Pullorum e S. Typhimurium)

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA, no uso da atribuição que lhe confere o artigo 78, inciso VII do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial nº 212, de 21 de agosto de 1992, resolve:

Art. 1º - Aprovar as Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (S. Enteritidis, S. Gallinarum, S. Pullorum e S. Typhimurium), em anexo.

Art. 2º - Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, revogando-se a [Portaria SDA nº207, de 20 de dezembro de 1994](#), publicada no Diário Oficial da União nº 244 de 26 de dezembro de 1994 e as demais disposições em contrário.

ÊNIO ANTÔNIO MARQUES PEREIRA

### ANEXO

NORMAS PARA CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO DAS SALMONELAS AVIÁRIAS (S. Enteritidis, S. Gallinarum, S. Pullorum e S. Typhimurium)

#### 1. Do Credenciamento

Para efeito de credenciamento e monitoramento serão obedecidas as determinações constantes das Portarias da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária / SNDA nº 53 de 20 de maio de 1991 e da divisão de Laboratório Animal / DLA nº 01 de 14 de agosto de 1991 e demais normas e instruções que vierem a ser baixadas por este Ministério.

#### 2. Material

##### 2.1. Antígenos e soro padrão

Só poderão ser utilizados antígenos (Ag) e o soro controle positivo (SCP) registrados no Departamento de Defesa Animal / DDA, observando o prazo de validade.

##### 2.2. Meios de cultura

- Ágar citrato de Simmons
- Ágar Fenilalanina
- Ágar Hektoen (HK)
- Áger Lisina Ferro (LIA)
- Ágar Macconkey
- Ágar Nutritivo
- Ágar Rambach
- Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)
- Ágar Verde Brilhante (BPLS)
- Caldo Cérebro Coração (BHI)
- Caldo Malonato
- Caldo para descarboxilação da Lisina
- Caldo para descarboxilação de Ornitina
- Caldo para desidrolação de Arginina

- Caldo para fermentação de Dulcitol
- Caldo para fermentação de Glicose
- Caldo para fermentação de Lactose
- Caldo para fermentação de Maltose
- Caldo para fermentação de Manitol
- Caldo para fermentação de Sacarose
- Caldo Rappaport Vassiliadis
- Caldo Tetracionato
- Caldo Uréia
- Leite Desnatado
- Meio de Clark e Lubs
- Meio de transporte Cary e Blair
- Meio SIM motilidade, produção de indol e H<sub>2</sub>S

### 2.3. Reagentes

- Reativo de Kovacs
- Reagente para a prova de Voges-Proskauer (VP)
- Reagente para a prova de Vermelho de Metila (VM)
- Solução aquosa de Cloreto de Cálcio a 1%
- Solução aquosa de Novobiocina a 4%
- Solução aquosa de Verde Brilhante a 0,1%
- Solução Iodo-Iodetada
- Solução salina a 0,85%
- Solução salina a 2%
- Soro anti-flagelar H<sub>2</sub> de Salmonella
- Soro anti-flagelar Hi de Salmonella
- Soro anti-flagelar Hg, m de Salmonella
- Soro anti-flagelar Hg, p de Salmonella
- Soro anti-flagelar Hm de Salmonella
- Soro anti-flagelar Hp de Salmonella
- Soro anti-flagelar Hg de Salmonella
- Soro anti-somático B (04) de Salmonella
- Soro anti-somático D (09) de Salmonella
- Soro anti-somático O polivalente de Salmonella

### 2.4. Amostras a serem testadas

#### 2.4.2. Diagnóstico bacteriológico

##### 2.4.2.1. Animais vivos:

- Swab de cloaca
- Fezes frescas do lote
- Material da cama, ninho e/ou swab de arrasto.
- Ovos

##### 2.4.2.2. Animais necropsiados:

- Swab de carcaça
- Baço
- Fígado
- Ovários
- Vesícula Biliar
- Rins
- Pulmão
- Coração
- Trato gastrointestinal
- Articulações com lesões
- Conjuntiva com lesões

### 2.4.3. Diagnóstico sorológico:

- Soro sanguíneo

## 3. Recebimento das amostras

3.1. As amostras deverão estar devidamente identificadas e acondicionadas em caixas isotérmicas.

3.2. As amostras deverão estar acompanhadas de um formulário de coleta devidamente preenchido, conforme modelo estabelecido pela Coordenação de Programa Sanitário CPS, do Departamento de Defesa Animal DDA.

3.3. As amostras serão registradas em livro próprio conforme modelo indicado pela Coordenação Geral de Laboratório Animal CGLA.

3.4. As amostras de tecidos destinadas ao diagnóstico bacteriológico deverão estar resfriadas a + 4°C.

3.5. Quando as amostras destinadas ao diagnóstico bacteriológico forem coletadas através de swabs, os mesmos deverão ser introduzidos em meio de transporte Cary e Blair, exceção feita a swabs de arrasto que deverão estar submersos em leite desnatado esterilizado. As amostras deverão estar resfriadas a + 4°C.

3.6. As amostras destinadas ao diagnóstico sorológico deverão estar resfriadas a + 4°C. Não serão aceitas amostras de sangue total, com presença de coágulo ou evidências de contaminação.

3.7. As amostras destinadas ao diagnóstico sorológico, deverão ser, obrigatoriamente, divididas em duas alíquotas e identificadas, uma como prova e outra como contra-prova.

3.8. A tageta de identificação da contra-prova, conforme modelo indicado pela CGLA, será preenchida e lacrada juntamente com as amostras para contraprova; o lacre será plástico, numerado e inviolável.

## 4. Conservação e estocagem

4.1. As amostras destinadas ao diagnóstico bacteriológico deverão ser mantidas a temperatura de + 4°C por não mais que 48 horas, até serem processadas.

4.2. As amostras destinadas ao exame sorológico deverão ser mantidas a temperatura de + 4°C por não mais que 48 horas, até serem processadas.

4.3. As amostras destinadas a contra-prova do diagnóstico sorológico deverão ser mantidas em temperatura de 20° C, por um período de 30 (trinta) dias.

## 5. Segurança biológica

5.1. Deverão ser respeitadas as normas de segurança biológica em todos os procedimentos realizados com o material de exame.

5.2. As amostras destinadas a contra-prova, serão destruídas após decorrido o prazo estabelecido para a sua estocagem, com a observância dos critérios e normas de segurança biológica.

## 6. Métodos

### 6.1. Diagnóstico bacteriológico

- Isolamento
- Identificação bioquímica
- Caracterização antigênica da cepa bacteriana isolada aglutinação rápida em lâmina.

## 6.2. Diagnóstico sorológico

- Soroaglutinação rápida
- Soroaglutinação lenta em tubo
- Microaglutinação

## 7. Dos resultados e relatórios

7.1. Toda a documentação referente a livro de registro, laudo de resultado e relatórios deverá ser arquivada por um período de cinco anos.

7.2. Os resultados dos exames deverão ser emitidos em formulário próprio, segundo modelo estabelecido pela Coordenação Geral do Laboratório Animal CGLA, e de acordo com o fluxograma determinado.

Resultado negativo: Enviar FAX ou outro tipo de comunicação imediata, para o Médico Veterinário requisitante.

Resultado positivo: Enviar FAX ou outro tipo de comunicação imediata, para:

- Serviço de Sanidade Animal / SSA / DFAARA;
- Comitê Estadual de Sanidade Avícola CESA;
- O Laboratório de Referência indicada pela CGLA;
- O Departamento de Defesa Animal DDA, em Brasília;
- O Médico Veterinário requisitante.

7.3. Todo laboratório credenciado deverá encaminhar até o quinto dia útil do mês subsequente, relatório das atividades mensais, em formulário próprio, segundo modelo estabelecido pela CGLA, à CGLA.

## 8. Do laboratório

8.1. O laboratório deve possuir instalações e equipamentos adequados para a realização do Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias responsável técnico e substituto deste, devidamente habilitado pela CGLA para a realização dos diagnósticos.

8.2. As instalações devem fazer parte da mesma base física do laboratório e atender as normas de segurança biológica.

8.3. Somente o responsável técnico ou seu substituto poderão assinar formulário de resultado do exame e o relatório mensal.

## 9. Instalações, equipamentos e materiais.

Para efeito de credenciamento e monitoramento, o laboratório será vistoriado, devendo atender as exigências quanto a:

### 9.1. Instalações

#### 9.1.1. Protocolo

O protocolo deverá ser constituído de dois ambientes distintos:

9.1.1.1. Recepção: Onde serão recebidos, registrados e identificados os materiais a serem examinados. Deverá ter pessoal próprio que procederá a conferência do material, observando a exatidão dos dados de remessa e o estado de conservação.

9.1.1.2. Escritório: Estrutura responsável pela emissão dos laudos do resultado devendo ser obrigatoriamente independente da sala da recepção.

#### 9.1.2. Sala de exame

Neste local as amostras serão processadas, incluindo-se a realização dos exames bacteriológicos e sorológicos.

### 9.1.3. Apoio técnico

#### 9.1.3.1. Meios e soluções

Este setor estará encarregado do preparo de meios e soluções.

9.1.3.2. Lavagem e esterilização Este setor atenderá o laboratório procedendo a desinfecção, lavagem, montagem, esterilização e estocagem de material oriundo dos setores de exame, meios e soluções.

### 9.2. Equipamentos e materiais

#### 9.2.1. Protocolo

##### 9.2.1.1. Recepção

- Mesa com superfície resistente a desinfetantes
- Refrigerador

##### 9.2.1.2. Escritório

- Arquivo com chave
- Máquina de escrever / equipamentos de informática

#### 9.2.2. Sala de exame

- Balança
- Banho-maria regulável
- Câmara asséptica ou fluxo laminar vertical
- Estufa bacteriológica a 35-37°C
- Estufa bacteriológica a 42 43°C
- Fonte de luz
- Homogeneizador de tubos (opcional)
- Microplacas com fundo em U com 96 poços
- Microscópio ótico
- Pipetas automáticas de 10, 40 e 100 ml
- Refrigerador
- Sistema de microteste
- Stomacher (opcional)

#### 9.2.3. Apoio técnico

##### 9.2.3.1. Meios e soluções

- Agitador magnético com e sem placa aquecedora
- Balança analítica (opcional)
- Balança semi-analítica
- Carrinho de laboratório (opcional)
- Congelador a 20° C
- Deionizador (opcional)
- Destilador (opcional)
- Dispensador de pipetas
- Fluxo laminar horizontal ou câmara asséptica
- Potenciômetro
- Refrigerador (+4 a +8°C)

##### 9.2.3.2. Lavagem e esterilização

Desinfecção:

- Autoclave
- Carrinho de laboratório (opcional)

#### Lavagem:

- Cuba para água sanitária
- Deionizador (opcional)
- Depósito para água destilada ou água deionizada
- Destilador
- Lavador de pipetas
- Sistema para enxágüe de material
- Sistema para ferver material (vidraria, etc.)

#### Montagem:

- Estante para secagem de material
- Mesa para montagem do material

#### Esterilização:

- Autoclave
- Carrinho de laboratório (opcional)
- Forno de esterilização

#### Estocagem:

- Congelador (-20°C)
- Estantes e / ou armários
- Refrigerador (+4 a +8°C)

### 10. Do responsável técnico e seu substituto

Para efeito de credenciamento e monitoramento, o responsável técnico e seu substituto serão submetidos a avaliação técnico-científica, pela CGLA.

### 11. Do credenciamento e monitoramento

Após a aprovação dos responsáveis técnicos na avaliação técnico-científica e atendimento às exigências de instalações e equipamentos na vistoria, o laboratório será credenciado.

O monitoramento se fará utilizando os procedimentos de envio de material para controle da qualidade técnica e realização de vistorias técnico-administrativas.

### 12. Disposições gerais

12.1. Sob nenhuma alegação será concedida contra-prova de diagnóstico bacteriológico efetuado.

12.2. Somente após a realização do isolamento e das caracterizações bioquímicas e antigênicas deverá ser liberado resultado definitivo e conclusivo para o diagnóstico das Salmoneloses Aviárias.

12.2.1. Independentemente da emissão, pelos laboratórios credenciados de resultados definitivo e conclusivo do diagnóstico das Salmoneloses nos casos em que as cepas apresentarem a fórmula antigênica completa (*Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum*), estas deverão ser encaminhadas ao Laboratório de Referência indicado pela CGLA, visando a formação de um banco de dados para a realização de estudos epidemiológicos.

12.2.2. As cepas que apresentarem a fórmula antigênica incompleta ou apenas aglutinarem com o soro anti-somático O polivalente, deverão ser encaminhadas ao Laboratório de Referência indicado pela CGLA para a confirmação e/ou caracterização final.

12.2.3. As remessas das amostras referidas nos itens 12.2.1 e 12.2.2 deverão ser acompanhadas dos

protocolos dos exames realizados, podendo ser utilizadas para fins de monitoramento dos laboratórios credenciados e pesquisa.

12.3. As técnicas, os reagentes e as soluções a serem utilizados para o diagnóstico das Salmoneloses Aviárias estão descritos nos Anexos I e II respectivamente.

12.4. Outros métodos diagnósticos poderão ser utilizados desde que previamente regulamentados pela CGLA.

12.5. O laboratório credenciado que não cumprir esses procedimentos terá o credenciamento para o Diagnóstico Oficial das Salmoneloses Aviárias, suspenso por tempo determinado ou cancelado, por ato desta Secretaria.

12.6. Os exames realizados pelos laboratórios credenciados serão custeados diretamente pelos interessados.

12.7. O Laboratório de Referência indicado pela CGLA, somente receberá amostra para a confirmação diagnóstica, remetida pelos laboratórios credenciados, cujos exames serão custeados diretamente pelos interessados.

## ANEXO I

### DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS / MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS E SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DAS SALMONELOSES AVIÁRIAS (S. Enteritidis, S. Gallinarum, S. Pullorum e S. Typhimurium)

#### 1. Diagnóstico Bacteriológico

##### 1.1. Enriquecimento

###### 1.1.1. ÓRGÃOS

###### 1.1.1.1. Enriquecimento não seletivo

Homogeneizar o material e inocular 2g em 20 ml de Caldo Cérebro Coração (BHI)

Incubar a temperatura de 35 a 37 °C por 18 a 24 horas.

###### 1.1.1.2. Enriquecimento seletivo

Homogeneizar o material e incubar 2g em 20ml de Caldo Tetrionato 0,2g em 20ml de Caldo Rappaport-Vassiliadis.

Incubar a temperatura de 42 a 43 °C por 18 a 24 horas e também à 35 a 37°C.

###### 1.1.2. OVOS

###### 1.1.2.1. Enriquecimento não seletivo

Proceder a desinfecção da casca do ovo com álcool etílico a 70% ou álcool iodado antes de abri-lo.

Homogeneizar o conteúdo em saco plástico esterilizado ou stomacher semear 10ml em 100 ml de BHI.

Incubar a temperatura de 35 a 37° C por 18 a 24 horas.

###### 1.1.3. MATERIAL DE CAMA, NINHO SWAB DE ARRASTO E FEZES.

### 1.1.3.1. Enriquecimento não seletivo

Homogeneizar o material e inocular 2g em 20ml de BHI.

Incubar a temperatura de 35 a 37 °C por 18 a 24 horas.

### 1.1.3.2. Enriquecimento seletivo

Homogeneizar o material e inocular 2g em 20ml de Caldo Tetratonato e 0,2g em 20 ml de Caldo RappaportVassiliadis.

Incubar a temperatura de 42 a 43 °C por 18 a 24 horas.

## 1.2. Isolamento

A partir dos caldos de enriquecimento seletivo e não seletivo estriar em placas de Ágar MacConkey, Ágar Verde Brilhante, Ágar Hektoen e /ou Ágar Rambach (Utilizar no mínimo, dois meios seletivos indicadores).

Incubar a temperatura de 35 a 37°C por 18 a 24 horas.

Verificar o aspecto das colônias desenvolvidas nas placas.

Características das colônias de Salmonella:

- Ágar MacConkey Colônias incolores.
- Ágar Hektoen Colônias verde-azuladas, com ou sem centro-negro.
- Ágar Verde Brilhante (BPLS) Colônias rosadas
- Ágar Rambach Colônias incolores (*S. Gallinarum* e *S. Pullorum*) ou vermelhas (outras *Salmonellas*).

## 1.3. Identificação

### 1.3.1. Identificação bioquímica preliminar

A partir do isolamento em Ágar MacConkey, Verde Brilhante, Hektoen e/ou Ágar Rambach repicar de cada uma das placas 2 a 3 colônias, com características de Salmonella, no Ágar TSI, LIA, SIM e Caldo Uréia. Fazer a leitura de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1 Identificação bioquímica presuntiva de Salmonella.

Comportamento bioquímico		Salmonella Pullorum	Salmonella Gallinarum	Salmonella sp. sub-espécie I	Salmonella sp. sub-espécies III a e IIIB
TSI 24 horas	Base	A gás +/-	A gás -	A gás +	A gás +
	Bisel	V	V	V	V ou A
	H2S	+/-	+	+	+
LIA 24 horas	Base	P	P	P	P
	H2S	+/-	+	-	+
Urease		-	-	+	-
Motilidade		-	-	+	+

Salmonella sp sub espécie I *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (entre outras)

Salmonella sp sub espécie III a e III b - Antigo grupo Arizona

A amarelo (ácido)

V vermelho (alcalino)  
 P púrpura (alcalino).

1.3.1.1. As cepas que apresentarem resultado negativo para a presença de urease e reações características de Salmonella no Ágar TSI e LIA móveis ou imóveis no SIM devem ser submetidas a testes bioquímicos complementares, de acordo com o quadro de diferenciação (Quadro 2).

Quadro 2 Diferenciação bioquímica de Salmonella

Comportamento bioquímico	Salmonella sp. sub-espécie I	Salmonella Pullorum	Salmonella Gallinarum	Salmonella sp. sub-espécies III a e IIIB
Indol	-	-	-	-
VM	+	+	+	+
VP	-	-	-	-
Cit. Simons	+	-	-	+
H <sub>2</sub> S no TSI	+	d	+	+
Urease	-	-	-	-
Fenilalanina desaminase	-	-	-	-
Lisina descarboxilase	+	+	+	+
Arginina desidrolase	d	d	-	d
Ornitina descarboxilase	+	+	-	+
Motilidade	+	-	-	+
Malonato	-	-	-	-
D-Glicose produção de ácido	+	+	+	+
D-Glicose produção de gás	+	d	-	+
Lactose	-	-	-	+
Sacarose	-	-	-	d
D Manitol	+	+	+	-
Dulcitol	+	-	+(*)	+
Maltose	+	-(**)	+	+

Salmonella sp sub espécie I S. Typhimurium e S. Enteritidis (entre outras)

Salmonella sp sub espécie III a e III b - Antigo grupo Arizona

+ - 90-100% de cepas são positivas

- - 90-100% de cepas são negativas

d Diferentes tipos

(\*) Ocasionalmente negativa

(\*\*) ou tardiamente positiva

As cepas que apresentarem perfil bioquímico compatível com Salmonella devem ser caracterizadas antigenicamente através do teste de aglutinação rápida com soro anti-somático O polivalente de Salmonella.

1.3.2. Caracterização antigênica da cepa bacteriana - aglutinação rápida em lâmina.

1.3.2.1. Com soro anti-somático O polivalente de Salmonella. Adicionar ao cultivo do Ágar Nutritivo 0,5 1,0 ml de solução salina 0,85% estéril e homogeneizar.

Depositar sobre a superfície da lâmina, uma gota da solução salina 2% e outra de soro anti-somático O polivalente de Salmonella.

Acrescentar uma gota de suspensão bacteriana sobre cada uma delas e Homogeneizar. Realizar a leitura em 30 a 60 segundos, com iluminação sobre fundo escuro.

Classificar a reação do seguinte modo:

Positiva Presença de aglutinação na mistura cultura + soro anti Salmonella.

Negativa Ausência de aglutinação na mistura cultura + soro anti Salmonella.

Caso ocorra aglutinação em ambas as misturas a caracterização antigênica estará inviabilizada por tratar-se de cepas rugosas (autoaglutinável), neste caso, proceder o isolamento.

1.3.2.2. As cepas móveis não rugosas que apresentarem resultado positivo frente ao soro anti-somático O polivalente de Salmonella deverão ser caracterizadas antigenicamente com os soros anti-somáticos B (04) e D (09) de Salmonella.

1.3.2.3. Com o soro anti-somático B (04) Caso ocorra aglutinação na mistura cultura+soro antissomático B (04) nas cepas móveis deveremos prosseguir na caracterização antigênica frente aos soros anti-flagelares H1 e H2 de Salmonella no sentido de se identificar a Salmonella Typhimurium (1, 4, [5], 12:i:1, 2). Portanto a aglutinação 4:i:2 confirma o sorovar acima.

1.3.2.4. Com o soro anti-somático D (09).

As cepas móveis que não apresentarem resultado positivo frente ao soro anti-somático B (04) deverão ser submetidas ao teste de aglutinação frente ao soro antissomático D (09). Caso ocorra aglutinação da mistura cultura +soro antissomático D (09) deveremos prosseguir na caracterização antigênica frente aos soros anti-flagelares: Hg, m; Hg, p; Hm, Hp e Hq, no sentido de identificar a Salmonella Enteritidis (1,9,12:g,m:-).

A inclusão dos soros anti-flagelares Hp e Hq visa afastar a possibilidade de identificação errônea de outros sorovares com fórmula antigênica assemelhada. Fazer a interpretação de acordo com o Quadro 3.

Quadro 03 Caracterização antigênica dos fatores flagelares Hg, Hm, Hp e Hq

Antissoros	Resultado da aglutinação	Interpretação
Soro anti-flagelar Hg,m	+	Confirmação da presença do fator Hg
Soro anti-flagelar Hg,p	+	
Soro anti-flagelar Hm	+	Confirmação da presença do fator Hm
Soro anti-flagelar Hp	-	Confirmação da ausência do fator Hp
Soro anti-flagelar Hq	-	Confirmação da ausência do fator Hq

Os resultados apontados no Quadro 03 permitem confirmar a caracterização antigênica da Salmonella Enteritidis (9:g,m).

1.3.2.5. As cepas imóveis não rugosas que apresentarem resultado positivo frente ao soro anti-somático polivalente O, deverão ser caracterizados antigenicamente com soro anti-somático D (09).

As cepas que apresentarem resultado positivo deverão ser diferenciadas bioquimicamente.

Quadro 04 Reações bioquímicas de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*.

Provas bioquímicas	Salmonella Pullorum	Salmonella Gallinarum
Descarboxilação da ornitina	+	-
Produção de H <sub>2</sub> S (TSI)	+/-	+
Fermentação do dulcitol	-	+/-(*)
Fermentação da maltose	-/+(**)	+
Fermentação de glicose/gás	+gás+/-	+ gás -

(\*) Ocasionalmente negativa

(\*\*) Ou tardiamente positiva

## 2. Diagnóstico Sorológico

### 2.1. Aglutinação rápida

Depositar uma gota no antígeno corado em uma placa ou lâmina, acrescentar uma gota de soro sanguíneo.

Homogeneizar com movimentos suaves da placa ou lâmina. Realizar a leitura após 1 e 2 minutos.

Classificar a reação do seguinte modo:

Positiva aglutinação em até 2 minutos.

Negativa Ausência de aglutinação em 2 minutos.

### 2.2. Aglutinação lenta em tubo

Misturar em tubo (13x100), 0,04 ml do soro sanguíneo e 1 ml do antígeno não corado para obter diluição de 1:25.

Incluir controles positivo e negativo com soros conhecidos.

Incubar a mistura de 35 a 37°C por 18 a 24 horas.

Classificar a reação do seguinte modo:

Positiva depósito granular branco, com sobrenadante límpido.

Negativa turbidez uniforme

### 2.3. Microaglutinação

Utilizando placas de microteste diluir o soro 1:20 pela adição de 10 ml de solução salina 0,85%, acrescentar 100 ml de antígeno para microteste, corado, previamente padronizado. Efetuar controles positivo e negativo.

Selar as placas e incubar por 24 a 48 horas de 35 a 37° C.

Classificar a reação do seguinte modo:

Positiva Precipitação fina, difusa.

Negativa precipitação em forma de botão.

## ANEXO II

### FORMULAÇÃO E PROCEDIMENTOS TÉCNICOS DE PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURAS E REAGENTES

#### 1 Ágar Citrato de Simmons

Sulfato de magnésio .....	0,2 g
Citrato de sódio .....	2,0 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
Fosfato monobásico de amônio.....	1,0 g
Fosfato dibásico de potássio .....	1,0 g
Azul de bromotimol .....	0,08 g
Ágar .....	15,0 g

Dissolver 24,2 g em um litro de água destilada ou deionizada. Aquecer até dissolução completa. Distribuir 3 a 4 ml em tubos 13x100 ou 13 x120 mm.

Esterilizar à 121°C por 15 minutos.

Solidificar em posição inclinada.

pH final 6,8 + 0,2 a 25 °C.

Semeadura A partir de cultura de 24 horas em ágar nutritivo, semear pequeno inóculo com agulha, em estrias, na superfície do meio. Incubar a temperatura de 35 a 37 °C por 18 a 24 horas.

Interpretação Uma viragem da cor verde para a azul (alcalinização) indica utilização do citrato.

#### 2 Ágar Fenilalanina

Extrato de levedura.....	3,0 g
Fosfato dibásico de potássio.....	1,0 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
DL fenilalanina.....	2,0 g
Ágar .....	12 g

Dissolver 23 g em um litro de água destilada ou deionizada e aquecer até dissolver completamente.

Distribuir 5 ml em tubos 16 x 160 mm. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Solidificar em posição inclinada. pH final 7,3 + 0,2 a 25°C Semeadura Fazer inóculo abundante e incubar a temperatura de 35 a 37°C por 18 a 24 horas.

Interpretação Adicionar 5 a 6 gotas do reagente. A cor verde escura indica a transformação de fenilalanina em ácido fenilpirúvico (Proteus Morganella Providencia).

#### 2.1 Reagente utilizado para o teste fenilalanina (desaminação).

Cloreto Férrico.....	10,0 g
Água destilada ou deionizada .....	100 ml

#### 3 Ágar Hektoen

Proteose-peptona .....	12 g
Extrato de levedo .....	3,0 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
Tiosulfato de sódio .....	5,0 g
Sais biliares .....	9,0 g
Citrato de ferro amoniacal .....	1,5 g
Salicina .....	2,0 g
Lactose .....	12,0 g
Sacarose .....	12,0 g
Fucsina ácida .....	0,1 g
Azul de bromotimol .....	0,065 g
Ágar .....	14,0 g

Dissolver 76 g em um litro de água destilada ou deionizada. Aquecer até a fervura por alguns segundos.

Não autoclavar. Distribuir 15 a 20 ml por placa. /

pH final: 7,5 + 0,1 a 25 °C.

#### 4 Ágar Lisina Ferro (LIA)

Peptona.....	5,0g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Glicose .....	1,0 g
L Lisina .....	10,0 g
Tiosulfato de sódio .....	0,04 g
Citrato de ferro amoniacal.....	0,5 g
Púrpura de bromocresol .....	0,02 g
Ágar .....	15,0 g

Dissolver 34 g em um litro de água deionizada ou destilada. Distribuir em tubos. Esterilizar à 121 °C por 12 minutos.

Esfriar em posição inclinada, de modo a produzir uma base de + 4 cm e um bisel menor. pH final: 6,7 + 0,2 a 25°C.

Semeadura A inoculação do meio se faz por picada central até a profundidade, seguida de espalhamento em estrias estreitas na superfície. Incubar a temperatura de 35 a 37 °C por 18 a 24 horas.

Interpretação:

(1) Base púrpura (reação alcalina) e superfície púrpura (reação alcalina): presença de lisina descarboxilase.

Base amarela (reação ácida) e superfície vermelha ou púrpura (reação alcalina): ausência de lisina descarboxilase.

(2) A presença de H<sub>2</sub>S se traduz por escurecimento do meio na junção da base com bisel. Em cepas que produzem pouco H<sub>2</sub>S o escurecimento se limita a picada.

#### 5 Ágar MacConkey

Bacto-peptona.....	17,0 g
Proteose-peptona .....	3,0 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
Lactose.....	10,0 g
Sais biliares nº 3 .....	1,5 g
Vermelho neutro .....	0,03 g
Cristal violeta .....	0,001 g
Ágar .....	13,5 g

Dissolver 50g em um litro de água deionizada ou destilada. Esterilizar à 121° C por 15 minutos.

Distribuir 15 a 20 ml por placa.

pH final 7,1 + 0,2 a 25 ° C.

#### 6 Ágar Nutritivo

Extrato de carne.....	3,0 g
Peptona.....	5,0 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
Agar .....	15,0 g

Dissolver 28 g em um litro de água destilada ou deionizada. Aquecer até dissolução completa. Distribuir em tubos. Esterilizar à 121°C por 15 minutos.

Solidificar na posição inclinada.

pH final 6,8 + 0,2 a 25 °C.

#### 7 Ágar Rambach

Peptona.....	8,0 g
Propileno glicol .....	10,5 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
Desoxicolato de sódio .....	1,0 g
Ágar .....	15,0 g
Mistura cromogênica .....	1,5 g
Água destilada deionizada .....	1.000 ml

Adicionar 1 frasco da mistura cromogênica a 250 ou 1000 ml de água destilada ou deionizada (a quantidade dependerá da embalagem). Misturar.

Adicionar um frasco do pó nutriente, dissolver em banho maria ou vapor fluente.

Não autoclavar. Homogeneizar bem antes do plaqueamento.

pH final: 7,3 + 0,2 a 25°C.

#### 8 Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)

Extrato de carne.....	3,0 g
Extrato de levedura .....	3,0 g
Peptona .....	15,0 g
Proteose-peptona .....	5,0 g
Lactose .....	10,0 g
Sacarose .....	10,0 g
Glicose .....	1,0 g
Sulfato ferroso .....	0,2 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
Tiosulfato de sódio .....	0,3 g
Vermelho de fenol .....	0,024 g
Ágar .....	12,0 g

Dissolver 65 g em um litro de água deionizada ou destilada. Distribuir em tubos. Esterilizar à 121°C por 15 minutos. Solidificar em posição inclinada. A base deve ter + 4 cm de altura e superfície inclinada de igual comprimento.

pH final: 7,4 + 0,2 a 25°C.

Semeadura A inoculação do meio se faz por picada central até a profundidade, seguida de espelhamento em estrias estreitas na superfície.

Incubar a temperatura de 35 a 37 °C por 18 a 24 horas.

Interpretação:

(1) Base inalterada: glicose não fermentada. A base vira para amarelo (reação ácida) em caso contrário. Se houver produção de gás surgem algumas bolhas ou mesmo ocorre deslocamento do meio de cultura.

(2) Se a superfície permanece inalterada ou se torna vermelha (reação alcalina): a lactose e a sacarose não foram fermentadas. A superfície vira para amarelo (reação ácida) em caso contrário (fermentação da lactose e/ou sacarose).

(3) A produção de H<sub>2</sub>S se traduz por escurecimento do meio na junção da base com o bisel. Em cepas que produzem pouco H<sub>2</sub>S o escurecimento se limita apicada.

#### 9 Ágar Verde Brilhante (BPLS)

Proteose-peptona n° 3 .....	10 g
Extrato de levedo .....	3,0 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
Lactose .....	10,0 g
Sacarose .....	10,0 g
Vermelho de fenol .....	0,08 g
Verde Brilhante .....	0,0125 g
Ágar .....	20,0 g

Dissolver 58,0 g em um litro de água deionizada ou destilada, esterilizar à 121 °C por 15 minutos.

Adicionar 1 ml da solução aquosa de novobiocina a 4% em um litro de meio antes do plaqueamento.

Distribuir 15 a 20 ml por placa.

pH final: 6,9 + 0,2 a 25°C.

#### 10 Caldo Cérebro e Coração (BHI)

Infusão de cérebro de boi desidratado .....	12,5 g
Infusão de coração de boi desidratado .....	5,0 g
Proteose peptona .....	10,0 g

Cloreto de sódio .....5,0 g  
Fosfato dissódico .....2,5 g  
Glicose .....2,0 g

Dissolver 37 g em um litro de água deionizada ou destilada. Distribuir em tubos ou frascos. Esterilizar à 121°C por 15 minutos.

pH final: 7,4 + 0,2 a 25 °C.

#### 11 Caldo Malonato

Sulfato de amônia .....2,0 g  
Fosfato dibásico de potássio .....0,6 g  
Fosfato monobásico de potássio .....0,4 g  
Cloreto de sódio .....2,0 g  
Malonato de sódio .....3,0 g  
Azul de bromotimol ..... 0,025 g

Dissolver 8 g em um litro de água destilada ou deionizada. Distribuir 3 ml em tubos. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

pH final: 6,7 + 0,2 a 25°C.

Semeadura inocular a partir de uma cultura de 18 a 24 horas em ágar nutritivo. Incubar a temperatura de 35 a 37°C. Observar até 72 horas.

Interpretação Uma viragem da cor verde amarelada para a azul (alcalinização) indica a utilização do malonato.

#### 12 Caldo para descarboxilação da Lisina e Ornitina e desidrolação de Arginina (Base Moeller)

Peptona .....5,0 g  
Extrato de carne .....5,0 g  
Glicose .....0,5 g  
Púrpura de bromocresol ..... 0,01g  
Vermelho de cresol ..... 0,005 g  
Piridoxal ..... 0,005 g

Dissolver 10,5 g em um litro de água deionizada ou destilada. Aquecer até dissolução completa. Dividir o meio em 4 alíquotas idênticas. Adicionar 2,5 g (1%) de L-lisina, L-arginina e L-ornitina, sendo que a última fração não receberá nenhum aminoácido, funcionando como controle. No caso do uso de DL-aminoácidos dobrar a concentração (2%).

pH final: 6,0 + 0,2 a 25°C.

Obs: A ornitina é extremamente ácida, devendo ser feito o reajuste do pH com 1,15 ml de NaOH a 1N por 250 ml de meio. Distribuir 4 a 5 ml em tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121°C por 10 minutos.

Semeadura Inocular a partir de uma cultura de 18 a 24 horas em ágar nutritivo. Incluir o tubo controle. Cobrir, assepticamente, a superfície dos mesmos com 4 a 5 mm de óleo mineral estéril. Incubar a temperatura de 35 a 37 °C.

Observar até 96 horas.

Interpretação Uma viragem de púrpura para amarelo para púrpura (realcalinização do meio) indica a utilização do aminoácido. O testemunho e a prova negativa permanecem amarelos (reação ácida).

#### 13 Caldo base para a fermentação de carboidratos

Triptona .....5,0 g  
Peptona de carne .....5,0 g  
Cloreto de sódio .....5,0 g  
Vermelho de fenol ..... 0,018 g

Dissolver 15 g em um litro de água destilada ou deionizada. Distribuir em tubos (com tubos de Durhan caso o carboidrato a ser incorporado seja a glicose).

Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Acrescentar, assepticamente, glicose, manitol, lactose e sacarose na concentração final de 1% e dulcitol e maltose a 0,5%.

pH final: 7,4 + 0,2 a 25 °C.

Semeadura Inocular os tubos com uma gota de suspensão tênue bacteriana. Incubar na temperatura de 35 a 37°C, por 18 a 24 horas. Observar por alguns dias.

Interpretação A cor amarela (reação ácida) indica a utilização do carboidrato. Na glicose pode-se observar a produção de gás (bolha no tubo de Durham).

Preparo da solução concentrada de carboidrato:

Carboidrato.....2,5 g

Água destilada ..... 10,0 ml

Dissolver e filtrar em seringa descartável acoplada a um filtro com membrana de 0,22µm.

#### 14 Caldo Rappaport Vassiliadis

Peptona caseína .....4,0 g

Peptona de soja .....1,0 g

Cloreto de magnésio ..... 29,0 g

Cloreto de sódio .....8,0 g

Fosfato dipotássico .....0,4 g

Fosfato monopotássico .....0,6 g

Verde malaquita ..... 0,036 g

Dissolver 43 g em um litro de água destilada ou deionizada. Distribuir em tubos ou frascos. Esterilizar a 115 °C por 15 minutos.

pH final: 5,5 + 0,1 a 25°C.

#### 15 Caldo Tetrionato

Proteose-peptona .....5,0 g

Mistura de sais biliares .....1,0 g

Carbonato de cálcio ..... 10,0 g

Tiosulfato de sódio ..... 30,0 g

Dissolver 46 g em um litro de água deionizada ou destilada, estéril. Aquecer até a fervura. Não autoclavar. Distribuir em tubos ou frascos estéreis.

pH final: 8,4 + 0,2 a 25°C

Antes da utilização, acrescentar para cada 100 ml do meio, 2 ml da solução iodo-iodetada, 1 ml da solução aquosa de verde brilhante a 0,1% e 0,1 ml da solução aquosa de verde brilhante a 0,1% e 0,1 ml da solução aquosa de novobiocina a 4%.

Solução Iodo-Iodetada:

Iodo .....6,0 g

Iodeto de potássio .....5,0 g

Água destilada ..... 20 ml

#### 16 Caldo Uréia

Extrato de levedura .....0,1 g

Fosfato de potássio .....9,1 g

Fosfato dissódico .....9,5 g

Uréia ..... 20,0 g

Vermelho fenol ..... 0,01 g

Dissolver 38,7 g em um litro de água destilada ou deionizada, estéril. Esterilizar por filtração. Distribuir 2 ml por tubo estéril.

pH final: 6,8 + 0,1 a 25°C.

Semeadura Fazer inóculo denso e incubar a temperatura de 35 a 37°C por 18 a 24 horas.

Interpretação Uma viragem da cor laranja para vermelho-cereja indica a presença de urease.

#### 17 Leite desnatado

Dissolver 100 g de leite em pó desnatado em um litro de água destilada ou deionizada. Distribuir em tubos ou frascos estéreis. Esterilizar em vapor fluente por 15 minutos.

pH final: 7,0 + 0,2 a 25 °C

#### 18 Meio de transporte Cary e Blair

Tioglicolato de sódio .....1,5 g  
Fosfato dissódico .....1,1 g  
Cloreto de sódio .....5,0 g  
Ágar .....5,0 g

Dissolver 12,6 g em 991 ml de água destilada ou deionizada. Esfriar a 50°C, acrescentar 9 ml de solução aquosa de cloreto de cálcio a 1%. Ajustar o pH para 8,4. Distribuir em tubos ou frascos estéreis.

Esterilizar em vapor fluente por 15 minutos.

#### 19 Meio de Clark e Lubs

Peptona .....5,0 g  
Fosfato dibásico de potássio .....5,0 g  
Glicose .....5,0 g

Dissolver 15,0 g em um litro de água deionizada ou destilada. Distribuir 3 a 5 ml em tubos. Esterilizar à 121°C por 15 minutos.

pH final: 6,9 + 0,2 a 25°C.

Semeadura inocular a partir de uma cultura de 18 a 24 horas em ágar nutriente. Incubar aa temperatura de 35 a 37°C.

· Prova do vermelho de metila (VM)

Após 2 dias de incubação adicionar 3 a 5 gotas do reagente.

Interpretação:

Cor vermelho (pH inferior a 4,2): reação positiva (VM+).

Cor amarela (pH superior a 6,3): reação alcalina (VM -)

Reagente:

Vermelho de metila .....0,1 g  
Álcool etílico a 95 %.....300,0 ml

Dissolver e completar para o volume de 500 ml com água destilada. · Prova de Voges ProsKauer Após 2 dias de incubação adicionar 0,6 ml do reagente A e 0,2 ml do reagente B. Agitar e aguardar 15 minutos.

Interpretação:

Cor vermelha presença de acetilmetilcarbinol (acetoína) reação positiva (VP+)

Cor amarela reação negativa (VP-).

Reagente A

Alfa-naftol.....5,0 g  
Álcool etílico absoluto.....100,0 ml

Reagente B

Hidróxido de potássio ..... 40,0 g  
Água destilada .....100,0 ml

Obs: Estocar os 3 reagentes a 4°C e ao abrigo da luz.

Meio SIM

Peptona..... 30,0g  
Extrato de carne .....3,0 g  
Citrato de ferro amoniacal .....0,2 g  
Tiosulfato de sódio ..... 0,025 g  
Ágar .....3,0 g

Dissolver 36 g em um litro de água destilada ou deionizada. Distribuir em tubos (4 cm de altura).

Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Solidificar em posição vertical.  
pH final: 7,3 + 0,2 a 25°C.

Semeadura A inoculação do meio se faz por picada central atingindo 1 cm de profundidade. Incubar a temperatura de 35 a 37°C por 18 a 24 horas.

Interpretação:

- (1) A presença de H<sub>2</sub>S se traduz por escurecimento do meio no ponto ou ao redor da picada.
- (2) O crescimento limitado ao ponto da picada significa que a cepa é imóvel, enquanto que o crescimento difuso representa motilidade.
- (3) A pesquisa de indol será feita pela adição de algumas gotas do reativo de Kovacs: anel vermelho +, anel amarelo.

#### 20.1 Reativo de Kovacs

Para-dimetil-aminobenzaldeido (PDAB) .....5,0 g

Álcool amílico ou iso-amílico..... 75,0 ml

Ácido clorídrico concentrado ..... 25,0 ml

Dissolver o PDAB no álcool em banho-maria a 60°C. Resfriar e adicionar lentamente o ácido clorídrico (gota a gota). Estocar ao abrigo da luz.

#### RETIFICAÇÃO

No anexo I da Portaria nº 126, de 3/11/95, publicado no D.O. de 6/11/95, Seção 1, págs. 17694 a 17698.

No subitem 1.1.1.2 Enriquecimento seletivo.

Onde se lê: Homogeneizar o material e incubar 2g em 20 ml de Caldo Tetrionato e 0,2 g em 20 ml de Caldo Rappaport-Vassiliadis, Incubar a temperatura de 42 a 43°C por 18 a 24 horas.

Leia-se: Homogeneizar o material e incubar 2g em 20 ml de Caldo Tetrionato e 0,2 g em 20 ml de Caldo Rappaport-Vassiliadis. Incubar a temperatura de 42 a 43°C por 18 a 24 horas e também à 35 a 37°C.

D.O.U., 06/11/1995