

CAPÍTULO II CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a contagem de bolores e leveduras em alimentos.

Aplica-se a amostras de matérias-primas, alimentos e rações.

2. FUNDAMENTOS

Baseia-se na verificação da capacidade desses microrganismos se desenvolverem em meios de cultura com pH próximo a 3,5 e temperatura de incubação de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

A utilização de meios acidificados a pH $3,5 \pm 0,1$ promove seletivamente o crescimento de fungos, inibindo a maioria das bactérias presentes no alimento.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar batata glicose 2%;

L(+) Ácido tartárico 10%;

Solução salina peptonada 0,1%.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Preparo das placas

Fundir o ágar batata glicose.

Resfriar em banho-maria até $46-48^\circ\text{C}$.

Acidificar o meio até pH 3,5 por meio da adição de 1,5 mL de solução de ácido tartárico 10% para cada 100 mL de meio.

Verter nas placas cerca de 15 a 20 mL.

Deixar solidificar em superfície plana.

Identificar as placas.

Antes da utilização, secar as placas semi-abertas com o fundo voltado para cima em estufa a 50°C por cerca de 15 minutos, ou em fluxo laminar expondo a superfície pelo tempo necessário para a completa secagem.

5.2 Pesagem e preparo da amostra

Pesar $25 \pm 0,2$ g ou pipetar $25 \pm 0,2$ mL da amostra de acordo com as instruções contidas no Anexo V, "Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras", deste Manual.

Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. Para amostras de doce de leite e de leite condensado, utilizar como diluente solução salina peptonada com 20% de glicose.

A partir da diluição inicial 10^{-1} , efetuar as diluições desejadas, de acordo com o Anexo II, "Diluições e soluções", deste Manual.

5.3 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.4 Inoculação em placas

Inocular 0,1 mL das diluições selecionadas sobre a superfície seca de ágar batata glicose 2% acidificado a pH 3,5.

Com o auxílio de alça de Drigalski ou bastão do tipo "hockey", espalhar o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção.

Utilizar no mínimo duas diluições decimais ou duplicata da mesma diluição.

Nos casos em que a legislação exigir valores menores que 100 UFC/g ou mL, distribuir em duplicata 1 mL da diluição 10^{-1} em 3 placas (0,4 mL, 0,3 mL e 0,3 mL). No caso de produtos líquidos poderá ser inoculado 0,1 mL diretamente da amostra (10^0), o que corresponderá à diluição 10^{-1} .

5.5 Incubação

Incubar as placas, sem inverter, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por 5 a 7 dias, em incubadora de B.O.D.

5.6 Leitura

Selecionar as placas que contenham entre 15 e 150 colônias.

OBSERVAÇÃO: Não abrir, em hipótese alguma, as placas que contenham crescimento de fungos, para evitar a contaminação ambiental por meio da dispersão dos seus esporos.

6. RESULTADOS

A partir dos dados obtidos, calcular o número de microrganismos presentes de acordo com o Anexo IV, "Procedimentos para a contagem de colônias", deste Manual.

Expressar o resultado em UFC/g ou mL.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

TOURNAS, V.; STACK, M.E.; MISLIVIC, P.B.; KOCH, H.A.; BANDLER, R. Yeasts, molds and mycotoxins. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>

CAPÍTULO III

CONTAGEM DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS VIÁVEIS CAPAZES DE CAUSAR ALTERAÇÃO EM PRODUTOS LÁCTEOS LÍQUIDOS UHT

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis em produtos UHT, com exclusão daqueles comprovadamente não patogênicos e não causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto.

Detectar a presença de *Bacillus sporothermodurans* para diferenciá-lo dos demais microrganismos mesófilos aeróbios viáveis.

Aplica-se a amostras de produtos lácteos líquidos, tratados pelo processo UHT.

ANEXO

MÉTODOS ANALÍTICOS OFICIAIS PARA ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS PARA CONTROLE DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL E ÁGUA

CAPÍTULO I

CONTAGEM PADRÃO DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS ESTRITOS E FACULTATIVOS VIÁVEIS

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis.

Aplica-se a amostras de matérias-primas, água e alimentos.

2. FUNDAMENTOS

Baseia-se na semeadura da amostra ou de suas diluições em ágar padrão para contagem seguida de incubação em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar padrão para contagem (PCA);

Solução salina peptonada 0,1%.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Pesagem e preparo da amostra

Pesar $25 \pm 0,2$ g ou pipetar $25 \pm 0,2$ mL da amostra, de acordo com as instruções contidas no Anexo V, "Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras", deste Manual.

Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%.

Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em "stomacher".

Esta é a diluição 10^{-1} .

5.2 Inoculação em placas

A partir da diluição inicial (10^{-1}), efetuar as demais diluições desejadas em solução salina peptonada 0,1%, de acordo com as instruções contidas no Anexo II, "Diluições e soluções", deste Manual.

Semear 1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis.

Adicionar cerca de 15 a 20 mL de PCA fundido e mantido em banho-maria a $46-48^\circ\text{C}$.

Homogeneizar adequadamente o ágar com o inóculo.

Deixar solidificar em superfície plana.

5.3 Incubação

Incubar as placas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

5.4 Leitura

Segundo o tipo de amostra em análise, realizar a leitura selecionando as placas de acordo com o seguinte critério, contando todas as colônias presentes:

Produtos em geral: Placas que contenham entre 25 e 250 colônias;

Amostras de água: Placas que contenham entre 30 e 300 colônias.

6. RESULTADOS

A partir dos dados obtidos, calcular o número de microrganismos presentes na amostra em análise, seguindo as instruções contidas no Anexo IV, "Procedimentos para contagem de colônias", deste Manual.

Expressar o resultado em UFC/g ou mL.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

FRANK, J.F. Microbial spoilage of foods: Milk and dairy products. In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Michael P. Doyle, Beuchat, L.R.; Montville, T.J. (Eds.). ASM Press Washington D.C., p. 101-116.

MORTON, R.D. Aerobic Plate Count. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.63-67.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Pré-incubação

Baseia-se na incubação das amostras em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 7 dias e posterior verificação da ocorrência de alterações das características do produto.

2.2 Contagem em placas

Baseia-se na semeadura da amostra e suas diluições em ágar cérebro-coração e em ágar nutriente isento de extrato de levedura, seguida de incubação a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas, e posterior identificação dos microrganismos presentes.

2.3 Limitações do Método

Devido à opacidade produzida pela homogeneização do meio de cultura com alguns tipos de amostras, pode haver dificuldade para a contagem de colônias na diluição 10^0 . Nesses casos, o resultado final deve ser obtido nas diluições subsequentes, o que pode resultar em dados finais estimados.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar cérebro-coração (ABHI);

Ágar nutriente isento de extrato de levedura;

Ágar esculina;

Caldo cérebro-coração nitrato (BHI-NO₃);

Caldo vermelho de fenol com glicose;

Solução salina peptonada 0,1%;

Ágar uréia;

Reativo para oxidase (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina ou oxalato de para-amino-dimetilanilina) ou tiras para teste de oxidase (comercialmente disponíveis);

Peróxido de hidrogênio 3%;

Alfa-naftilamina 0,5%;

Ácido sulfanílico 0,8%;

Corantes para coloração de Gram;

Zinco em pó;

Etanol 70% ou Etanol 70° GL;

Reagentes para coloração de Gram.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Preparo da amostra

Após a pré-incubação, as amostras visualmente inalteradas devem ser agitadas por 25 vezes.

Antes da abertura, desinfetar externamente as embalagens com solução desinfetante e após com etanol 70% ou etanol 70° GL. Deixar secar.

Com auxílio de tesouras ou bisturis previamente esterilizados, abrir a embalagem. Caso se observe alteração evidente (coagulação, floculação, dessoração, odor não característico ou outros), interromper a análise e reportar como “produto alterado após incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 7 dias”.

As amostras que apresentarem qualquer alteração não devem ser analisadas. Reportar o resultado como “amostra alterada”, incluindo informações sobre o tipo de alteração observada.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Contagem em placas

Diluir a amostra em tubos contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% até 10^{-2} .

Pipetar 1mL diretamente da amostra (10^0) e 1 mL de cada uma das diluições preparadas (10^{-1} e 10^{-2}), transferindo-as para placas de Petri estéreis, em duplicata.

Adicionar cerca de 20 mL de ágar cérebro-coração (ABHI) a uma das placas de cada diluição. Nas demais, adicionar cerca de 20 mL de ágar nutriente isento de extrato de levedura.

Homogeneizar adequadamente os meios com os inóculos.

Deixar solidificar. Inverter as placas.

5.4 Incubação

Incubar as placas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas.

5.5 Leitura

Verificar a presença de colônias nas placas, contando cada uma e observando suas características.

Selecionar placas que contenham entre 25 e 250 colônias para a realização da contagem.

Se os resultados de contagem obtidos em ambos os meios forem coerentes entre si, proceder conforme Anexo IV, “Procedimentos para contagem de colônias”, deste Manual.

Se os resultados forem discrepantes entre si, considerar o resultado obtido nas placas de ABHI.

Quando o crescimento bacteriano é devido à presença de esporos de *Bacillus sporothermodurans* na amostra em análise, será observado nas placas de ABHI um abundante crescimento de colônias lisas, de forma regular, com coloração entre branco e bege, com diâmetro máximo de 3 mm, facilmente identificáveis.

No ágar nutriente isento de extrato de levedura, o *Bacillus sporothermodurans* comumente não forma colônias visíveis, porém poderão se desenvolver colônias puntiformes, de coloração entre branco e bege.

Esta diferenciação é necessária porque as colônias de *B. sporothermodurans* não devem ser contabilizadas no cálculo de mesófilos aeróbios viáveis capazes de causar alteração no produto.

Quando for observado crescimento em ambos os meios, realizar a contagem nas placas de ABHI, registrando em separado o número de colônias suspeitas de serem *Bacillus sporothermodurans*, que deverão ser confirmadas de acordo com o que segue:

Repicar 3 a 5 colônias suspeitas para tubos com ABHI inclinado.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por até 72h.

Realizar os testes confirmatórios.

5.6 Coloração de Gram

Preparar esfregaço e corar pelo método de Gram, conforme instruções constantes do Anexo VII, “Procedimentos de coloração”, deste Manual.

Quando forem observados bastonetes Gram positivos, realizar a prova da catalase conforme item 5.7.

Quando forem observados microrganismos com morfologia e características diferentes de bastonetes Gram positivos, reportar o número encontrado como a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos.

5.7 Catalase

Com auxílio de alça de platina, palito de madeira, bastão de vidro ou Pipeta de Pasteur, estéreis, transferir a cultura para uma lâmina ou placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio 3%. Misturar o inóculo ao peróxido e observar a reação.

A não formação de bolhas indica prova negativa para catalase. A formação de bolhas indica prova positiva para catalase.

A maioria dos membros do gênero *Bacillus* apresentam reação de catalase positiva.

Quando a coloração de Gram demonstrar a presença de bastonetes Gram positivos e a prova da catalase for positiva para a cultura em teste, confirmar a presença de *Bacillus sporothermodurans* por meio das provas da oxidase, crescimento em anaerobiose, hidrólise da esculina, fermentação da glicose, redução do nitrato e produção de urease, conforme abaixo descrito.

5.8 Oxidase

Usando alça de platina, Pipeta de Pasteur, palitos de madeira ou de plástico, descartáveis e estéreis, realizar a prova de oxidase, espalhando a cultura sobre papel filtro impregnado com o reativo para oxidase ou sobre tiras para teste de oxidase.

Fazer a leitura em 10 a 20 segundos. Após esse tempo, reações falso positivas podem ocorrer.

O aparecimento de cor azul (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho intenso (oxalato de para-amino-dimetilanilina) é indicativo de uma reação positiva.

Não utilizar alças de níquel-cromo ou alças de aço inoxidável para realizar a prova de oxidase, pois traços de óxido de ferro na superfície flambada pode produzir reação falso positiva.

O *Bacillus sporothermodurans* apresenta reação de oxidase positiva.

5.9 Crescimento em anaerobiose

Inocular a cultura em tubos de ABHI inclinados e incubar em jarra de anaerobiose a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72h.

O *Bacillus sporothermodurans* não cresce em anaerobiose.

5.10 Hidrólise da esculina

Inocular a cultura, com agulha, em tubos contendo ágar esculina inclinado.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72h.

A hidrólise da esculina é evidenciada pelo enegrecimento do meio.

O *Bacillus sporothermodurans* hidrolisa a esculina.

5.11 Fermentação da glicose

Semear tubos com caldo vermelho de fenol-base adicionados de glicose.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por até 72 horas.

A viragem de cor do indicador vermelho de fenol para amarelo indica a fermentação do açúcar presente.

O *Bacillus sporothermodurans* não fermenta a glicose.

5.12 Redução de nitrato

Inocular a cultura, com alça, em tubos contendo caldo BHI-NO₃.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas.

Após incubação, adicionar aos tubos 0,5 a 1 mL de alfa naftilamina 0,5%, e 0,5 a 1 mL de ácido sulfanílico 0,8%.

O aparecimento de coloração rosa indica positividade para redução de nitrato.

Quando não houver desenvolvimento de coloração, adicionar ao tubo alguns miligramas de pó de zinco. Nessa situação, o aparecimento de coloração rosa indica reação negativa, enquanto que o não desenvolvimento de cor indica positividade.

O *Bacillus sporothermodurans* não reduz o nitrato a nitrito.

5.13 Prova da urease

Inocular a cultura, com alça, em tubos ou placas contendo ágar uréia.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72h.

Observar o crescimento com mudança de coloração para rosa intenso, o que indica positividade para produção de urease.

O *Bacillus sporothermodurans* não produz urease.

6. RESULTADOS

A partir dos dados obtidos, calcular o número de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis presentes na amostra em análise, seguindo as instruções contidas no Anexo IV, “Procedimentos para contagem de colônias”, deste Manual.

O número de UFC/mL de *Bacillus sporothermodurans* não deverá ser reportado como resultado da contagem de mesófilos aeróbios. Quando estes microrganismos forem encontrados, fazer constar do campo “OBS” do Certificado Oficial de Análise (COA): “Presença de *Bacillus sporothermodurans*”.

Somente será reportado o número de unidades formadoras de colônias de outros mesófilos encontrados.

Deverão ainda acompanhar o resultado da análise informações adicionais sobre o tipo de microrganismo encontrado (como por exemplo: cocos Gram positivos, bastonetes Gram negativos, flora mista, etc.) ou o(s) microrganismo(s) aeróbio(s) presente(s), quando identificado(s).

Os resultados de contagem de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis em leite UHT a 30°C por até 72 horas devem ser expressos em UFC/mL.

Para todos os produtos UHT, o resultado da análise de pré-incubação por 7 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ deve ser expresso como “alterado” ou “sem alteração”.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual de métodos microbiológicos para alimentos. Coordenação Geral de Laboratório Animal. 1991/1992 2ª revisão. 136p.

PETTERSSON, B.; LEMBKE, F.; HAMMER, P.; STACKE-BRANDT, E.; PRIEST, F.G. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly-heat-resistant endospores. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996. p. 759-764.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p. 53-62.

MORTON, R.D. Aerobic Plate Count. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.63-67.

CAPÍTULO IV

CONTAGEM DE *Clostridium* SULFITO REDUTORES E DE *Clostridium perfringens*

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a contagem de *Clostridium* sulfito redutores e de *Clostridium perfringens* em alimentos.

Aplica-se a amostras de matérias-primas e alimentos.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Contagem

Baseia-se na inoculação da amostra ou de uma diluição da mesma em meios de cultura seletivos. Após incubação em anaerobiose, os *Clostridium* formam colônias negras, devido à reação de redução de sulfito a sulfeto, que reage com citrato de amônio e ferro III, formando um precipitado negro.

2.2 Fermentação tempestuosa

Baseia-se na verificação da fermentação tempestuosa do leite presente no meio leite com ferro, característica do *Clostridium perfringens*.

Essa fermentação caracteriza-se por formação de coágulo bem definido, com grande formação de gás, durante incubação à temperatura seletiva de $46 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3 Testes confirmativos

A confirmação de *Clostridium perfringens* se faz por meio de provas confirmativas, com as quais se evidenciam suas características de: imobilidade, redução de nitratos, produção de ácido e gás a partir da lactose, fermentação da rafinose e liquefação da gelatina.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Solução salina peptonada 0,1%;

Ágar triptose - sulfito - cicloserina (TSC)- base ou Ágar Sahid Ferguson Perfringens (SFP) -base;

Ágar estoque;

Ágar motilidade - nitrato tamponado;

Meio leite com ferro;

Meio lactose-gelatina;

Caldo vermelho de fenol-base;

Solução de rafinose 10% ;

Caldo de carne cozida (opcional caldo Tarozzi);

Meio tioglicolato;

Alfa naftilamina 0,5%;

Ácido sulfanílico 0,8%;

Solução de cicloserina 5%;

Polimixina B;

Kanamicina;

Vaspar ou óleo mineral ou parafina líquida;

Gerador de anaerobiose;

Reagentes para coloração de Gram.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Pesagem e preparo da amostra

Pesar $25 \pm 0,2$ g da amostra de acordo com as instruções contidas no Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1% e homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”. Essa é a diluição 10^{-1} .

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Inoculação em Placas

A partir da diluição inicial 10^{-1} , efetuar as diluições desejadas de acordo com o Anexo II, “Diluições e soluções”, deste Manual.

A partir das diluições escolhidas, semear alíquotas de 1 mL em placas estéreis e adicionar cerca de 15 mL de ágar TSC ou SFP em temperatura de $46 - 48^\circ\text{C}$.

Homogeneizar cuidadosamente e deixar solidificar em superfície plana.

Após, adicionar uma segunda camada de cerca de 10 mL do mesmo meio.

Deixar solidificar em superfície plana.

5.4 Incubação

Imediatamente após a solidificação do ágar, incubar as placas (sem inverter), em jarra de anaerobiose a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

5.5 Seleção e Isolamento

As colônias típicas de *Clostridium* sulfito redutores são negras e de tamanho variável de 1 a 3 mm no ágar TSC e no ágar SFP.

Selecionar placas que contenham entre 20 e 200 colônias típicas.

Contar todas as colônias negras presentes. Anotar o resultado.

Esse resultado, multiplicado pela diluição usada, corresponde ao número de *Clostridium* sulfito redutores presentes por grama da amostra em análise.

Escolher 5 colônias negras e repicar para tubos com ágar estoque. Incubar em anaerobiose a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por no mínimo 24 horas. Paralelamente, repicar para meio tioglicolato ou caldo de carne cozida (com selo estéril de vaspar ou vaselina ou parafina líquida ou óleo mineral).

5.6 Testes confirmativos para *Clostridium perfringens*

5.6.1 Coloração de Gram

A partir de cultura pura em ágar estoque ou dos meios usados paralelamente, preparar esfregaço e corar pelo método de Gram. Quando for verificada a presença de bastonetes retos com extremidades arredondadas, Gram-positivos, realizar a prova de fermentação tempestuosa.

5.6.2 Fermentação tempestuosa (storm test)

Transferir 1 mL da cultura fresca obtida no meio tioglicolato ou no caldo de carne cozida para um tubo contendo meio leite com ferro. Adicionar o selo estéril e incubar a $46 \pm 1^\circ\text{C}$ em banho-maria por 6 horas (reincubar por maior tempo (12 a 18 h) quando o controle positivo não apresentar reação claramente positiva).

Alternativamente, pode ser utilizada uma suspensão da cultura em teste, obtida pela lavagem da superfície do ágar estoque com solução salina peptonada 0,1%, transferindo 1 mL desta para o meio leite com ferro.

O *Clostridium perfringens* geralmente coagula o leite em até 6 horas a 46°C , com formação de coágulo firme e grande quantidade de gás (“fermentação tempestuosa”).

A partir das culturas que se apresentaram como *C.perfringens* na coloração de Gram e ofereceram resultado positivo na prova de fermentação tempestuosa, realizar as seguintes provas:

5.6.3 Prova da motilidade

Inocular a cultura, com agulha, em ágar motilidade-nitrato tamponado.

Incubar em anaerobiose a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

O *Clostridium perfringens* é imóvel, com crescimento apenas ao longo da linha de inoculação.

5.6.4 Prova da redução do nitrato

Após a leitura da motilidade, acrescentar ao ágar 0,5 a 1 mL de solução de alfa-naftilamina 0,5% e 0,5 a 1 mL de ácido sulfanílico 0,8%.

O aparecimento de coloração vermelha indicará a redução do nitrato a nitrito.

Para confirmação do resultado negativo, acrescentar alguns miligramas de pó de zinco.

O aparecimento de uma cor rosa será indicativo da não redução do nitrato, enquanto que a não alteração de cor será indicativa de reação positiva para redução do nitrato.

O *Clostridium perfringens* reduz nitrato a nitrito.

5.6.5 Fermentação da lactose e liquefação da gelatina

Inocular a cultura, com agulha, em vários pontos do meio lactose-gelatina.

Se o meio for utilizado 8 ou mais horas após a sua preparação, regenerá-lo por aquecimento a 50°C por 2 horas em banho-maria, antes da inoculação.

Incubar em anaerobiose a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por $44 \pm 2\text{h}$. Após a incubação, manter os tubos em geladeira por 1 hora.

Observar a fermentação da lactose pela produção de bolhas de gás e pela mudança da cor do meio de vermelho para amarelo e também a liquefação da gelatina por meio da permanência do estado líquido após o resfriamento por cerca de 1 hora em geladeira.

O *Clostridium perfringens* fermenta a lactose e liquefaz a gelatina em $44 \pm 2\text{h}$ a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.6.6 Fermentação da rafinose

Repicar a cultura para tubo contendo caldo para fermentação da rafinose.

Após inoculação, adicionar 1 a 2 mL de selo estéril: vaspar ou vaselina ou parafina líquida ou óleo mineral. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por $72 \pm 2\text{h}$.

Verificar a fermentação da rafinose pela viragem da cor do indicador vermelho de fenol para amarelo.

As provas de liquefação da gelatina em $44 \pm 2\text{h}$ horas e a fermentação da rafinose em $72 \pm 2\text{h}$ tornam possível a diferenciação entre *Clostridium perfringens* e outros clostrídios imóveis e redutores de nitrato como o *Clostridium celatum*, *Clostridium sardiniense* e *Clostridium paraperfringens*.

O *Clostridium perfringens* fermenta a rafinose dentro de $72 \pm 2\text{h}$.

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS DE CLOSTRÍDIOS

| | Meio motilidade nitrato | | Meio lactose-gelatina | |
|--------------------------------|-------------------------|---------|-----------------------|----------------------|
| | Motilidade | Nitrato | Ácido/ gás | Liquefação. gelatina |
| Espécies de <i>Clostridium</i> | | | | |
| <i>C. perfringens</i> A | - | + | AG/T | + (48h) |
| <i>C.perfringens</i> B | - | + | AG/T | + (48/72h) |
| <i>C. absoumum</i> | + | + | AG/CS | .* |
| <i>C. baratii</i> | - | + | AG/CS | - |
| <i>C. celatum</i> | - | + | AG/CS | - |
| <i>C. paraperfringens</i> | - | + | AG/CS | - |
| <i>C. sardiniense</i> | ± | (+) | AG/CS | .* |

A = ácido; AG = ácido e gás; T = turbidez; CS = claro com sedimento celular; + = positiva; - = negativa; (+) = fraco; ± = motilidade fraca; * = hidrólise lenta da gelatina

6. RESULTADOS

6.1 Cálculo do número de *Clostridium* sulfito redutores presentes na amostra:

Calcular o número de *Clostridium* sulfito redutores multiplicando o número de colônias negras contadas no ágar TSC ou no ágar SFP pelo fator de diluição usado, conforme recomendações constantes do Anexo IV, “Procedimentos para contagem de colônias”, deste Manual.

6.2 Cálculo do número de *Clostridium perfringens*

Considerar como *Clostridium perfringens* as colônias que se apresentarem, na coloração de Gram, como bastonetes Gram positivos, retos, com extremidades arredondadas, positivos para a prova de fermentação tempestuosa, imóveis, redutores de nitrato, fermentadores da lactose em $44 \pm 2\text{h}$, da rafinose em até $72 \pm 2\text{h}$ e capazes de hidrolizar a gelatina em $44 \pm 2\text{h}$.

A partir dos dados obtidos, calcular o número de microrganismos presentes, de acordo com o Anexo IV, “Procedimentos para a contagem de colônias”, deste Manual.

Expressar o resultado em UFC/g.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Clostridium perfringens*. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>

LABBE, R.G. *Clostridium perfringens*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.325-330.

MacFADDIN, J.F. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1985. 928p.

MacFADDIN, J.F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 2000. 912p.

CAPÍTULO V

CONTAGEM DE *Staphylococcus aureus*

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a contagem de *Staphylococcus aureus*.

Aplica-se a amostras de matérias-primas e alimentos.

Para os produtos destinados ao comércio no MERCOSUL, a contagem final se referirá apenas a *Staphylococcus* coagulase positiva.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Contagem

Baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras em ágar Baird-Parker, cuja composição evidencia a habilidade desse microrganismo de crescer na presença de 0,01 a 0,05% de telurito de potássio em combinação com 0,2 a 0,5 % de cloreto de lítio e 0,12 a 1,26% de glicina.

O *Staphylococcus aureus* reduz anaeróbia e aerobiamente o telurito de potássio, produzindo colônias negras.

O ágar Baird-Parker suplementado com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica do *Staphylococcus aureus*, por meio do aparecimento de um halo de transparência e um de precipitação ao redor da colônia, respectivamente.

2.2 Prova da coagulase

Baseia-se na comprovação da capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pelo microrganismo.

2.3 Provas complementares

2.3.1 Coloração de Gram

Baseia-se na verificação das características morfológicas e tintoriais do microrganismo.

2.3.2 Prova da termonuclease

Baseia-se na degradação do DNA em oligonucleotídeos pela ação da enzima DNase produzida pelo microrganismo.

A reação é evidenciada pelo aparecimento de um halo de coloração rósea no ágar azul de toluidina e de clarificação, quando utilizado o ágar para teste de DNase com verde de metila.

2.3.3 Prova da catalase

Baseia-se na capacidade da enzima catalase de decompor o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, o que é evidenciado por meio da formação de borbulhas.

2.4 Limitação do Método

A metodologia para contagem de *S. aureus*, no que se refere aos resultados da prova de coagulase, apresenta limitações quanto à especificidade, devido ao fato de que algumas espécies de *Staphylococcus* relacionadas a animais, como o *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* e *S. schleiferi ssp coagulans*, também serem coagulase positivas.

Cepas de *S. schleiferi ssp schleiferi* e algumas cepas de *S. lugdunensis* apresentam fraca reação na prova da coagulase. Além disso, o *S. schleiferi ssp schleiferi* apresenta reação de termonuclease positiva.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar Baird-Parker - base;

Ágar azul de toluidina - DNA ou Ágar para ensaio de DNA-se, com verde de metila;

Ágar estoque;

Caldo cérebro-coração (BHI);

Solução salina peptonada 0,1%;

Solução salina 0,85%;

Emulsão de gema de ovo a 50%;

Telurito de potássio 3,5%;

Plasma de coelho oxalatoado ou com EDTA;

Peróxido de hidrogênio 3%;

Etanol 70% ou Etanol 70° GL;

Reagentes para coloração de Gram.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Pesagem e preparo da amostra

Pesar $25 \pm 0,2\text{g}$ da amostra de acordo com as instruções contidas no Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%.

Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”.

Essa é a diluição 10^{-1} .

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Inoculação

A partir da diluição inicial 10^{-1} , efetuar as diluições desejadas de acordo com o Anexo II, “Diluições e soluções”, deste Manual.

Inocular, sobre a superfície seca do ágar Baird-Parker, 0,1 mL de cada diluição selecionada.

Com o auxílio de alça de Drigalski ou bastão do tipo “hockey”, espalhar o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção.

Utilizar no mínimo duas diluições decimais ou duplicata da mesma diluição.

Nos casos em que a legislação exigir valores menores que 100 UFC/g ou mL, distribuir em duplicata 1 mL da diluição 10^{-1} em 3 placas (0,4 mL, 0,3 mL e 0,3 mL). No caso de produtos líquidos poderá ser inoculado 0,1 mL diretamente da amostra (10^0), o que corresponderá à diluição 10^{-1} .

5.4 Incubação

Incubar as placas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 a 48 horas.

5.5 Leitura

Selecionar as placas que contenham entre 20 e 200 colônias.

Contar as colônias típicas (T): negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio.

Contar também colônias atípicas (A): acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos.

Registrar separadamente as contagens de colônias típicas e atípicas.

Selecionar 3 a 5 colônias de cada tipo (T) e/ou (A) e semear cada colônia em tubos contendo BHI, para confirmação.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas.

Observação: para a obtenção do número final de UFC/mL ou g, utilizar, de preferência, apenas uma diluição, pois, uma colônia atípica pode tornar-se típica na diluição subsequente em função da maior disponibilidade de nutrientes e pela menor competição bacteriana.

5.6 Prova da coagulase

Transferir 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 horas.

Verificar a presença de coágulos, considerando os critérios a seguir:

Reação negativa: não formação de coágulo;

Reação 1+ : coágulo pequeno e desorganizado;

Reação 2+ : coágulo pequeno e organizado;

Reação 3+ : coágulo grande e organizado;

Reação 4+: coagulação de todo o conteúdo do tubo, que não se desprenderá quando o tubo for invertido;

Quando a reação de coagulação for do tipo 3+ e 4+, considerar a prova positiva para *Staphylococcus aureus*;

Quando a reação de coagulação for negativa, considerar a prova negativa para *Staphylococcus aureus*.

Quando a reação for duvidosa do tipo 1+ e 2+, repicar do mesmo caldo de cultura para um tubo contendo ágar estoque ou outro contendo caldo BHI. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, para a realização dos testes complementares.

5.7 Testes complementares

A partir da cultura pura em BHI ou ágar estoque, realizar as seguintes provas confirmativas:

5.7.1 Coloração de Gram

Preparar esfregaço e corar pelo método de Gram.

A ausência de cocos Gram positivos indica teste negativo para *Staphylococcus aureus*. A presença de cocos Gram positivos indica a necessidade da realização de testes complementares.

5.7.2 Pesquisa de termonuclease

Fazer orifícios eqüidistantes com cerca de 2 mm de diâmetro no ágar para ensaio de termonuclease ou no ágar azul de toluidina - DNA, em placas previamente preparadas.

Colocar os tubos das culturas, mantidos em caldo BHI, em banho-maria fervente por 15 minutos.

Deixar esfriar e preencher completamente um orifício para cada cultivo a ser analisado.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 horas ou a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 horas.

O aparecimento, ao redor dos orifícios, de um halo rosa no ágar azul de toluidina ou de um halo de clarificação no agar para ensaio de DNase com verde de metila, será indicativo de reação positiva para termonuclease.

Considerar como positivas as culturas que apresentarem halo de diâmetro superior a 1 mm. O *Staphylococcus aureus* é termonuclease positiva.

5.7.3 Prova da catalase

Com auxílio de alça de platina, bastão de vidro, palito de madeira ou Pipeta de Pasteur, estéreis, retirar uma alíquota do cultivo em ágar estoque e transferir para uma lâmina ou placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%.

Misturar o inóculo ao peróxido e observar a reação.

A não formação de borbulhas indica prova negativa para catalase.

A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase.

O *Staphylococcus aureus* é catalase positiva.

6. RESULTADOS

Quando o número de colônias confirmadas for igual ao número de colônias selecionadas e repicadas, o resultado será igual à contagem inicial, levando-se em consideração a diluição utilizada. Quando o número de colônias confirmadas for diferente do número de colônias selecionadas e repicadas, calcular a proporção de colônias positivas de acordo com o Anexo IV, "Procedimentos para contagem de colônias", deste Manual.

O resultado final será a soma dos resultados de colônias típicas e atípicas confirmadas.

Expressar o resultado como:

Contagem de *Staphylococcus aureus*: X x 10^y UFC/ g ou mL

ou

Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva: X x 10^y UFC/ g ou mL.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: [http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de leite e produtos lácteos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento/ Secretaria de Defesa Animal/ Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal/ Divisão de Normas Técnicas. Brasília, D.F. Série Regulamentação Técnica de Identidade e Qualidade de Produtos de Origem Animal; n.2. 1997, 77p.

GUNN, B.A. Culture Media, Tests, and Reagents in Bacteriology. . In: Clinical and Pathogenic Microbiology, Howard, B.J.; Keiser, J.F.; Smith, T.F. *et al*(Eds.). 2 ed. Mosby. St. Louis, 1994, p. 863-912.

HOWARD. B. J.; KLOOS, W.E. *Staphylococci*. In: Clinical and Pathogenic Microbiology, Howard, B.J.; Keiser, J.F.; Smith, T.F. *et al* (Eds.). 2 ed. Mosby. St. Louis, 1994, p.243-256.

LANCETTE, G. A.; TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus* . In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.). 2001. P.387-403.

MAC FADDIN, J.F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A. 1980, p. 39-49 e 50-60.

MAC FADDIN, J.F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 2000. 912p.

PAHO. Organización Panamericana de la Salud. Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina y características socio-económicas de sus vendedores y consumidores. Almeida, C.R.; Schuch, D.M.T.; Gelli, D.S. et al. (Eds.). 1996, 176p.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. Disease Without Colonization; Food-Borne Toxinoses caused by *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium perfringens*. In: Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. Washington: ASM, 1994, p. 130-140.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. Foodborne Pathogens - An illustrated text. London: Wolf Publishing Ltd, 1991.p. 235-265.

CAPÍTULO VI CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM ALIMENTOS

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes em alimentos.

Aplica-se a amostras de matérias-primas, alimentos e rações, devendo ser utilizada quando o limite máximo tolerado for igual ou superior a 100 UFC/g ou mL.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Prova presuntiva

Baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras sob teste em ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA) e posterior contagem das colônias suspeitas.

O ágar cristal violeta vermelho neutro bile apresenta em sua composição sais biliares e cristal violeta, responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos e vermelho neutro, um indicador de pH que revela a fermentação da lactose pelos microrganismos presentes.

A adição de sobrecamada visa a prevenção do crescimento e do espraiamento de colônias na superfície do ágar.

2.2 Prova confirmativa para coliformes totais

A confirmação da presença de coliformes totais é feita por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo verde brilhante bile 2% lactose e posterior incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a fermentação da lactose presente no meio.

O caldo verde brilhante bile 2% lactose apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante) responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos.

2.3 Prova confirmativa para coliformes termotolerantes

A confirmação da presença de coliformes termotolerantes é feita por meio da inoculação das colônias suspeitas em caldo EC e posterior incubação em temperatura seletiva de $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$, em banho-maria com agitação ou circulação de água. A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a fermentação da lactose presente no meio.

O caldo EC apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante impedindo a sua acidificação. A seletividade é devido a presença de sais biliares responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidrarias e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA);

Caldo verde brilhante bile 2% lactose;

Caldo EC;

Solução salina peptonada 0,1%.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

Banho-maria com movimentação de água (agitação ou circulação).

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Pesagem e preparo da amostra

Pesar $25 \pm 0,2$ g ou pipetar $25 \pm 0,2$ mL da amostra de acordo com as instruções contidas no Anexo V, "Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras", deste Manual.

Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%.

Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em "stomacher".

Esta é a diluição 10^{-1} .

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Prova presuntiva

5.3.1 Inoculação

A partir da diluição inicial (10^{-1}), efetuar as demais diluições desejadas em solução salina peptonada 0,1% de acordo com as instruções contidas no Anexo II, "Diluições e soluções", deste Manual.

Inocular 1 mL de cada diluição desejada em placas de Petri esterilizadas.

Adicionar a cada placa cerca de 15 mL de VRBA previamente fundido e mantido a 46°C - 48°C em banho-maria.

Homogeneizar cuidadosamente e deixar em repouso até total solidificação do meio.

Adicionar, sobre cada placa, cerca de 10 mL de VRBA previamente fundido e mantido a 46°C - 48°C em banho-maria, formando uma segunda camada de meio. Deixar solidificar.

5.3.2 Incubação

Após completa solidificação do meio, incubar as placas em posição invertida em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

5.3.3 Leitura

Selecionar placas que contenham entre 15 e 150 colônias.

Contar as colônias que apresentarem morfologia típica de coliformes, ou seja, colônias róseas, com 0,5 a 2 mm de diâmetro rodeadas ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio. Anotar os resultados de contagem.

Contar separadamente colônias típicas e atípicas e submeter 3 a 5 colônias, de cada uma, às provas confirmativas.

5.4 Provas confirmativas

5.4.1 Coliformes totais

5.4.1.1 Inoculação

Inocular cada uma das colônias típicas e atípicas selecionadas em tubos contendo caldo verde brilhante bile 2% lactose.

5.4.1.2 Incubação

Incubar os tubos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas.

5.4.1.3 Leitura

A presença de coliformes totais é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham) ou efervescência quando agitado gentilmente.

Anotar o resultado obtido para cada colônia, bem como a diluição utilizada.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

5.4.2 Coliformes termotolerantes

5.4.2.1 Inoculação

Inocular as culturas suspeitas de coliformes termotolerantes em tubos contendo caldo EC.

5.4.2.2 Incubação

Incubar os tubos a $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$, por 24 a 48 horas em banho-maria com agitação.

5.4.2.3 Leitura

A presença de coliformes termotolerantes é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham) ou efervescência quando agitado gentilmente.

Anotar o resultado obtido para cada tubo, bem como a diluição utilizada.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

6. RESULTADOS

Para alimentos comercializados no MERCOSUL, os resultados de contagem de coliformes totais se referem à determinação "contagem de coliformes a 35°C " e os resultados da contagem de coliformes termotolerantes correspondem à determinação "coliformes a 45°C ".

Para o cálculo final das contagens de coliformes totais e termotolerantes, proceder de acordo com as indicações contidas no Anexo IV, "Procedimentos para contagem de colônias", deste Manual.

Expressar o resultado em UFC/g ou mL.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de leite e produtos lácteos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento/ Secretaria de Defesa Animal/ Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal/ Divisão de Normas Técnicas. Brasília, D.F. Série Regulamentação Técnica de Identidade e Qualidade de Produtos de Origem Animal; n.2. 1997, 77p.

ICMSF. Microorganismos de los Alimentos - Técnicas de Análisis Microbiológico. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. V.1. 2. ed. Acirbia, Zaragoza, Espanha.

HITCHINS, A.D.; FENG, P.; WATKINS W.D.; RIPPEY S.R.; CHANDLER L.A. *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: [http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov).

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p. 69-82.

CAPÍTULO VII

CONTAGEM DE *Bacillus cereus*

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a contagem de *Bacillus cereus*.

Aplica-se a matérias primas e alimentos.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Contagem

Baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras sob teste em ágar polimixina gema de ovo vermelho de fenol (MYP) ou em ágar cereus (PEMBA).

Em ambos é adicionada emulsão de gema de ovo que objetiva a verificação da produção de lecitinase pelo *B.cereus*.

No ágar PEMBA, a presença de 0,1% de peptona associada ao piruvato de sódio evidencia a precipitação da lecitina da gema do ovo adicionada ao meio.

A polimixina B é um agente seletivo utilizado nos dois meios, que atua sobre a flora acompanhante. No PEMBA, quando um grande número de leveduras é esperado no alimento, poderá ser adicionada também cicloheximide (40µg/mL) como agente seletivo.

Estes dois meios contêm manitol, carboidrato não fermentado pelo *B.cereus*. No MYP, o indicador de pH é o vermelho de fenol e no PEMBA, o azul de bromotimol.

2.2 Provas Bioquímicas

A identificação bioquímica de *Bacillus cereus* baseia-se na verificação de produção de â-hemolisina, motilidade em meio semi-sólido, na capacidade de decomposição da tirosina, redução do nitrato a nitrito, verificação do tipo de crescimento em superfície de ágar nutriente, e da não produção de corpúsculos de inclusão cristalina.

3. REAGENTES E MATERIAIS
Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;
Solução salina peptonada 0,1%;
Ágar nutriente;
Ágar manitol gema de ovo polimixina segundo Mossel (MYP) ou Ágar cereus (PEMBA);
Ágar estoque;
Ágar Columbia sangue de carneiro desfibrinado;
Ágar tirosina;
Ágar motilidade - nitrato;
Ácido sulfanílico solução 0,8%;
Alfa-naftilamina solução aquosa 0,5%;
Polimixina B - solução contendo 5.000 UI/mL;
Emulsão de gema de ovo 50%;
Sangue de carneiro desfibrinado;
Ácido acético 5N;
Zinco em Pó;
Reagentes para coloração de corpúsculos de inclusão cristalina;

Reagentes para coloração de Gram.
4. EQUIPAMENTOS
Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS
5.1 Pesagem e preparo da amostra
Pesar 25 ± 0,2 g ou pipetar 25 ± 0,2 mL da amostra de acordo com as instruções contidas no Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.
Adicionar 225 mL da solução salina peptonada 0,1%.

Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”.

Esta é a diluição 10⁻¹.
5.2 Procedimentos de controle
Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Inoculação
A partir da diluição inicial 10⁻¹, efetuar as diluições desejadas conforme o Anexo II, “Diluições e soluções”, deste Manual.

Inocular sobre a superfície seca do ágar MYP ou ágar PEMBA 0,1 mL de cada diluição selecionada.
Com auxílio de alça de Drigalski ou bastão tipo “hockey”, espalhar o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio até completa absorção.

Utilizar, no mínimo, duas diluições decimais ou duplicata da mesma diluição.
Nos casos em que for necessária a obtenção de resultado menor que 100 UFC/g ou mL distribuir 1 mL da diluição 10⁻¹ em 3 placas (0,4 mL, 0,3 mL e 0,3 mL).

No caso de amostras líquidas, poderá ser inoculado 0,1 mL diretamente da amostra.

5.4 Incubação
Incubar as placas invertidas a 30 ± 1°C por 30 a 48 horas.
5.5 Leitura
Selecionar as placas que contenham entre 15 e 150 colônias.

Contar as colônias rodeadas por um halo de precipitação opaco sobre um fundo róseo, no ágar MYP e azul turquesa com aspecto recortado, com cerca de 5 mm de diâmetro e rodeadas por halo de precipitação de lecitina hidrolizada, no ágar PEMBA.

Selecionar 3 a 5 colônias típicas e semeá-las em tubos com ágar estoque inclinado.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 horas.
De cada tubo, fazer esfregão e corar pelo método Gram para verificar a presença de bastonetes curtos Gram positivos, com extremidades quadradas dispostos em cadeias.

Os esporos são centrais ou sub-terminais.
Das culturas puras em ágar estoque inclinado, realizar as seguintes provas:

5.6 Identificação Bioquímica
5.6.1 Motilidade e redução de nitrato
Inocular, com agulha, tubos contendo ágar motilidade-nitrato.

Incubar a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.
Após incubação, verificar o tipo de crescimento presente.
Culturas imóveis mostram crescimento apenas na linha de inoculação, enquanto que as móveis crescem de forma difusa.
O *Bacillus cereus* em 50 a 90% dos casos mostra-se imóvel.

Após a leitura da motilidade, adicionar aos tubos 2 a 3 gotas de alfa naftilamina 0,5% e 2 a 3 gotas de ácido sulfanílico 0,8%. O aparecimento de coloração rosa indica positividade para redução de nitrato.

Quando não houver desenvolvimento de coloração, adicionar ao tubo alguns miligramas de pó de zinco. Nesta situação, o aparecimento de coloração rosa indica reação negativa, enquanto que o não desenvolvimento de cor indica positividade.

O *Bacillus cereus* reduz o nitrato a nitrito.
5.6.2 â-hemólise em ágar sangue de carneiro
Inocular por estria em placa com ágar sangue de carneiro.
Incubar a 36 ± 1°C por 24 horas. Observar a produção de â-hemólise característica do *Bacillus cereus*.
Bacillus cereus é produtor de â-hemólise.

5.6.3 Decomposição de tirosina
Inocular por estrias a superfície de ágar tirosina (inclinado em tubo ou distribuído em placas).
Incubar a 36 ± 1°C por 48 horas. Após incubação, observar o aparecimento de uma zona clara próxima ao crescimento produzida pela decomposição da tirosina.
Nos casos em que houver dúvidas, reincubar por até 7 dias a 36 ± 1°C.

O *Bacillus cereus* decompõe a tirosina.
5.6.4 Crescimento rizóide
Inocular com alça sobre a superfície seca de ágar nutriente, depositando o inóculo no ponto central da placa.

Incubar a 36 ± 1°C por 48 a 72 horas.
Após incubação verificar o tipo de crescimento.
Crescimento rizóide se caracteriza pelo aparecimento de colônias com longas extensões em forma de raízes ou longos fios, típicas de *Bacillus mycoides*.

O *Bacillus cereus* não apresenta crescimento rizóide, porém algumas cepas podem apresentar colônias rugosas em forma de galáxia.

5.6.5 Teste para verificação da presença de corpúsculos de inclusão cristalina

A partir das culturas suspeitas repicadas em ágar estoque inclinado (item 5.5) e deixadas em temperatura ambiente por 2 a 3 dias, verificar a presença de corpúsculos de inclusão cristalina procedendo conforme item 7 do Anexo VII, “Procedimentos de coloração”, deste Manual.

A presença de cristais tetragonais de toxina são abundantes em culturas velhas (3-4 dias) de *Bacillus thuringiensis*, que são liberados somente após a lise do esporângio. Verifica-se então a presença dos cristais e esporos livres.

O *Bacillus cereus* não produz corpúsculos de inclusão cristalina.

PROVAS DIFERENCIAIS PARA MICRORGANISMOS DO GÊNERO *Bacillus*

| | <i>Bacillus megaterium</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus mycoides</i> | <i>Bacillus anthracis</i> |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Coloração de Gram | + | + ^a | + | + | + |
| Catalase | + | + | + | + | + |
| Motilidade | ± | ± ^b | ± | - ^c | - |
| Redução de nitrato | - ^d | + | ± | + | + |
| Hemólise em sangue de carneiro | - | + | + | + | - ^d |
| Decomp. da tirosina | ± | + | + | ± | - ^d |
| Corpúsc.de inclusão cristalina | - | - | + | - | - |
| Crescimento rizóide | - | - | - | + | - |

a: 90 a 100% são positivos

b: 50 a 90% são positivos

c: 90 a 100% são negativos

d: a maioria é negativa

6.RESULTADOS

A partir dos dados obtidos, calcular o número de microrganismos presentes na amostra em análise seguindo as instruções contidas no Anexo IV, “Procedimentos para contagem de colônias”, deste Manual.

Calcular o número de *Bacillus cereus* multiplicando o número de colônias confirmadas, nas provas confirmativas, pelo fator de diluição usado, conforme recomendações constantes no Anexo III, “Procedimentos básicos de contagem”, deste Manual.

Expressar o resultado em UFC/g ou mL.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de leite e produtos lácteos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento/ Secretaria de Defesa Animal/ Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal/ Divisão de Normas Técnicas. Brasília, D.F. Série Regulamentação Técnica de Identidade e Qualidade de Produtos de Origem Animal; n.2. 1997, 77p.

BENNETT, R.W.and BEHY, N. . *Bacillus cereus* . In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.). 4.ed. Washington DC: American Public Health Association, 2001, p.311-316

MAC FADDIN, J.F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A. 1980, 275p.

RHODEHAMEL, E.J. and HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>.

CAPÍTULO VIII

CONTAGEM TOTAL DE ENTEROBACTÉRIAS

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a contagem de Enterobactérias.

Aplicar-se a amostras de produtos de origem animal.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Contagem

Baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras testadas em ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBG), cuja composição evidencia a habilidade dos microrganismos fermentarem a glicose com produção de ácido, reação indicada por uma viragem do indicador a vermelho e a precipitação de sais biliares ao redor das colônias.

A seletividade é exercida pela presença de cristal violeta e bile no meio.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;
Ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBG);
Ágar estoque;
Solução salina peptonada 0,1%;

Reativo para oxidase (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina ou oxalato de para-amino-dimetilanilina), ou tiras de papel para teste de oxidase;

Reativos para coloração de Gram.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos, obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Pesagem e preparo da amostra

Pesar 25 ± 0,2 g ou pipetar 25 ± 0,2 mL da amostra de acordo com as instruções contidas no Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

Adicionar 225 mL de solução salina 0,1%.

Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”.

Esta é a diluição 10⁻¹.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Inoculação

A partir da diluição inicial (10⁻¹), efetuar as demais diluições desejadas em solução salina peptonada 0,1% de acordo com as instruções contidas no Anexo II, “Diluições e soluções”, deste Manual.

Inocular 1 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas.

Adicionar a cada placa cerca de 15 mL de ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose previamente fundido e mantido a 46°C-48°C em banho-maria.

Homogeneizar cuidadosamente o inóculo com o meio e deixar em repouso até total solidificação. Após adicionar uma segunda camada com o mesmo meio e deixar solidificar.

5.4 Incubação

Após completa solidificação do meio, incubar as placas em posição invertida em temperatura de 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

5.5 Leitura

Selecionar placas que contenham entre 15 e 150 colônias.
Contar as colônias de coloração vermelha, rodeadas ou não por halo de precipitação da bile presente no meio, com 0,5 a 2 mm de diâmetro e anotar os resultados de contagem.

Selecionar 3 a 5 colônias típicas e repicar para tubos com ágar estoque inclinado.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 horas.

Realizar a prova da oxidase conforme o item 5.6.

5.6 Prova da oxidase

Usando alça de platina, Pipeta de Pasteur, palitos de madeira estéreis, ou de plástico descartáveis estéreis, realizar a prova da oxidase espalhando a cultura sobre papel filtro impregnado com o reativo para oxidase ou sobre tiras de papel com reativo para oxidase, comercialmente disponíveis.

Fazer a leitura em 10 a 20 segundos. Após este tempo, reações falso-positivas podem ocorrer.

O aparecimento de cor azul (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho intenso (oxalato de para-amino-dimetilanilina) é indicativo de reação positiva.

Não utilizar alças de níquel-cromo ou alças de aço inoxidável para realizar a prova da oxidase, pois traços de óxido de ferro na superfície flambada podem produzir reação falso-positiva.

Todas as enterobactérias apresentam reação de oxidase negativa.

5.7 Coloração de Gram

Das colônias oxidase negativas, preparar esfregão e corar pelo método de Gram, seguindo as instruções contidas no Anexo VII, “Procedimentos de coloração”, deste Manual.

Todas as enterobactérias apresentam-se como bastonetes Gram negativos.

6. RESULTADOS

A partir dos dados obtidos, calcular o número de microrganismos presentes de acordo com o Anexo IV, “Procedimentos para a contagem de colônias”, deste Manual.

Expressar o resultado em UFC/g ou mL

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL, V.R.; JANDA, W.M.; SOMMERS, H.M.; WINN, W.C. *Enterobacteriaceae*. In: Diagnóstico micro-biológico. Texto y Atlas Color. 3ed. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana. 1997, p.203-267.

MAC FADDIN, J.F. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A. 1980, 275 p.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. Foodborne Pathogens-An illustrated text. London: Wolf Publishing Ltd. 1991, 557p.

CAPÍTULO IX NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM ÁGUA E GELO

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e coliformes termotolerantes em amostras de água e gelo.

Aplica-se a amostras de água e de gelo usados em estabelecimentos produtores de alimentos.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Prova presuntiva

Baseia-se na inoculação da amostra em caldo lauril sulfato de sódio, em que a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durham, produzido pela fermentação da lactose contida no meio.

O caldo lauril sulfato de sódio apresenta, em sua composição, uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante, impedindo a sua acidificação. A seletividade do meio se deve à presença do lauril sulfato de sódio, um agente surfactante aniônico que atua na membrana citoplasmática de microrganismos Gram positivos, inibindo o seu crescimento.

2.2 Prova confirmativa para coliformes totais

A confirmação da presença de coliformes totais é feita por meio da inoculação dos tubos positivos para a fermentação de lactose, na prova presuntiva, em caldo verde brilhante bile 2% lactose, e posterior incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A presença de gás nos tubos de Durham do caldo verde brilhante evidencia a fermentação da lactose presente no meio.

O caldo verde brilhante bile 2% lactose apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifênilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição dos microrganismos Gram positivos.

2.3 Prova confirmativa para coliformes termotolerantes

A confirmação da presença de coliformes termotolerantes é feita por meio da inoculação em caldo EC, com incubação em temperatura seletiva de $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ a partir dos tubos positivos obtidos na prova presuntiva. A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a fermentação da lactose presente no meio.

O caldo EC apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante, impedindo a sua acidificação. A seletividade do meio se deve à presença de sais biliares, responsáveis pela inibição dos microrganismos Gram positivos.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Caldo lauril sulfato de sódio concentração simples;

Caldo lauril sulfato de sódio concentração dupla;

Caldo verde brilhante bile 2% lactose;

Caldo EC;

Solução salina peptonada 0,1%.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

Banho-maria com movimentação de água (agitação ou circulação).

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Preparo da amostra

Preparar a amostra de água de acordo com as instruções contidas no Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

No caso de amostras de gelo, quando encaminhadas em frascos de boca larga, deixar descongelar no próprio frasco, sob refrigeração, pelo período necessário para seu completo descongelamento. Antes do início da análise, homogeneizar bem.

Quando o gelo for encaminhado em sacos plásticos, colocar a amostra dentro de outro saco plástico resistente (sem perfurações) e deixar descongelar, sob refrigeração, pelo período necessário para seu completo descongelamento.

Após descongelamento total, verificar a presença de água no saco plástico de proteção da amostra, o que indica a presença de perfurações na embalagem do gelo. Nesse caso, não analisar a amostra.

Da mesma forma, as amostras de gelo que chegarem descongeladas ou em descongelamento deverão ser descartadas.

Quando a embalagem da amostra de gelo mostrar evidências de que não continha perfurações, após o descongelamento total, homogeneizar bem e proceder à análise, seguindo o procedimento estabelecido para amostras de água.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Prova presuntiva

5.3.1 Inoculação

Inocular volumes de 10 mL da amostra a ser analisada em uma série de 3 tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio em concentração dupla.

Inocular volumes de 1 mL da amostra na segunda série de 3 tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio em concentração simples e volumes de 1 mL da diluição 10^{-1} na terceira série de 3 tubos contendo o mesmo meio.

Observação: caso seja necessário um maior número de diluições, proceder de acordo com as instruções contidas no Anexo II, “Diluições e soluções”, deste Manual. Neste caso, inocular volumes de 1 mL de cada uma das diluições efetuadas em séries de 3 tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio em concentração simples.

Quando o limite de aceitação for $<2,0/100\text{mL}$, usar séries de 5 tubos.

Quando o limite de aceitação for $<1,0/100\text{mL}$, usar séries de 10 tubos.

5.3.2 Incubação

Incubar os tubos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas.

5.3.3 Leitura

A suspeita de coliformes totais é indicada pela formação de gás nos tubos de Durham (mínimo 1/10 do volume total) ou eferescência quando agitado gentilmente.

Anotar o número de tubos positivos em cada série de diluição.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

5.4 Prova confirmativa

5.4.1 Coliformes Totais

5.4.1.1 Inoculação

Repicar cada tubo positivo de caldo lauril sulfato de sódio obtido na prova presuntiva, para tubo contendo caldo verde brilhante bile 2% lactose.

5.4.1.2 Incubação

Incubar os tubos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas.

5.4.1.3 Leitura

A presença de coliformes totais é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham) ou eferescência quando agitado gentilmente.

Anotar o número de tubos positivos em cada série de diluição.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

5.4.2 Coliformes termotolerantes

5.4.2.1 Inoculação

Repicar cada tubo positivo de caldo lauril sulfato de sódio obtido na prova presuntiva, para tubo contendo caldo EC.

5.4.2.2 Incubação

Incubar os tubos a $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$, por 24 a 48 horas em banho-maria com agitação ou circulação de água.

5.4.2.3 Leitura

A presença de coliformes termotolerantes é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham) ou eferescência quando agitado gentilmente.

Anotar o resultado obtido para cada tubo, bem como a diluição utilizada.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

6. RESULTADOS

A partir da combinação de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultado positivo em cada um dos testes confirmativos (coliformes totais e coliformes termotolerantes), verificar o Número Mais Provável de acordo com o Anexo III, “Procedimentos básicos de contagem”, deste Manual.

Certificar-se que a tabela de NMP usada é a indicada para o caso específico.

Expressar o valor obtido em NMP/100 mL.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20 ed. Washington DC. Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E.; Eaton, A.D.; Franson, M.A.H. (Ed.), 1998. p. 9.47-9.55.

HITCHINS, A.D.; FENG, P.; WATKINS W.D.; RIPPEY S.R.; CHANDLER L.A. *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p. 69-82.

CAPÍTULO X NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM ALIMENTOS

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes em alimentos.

Aplica-se a amostras de matérias-primas e alimentos, devendo ser utilizada quando o limite máximo tolerado for inferior a 100 UFC/g ou mL.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Prova presuntiva

Baseia-se na inoculação da amostra em caldo lauril sulfato de sódio, em que a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durham, produzido pela fermentação da lactose contida no meio.

O caldo lauril sulfato de sódio apresenta, em sua composição, uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante, impedindo a sua acidificação. A seletividade do meio se deve à presença do lauril sulfato de sódio, um agente surfactante aniônico que atua na membrana citoplasmática de microrganismos Gram positivos, inibindo o seu crescimento.

2.2 Prova confirmativa para coliformes totais

A confirmação da presença de coliformes totais é feita por meio da inoculação dos tubos positivos para a fermentação de lactose em caldo verde brilhante bile lactose 2% e posterior incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A presença de gás nos tubos de Durham do caldo verde brilhante evidencia a fermentação da lactose presente no meio.

O caldo verde brilhante bile lactose 2% apresenta, em sua composição, bile bovina e um corante derivado do trifênilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição dos microrganismos Gram positivos.

2.3 Prova confirmativa para coliformes termotolerantes

A confirmação da presença de coliformes termotolerantes é feita por meio da inoculação em caldo EC, com incubação em temperatura seletiva de $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ a partir dos tubos positivos obtidos na prova presuntiva. A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a fermentação da lactose presente no meio.

O caldo EC apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante, impedindo a sua acidificação. A seletividade do meio se deve à presença de sais biliares, responsáveis pela inibição dos microrganismos Gram positivos.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Caldo lauril sulfato de sódio concentração simples;

Caldo lauril sulfato de sódio concentração dupla;

Caldo verde brilhante bile lactose 2%;

Caldo EC;

Solução salina peptonada 0,1%.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

Banho-maria com movimentação de água (agitação ou circulação)

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Pesagem e preparo da amostra

5.1.1 Produtos sólidos e pastosos

Pesar $25 \pm 0,2$ g ou pipetar $25 \pm 0,2$ mL da amostra de acordo com as instruções contidas no Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%.

Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”. Esta é a diluição 10^{-1} .

5.1.2 Produtos líquidos

Preparar as amostras de acordo com as instruções contidas no Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Prova presuntiva

5.3.1 Inoculação

5.3.1.1 Produtos sólidos, pastosos e creme de leite pasteurizado

A partir da diluição inicial (10^{-1}), inocular volumes de 10 mL em série de 3 tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio em concentração dupla (corresponde à diluição 10^0).

A seguir, inocular volumes de 1 mL da diluição inicial (10^{-1}) em uma série de 3 tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio em concentração simples.

A partir da diluição 10^{-1} , preparar a diluição 10^{-2} em solução salina peptonada 0,1% de acordo com as instruções contidas no Anexo II, “Diluições e soluções”, deste Manual.

Inocular 1 mL da diluição 10^{-2} na terceira série de 3 tubos.

Havendo necessidade, outras diluições decimais podem ser inoculadas em séries de 3 tubos.

5.3.1.2 Produtos líquidos

Diretamente da amostra (10^0), inocular volumes de 1 mL em uma série de 3 tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio em concentração simples.

Transferir também 1 mL da amostra para tubo contendo solução salina peptonada 0,1% de forma a obter a diluição 10^{-1} .

A partir da diluição 10^{-1} , efetuar as demais diluições desejadas em solução salina peptonada 0,1% de acordo com as instruções contidas no Anexo II, “Diluições e soluções”, deste Manual.

A seguir, inocular volumes de 1 mL da diluição 10^{-1} na segunda série de 3 tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio em concentração simples.

Inocular 1 mL da diluição 10^{-2} na terceira série de 3 tubos.

Havendo necessidade, outras diluições decimais poderão ser inoculadas em séries de 3 tubos.

5.3.2 Incubação

Incubar os tubos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas.

5.3.3 Leitura

A suspeita de coliformes totais é indicada pela formação de gás nos tubos de Durham (mínimo 1/10 do volume total) ou eferescência quando agitado gentilmente.

Anotar o número de tubos positivos em cada série de diluição.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

5.4 Prova confirmativa

5.4.1 Coliformes Totais

5.4.1.1 Inoculação

Repicar cada tubo positivo de caldo lauril sulfato de sódio obtido na prova presuntiva, para tubo contendo caldo verde brilhante bile 2% lactose.

5.4.1.2 Incubação

Incubar os tubos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas.

5.4.1.3 Leitura

A presença de coliformes totais é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham) ou eferescência quando agitado gentilmente.

Anotar o número de tubos positivos em cada série de diluição.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

5.4.2 Coliformes Termotolerantes

5.4.2.1 Inoculação

Repicar cada tubo positivo de caldo lauril sulfato de sódio, obtido na prova presuntiva, para tubo contendo caldo EC.

5.4.2.2 Incubação

Incubar os tubos a $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$, por 24 a 48 horas em banho-maria com agitação ou circulação de água.

5.4.2.3 Leitura

A presença de coliformes termotolerantes é confirmada pela formação de gás (mínimo 1/10 do volume total do tubo de Durham) ou eferescência quando agitado gentilmente.

Anotar o resultado obtido para cada tubo, bem como a diluição utilizada.

Observação: A leitura pode ser feita após 24 horas de incubação, porém, só serão válidos os resultados positivos. Os tubos que apresentarem resultado negativo deverão ser reincubados por mais 24 horas.

6. RESULTADOS

A partir da combinação de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultado positivo em cada um dos testes confirmativos (coliformes totais e coliformes termotolerantes), verificar o Número Mais Provável de acordo com o Anexo III, "Procedimentos básicos de contagem", deste Manual.

Certificar-se que a tabela de NMP usada é a indicada para o caso específico.

Expressar o valor obtido em NMP/g ou mL.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

HITCHINS, A.D.; FENG, P.; WATKINS W.D.; RIPPEY S.R.; CHANDLER L.A. *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p. 69-82.

CAPÍTULO XI

NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE *Staphylococcus aureus*

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a determinação do NMP de *Staphylococcus aureus* em alimentos.

Aplica-se a amostras de alimentos em que os limites de aceitação determinados pela legislação encontram-se abaixo de 100 UFC/g ou mL.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Determinação do NMP

Baseia-se na inoculação das diluições desejadas das amostras sob teste em caldo telurito manitol glicina, segundo Giolitti e Cantoni ou Caldo soja triptona com sal 10% - piruvato de sódio 1% (TSB-NP), com posterior confirmação em ágar Baird-Parker.

No caldo TSB-NP, a alta concentração de NaCl (10%) atua seletivamente, inibindo o crescimento de microbiota acompanhante que não apresente capacidade de se desenvolver nesta condição.

O *Staphylococcus aureus* reduz, anaeróbia e aerobiamente, o telurito de potássio, produzindo escurecimento do caldo Giolitti e Cantoni, bem como colônias negras no ágar Baird-Parker.

O ágar Baird-Parker, enriquecido com solução de gema de ovo, possibilita a evidência das atividades proteolítica e lipolítica do *Staphylococcus aureus*, respectivamente, por meio do aparecimento de um halo de precipitação e um de transparência ao redor da colônia.

Prova da coagulase

Baseia-se na comprovação da capacidade do microrganismo de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase.

2.3 Provas complementares

2.3.1 Coloração de Gram

Baseia-se na verificação das características morfológicas e tintoriais do microrganismo.

2.3.2 Prova da termonuclease

Baseia-se na degradação do DNA em oligonucleotídeos pela ação da enzima DNase produzida pelo microrganismo.

A reação é evidenciada pelo aparecimento de um halo de coloração rósea no ágar azul de toluidina e de clarificação, quando utilizado o ágar para teste de DNase com verde de metila.

2.3.3 Prova da catalase

Baseia-se na capacidade da enzima catalase de decompor o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, o que é evidenciado por meio da formação de borbulhas.

2.4 Limitações do Método

A metodologia para contagem de *S. aureus*, no que se refere aos resultados da prova de coagulase, apresenta limitações quanto à especificidade, devido ao fato de algumas espécies de *Staphylococcus* relacionadas a animais, como o *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* e *S. schleiferi ssp coagulans*, também serem coagulase positivas.

Cepas de *S. schleiferi ssp schleiferi* e algumas cepas de *S. lugdunensis* apresentam fraca reação na prova da coagulase. Além disto, o *S. schleiferi ssp schleiferi* apresenta reação de termonuclease positiva.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar Baird-Parker-base;

Ágar azul de toluidina - DNA ou Ágar para ensaio de DNA-verde de metila;

Ágar estoque;

Caldo soja triptona sal 10%-piruvato de sódio 1% (TSB-NP) ou Caldo telurito manitol glicina segundo; Giolitti e Cantoni (GC);

Caldo cérebro-coração (BHI);

Solução salina peptonada 0,1%;

Solução salina 0,85%;

Solução de azul de toluidina 1%;

Emulsão de gema de ovo a 50%;

Telurito de potássio 3,5%;

Plasma de coelho oxalatoado ou com EDTA;

Peróxido de hidrogênio 3%;

Etanol 70% ou Etanol 70° GL;

Reagentes para coloração de Grâm.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Pesagem e preparo da amostra

5.1.1 Alimentos sólidos

Pesar $25 \pm 0,2$ g da amostra de acordo com as instruções contidas no Anexo V, "Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras", deste Manual.

Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%.

Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos no "stomacher".

Esta é a diluição 10^{-1} .

A partir da diluição inicial 10^{-1} , efetuar as diluições desejadas de acordo com o Anexo II, "Diluições e soluções", deste Manual.

Inocular 1 mL de cada diluição selecionada em três séries de três tubos contendo caldo telurito manitol glicina (GC) ou caldo TSB-NP.

Adicionar a cada tubo de caldo GC uma camada de 1 a 2 mL de selo estéril (vaspar, vaselina, óleo mineral ou parafina líquida, estéreis e previamente fundidos).

5.1.2 Alimentos líquidos

Pipetar 1 mL diretamente da amostra e transferir para cada três tubos contendo caldo GC ou caldo TSB-NP.

Transferir também 1 mL da amostra para um tubo contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}).

A partir da diluição inicial 10^{-1} , efetuar as diluições desejadas de acordo com o Anexo II, "Diluições e soluções", deste Manual.

Inocular 1 mL das duas diluições subsequentes em séries de três tubos com caldo GC ou caldo TSB-NP.

Adicionar uma camada de 1 a 2 mL de selo estéril (vaspar, vaselina, óleo mineral ou parafina líquida, estéreis e previamente fundidos) a cada tubo de caldo GC.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Incubação

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

5.4 Leitura

Fazer a leitura anotando os tubos que apresentarem escurecimento do meio ou precipitado negro em caldo GC e turvação em caldo TSB-NP.

5.5 Provas confirmatórias

Com pipetas de Pasteur estéreis, retirar do fundo de cada tubo de caldo GC positivo uma gota da cultura e colocá-la sobre a superfície seca de ágar Baird-Parker, junto à borda da placa, estriando posteriormente com alça, de forma a obter colônias isoladas.

A partir dos tubos de caldo TSB-NP que apresentarem turvação, com auxílio de alça de platina ou níquel-cromo, repicar sobre a superfície seca de ágar Baird-Parker.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 a 48 horas.

Selecionar de 2 a 3 colônias negras, brilhantes, comanel opaco de precipitação e/ou rodeadas por halo transparente, correspondentes a cada um dos tubos positivos e repicar cada colônia para um tubo contendo caldo BHI.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

A partir das culturas em BHI, efetuar a prova da coagulase.

5.5.1 Prova da coagulase

Transferir 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos contendo 0,3 mL de plasma de coelho.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 6 horas.

Verificar a presença de coágulos, considerando os critérios a seguir:

Reação negativa: não formação de coágulo;

Reação 1+ : coágulo pequeno e desorganizado;

Reação 2+ : coágulo pequeno e organizado;

Reação 3+ : coágulo grande e organizado;

Reação 4+: coagulação de todo o conteúdo do tubo que não se desprenderá quando o tubo for invertido;

Quando a reação de coagulação for do tipo 3+ e 4+, considerar a prova positiva para *Staphylococcus aureus*;

Quando a reação de coagulação for negativa, considerar a prova negativa para *Staphylococcus aureus*;

Quando a reação for duvidosa do tipo 1+ e 2+, repicar do mesmo caldo de cultura para um tubo contendo ágar estoque ou caldo BHI. Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para a realização dos testes complementares.

5.6 Testes complementares

A partir da cultura pura em caldo BHI ou ágar estoque, realizar as seguintes provas confirmativas:

5.6.1 Coloração de Gram

Preparar esfregaço e corar pelo método de Gram.

A ausência de cocos Gram positivos indica teste negativo para *Staphylococcus aureus*. A presença de cocos Gram positivos indica a necessidade da realização de testes complementares.

5.6.2 Pesquisa da termonuclease

Fazer orifícios equidistantes, com cerca de 2 mm de diâmetro, no ágar para ensaio da termonuclease ou no ágar azul de toluidina - DNA, em placas previamente preparadas.

Colocar os tubos das culturas mantidas em caldo BHI em banho-maria fervente por 15 minutos. Deixar esfriar e preencher completamente um orifício para cada cultivo a ser analisado.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 horas ou a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 horas.

O aparecimento de um halo rosa no ágar azul de toluidina ou de um halo de clarificação no ágar para ensaio de DNase com verde de metila, será indicativo de reação positiva para termonuclease.

Considerar como positivas as culturas que apresentarem halo de diâmetro superior a 1 mm. O *Staphylococcus aureus* é termonuclease positiva.

5.6.3 Prova da catalase

Com auxílio de alça de platina, bastão de vidro, palito de madeira ou pipeta de Pasteur, estéreis, retirar uma alíquota do cultivo em ágar estoque e transferir para uma lâmina ou placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%.

Misturar o inóculo ao peróxido e observar a reação.

A não formação de borbulhas indica prova negativa para catalase.

A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase.

O *Staphylococcus aureus* é catalase positiva.

6. RESULTADOS

A partir da combinação de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultado positivo em cada um dos testes confirmativos, verificar o Número Mais Provável de acordo com o Anexo III, "Procedimentos básicos de contagem", deste Manual.

Certificar-se de que a tabela de NMP em uso é a indicada para cada caso específico.

Expressar o valor obtido em NMP/g ou mL.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AOAC Official Method 987.09 *Staphylococcus aureus* in Foods: most probable number method for isolation and enumeration In: Microbiological Methods. 17 ed., AOAC, Andrews, W.H. (Ed.), cap. 17.5.01, 1998.

BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de leite e produtos lácteos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento/ Secretaria de Defesa Animal/ Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal/ Divisão de Normas Técnicas. Brasília, D.F. Série regulamentação técnica de identidade e qualidade de produtos de origem animal; n.2. 1997, 77p.

GUNN, B.A. Culture Media, Tests, and Reagents in Bacteriology. In: Clinical and Pathogenic Microbiology, Howard, B.J.; Keiser, J.F.; Smith, T.F. *et all*(Eds.). 2 ed. Mosby. St. Louis, 1994, p. 863-912.

HOWARD, B. J.; KLOOS, W.E. *Staphylococci*. In: Clinical and Pathogenic Microbiology, Howard, B.J.; Keiser, J.F.; Smith, T.F. *et all* (Eds.). 2 ed. Mosby. St. Louis, 1994, p.243-256.

LANCETTE, G. A.; TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. P.387-403.

MAC FADDIN, J.F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A. 1980, p. 39-49 e 50-60.

MAC FADDIN, J.F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 2000. 912p.

CAPÍTULO XII

NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE *Vibrio parahaemolyticus*

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a determinação do número mais provável de *Vibrio parahaemolyticus*.

Aplica-se a amostras de pescado e derivados.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Provas presuntivas

2.1.1 Enriquecimento em caldo seletivo

Inoculação em meio de cultura de enriquecimento seletivo: caldo glicose sal Teepol (GSTB) ou caldo Horie arabinose violeta de etila (HAEB), em que a presença de *Vibrio parahaemolyticus* é evidenciada pela turvação do meio após a incubação.

Em sua composição, o meio GSTB apresenta teepol, solução aquosa de sulfatos de sódio alcalinos primários que atuam na membrana citoplasmática de microrganismos Gram positivos, inibindo o seu crescimento e formalina que funciona como um agente antimicrobiano.

Como o *Vibrio parahaemolyticus* é halófilo obrigatório, os dois meios contêm 3% de cloreto de sódio.

2.1.2 Isolamento em ágar tiosulfato citrato sacarose sais biliares (TCBS)

Isolamento se realiza em ágar TCBS, meio seletivo altamente alcalino que contém elevada concentração de tiosulfato e citrato de sódio, responsáveis pela inibição do crescimento das enterobactérias presentes.

A bile e o colato de sódio inibem os enterococos. Como indicador de pH, o meio possui o azul de timol e o azul de bromotimol que alteram a cor do meio para amarelo quando da formação de ácido pelos microrganismos que fermentam a sacarose contida no meio.

2.2 Provas de identificação

A identificação de *Vibrio parahaemolyticus* é feita por meio de provas bioquímicas, sorológicas, morfológicas e tintoriais.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar Müeller-Hinton sal 3%;

Ágar nutriente sal 3%;

Ágar gelatina sal 3%;

Ágar soja triptonal sal 3%;

Ágar tiosulfato citrato sacarose sais biliares (TCBS);

Ágar ferro três açúcares (TSI) sal 3% ou Ágar Kligler sal

3%;

Ágar motilidade sal 3%;

Caldo glicose sal teepol (GSTB) ou Caldo Horie arabinose

violeta de etila (HAEB);

Caldo peptonado sem sal;

Caldo peptonado sal 3%;

Caldo peptonado sal 6%;

Caldo peptonado sal 8%;

Caldo peptonado sal 10%;

Caldo ONPG sal 3%;

Caldo vermelho de fenol manitol sal 3%;

Caldo vermelho de fenol sacarose sal 3%;

Caldo vermelho de fenol arabinose sal 3%;

Caldo vermelho de fenol arginina sal 3%;

Caldo vermelho de fenol lisina sal 3%;

Meio O/F (Hugh-Leifson) sal 3%;

Solução salina peptonada 0,1% sal 3%;

Solução fisiológica (NaCl 0,85%);

Agente vibriostático O 129 10µg ;

Agente vibriostático O 129 150 µg;

Arabinose;

L-arginina;

L-lisina;

Manitol;

Sacarose;

Óleo mineral ou parafina líquida estéreis;

Reativo para Oxidase (oxalato de para-amino-dimetilanilina ou N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina);

Teepol;

O-nitrofenil-â-D-galactopiranosídeo ou p-nitrofenil-â-D-galactosídeo;

Etanol 96%;

Reagentes para coloração de Gram.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Preparo e Pesagem

Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

Pesar 50g da amostra. Adicionar 450 mL de Caldo peptonado sal 3%.

Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”.

Esta é a diluição 10⁻¹.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Provas presuntivas

5.3.1 Inoculação em caldo de enriquecimento seletivo

A partir da diluição inicial (10⁻¹), efetuar as demais diluições desejadas em Caldo peptonado sal 3% (no mínimo mais duas diluições) de acordo com as instruções contidas no Anexo II, “Diluições e soluções”, deste Manual.

Inocular volumes de 1 mL de cada uma das diluições desejadas em séries de 3 tubos contendo GSTB ou caldo HAEB.

5.3.2 Incubação

Incubar os tubos a 36 ± 1°C por 18 horas a 24 horas.

5.3.3 Leitura

A presença de turvação do meio indica a suspeita da presença de *Vibrio parahaemolyticus*.

Anotar o número de tubos de cada série que apresentaram turvação.

5.3.4 Isolamento em ágar tiosulfato citrato sais biliares (TCBS)

5.3.4.1 Inoculação

A partir de cada tubo de GSTB ou HAEB que apresentar turvação, sem agitar-lo e com auxílio de uma alça de níquel-cromo, de platina ou descartável estéril, retirar uma alçada do crescimento da superfície e estríá-la sobre a superfície seca de ágar tiosulfato citrato sacarose sais biliares (TCBS).

5.3.4.2 Incubação

Incubar as placas em posição invertida a 36 ± 1°C por 24 horas.

5.3.4.3 Leitura

Verificar o aparecimento de colônias arredondadas, opacas, de cor azul esverdeada, com 2 a 3 mm de diâmetro, típicas de *Vibrio parahaemolyticus*.

Quando não houver colônias suspeitas, o resultado será negativo para o tubo de origem.

5.4 Provas preliminares para identificação de *Vibrio parahaemolyticus*

De cada placa, selecionar de 2 a 3 colônias típicas e transferi-las simultaneamente para tubos contendo caldo peptonado sal 3% e ágar nutriente sal 3% inclinado.

Incubar a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

5.4.1 Coloração de Gram

A partir do cultivo mantido em ágar nutriente sal 3%, proceder à coloração de Gram de acordo com as instruções descritas no Anexo VII, “Procedimentos de coloração”, deste manual.

O *Vibrio parahaemolyticus* se apresenta como bastonetes retos ou curvos Gram negativos. Em culturas antigas, pode se apresentar em forma de cocobacilos.

5.4.2 Crescimento com 8% de sal e sem sal

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, transferir, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, uma alçada para um tubo contendo caldo peptonado sem sal e caldo peptonado sal 8%.

Incubar os tubos a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, verificar a presença de turvação indicativa da ocorrência de crescimento.

O *Vibrio parahaemolyticus* não cresce no meio sem sal e cresce no meio com 8% de sal.

5.4.3 Prova da oxidase

A partir do cultivo mantido em ágar nutriente sal 3%, usando palitos de madeira, de plástico descartáveis, pipetas Pasteur, ou alça de platina, realizar a prova de oxidase espalhando a cultura sobre papel filtro impregnado com o reativo para oxidase ou sobre tiras de papel para teste de oxidase, comercialmente disponíveis.

Fazer a leitura em 10 a 20 segundos. Após este tempo, podem ocorrer reações falso-positivas.

O aparecimento de cor azul (quando é usado o reativo N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou de cor vermelha intensa (quando o reativo usado é o oxalato de para-amino-dimetilanilina) é indicativo de reação positiva.

OBS.: Não utilizar alças de níquel-cromo ou alças de aço para realizar a prova de oxidase, pois traços de óxido de ferro na superfície flambada podem produzir reação falso-positiva.

O *Vibrio parahaemolyticus* é oxidase positiva

5.4.4 Caldo vermelho de fenol sacarose sal 3%

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, inocular, com auxílio de alça de níquel-cromo, um tubo contendo caldo vermelho de fenol sacarose sal 3%.

Cobrir o meio com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéreis.

Incubar a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração do meio, de vermelho para amarelo, devido à fermentação da sacarose e produção de ácido.

O *Vibrio parahaemolyticus* não altera a coloração do meio pois não é capaz de fermentar a sacarose.

5.4.5 Ágar ferro três açúcares sal 3% (TSI) ou Ágar Kligler ferro sal 3%

A partir do cultivo mantido no ágar nutriente sal 3% inclinado, com auxílio de agulha de platina ou níquel-cromo, inocular, mediante picada central em toda a profundidade do ágar e estriando a superfície inclinada, tubos com ágar TSI sal 3% ou ágar Kligler ferro sal 3%. Incubar a 36 ± 1°C por 24 horas.

O *Vibrio parahaemolyticus* apresenta base ácida (amarela), sem gás, sem produção de H₂S e bisel alcalino (vermelho).

5.4.6 Teste ONPG

A partir da cultura em TSI, inocular uma alçada espessa em tubo contendo 0,5 mL de caldo ONPG sal 3%.

Incubar em banho-maria a 36 ± 1°C, durante 2 horas. Examinar os tubos, verificando o aparecimento ou não de cor amarela, indicativa de reação positiva. Se o caldo permanecer incolor, a reação é negativa.

O *Vibrio parahaemolyticus* é ONPG negativo.

5.5 Provas adicionais para identificação de *Vibrio parahaemolyticus*

As colônias que apresentarem comportamento compatível com *Vparahaemolyticus* nas provas preliminares, deverão ser submetidas às provas adicionais, conforme descrito em 5.5.1 a 5.5.9.

5.5.1 Teste do crescimento a 42°C

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo caldo peptonado sal 3%.

Incubar a 42 ± 1°C por 24 horas.

Após o período de incubação, observar a presença de turvação dos meios.

O *vibrio parahaemolyticus* cresce à temperatura de 42°C.

5.5.2 Ágar gelatina sal 3%

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular uma placa de Petri contendo ágar gelatina sal 3% (cada placa pode ser dividida em até 6 setores e cada cultivo pode ser inoculado no centro de cada setor).

Incubar as placas a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

Colocar as placas em refrigeração por alguns minutos antes de realizar a leitura, o que facilita a visualização do halo.

O aparecimento de um halo opaco ao redor do crescimento indica a presença da gelatinase.

O *Vibrio parahaemolyticus* é gelatinase positiva.

5.5.3 Teste da motilidade

A partir da cultura mantida no ágar nutriente sal 3% inclinado, com auxílio de agulha de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, através de picada central, inocular um tubo contendo ágar motilidade sal 3%.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 horas.

Um crescimento bacteriano difuso ao redor da picada caracteriza motilidade positiva.

O *Vibrio parahaemolyticus* apresenta motilidade positiva.

5.5.4 Prova de Hugh-Leifson glicose (OF)

A partir do cultivo mantido em ágar nutriente sal 3% , inocular, com auxílio de agulha de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, dois tubos contendo meio OF glicose (Hugh-Leifson) sal 3%.

Cobrir um dos tubos com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril.

Incubar a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, verificar a viragem de cor dos meios de verde para amarelo e a presença de bolhas de gás nos meios.

A cor amarela nos dois tubos significa fermentação da glicose. A presença de cor amarela somente no tubo sem óleo mineral significa utilização oxidativa da glicose.

O *Vibrio parahaemolyticus* fermenta a glicose sem produção de gás, ou seja, os dois tubos devem apresentar coloração amarela.

5.5.5 Descarboxilação da lisina

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo Caldo vermelho de fenol lisina sal 3%.

Inocular também um tubo contendo meio base (sem adição do aminoácido) que servirá de controle.

Cobrir os tubos com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril.

Incubar a 36 ± 1°C por, no máximo, 4 dias, juntamente com um tubo de Caldo vermelho de fenol lisina sal 3% não inoculado, que servirá de controle negativo.

Examinar os tubos todos os dias.

Durante o período de incubação, a cor do meio passa para amarela devido à fermentação da glicose, e, ocorrendo a descarboxilação da lisina, o meio retorna à cor púrpura devido à produção de aminas primárias e dióxido de carbono.

O tubo controle, sem aminoácido, deve virar para amarelo e assim permanecer.

O *Vibrio parahaemolyticus* descarboxila a lisina.

5.5.6 Hidrólise da arginina

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo caldo arginina sal 3%.

Inocular também um tubo contendo o meio base (sem adição do aminoácido) que servirá de controle.

Cobrir os tubos com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril.

Incubar a 36 ± 1°C por, no máximo, 4 dias, juntamente com um tubo de caldo arginina sal 3% não inoculado, que servirá de controle negativo.

Examinar os tubos todos os dias.

Durante o período de incubação, a cor do meio passa para amarela devido à fermentação da glicose, e, ocorrendo a hidrólise da arginina, o meio retorna a cor púrpura devido à produção de aminas primárias e dióxido de carbono.

O tubo controle, sem aminoácido, deve virar para amarelo e assim permanecer.

O *Vibrio parahaemolyticus* não hidrolisa a arginina.

5.5.7 Prova da fermentação do manitol e arabinose

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo caldo vermelho de fenol manitol sal 3% e outro tubo contendo caldo vermelho de fenol arabinose sal 3%.

Cobrir o meio com 2 a 3 mL de óleo mineral ou parafina líquida, estéril.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 horas.

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração dos meios de vermelho para amarelo, devido à fermentação dos açúcares e conseqüente produção de ácido.

99% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fermenta o manitol.

50% das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* fermenta a arabinose.

5.5.8 Teste do halofilismo

A partir do cultivo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, platina ou descartável estéril, inocular tubos contendo caldo peptonado sal 6% e 10%.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 horas.

Após o período de incubação, observar a presença de turvação nos meios.

O *Vibrio parahaemolyticus* cresce a 6% de sal e não cresce, ou apresenta crescimento discreto, a 10% de sal.

5.5.9 Sensibilidade do agente vibriostático O/129

Esta prova é utilizada como diferencial entre *Vibrio parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

Embeber um “swab” previamente esterilizado com a cultura suspeita mantida em caldo peptonado sal 3% e inocular uma placa contendo ágar Müeller-Hinton sal 3% ou agar soja triptonal sal 3%, espalhando bem o inocúlo, de forma a obter um crescimento o mais homogêneo possível.

Deixar as placas absorverem o inóculo.
Colocar um disco do agente vibriostático O/129 com concentração de 10µg e um disco de concentração de 150µg.
Incubar as placas a 36 ± 1°C por 24 horas.

O *Vibrio parahaemolyticus* é resistente à concentração de 10µg de agente vibriostático O/129 enquanto o *V. vulnificus* é sensível. Todos os vibrios são sensíveis à concentração de 150µg do agente O/129.

6. RESULTADOS

Serão consideradas como positivas para *Vibrio parahaemolyticus* as culturas que apresentarem os seguintes resultados nas provas adicionais de identificação:

Motilidade - positiva
Hugh Leifson (OF) - glicose fermentativo
Descarboxilação da lisina - positivo
Hidrólise da arginina - negativo
Crescimento a 42°C - positivo
Fermentação do manitol - positivo
Fermentação da arabinose - positivo
Sensibilidade ao Agente Vibriostático O/129 - 10µg - resistente

Sensibilidade ao Agente Vibriostático O/129 - 150µg - sensível

Ágar gelatina sal 3% - crescimento com formação de halo
Halofilismo (6% sal) - positivo
Halofilismo (8% sal) - positivo
Halofilismo (10% sal) - negativo ou crescimento discreto
A partir da combinação de tubos com resultado positivo em cada série, calcular o Número Mais Provável de acordo com o Anexo III, “Procedimentos Básicos de Contagem”, deste Manual.
Expressar o valor obtido em NMP/g.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ELLIOT, E.L.; KAYSNER, C.A.; JACKSON, L. e CEBULLE, T.A. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and Others *vibrio* spp. In Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>.

MacFADDIN, J.F. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3ed. Lippincott Williams & Wilkins (Ed.), Philadelphia. 2000. p. 160-169.

CAPÍTULO XIII

NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS VIÁVEIS CAPAZES DE CAUSAR ALTERAÇÃO EM PRODUTOS LÁCTEOS UHT E ESTERILIZADOS, PASTOSOS E VISCOSOS

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a determinação do NMP de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis, com exclusão daqueles comprovadamente não patogênicos e não causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas em produtos lácteos pastosos e viscosos.

Detectar a presença de *Bacillus sporothermodurans* para diferenciá-lo dos demais microrganismos mesófilos aeróbios viáveis.
Aplica-se a amostras de creme de leite e outros produtos pastosos e viscosos tratados pelo processo UHT e produtos esterilizados.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Pré-incubação

Baseia-se na incubação das amostras em estufa a 36 ± 1°C por 7 dias e posterior verificação da ocorrência de alterações das características do produto.

2.2 Determinação do NMP

Baseia-se na sementeira de diluições seriadas da amostra em tubos contendo caldo cérebro-coração-sal 0,65%-extrato de levedura 0,6% (BHI-SE), seguida de incubação a 30 ± 1°C por 72 horas, com posterior repique em ágar cérebro-coração (BHI) e ágar nutriente isento de extrato de levedura e a subsequente identificação da flora presente.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar cérebro-coração (ABHI);
Ágar nutriente isento de extrato de levedura;
Ágar esculina;
Ágar uréia;

Caldo cérebro-coração nitrato (BHI-NO₃);

Caldo cérebro-coração-sal 0,65%-extrato de levedura 0,6% (BHI-SE);

Caldo cérebro-coração-sal 0,65%-extrato de levedura 0,6% concentração dupla (BHI-SE2);

Caldo vermelho de fenol com glicose;

Solução salina peptonada 0,1%;

Reativo para oxidase (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina ou oxalato de para-amino-dimetilanilina) ou tiras para teste de oxidase;

Peróxido de hidrogênio 3%;

Alfa-naftilamina 0,5%;

Ácido sulfanílico 0,8%;

Zinco em pó;

Etanol 70% ou Etanol 70° GL;

Reagentes para coloração de Gram.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Preparo da amostra

Após pré-incubação, as amostras visualmente inalteradas devem ser agitadas por 25 vezes. Antes da abertura, desinfetar externamente as embalagens com solução desinfetante e posteriormente com etanol 70% ou etanol 70° GL. Deixar secar.

Pesar 25 ± 0,2 g ou pipetar 25 ± 0,2 mL da amostra de acordo com as instruções contidas no Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%.

A partir da diluição inicial 10⁻¹, efetuar as diluições desejadas de acordo com o Anexo II, “Diluições e soluções”, deste Manual.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Inoculação

Inocular 10 mL da diluição 10⁻¹, 1 mL da diluição 10⁻¹ e 1 mL da diluição 10⁻², separadamente, em três séries de três tubos contendo 10 mL de BHI-SE. Na primeira série de tubos, que foram inoculados com 10 mL da diluição 10⁻¹, usar o meio com concentração dupla (BHI-SE2).

Incubar a 30 ± 1°C por 72 horas.

5.4 Confirmação do crescimento

Finalizado o período de incubação, repicar todos os tubos sobre a superfície seca de ABHI e de ágar nutriente isento de extrato de levedura, estriando de forma a obter colônias isoladas.

Incubar a 30 ± 1°C por até 72 horas.

5.5 Leitura

O crescimento nas placas será indicativo de presença de mesófilos aeróbios no tubo de origem, porém será necessária a diferenciação entre *Bacillus sporothermodurans* (que não é patogênico nem produz alteração do produto) e outros mesófilos aeróbios capazes de alterar o alimento. Registrar o número de tubos que apresentaram crescimento de colônias nas placas correspondentes, registrando em separado as colônias suspeitas de *Bacillus sporothermodurans*.

Quando o crescimento bacteriano for devido à presença de esporos de *Bacillus sporothermodurans* na amostra em análise, será observado crescimento abundante de colônias lisas, de forma regular, com coloração entre branco e bege, com diâmetro máximo de 3 mm, facilmente identificáveis, nas placas com ABHI.

No ágar nutriente isento de extrato de levedura, o *Bacillus sporothermodurans* comumente não forma colônias visíveis, porém poderão se desenvolver colônias puntiformes de coloração entre branco e bege.

Selecionar de 2 a 3 colônias correspondentes a cada um dos tubos positivos e repicar para tubos com ABHI inclinado.

Incubar a 36 ± 1°C por até 72 horas e realizar os seguintes testes confirmatórios:

5.6 Coloração de Gram

Preparar esfregaço das colônias suspeitas e corar pelo método de Gram .

Quando forem observados bastonetes Gram positivos, realizar a prova da catalase conforme o item 5.7.

Quando forem observados microrganismos com morfologia e características diferentes de bastonetes Gram positivos, considerar o tubo correspondente como positivo para presença de aeróbios mesófilos.

5.7 Catalase

Com auxílio de alça de platina, palito de madeira, bastão de vidro ou Pipeta de Pasteur, estéreis, transferir a cultura para uma lâmina ou placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio 3%. Misturar o inóculo ao peróxido e observar a reação.

A não formação de borbulhas indica prova negativa para catalase. A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase.

A maioria dos membros do gênero *Bacillus* apresenta reação de catalase positiva.

Quando a coloração de Gram demonstrar a presença de bastonetes Gram positivos e a prova da catalase for positiva para a cultura em teste, proceder à confirmação da presença de *Bacillus sporothermodurans* por meio das provas da oxidase, hidrólise da esculina, fermentação da glicose, redução do nitrato, produção de urease e crescimento em anaerobiose, conforme abaixo descrito.

5.8 Oxidase

Usando alça de platina, Pipeta de Pasteur, palitos de madeira ou de plástico descartáveis, estéreis, realizar a prova da oxidase, espalhando a cultura sobre papel filtro impregnado com o reativo ou sobre tiras de papel com reativo para oxidase, comercialmente disponíveis.

Fazer a leitura em 10 a 20 segundos. Após esse tempo, reações falso positivas podem ocorrer.

O aparecimento de cor azul (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho intenso (oxalato de para-amino-dimetilanilina) é indicativo de reação positiva.

Não utilizar alças de níquel-cromo ou alças de aço inoxidável para realizar a prova de oxidase pois traços de óxido de ferro na superfície flambada pode produzir reação falso positiva.

O *Bacillus sporothermodurans* apresenta reação de oxidase positiva.

5.9 Crescimento em anaerobiose

Inocular a cultura em tubos de ABHI inclinados e incubar em jarra de anaerobiose a 36 ± 1°C por 72h.

O *Bacillus sporothermodurans* não cresce em anaerobiose.

5.10 Hidrólise da esculina

Inocular a cultura, com agulha, em tubos contendo ágar esculina inclinado.

Incubar a 36 ± 1°C por até 72 horas.

A hidrólise da esculina é evidenciada pelo enegrecimento do meio.

O *Bacillus sporothermodurans* hidrolisa a esculina.

5.11 Fermentação da glicose

Semear tubos de caldo vermelho de fenol-base adicionados de glicose.

Incubar a 36 ± 1°C por até 72 horas.

A viragem de cor do indicador vermelho de fenol para amarelo indica a fermentação do açúcar presente.

O *Bacillus sporothermodurans* não fermenta a glicose.

5.12 Redução de nitrato

Inocular a cultura, com alça, em tubos contendo caldo BHI-NO₃.

Incubar a 36 ± 1°C por 72 horas.

Após incubação, adicionar aos tubos 0,5 a 1 mL de alfa naftilamina 0,5%, e 0,5 a 1 mL de ácido sulfanílico 0,8%.

O aparecimento de coloração rosa indica positividade para redução de nitrato.

Quando não houver desenvolvimento de coloração, adicionar ao tubo alguns miligramas de pó de zinco. Nesta situação, o aparecimento de coloração rosa indica reação negativa enquanto que o não desenvolvimento de cor indica positividade.

O *Bacillus sporothermodurans* não reduz o nitrato à nitrito.

5.13 Prova da urease

Inocular com alça a superfície de placas ou tubos com ágar uréia previamente preparadas.

Incubar a 36 ± 1°C por até 72 horas.

Observar o crescimento com mudança de coloração para rosa intenso, o que indica positividade para produção de urease.

O *Bacillus sporothermodurans* não produz urease.

6. RESULTADOS

Considerar positivos os tubos que apresentaram crescimento de outras bactérias diferentes do *Bacillus sporothermodurans* e considerar como negativo quando não for observado crescimento de colônias nas placas e quando o crescimento observado for confirmado como sendo somente de *Bacillus sporothermodurans*.

A partir dos resultados obtidos, consultando a tabela de NMP apropriada e seguindo as instruções contidas no Anexo III, “Procedimentos básicos de contagem”, deste Manual, calcular o número mais provável de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis presentes na amostra em análise.

Quando for confirmada a presença de *Bacillus sporothermodurans* juntamente com outros mesófilos na amostra, deverão ser excluídos os tubos que continham apenas *Bacillus sporothermodurans* para o cálculo final do NMP de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis.

Quando for observada somente a presença de colônias de *Bacillus sporothermodurans* na amostra, reportar o resultado de mesófilos aeróbios viáveis como <0,3 NMP/mL.

Sempre que for observada a presença de *Bacillus sporothermodurans*, fazer constar no Certificado Oficial de Análise (COA), no campo “OBS”, a expressão: “Presença de *Bacillus sporothermodurans*”.

Deverão ainda acompanhar o resultado de análise informações adicionais sobre o tipo de microrganismo encontrado (como por exemplo: cocos Gram positivos, bastonetes Gram negativos, flora mista, etc.) ou o(s) microrganismo(s) aeróbio(s) presente(s), quando identificado(s).

Os resultados da análise de NMP de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis a 30°C por 72 horas em produtos lácteos UHT e esterilizados, pastosos e viscosos, devem ser expressos em: NMP/g.

O resultado da análise de pré-incubação a 36°C por 7 dias deve ser expresso como “alterado” ou “sem alteração”.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual de métodos microbiológicos para alimentos. Coordenação Geral de Laboratório Animal. 1991/1992 2ª revisão. 136p.

PETTERSSON, B.; LEMBKE, F.; HAMMER, P.; STACKE-BRANDT, E.; PRIEST, F.G. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly-heat-resistant endospores. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996. P. 759-764.

MORTON, R.D. Aerobic Plate Count. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.63-67.

CAPÍTULO XIV

PESQUISA DE *Listeria monocytogenes*

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer método analítico para a detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal.

A metodologia aplica-se a todos os alimentos cárneos e lácteos.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Enriquecimento Seletivo

O enriquecimento seletivo, realizado em duas etapas (a primeira em caldo UVM, e a segunda em caldo Fraser), tem a finalidade de inibir a flora acompanhante, permitindo a recuperação de baixos números de células de *Listeria sp*.

O efeito seletivo no caldo UVM é exercido pela associação de ácido nalidíxico e acriflavina e no caldo Fraser pelo cloreto de lítio, ácido nalidíxico e acriflavina.

2.2 Seleção e Isolamento

Nos produtos cárneos, a seleção se realiza em dois meios sólidos: ágar triptose com ácido nalidíxico (ATN) e ágar Palcam (AP), enquanto que nos produtos lácteos esta se realiza em ágar Oxford (AO), ágar Palcam (AP) e ágar triptose com ácido nalidíxico (ATN).

As substâncias impiedentes presentes nos meios sólidos são ácido nalidíxico no ATN, sulfato de polimixina B, acriflavina, cloreto de lítio e ceftazidina no AP, e cloreto de lítio, acriflavina, sulfato de colistina, cefotetan, cicloheximide e fosfomicina no AO.

A seleção no ATN baseia-se nas características das colônias, quando observadas sob luz oblíqua, em estereoscópio. No AP, observa-se a não fermentação do manitol e a formação de esculetina pela hidrólise da esculina, reação revelada pela presença de ferro trivalente. No AO, as colônias de *Listeria sp* apresentam-se pretas, rodeadas por halo negro devido à hidrólise da esculina.

2.3 Confirmação da presença de *Listeria sp*

A confirmação bioquímica de *Listeria sp* realiza-se por meio da verificação da produção de catalase, observação das características morfológicas e tintoriais, verificação do crescimento típico em meio semi-sólido e, adicionalmente, por meio da verificação da incapacidade de redução de nitrato e verificação da positividade nas reações de Vermelho de Metila e Voges Proskauer (VM-VP).

2.4 Identificação de *Listeria monocytogenes*

A diferenciação das espécies de *Listeria sp* realiza-se por meio da verificação da produção de â-hemólise em ágar sangue de cobaio ou ágar sangue de carneiro, verificação da capacidade de produzir reação de CAMP positiva com *S. aureus* (e opcionalmente também com *Rodococcus equi*), e verificação da capacidade de fermentação dos carboidratos ramosse, xilose e manitol. A utilização concomitante de culturas de *R. equi* e *S. aureus* no CAMP teste é útil para a diferenciação de *L. ivanovii*, que apresenta reação de CAMP forte com *R. equi* (em forma de flecha). Quando se julgar conveniente, a identificação poderá ser realizada por meio de um sistema comercialmente disponível de testes bioquímicos miniaturizados padronizados, conjuntamente com a prova de â-hemólise ou CAMP teste.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Caldo Fraser - base;

Caldo de enriquecimento para *Listeria* (UVM) ou opcionalmente Caldo para Enriquecimento de *Listeria* (LEB);

Caldo VM-VP;

Caldo vermelho de fenol - base ou Ágar para fermentação de carboidratos - base;

Ágar Palcam (AP);

Ágar Columbia com ácido nalidíxico - base;

Ágar triptose com ácido nalidíxico (ATN);

Ágar Oxford (AO) - base;

Ágar motilidade;

S. aureus ATCC 25923 para CAMP teste;

Rodococcus equi ATCC 6939 para CAMP teste (opcional);

Sistema miniaturizado para identificação bioquímica de *Listeria* (opcional);

Ácido nalidíxico 1%;

Acriflavina cloridrato 1%;

Peróxido de hidrogênio 3%;

Vermelho de metila 0,06%;

Alfa-naftol 5%;

Hidróxido de potássio 40%;

Ácido sulfanílico 0,8%;

Alfa-naftilamina 0,5%;

Suplemento para caldo UVM (ácido nalidíxico 20mg/L; acriflavina 12mg/L);

Suplemento para caldo LEB (acriflavina 12mg/L);

Suplemento para ágar Oxford (cicloheximide 200mg/0,5L;

sulfato de colistina 10,0mg/0,5L; acriflavina 2,5mg/0,5L; Cefotetan 1,0mg/0,5L; fosfomicina 5,0mg/0,5L);

Suplemento para ágar Palcam (polimixina B 5,0mg/0,5L;

acriflavina 2,5mg/0,5L; Cefazidime 10,0mg/0,5L);

Suplemento para caldo Fraser (citrato de amônio e ferro III 250mg/0,5L; acriflavina 12,5mg/0,5L; ácido nalidíxico 10mg/0,5L);

Pó de Zinco;

Xilose solução aquosa 5%;

Manitol solução aquosa 10%;

Ramnose solução aquosa 5%;

Sangue desfibrinado de carneiro;

Sangue desfibrinado de cobaio .

OBS.: Os suplementos podem ser adquiridos em forma de vial (comercialmente disponível), necessitando apenas a suspensão em diluente antes de seu uso. Verificar sempre a composição, comparando com aquela indicada nesta metodologia.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

Estereoscópio com iluminação em ângulo de 45°.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Preparo da Amostra

Acrescentar à alíquota de 25 ± 0,2 g ou mL da amostra preparada conforme Anexo V, 225 mL de caldo UVM adicionado de seu suplemento.

OBS.: Verificar a formulação do Caldo UVM ou LEB. Algumas marcas de caldo UVM já contêm em sua formulação ácido nalidíxico e acriflavina. O caldo LEB já contém ácido nalidíxico, bastando a suplementação com 0,25 mL de solução 1% de acriflavina.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Primeiro enriquecimento seletivo

Homogeneizar as alíquotas preparadas conforme item 5.1 e incubar a 30 ± 1°C por 24 horas.

5.4 Segundo enriquecimento seletivo

Após a incubação, transferir 0,1 mL da cultura para tubo contendo 10mL de caldo Fraser suplementando-o, se necessário, com 0,1 mL do vial diluído conforme a indicação do fabricante.

OBS.: Alguns fabricantes de caldo Fraser fornecem o meio já pronto para o uso; outros fornecem o meio adicionado de ácido nalidíxico e de acriflavina, bastando a suplementação com citrato de amônio e ferro III (0,1 mL de solução a 5% equivalente a 250 mg/0,5L de meio).

Incubar a 30 ± 1°C por 24 a 48 horas.

5.5 Isolamento

5.5.1 Amostras de produtos cárneos

Utilizando alça de platina de 5 mm de diâmetro, repicar do caldo Fraser para placas contendo ATN e placas contendo AP suplementado, sendo que as placas devem estar com as superfícies secas, de forma a proporcionar a obtenção de colônias isoladas. Opcionalmente, pode ser usado o ATNS em paralelo com os meios ATN e AP.

Incubar as placas de ATN a 30 ± 1°C por 24 horas e as placas de AP e ATNS, na mesma temperatura, por 24 a 48 horas.

5.5.2 Amostras de produtos lácteos

Utilizando alça de platina de 5 mm de diâmetro, repicar do caldo Fraser para placas contendo AO suplementado e placas contendo AP suplementado, sendo que as placas devem estar com as superfícies secas, de forma a proporcionar a obtenção de colônias isoladas.

Incubar as placas de ATN a 30 ± 1°C por 24 horas e as placas de AP na mesma temperatura, por 24 a 48 horas.

5.6 Seleção

Com auxílio de lupa ou estereoscópio com iluminação angular de 45°, selecionar 3 a 5 colônias de cor azulada ou azul-acinzentada em ATN.

Selecionar, com o auxílio de conta-colônias ou de estereoscópio com iluminação normal, colônias pretas rodeadas por halo escuro em AO.

Selecionar, com o auxílio de conta-colônias ou de estereoscópio com iluminação normal, colônias verde-amareladas rodeadas por zona escura, ou colônias verde-acinzentadas, em AP.

5.7 Confirmação da presença de *Listeria sp*

Repicar o mesmo inóculo para tubos com ágar estoque inclinado e para placas contendo ATN. Incubar a 30 ± 1°C por 24 horas. Verificar a pureza das culturas no ATN. Utilizar as culturas do ágar estoque para a realização das provas de confirmação e identificação.

5.7.1 Prova da catalase

Em uma placa de Petri, depositar 1 gota de peróxido de hidrogênio 3%. Com auxílio de alça de platina, bastão de vidro, palito de madeira ou pipeta de Pasteur, retirar uma alíquota do cultivo e misturar com a gota do reagente. A presença de catalase se traduz por desprendimento de bolhas de oxigênio (catalase positiva). Das culturas catalase positivas, fazer um esfregaço para coloração de Gram.

5.7.2 Coloração de Gram

A *Listeria sp* se apresenta como bastonete curto ou na forma de cocobacilo, Gram positivo.

5.7.3 Prova da motilidade típica

Inocular uma alíquota da cultura em ágar motilidade, com agulha, por picada. Incubar em estufa de B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio) a 22-25°C por 2 a 5 dias. Após incubação, verificar o tipo de crescimento.

A *Listeria sp* apresenta crescimento móvel característico em forma de guarda-chuva.

5.7.4 Prova de Redução de Nitrato

Após a leitura da motilidade, adicionar a cada tubo 2 a 3 gotas de alfa-naftilamina 0,5% e 2 a 3 gotas de ácido sulfanílico a 0,8%.

O aparecimento de coloração rosa indica positividade. Quando não houver desenvolvimento de coloração, adicionar ao meio alguns miligramas de pó de zinco. Nesse caso, o aparecimento de coloração rosa indica reação negativa e a não alteração de cor indica positividade.

As culturas de *Listeria sp* não reduzem o nitrato.

5.7.5 Prova de VM-VP

Inocular tubos com caldo VM-VP e incubar a 36 ± 1°C, por 5 dias.

Após a incubação, pipetar alíquotas de 5 e 1 mL da cultura para dois tubos estéreis.

No tubo contendo 5 mL adicionar 2 a 3 gotas de solução de vermelho de metila a 0,06%.

O aparecimento da cor vermelha indica reação VM positiva.

No tubo contendo 1 mL, adicionar 0,6 mL de alfa-naftol solução alcoólica 5% e 0,2 mL de hidróxido de potássio solução aquosa 40% (nesta ordem) e agitar.

Deixar em repouso por 1 a 2 horas. O aparecimento da cor vermelha escura indica reação VP positiva.

As culturas de *Listeria sp* apresentam reações VM e VP positivas.

5.8 Identificação de *Listeria monocytogenes*

As culturas que tenham confirmado as características do gênero *Listeria* deverão ser testadas para diferenciação entre *Listeria monocytogenes* e outras espécies por meio das seguintes provas bioquímicas:

5.8.1 Produção de â-hemólise

Sobre a superfície seca de ágar sangue desfibrinado de cobaio ou carneiro (ACNS), estriar o inóculo com alça ou semear com agulha, por picada. Incubar a 36 ± 1°C por 24 a 48 horas.

A reação positiva se traduz pelo aparecimento de zona clara transparente (â-hemólise) ao redor das colônias.

As culturas de *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* e *Listeria seeligeri* são â-hemolíticas.

OBS.: A utilização de sangue de cobaio desfibrinado nesta prova oferece a vantagem de zonas de hemólise mais claras, especialmente com culturas de *L. monocytogenes* fracamente hemolíticas.

5.8.2 CAMP teste

Em ágar Columbia com ácido nalidíxico adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado (CNAS), com auxílio de agulha ou alça de 1 iL, traçar uma linha perpendicular à linha previamente semeada com *S. aureus*. Tomar o cuidado para que as linhas não se toquem.

Incubar a 36 ± 1°C por 72 horas, em atmosfera de 2 a 5% de dióxido de carbono (CO₂).

As culturas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria seeligeri* produzem zona clara de hemólise total acentuada próximo à linha de crescimento do *Staphylococcus aureus*.

Opcionalmente, este teste pode ser feito com *S. aureus* e *R. equi*. Nesse caso, traçar na placa de CNAS uma linha vertical com inóculo de *S. aureus* e outra com *R. equi*, distantes alguns centímetros entre si. Semear as culturas teste em linhas horizontais entre as linhas de *S. aureus* e *R. equi*, mantendo distância de cerca de 1,5 cm entre as linhas e cuidando que estas não toquem as linhas de *S. aureus* e *R. equi*.

Incubar a 36 ± 1°C por 72 horas, em atmosfera de 2 a 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Após a incubação, examinar as placas para verificação de hemólise na zona de interação, próximo às linhas verticais. A atividade hemolítica de *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* se apresenta aumentada próximo a linha de crescimento do *S. aureus*. As demais listérias apresentam reação de CAMP negativa com o *S. aureus*. A reação de CAMP produzida pela *L. ivanovii* com *R. equi* se caracteriza por ser mais intensa e se apresentar em forma de flecha. As *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* são não-hemolíticas e não apresentam reação de CAMP positiva com o *S. aureus* nem com o *R. equi*.

O CAMP teste diferencia *L. ivanovii* de *L. seeligeri* e pode diferenciar uma *L. seeligeri*, fracamente hemolítica, de *L. welshimeri*. Isolados que dão reações típicas para *L. monocytogenes*, exceto para a produção de hemolisina, devem ser testadas para CAMP antes de serem identificadas como *L. innocua* (não hemolítica).

A maioria dos isolados de *L. monocytogenes* produz também uma zona de intensificação da hemólise junto à linha de crescimento do *R. equi*.

5.8.3 Fermentação de carboidratos

Inocular 3 tubos com caldo vermelho de fenol-base, adicionados respectivamente, de xilose, manitol e ramosse.

Incubar a 30 ± 1°C por 36 horas. A viragem de cor do indicador vermelho de fenol para amarelo indica a fermentação do açúcar presente. Alternativamente, esta prova pode ser realizada inoculando as culturas com agulha (em apenas um ponto) em 3 placas de ágar para fermentação de carboidratos adicionado de xilose, manitol e ramosse, respectivamente. A viragem de cor do indicador púrpura de bromocresol (azul) para amarelo indica a fermentação do açúcar presente.

As reações típicas das diversas *Listeria sp* estão representadas no quadro abaixo:

| | LM | LIVA | LINN | LW | LS | LG |
|---------------------|----|------|------|----|----|----|
| â-hemólise | + | + | - | - | + | - |
| Red-NO ₃ | - | - | - | - | - | - |
| CAMP Teste SA | - | + | - | - | + | - |
| CAMP Teste RE | - | V | + | - | - | - |
| Manitol | - | - | - | - | - | + |
| Ramnose | + | - | V | V | - | - |
| Xilose | - | + | - | + | + | - |
| VM | + | + | + | + | + | + |
| VP | + | + | + | + | + | + |
| Catalase | + | + | + | + | + | + |
| Gram | + | + | + | + | + | + |

V= variável AS = *S.aureus* RE = *R.equi*

LM = *L. monocytogenes*; LIVA = *L. ivanovii*; LINN = *L. innocua*; LW = *L.welshimeri*;

LS = *L.seeligeri*; LG = *L. grayi*

6. RESULTADOS

6.1 Interpretação

Considerar como *Listeria monocytogenes* as culturas que apresentarem reações típicas nas provas bioquímicas.

6.2 Expressão dos resultados:

Expressar o resultado como:

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*: Presença/25 g ou mL;

ou

Pesquisa de *Listeria monocytogenes* : Ausência/25 g ou mL

Nota: sempre que as análises laboratoriais demonstrarem a presença de outras espécies de *Listeria*, da área reservada a observações, do Certificado Oficial de Análise, deverá constar: Presença de *Listeria*, seguida do nome da espécie encontrada. Por exemplo:

Presença de *Listeria innocua*, Presença de *Listeria welshimeri* ou outra.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BENNETT , R.W.; WEAVER, R.E. Serodiagnosis of *Listeria monocytogenes*. In: AOAC International. Bacterial Analytical Manual. 8. ed. Gaithersburg. Food and Drug Administration, 1995. p.11.01-11.08.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 ed. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), Washington: American Public Health Association, 2001. p.63-67.

HITCHINS A.D. *Listeria monocytogenes* . In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>

MacFADDIN, J.F. Media for isolation - Cultivation - Identification - Maintenance of Medical Bacteria. John Buttler (Ed.) William & Wilkins. Baltimore. 1985.

CAPÍTULO XV

PESQUISA DE *Salmonella*

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer metodologia analítica para a detecção de *Salmonella* sp em amostras de alimentos, rações e ingredientes.

Aplica-se a amostras de alimentos de origem animal, rações e ingredientes.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Pré-enriquecimento

Baseia-se na incubação, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas, de $25 \pm 0,2$ g ou $25 \pm 0,2$ mL da amostra, adicionada de 225 mL do diluente específico para cada caso, estabelecido no item 5.1. Esse procedimento visa minimizar os efeitos do processamento industrial dos alimentos, capaz de promover estresse nas células de *Salmonella*, sem inativá-las biologicamente.

Quando é utilizada solução salina peptonada tamponada, esta favorece a manutenção do pH, evitando que as bactérias acompanhantes acidifiquem o meio, prejudicando a recuperação das células de *Salmonella*.

Para leite em pó, segundo o FDA, o diluente utilizado é água destilada estéril adicionada de solução de verde brilhante, o que visa inibir o crescimento de bactérias Gram positivas.

2.2 Enriquecimento seletivo

Baseia-se na utilização de meios que contêm substâncias de ação impeditiva do crescimento para a maioria dos microrganismos interferentes e na incubação em temperatura seletiva.

O enriquecimento seletivo de *Salmonella* se faz obrigatoriamente nos meios líquidos seletivos, caldo Rappaport Vassiliadis e caldo selenito-cistina.

Adicionalmente, utiliza-se o caldo tetratonato.

No caldo Rappaport Vassiliadis, a presença de verde malvaquita e de cloreto de magnésio, associada à temperatura de $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas, atua como agentes seletivos da microbiota acompanhante, enquanto a presença de peptonada de farinha de soja estimula o crescimento de *Salmonella*.

No caldo selenito-cistina, o agente inibidor selenito de sódio atua inibindo os coliformes e enterococos. Esse meio é incubado a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas.

No caldo tetratonato, a seletividade é conferida pelo tetratonato e pelo verde brilhante.

2.3 Isolamento e seleção

Baseia-se na seleção de colônias de *Salmonella* em, pelo menos, dois meios sólidos: o ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) obrigatoriamente e outro ágar de maior impedância escolhido pelo laboratório.

No ágar verde brilhante, a novobiocina adicionada visa principalmente a inibição de *Proteus* sp. Esse meio apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição de microrganismos Gram positivos.

Como meio de maior impedância, utilizar MLCB ou Rambach ou XLD ou XLT4 ou outro.

No ágar Rambach, a diferenciação entre *Salmonella* e outros microrganismos é promovida pela presença de propilenoglicol, e também de um cromógeno que evidencia a hidrólise da beta-galactosidase.

No ágar MLCB, a concentração de íons Magnésio promove o crescimento de *Salmonella*. A presença de verde-brilhante inibe a flora acompanhante. Esse ágar não utiliza a fermentação da lactose como sistema de identificação, o que possibilita a detecção de cepas de comportamento atípico no BPLS. A produção de H_2S é evidenciada pelo enegrecimento do centro da colônia. Cepas de *Salmonella* H_2S negativas, como *Salmonella* Sendai, *Salmonella* Berta, *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Seftenberg, podem produzir colônias azuis. É um meio que, associado ao caldo de enriquecimento Rappaport Vassiliadis, tem sua seletividade substancialmente aumentada. A *Salmonella* Typhi e a *Salmonella* Paratyphi não crescem nesse meio devido à presença de verde-brilhante.

2.4 Identificação bioquímica

Baseia-se na evidênciação das propriedades fisiológicas e metabólicas das culturas suspeitas: por meio da verificação da presença de citocromo oxidase; detecção de pirrolidonil peptidase (PY-Rase) segundo Bennett *et al* (1999); produção de urease; fermentação da glicose, sacarose e lactose no meio TSI; detecção de beta-galactosidase; descarboxilação da lisina; produção de H_2S ; motilidade e produção de indol.

Para confirmação final, em casos de dúvida, realizam-se outras provas complementares, baseadas na inoculação das culturas suspeitas em uma bateria miniaturizada de testes padronizados. Os microtubos contendo substratos desidratados para cada teste são re-

idratados pela adição da suspensão do microrganismo teste em diluente específico para esta finalidade.

2.5 Prova de soroaglutinação

Baseia-se na reação antígeno-anticorpo, com conseqüente aglutinação do antígeno frente ao anti-soro para *Salmonella* polivalente “O”.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidrarias e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS);

Ágar Rambach ou Ágar manitol lisina cristal violeta verde brilhante (MLCB) ou Ágar XLD ou Ágar; XLT4 ou outro;

Ágar ferro três açúcares (TSI) ou Ágar Kligler (KIA);

Ágar estoque;

Caldo lisina descarboxilase ou Ágar lisina ferro - (LIA);

Caldo uréia ou ágar uréia;

Ágar fenilalanina;

Caldo selenito cistina;

Caldo Rappaport Vassiliadis;

Caldo tetratonato (adicional);

Caldo VM/VP;

Meio SIM;

Sistema miniaturizado de provas bioquímicas para identificação de enterobactérias;

Solução salina 0,85%;

Solução salina 2%;

Água destilada estéril;

Solução salina peptonada 1% tamponada;

Solução salina peptonada 1% tamponada com 1% Tween

80;

Solução de α -naphтол 5%;

Solução de hidróxido de potássio 40%;

Solução de uréia 40% estéril;

Solução de iodo-iodeto;

Reativo de Kovac's (opcional: reativo de Ehrlich);

Verde brilhante solução aquosa 0,1%;

Cloreto férrico solução aquosa 10%;

Novobiocina solução aquosa 4%;

Soro anti *Salmonella* polivalente “O”;

Reativo para oxidase (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina ou oxalato de para-amino-dimetilanilina) ou tiras para teste de oxidase;

Óleo mineral, parafina líquida ou vaspar estéreis;

Reativos para prova da PYRase - Ácido L-piroglutâmico 7-amino 4-metil cumarina (7 AMC) e Dimetilaminocinamaldeído;

Tween 80.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

Banho-maria com movimentação de água (agitação ou circulação).

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Pesagem e preparo da amostra

Pesar $25 \pm 0,2$ g ou pipetar $25 \pm 0,2$ mL da amostra, de acordo com as instruções contidas no Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 1% tamponada (ver exceções na observação abaixo).

Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos no “stomacher”.

Deixar 1 hora em temperatura ambiente.

OBS: Para leite em pó e soro de leite em pó, utilizar como diluente água destilada e adicionar 5 mL de verde brilhante solução aquosa 0,1%.

Para produtos gordurosos (creme e manteiga) utilizar como diluente solução salina peptonada 1% tamponada com 1% de Tween 80.

Para os demais alimentos, utilizar solução salina peptonada 1% tamponada.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Pré-enriquecimento

O pré-enriquecimento se realiza por meio da incubação das alíquotas das amostras preparadas conforme item 5.1, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por, no mínimo, 16 horas e não mais que 20 horas.

5.4 Enriquecimento seletivo

A partir do procedimento de pré-enriquecimento estabelecido em 5.3, inocular, simultaneamente, nos meios líquidos seletivos conforme abaixo:

5.4.1 Inoculação em caldo Rappaport Vassiliadis

Pipetar alíquotas de 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis.

Incubar os tubos a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em banho-maria, preferencialmente com agitação ou circulação contínua de água, por 24 a 30 horas.

5.4.2 Inoculação em caldo selenito cistina

Pipetar alíquotas de 1 mL das amostras pré-enriquecidas e transferir para tubos contendo 10 mL de caldo selenito cistina.

Incubar os tubos a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em banho-maria, preferencialmente com agitação ou circulação contínua de água, por 24 a 30 horas.

5.4.3 Inoculação em caldo tetratonato (adicional)

Pipetar alíquotas de 1 mL das amostras pré-enriquecidas e transferir para tubos contendo 10 mL de caldo tetratonato.

Incubar os tubos a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em banho-maria, preferencialmente com agitação ou circulação contínua de água, por 24 a 30 horas.

5.5 Isolamento

A partir dos caldos seletivos de enriquecimento, repicar sobre a superfície previamente seca de placas com cada meio sólido seletivo, estriando de forma a se obter colônias isoladas. Dessa forma serão obtidas 2 placas de BPLS, uma originária do caldo Rappaport Vassiliadis e outra originária do caldo selenito cistina e 2 placas do segundo meio seletivo utilizado pelo laboratório, obtidas do mesmo modo.

Incubar todas as placas, invertidas, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

5.6 Seleção

Selecionar de 3 a 10 colônias suspeitas por amostra, conforme características descritas em 5.6.1.

5.6.1 Características das colônias típicas ou suspeitas de *Salmonella* nos diferentes meios sólidos

Em Ágar BPLS, as colônias apresentam-se incolores ou de cor rosada, entre translúcidas a ligeiramente opacas. Quando rodeadas por microrganismos fermentadores de lactose, podem apresentar-se de cor verde-amarelada.

Em Ágar Rambach, apresentam-se de cor vermelha. Alguns sorovares podem se apresentar com coloração rosa claro, de cor pêssego ou amarelas (cor de gema).

Em ágar MLCB, apresentam-se negras, convexas, lisas e brilhantes, com bordas regulares. As colônias de *Salmonella* Pullorum e de *Salmonella* Gallinarum apresentam-se de tamanho pequeno (cerca de 1 mm), de cor azul intensa ou violeta.

5.7 Provas Bioquímicas

As colônias selecionadas devem ser repicadas em ágar não-seletivo e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas, a fim de verificar sua pureza.

5.7.1 Provas bioquímicas preliminares

Como bateria mínima para identificação de *Salmonella*, devem ser realizadas as seguintes provas bioquímicas:

5.7.1.1 Produção de urease

Semear maciçamente em caldo ou ágar uréia.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas.

Observar a coloração do meio. A manutenção da cor inicial do meio indica que não ocorreu hidrólise da uréia. A alteração para rosa intenso é indicativa de alcalinização do meio devido à ação da urease sobre a uréia.

5.7.1.2 Reações em ágar TSI ou ágar Kligler (KIA)

Inocular o ágar através de picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

No ágar TSI, estão presentes: glicose (1,0 g/L), lactose (10,0 g/L) e sacarose (10,0 g/L). Como a glicose é um monossacarídeo e está em baixa concentração, será rapidamente fermentada anaerobiamente, formando ácido no fundo do tubo, o que torna o meio amarelo pela viragem do indicador vermelho de fenol (todos os membros da família *Enterobacteriaceae* fermentam a glicose com produção de ácido).

A fermentação aeróbia da glicose, que ocorre na superfície do bisel, resulta em ácido pirúvico, que é posteriormente degradado a CO_2 e água.

A grande maioria das salmonelas não fermenta a sacarose e a lactose, não provocando alterações no meio TSI (que contém esses dois açúcares; já no KIA, a sacarose não está presente). Como a fonte de carbono utilizável (glicose) é rapidamente esgotada, a *Salmonella* passa a degradar aerobiamente o substrato protéico do meio, produzindo amoníaco (NH_3), o que confere ao meio um pH alcalino, modificando a coloração do bisel para rosa intenso.

A maioria das salmonelas apresenta no TSI e no KIA as seguintes reações:

Ácido na base, com ou sem produção de gás.

Alcalino ou inalterado no bisel.

Com produção de H_2S .

5.7.1.3 Descarboxilação da lisina

Utilizar caldo lisina ou ágar LIA.

Inocular o caldo lisina e adicionar selo estéril (vaspar, vaselina, parafina), visando evitar o contato do meio com o ar e o conseqüente aparecimento de uma falsa alcalinização na superfície do meio por degradação aeróbia do substrato protéico.

Quando usar o ágar, inocular através de picada profunda, estriando na superfície inclinada do bisel.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas.

Observar se ocorreu descarboxilação da lisina pela alcalinização do meio, o que é demonstrado pela não alteração de cor do indicador presente.

A atividade da enzima lisina descarboxilase é dependente do pH, sendo mais ativa em pH abaixo de 5,5.

A acidificação do meio é obtida pela fermentação da glicose presente. Nessa etapa do processo, ocorre a viragem do indicador púrpura de bromocresol, de violeta para amarelo.

É recomendável a inoculação de um tubo controle de caldo base para descarboxilação sem lisina, para comprovação da acidificação pela fermentação da glicose. Esse tubo deve permanecer amarelo até o final do período de incubação.

Na condição anaeróbia, obtida pelo uso da camada de selo (no caldo lisina) ou na base (do LIA), todo o oxigênio não combinado é consumido pelo microrganismo presente, na fase inicial de crescimento.

A descarboxilação da lisina, que ocorre posteriormente, resulta na produção de uma diamina (cadaverina) e CO₂, que conferem ao meio características de alcalinidade e nova viragem da cor do indicador, que passa de amarelo para violeta. A diamina cadaverina é estável quando produzida em condições anaeróbias.

A maioria das salmonelas é capaz de produzir lisina descarboxilase.

Quatro por cento das cepas de *Salmonella* não descarboxilam a lisina.

A *Salmonella* paratyphi A e alguns outros sorovares não produzem lisina descarboxilase.

5.7.1.4 Meio SIM

Inocular com picada o meio de cultura.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 a 30 horas.

A motilidade é caracterizada pela difusão do crescimento por todo o meio. Se for restrito à linha de semeadura, indica que o microrganismo é imóvel.

A maioria das salmonelas apresenta motilidade positiva. A *Salmonella* Gallinarum e a *Salmonella* Pullorum apresentam motilidade negativa.

O meio SIM é o meio mais indicado para a verificação da produção de H₂S.

O H₂S é um gás incolor produzido pelo microrganismo em teste, pela redução do tiosulfato presente no meio. A revelação da presença de H₂S se realiza por meio da reação do H₂S com o citrato de ferro e amônio (presente no meio), formando um precipitado negro insolúvel.

Quinze por cento das culturas de *Salmonella* Choleraesuis e 95% das *Salmonella* Paratyphi A não produzem H₂S.

A maioria das salmonelas produz H₂S.

Quatorze por cento das cepas de *Salmonella* são H₂S negativo.

Após a leitura da motilidade e da produção de H₂S, adicionar algumas gotas de reativo de Kovačs (ou, opcionalmente de reativo de Ehrlich) aos tubos para verificar se houve produção de indol.

A oxidação do triptofano presente no meio SIM leva à formação de três principais compostos: indol, escatol e indolacetato.

A adição do reativo de Kovačs resulta na formação de um anel vermelho, resultante da reação entre o indol e o dimetilaminobenzaldeído contido nesse reativo.

Quase a totalidade das salmonelas não produz indol. Segundo Weissfeld *et al* (1994), cerca de 1% das salmonelas produzem indol.

5.7.1.5 Prova da Oxidase

Usando palitos de madeira, de plástico descartáveis ou pipetas Pasteur, estéreis, ou alça de platina, realizar a prova de oxidase espalhando a cultura sobre papel filtro impregnado com o reativo para oxidase, ou sobre tiras de papel para teste de Oxidase, disponíveis comercialmente.

Fazer a leitura em 10 a 20 segundos. Após esse tempo, podem ocorrer reações falso-positivas.

O aparecimento de cor azul (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho intenso (oxalato de para-amino-dimetil-anilina) é indicativo de reação positiva.

Não utilizar alças de níquel-cromo ou alças de aço para realizar a prova de oxidase, pois traços de óxido de ferro na superfície flambada podem produzir reação falso-positiva.

Todas as salmonelas apresentam reação de oxidase negativa.

5.7.2 Provas bioquímicas complementares opcionais

5.7.2.1 Desaminação da fenilalanina

Inocular a superfície do ágar fenilalanina por estriamento.

Incubar a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

Adicionar 2 a 3 gotas de solução de cloreto férrico 10%.

A alteração da coloração da cultura na superfície do bisel para verde indica reação de desaminação da fenilalanina.

Salmonella não desamina a fenilalanina.

5.7.2.2 Reação de Voges-Proskauer

Inocular o caldo VM-VP em duplicata.

O outro tubo deve ser incubado a 22 ± 1°C, por 96 horas.

Adicionar primeiramente 0,6 mL de solução de α-naphtol 5% e, em seguida, 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio 40%.

Agitar os tubos para que haja oxigenação do meio.

Aguardar de 10 a 15 minutos.

A alteração da cor para rosa intenso indica reação de VP positiva.

Hafnia alvei apresenta reação positiva a 22 ± 1°C e resultado variável a 36 ± 1°C.

Salmonella apresenta reação negativa para VP nas duas temperaturas.

5.7.2.3 Detecção da enzima pirrolidona peptidase (PYRase)

A partir das culturas em ágar estoque que apresentaram resultados compatíveis com *Salmonella*, realizar o teste da presença da enzima pirrolidona peptidase (PYRase). Espalhar a cultura suspeita sobre cartão impregnado com ácido L-piroglutâmico, substrato que será hidrolisado pela PYRase, quando produzido pelo microrganismo teste.

Para revelar a hidrólise do ácido L-piroglutâmico, adicionar sobre o cartão algumas gotas de para-dimetilaminocinamaldeído, o que, nos casos positivos, resultará no desenvolvimento de coloração vermelha.

Esta prova destina-se à diferenciação entre *Citrobacter* e *Salmonella*.

Todas as cepas de *Citrobacter* sp produzem a enzima pirrolidona peptidase (reação positiva)

Todas as cepas de *Escherichia coli* e 96% das *Salmonella* não produzem essa enzima (reação negativa).

5.7.3 Comportamentos atípicos de *Salmonella*

Algumas cepas de *Salmonella* podem apresentar as seguintes reações atípicas:

fermentação da lactose (bisel do TSI e KIA ácido);

fermentação da sacarose (bisel do TSI ácido);

não produção de H₂S (SIM sem H₂S, TSI/KIA sem H₂S);

não descarboxilação da lisina (meio ácido);

produção de indol (reação positiva no SIM).

5.8 Reação sorológica frente ao anti-soro polivalente “O”

Ressuspender o cultivo obtido em ágar estoque inclinado (de 18 a 24 horas) em aproximadamente 2 mL de solução salina 0,85%.

Em lâmina de vidro, placa de Petri ou placa de Huddleson, depositar separadamente uma gota de solução salina 2% e uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente “O”, diretamente do frasco.

Em seguida, acrescentar a cada uma delas uma gota da suspensão em teste.

Com movimentos circulares, 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 + anti-soro;

Negativa: ausência de aglutinação em ambas as misturas;

Não específica: presença de aglutinação em ambas as misturas (formas rugosas).

As culturas que apresentem resultados compatíveis com *Salmonella*, porém incapazes de assegurar sua identificação por meio da sorologia, deverão ser reisoladas em ágar não-seletivo e serem novamente submetidas à reação sorológica.

5.9 Provas opcionais

Adicionalmente, podem ser utilizados sistemas miniaturizados de provas bioquímicas para identificação de enterobactérias, aprovados para uso pela CLA/MAPA.

6. RESULTADOS

6.1 Interpretação

Emitir o resultado como positivo para *Salmonella* quando as culturas apresentarem reações típicas nas provas bioquímicas e reação sorológica positiva frente ao anti-soro polivalente “O”.

As culturas que apresentarem perfil bioquímico compatível com *Salmonella* e que não reagirem frente ao anti-soro polivalente “O” ou apresentarem reação inespecífica devem ser identificadas por método molecular ou remetidas para uma Instituição de Referência, para conclusão do resultado.

6.2 Sorotipificação

Remeter as culturas identificadas como *Salmonella* a uma Instituição de Referência no país, designada pela Coordenação de Laboratório Animal (CLA) para sorotipificação.

Manter no laboratório as culturas isoladas de *Salmonella*, adequadamente identificadas. Manter registro de todas as confirmações sorológicas realizadas pela Instituição de Referência.

6.3 Expressão dos resultados

Expressar o resultado como:

Pesquisa de *Salmonella* : PRESENÇA/25 g ou mL; ou

Pesquisa de *Salmonella* : AUSÊNCIA/25 g ou mL

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, R.S.; SILLIKER, J.; BALLELY, J.S. *Salmonella*. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.357-380.

ANDREWS, W.H.; HAMMACK, T.S. *Salmonella*. In: *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>.

BENNETT, A.R.; MaCPHEE, S.; BETTS, R.; POST, D. 1999. Use of pyrrolidonyl peptidase to distinguish *Citrobacter* from *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford. 28: 175-178.

ISO. International Organization for Standardization. International Standard ISO 6579, 3.ed. 1993.

CAPÍTULO XVI

PESQUISA DE *Salmonella* POR SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA (IMS)

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer metodologia analítica para a detecção de *Salmonella* sp., pelo método de separação imunomagnética.

Aplica-se em alimentos de origem animal.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Pré-enriquecimento

Baseia-se na incubação de 25 ± 0,2 g ou 25 ± 0,2 mL da amostra, adicionada de 225 mL do diluente específico para cada caso, a 36 ± 1°C por 16 a 20 horas.

Este procedimento visa minimizar os efeitos do processo tecnológico capaz de promover injúria celular fisiológica, sem inativar biologicamente a célula. Quando é utilizada solução salina peptonada 1% tamponada, o tampão utilizado favorece a manutenção do pH, o que assegura melhor recuperação das células de *Salmonella*.

Para leite em pó, o diluente utilizado é água destilada estéril adicionada de solução de verde brilhante, o que visa inibir o crescimento de bactérias Gram positivas.

2.2 Separação imunomagnética

Baseia-se em duas ações principais: a captura por ligação imunológica e a separação por ação de forças magnéticas. A aplicação destas duas ações leva à obtenção de efeitos de concentração e purificação do microrganismo alvo.

O sistema de separação imunomagnética utiliza microesferas superparamagnéticas cobertas uniformemente com uma fina camada polimérica, biologicamente inerte, que protege o material magnético e oferece uma área de superfície definida para adsorção ou acoplamento de várias moléculas, onde estão ligados anticorpos monoclonais específicos para *Salmonella*.

2.2.1 Lavagem das microesferas (“beads”)

Baseia-se em três passos de lavagem com solução salina tamponada, adicionada de tween 20, realizados com a finalidade de retirar microrganismos inespecificamente ligados às partículas imunomagnéticas.

2.3 Enriquecimento seletivo

Baseia-se na semeadura da alíquota imunomagneticamente separada em meio que contém substâncias de ação impediendo do crescimento para a maioria dos microrganismos interferentes, e incubação em temperatura seletiva de 41 ± 0,5°C por 18 a 24h.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidrarias e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Partículas imunomagnéticas de 280 nm cobertas com anticorpo anti-*Salmonella* (“beads”);

Ágar Rambach;

Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose

(BPLS);

Ágar ferro três açúcares (TSI) ou Ágar ferro dois açúcares Kligler (KIA);

Ágar manitol lisina cristal violeta verde brilhante (MLCB);

Ágar estoque;

Caldo lisina descarboxilase ou Ágar lisina ferro (LIA);

Caldo uréia ou Ágar uréia;

Caldo Rappaport Vassiliadis (RV);

Meio SIM;

Solução salina 0,85%;

Solução salina 2%;

Solução salina peptonada tamponada, pH 7,2 (PBS);

Água destilada estéril;

Solução salina peptonada 1% tamponada;

Ácido clorídrico 0,1N;

Reativo para oxidase (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina ou oxalato de para-amino-dimetil-anilina) ou tiras para teste de oxidase;

Reativo de Kovačs (ou, opcionalmente, reativo de Ehrlich);

Verde brilhante solução aquosa 0,1%;

Cloreto férrico solução aquosa 10%;

Novobiocina solução aquosa 4%;

Soro anti-*Salmonella* polivalente “O”;

Solução salina peptonada 1% tamponada adicionada de 0,02% de tween 20;

Óleo mineral, vaspar ou parafina líquida estéreis.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia;

Misturador de amostras;

Separador imunomagnético;

Pipetadores automáticos ajustáveis (5-50, 50-200, 100-1000 µL) e respectivas ponteiras com barreira.

5. PROCEDIMENTO

5.1 Preparo da amostra

Proceder conforme instruções contidas no Capítulo XV, “Pesquisa de *Salmonella*”, deste Manual.

5.2 Pré-enriquecimento

Proceder conforme instruções contidas no Capítulo XV, “Pesquisa de *Salmonella*”, deste Manual.

5.3 Separação imunomagnética

De cada amostra pré-enriquecida, transferir uma alíquota de 1 mL para tubo eppendorf com tampa apegada, com capacidade de 1,5 mL.

Adicionar a cada eppendorf 20 microlitros de partículas imunomagnéticas de 280nm cobertas com anticorpo específico para *Salmonella* (“beads”).

Após homogeneização por suaves inversões sucessivas do eppendorf, dispor os tubos no equipamento misturador onde deverão permanecer por 30 minutos, em baixa velocidade.

Em seguida colocar os tubos no separador com a barra magnética já acoplada no suporte, onde devem permanecer por 10 minutos.

Sem retirar os tubos do separador magnético, retirar todo o líquido dos tubos eppendorf com o auxílio de pipetas Pasteur, ou descartáveis com bulbo, estéreis, tomando o cuidado para não tocar na parede onde as partículas imunomagnéticas estão aderidas.

Descartar o líquido em recipiente com desinfetante testado e aprovado.

Retirar a barra magnética do suporte do separador.

A cada tubo, adicionar 1 mL de solução salina peptonada 1% tamponada, adicionada de 0,02% de tween 20 e misturar delicadamente por repetidas inversões. Recolocar a barra magnética no suporte do separador e deixar por mais 5 minutos.

Repetir esta operação por mais 2 vezes e finalizar com uma lavagem adicional com PBS, sempre descartando o líquido em recipiente com desinfetante aprovado.

Depois da retirada total do líquido, suspender os “beads” em 20 µL de PBS. Esta será denominada “fração imunomagneticamente separada” ou FIS.

5.4 Enriquecimento seletivo e pré-isolamento

Inocular a FIS, obtida conforme item 5.3, em tubo com 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis.

Incubar os tubos a 41 ± 0,5°C, em banho-maria com agitação ou circulação contínua de água, por 24 a 30 horas.

5.5 Isolamento, seleção e identificação bioquímica e sorológica

Proceder conforme Capítulo XV, “Pesquisa de *Salmonella*”, deste Manual.

6. RESULTADOS

Proceder conforme Capítulo XV, “Pesquisa de *Salmonella*”, deste Manual.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

DYNAL. Cell separation and protein purification - technical handbook. 2 ed. Oslo: DYNAL, 1996. 165p.

ISO. International Organization for Standardization. International Standard ISO 6579, 3.ed. 1993.

OLSVIK, O.; POPOVIK, T.; SKJERVE, E. *et al.* Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology. Clinical Microbiology Reviews, v. 7, p. 43-54, 1994.

SAFARIK, I.; SAFARIKOVÁ, M.; FORSYTHE, S.J. The application of magnetic separations in applied microbiology. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v. 78, p. 576-585, 1995.

CAPÍTULO XVII

PESQUISA DE *Vibrio cholerae*

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a pesquisa de *Vibrio cholerae* em alimentos;

A metodologia para detecção de *Vibrio cholerae* destina-se à verificação da presença deste patógeno em alimentos de origem animal.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Pré-enriquecimento

Baseia-se na recuperação das células, fisiologicamente lesadas ou não, e crescimento em meio não seletivo.

2.2 Etapa presuntiva

Baseia-se no isolamento das colônias em meio sólido seletivo, ágar TCBS, e em meio não seletivo, ágar gelatina, e posterior incubação a 36 ± 1°C, sendo as colônias típicas submetidas à identificação bioquímica.

O ágar TCBS apresenta, em sua composição, elevada concentração de tiosulfato e citrato de sódio, além de ser altamente alcalino, inibindo assim o crescimento das enterobactérias. A bile e o colato de sódio inibem os enterococos. Como indicador de pH, o meio possui o azul de timol e o azul de bromotimol, que provocam a mudança de coloração do meio para amarelo quando da fermentação da sacarose presente no meio, com consequente formação de ácido.

2.3 Provas de identificação

A identificação de *Vibrio cholerae* é feita por meio de provas bioquímicas, sorológicas e tintoriais.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar sal triptona (TIN1);

Ágar ferro dois açúcares (ágar Kligler);

Ágar tiosulfato citrato sacarose sais biliares (ágar TCBS);

Ágar soja triptona (TSA);

Ágar gelatina (AG);

Água peptonada alcalina pH 8,5 ± 0,1;

Caldo peptonado sem sal;

Caldo peptonado sal 3%;

Caldo peptonado sal 6%;

Caldo vermelho de fenol base;

Caldo gelatina fosfato sal (GPS);

Caldo vermelho de fenol manitol;

Caldo vermelho de fenol sacarose;

Meio O/F Hugh-Leifson;

Bacto *Vibrio cholerae* - anti-soro polivalente;

Arabinose;

Desoxicolato de sódio;

L-arginina;

L-inositol;

L-lisina;

L-ornitina;

Manitol;

Manose;

Reativo para oxidase (oxalato de para-amino-dimetilanilina ou N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou tiras para teste de oxidase;

Etanol 96%;

Reagentes para coloração de Gram;

Óleo mineral estéril.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Enriquecimento

Preparar a amostra de acordo com as instruções contidas no Anexo V, “Procedimentos para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

Pesar, separadamente, 25 ± 0,2 g da amostra em dois recipientes estéreis.

Adicionar 225 mL de água peptonada alcalina pH 8,5 a um dos recipientes e 225 mL de caldo gelatina fosfato sal (GPS) ao outro.

Homogeneizar, no máximo por 60 segundos em “stomacher”.

Incubar os caldos a 36 ± 1°C por 6 a 8 horas.

Para amostras de 225 mL, inocular um terceiro recipiente com 25 ± 0,2 g de amostra e 225 mL de água peptonada alcalina pH 8,5, que deverá ser incubado por 6 a 8 horas a 42 ± 0,2°C.

Não agitar os frascos após a incubação.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Inoculação

Após a incubação, com auxílio de alça de níquel-cromo descartável, estéril ou de platina, transferir uma alçada de 3 mm de diâmetro, retirada da superfície de cada cultivo, para placas de ágar tiosulfato citrato sais biliares sacarose (TCBS) e de ágar gelatina (AG).

Incubar as placas em posição invertida a 36 ± 1°C por 24 horas.

5.4 Leitura

Verificar o aparecimento de colônias típicas.

No ágar TCBS, as colônias de *Vibrio cholerae* apresentam-se com coloração amarela, ligeiramente elevadas no centro, com bordas translúcidas e 2 a 3 mm de diâmetro.

Algumas cepas lento-fermentadoras da sacarose se apresentam verdes no TCBS, após 24 horas de incubação.

No ágar gelatina, as colônias de *Vibrio cholerae* apresentam-se como colônias transparentes com uma zona opaca ao seu redor que, geralmente, torna-se mais nítida após alguns minutos sob refrigeração.

5.5 Provas preliminares para a identificação do *Vibrio cholerae*

5.5.1 Preparo do inóculo

Selecionar 3 ou mais colônias de cada placa dos diversos meios.

Repicar cada colônia para um tubo com ágar sal triptona (TIN1) inclinado.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 horas.

5.5.2 “String Test”

Colocar uma gota (grande) de solução de desoxicolato de sódio 0,5 % sobre uma lâmina.

Retirar uma alçada da cultura mantida em TIN1 inclinado (5.5.1) e suspendê-la na gota.

O aparecimento, em cerca de um minuto, de uma massa mucóide, que forma um filamento quando a alça é suspensa a uma altura de 2 a 3 cm da lâmina (“string” test positivo), é presuntivo da presença de *Vibrio cholerae*.

5.5.3 Prova da oxidase

Usando palitos de madeira, de plástico descartáveis ou pipetas Pasteur, estêreis, ou alça de platina, realizar a prova de oxidase espalhando a cultura sobre papel filtro impregnado com o reativo para oxidase, ou sobre tiras de papel para teste de oxidase, comercialmente disponíveis.

Fazer a leitura em 10 a 20 segundos. Após este tempo, podem ocorrer reações falso-positivas.

O aparecimento de cor azul (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho intenso (oxalato de para-amino-dimetilanilina) é indicativo de reação positiva.

Não utilizar alças de níquel-cromo ou alças de aço para realizar a prova de oxidase, pois traços de óxido de ferro na superfície flambada podem produzir reação falso-positiva.

O *Vibrio cholerae* é oxidase positiva.

5.5.4 Coloração de Gram

A partir da cultura mantida em TIN1, fazer um esfregaço e corar pelo método de Gram, de acordo com as instruções contidas no Anexo VII, “Procedimentos de coloração”, deste Manual.

O *Vibrio cholerae* apresenta-se como bastonete Gram negativo, reto ou curvo.

5.5.5 Leitura

Serão consideradas como suspeitas de *Vibrio cholerae* as colônias que forem oxidase positiva, “String Test” positivo e se mostrarem ao microscópio como bastonetes Gram negativos, retos ou curvos.

5.6 Provas para a identificação de *Vibrio cholerae*

5.6.1 Teste do halofilismo

A partir da cultura mantida em TIN1, com auxílio de agulha de níquel-cromo ou de platina, inocular tubos contendo caldo peptonado sem sal, tubos contendo caldo peptonado sal 3% e caldo peptonado sal 6%.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 horas.

Após o período de incubação, observar a presença de turvação nos meios.

O *Vibrio cholerae* cresce na ausência e na presença de 3% de sal e não cresce na presença de 6% de sal.

Esta prova permite a diferenciação entre *Vibrio cholerae* e *Vibrio alginolyticus*, pois o primeiro cresce na ausência de sal, o que não acontece com o segundo.

Observação: Reservar o tubo com o caldo peptonado sal 3%, que servirá de inóculo para outras provas de identificação.

5.6.2 Ágar ferro dois açúcares (Kligler)

A partir das culturas mantidas em TIN1, com auxílio de uma agulha de níquel-cromo ou de platina, inocular o ágar Kligler mediante picada central profunda, estriando na superfície inclinada do bisel.

Incubar a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

Neste meio, o *Vibrio cholerae* fermenta a glicose presente, produzindo a acidificação da base (amarela), sem produção de gás (sem bolhas) nem de H₂S (sem enegrecimento). Por não metabolizar a lactose, produz uma alcalinização no bisel (vermelho).

5.6.3 Fermentação da sacarose

A partir da cultura mantida em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo ou de platina, inocular um tubo contendo caldo vermelho de fenol-sacarose.

Cobrir o meio com 1 a 2 mL de óleo mineral, ou vaselina líquida, estéril.

Incubar a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, devido à fermentação da sacarose e produção de ácido.

O *Vibrio cholerae* fermenta a sacarose.

5.6.4 Descarboxilação da lisina

A partir do inóculo mantido em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, inocular um tubo contendo caldo lisina.

Inocular também um tubo de meio base (sem lisina), que servirá de controle para a produção de ácido a partir da glicose contida no meio.

Cobrir os tubos com 1 a 2 mL de óleo mineral, ou vaselina líquida, estéril.

Incubar a 36 ± 1°C por no máximo 4 dias, juntamente com um tubo de caldo lisina, não inoculado e coberto por óleo, que servirá de controle negativo.

Examinar os tubos todos os dias.

Durante o período de incubação, a cor do meio passa para amarela devido à fermentação da glicose e, ocorrendo a descarboxilação da lisina, o meio retorna à cor púrpura devido à produção de aminas primárias e dióxido de carbono.

O tubo controle, sem aminoácido, deve virar para amarelo e assim permanecer.

O *Vibrio cholerae* descarboxila a lisina.

5.6.5 Leitura

Serão consideradas como suspeitas de *Vibrio cholerae* as colônias que apresentarem as características abaixo, que deverão ser confirmadas por meio de provas adicionais.

Kligler - Bisel vermelho (alcalino)

Kligler - Base amarela sem gás (ácida)

Kligler - Sem enegrecimento (H₂S negativo)

Sacarose - Positiva

Lisina descarboxilase - Positiva

Caldo peptonado sem sal - Crescimento

Caldo peptonado sal 3% - Crescimento

Caldo peptonado sal 6% - Sem crescimento

5.7 Provas adicionais para a identificação do *Vibrio cholerae*

5.7.1 Prova de Hugh-Leifson glicose (Meio O/F)

A partir do inóculo mantido em TIN1, com auxílio de agulha de níquel-cromo ou de platina, inocular dois tubos contendo meio de Hugh-Leifson glicose.

Cobrir um dos tubos com 1 a 2 mL de óleo mineral, ou vaselina líquida, estéril.

Incubar os tubos a 36 ± 1°C por 24 a 48 horas.

Após o período de incubação, verificar a viragem de cor dos meios de verde para amarelo e a presença de gás nos tubos de Durhan.

A cor amarela em ambos significa fermentação da glicose. A presença de cor amarela somente no tubo sem óleo mineral significa utilização oxidativa da glicose.

O *Vibrio cholerae* fermenta a glicose sem produção de gás, por isto ambos os tubos devem apresentar coloração amarela, sem gás.

5.7.2 Prova da fermentação do manitol

A partir da cultura mantida em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo ou de platina, inocular um tubo contendo caldo vermelho de fenol manitol.

Cobrir o meio com 1 a 2 mL de óleo mineral, ou vaselina líquida, estéril.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 a 48 horas.

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, o que indica a fermentação do manitol.

O *Vibrio cholerae* fermenta o manitol.

5.7.3 Prova da fermentação da arabinose

A partir da cultura mantida em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo ou de platina, inocular um tubo contendo caldo vermelho de fenol arabinose.

Cobrir o meio com 1 a 2 mL de óleo mineral, ou vaselina líquida, estéril.

Incubar a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, o que indica a fermentação da arabinose.

O *Vibrio cholerae* não fermenta a arabinose, portanto o meio deve permanecer vermelho.

5.7.4 Prova da fermentação da manose

A partir da cultura mantida em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo, de platina ou descartável estéril, inocular um tubo contendo caldo vermelho de fenol manose.

Cobrir o meio com 2 a 3 mL de óleo mineral, ou vaselina líquida, estéril.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 a 48 horas.

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, o que indica a fermentação da manose.

O *Vibrio cholerae* fermenta a manose.

5.7.5 Prova da fermentação do inositol

A partir da cultura mantida em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo ou de platina, inocular um tubo contendo caldo vermelho de fenol inositol.

Cobrir o meio com 1 a 2 mL de óleo mineral, ou vaselina líquida, estéril.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 a 48 horas.

Após o período de incubação, observar a mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, o que indica a fermentação do inositol.

O *Vibrio cholerae* não fermenta o inositol, portanto o meio deve permanecer vermelho.

5.7.6 Prova da descarboxilação da ornitina

A partir da cultura mantida em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo ou de platina, inocular um tubo contendo caldo ornitina.

Semear também um tubo de meio base (sem ornitina) para controle.

Cobrir os tubos com 1 mL de óleo mineral, ou vaselina líquida, estéril.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por no máximo 4 dias, juntamente com um tubo de caldo ornitina não inoculado e com óleo, que servirá de controle negativo.

Examinar os tubos todos os dias.

Durante o período de incubação, a cor do meio passa para amarela devido à fermentação da glicose, e, ocorrendo a descarboxilação da ornitina, o meio retorna à cor púrpura devido à produção de aminas primárias e dióxido de carbono. O tubo controle, sem aminoácido, deve virar para amarelo e assim permanecer.

O *Vibrio cholerae* descarboxila a ornitina.

5.7.7 Prova da hidrólise da arginina

A partir da cultura mantida em caldo peptonado sal 3%, com auxílio de alça de níquel-cromo ou de platina, inocular um tubo contendo caldo arginina.

Semear também um tubo de meio base (sem arginina) para controle.

Cobrir os tubos com 1 mL de óleo mineral, ou vaselina líquida, estéril.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por no máximo 4 dias, juntamente com um tubo de caldo arginina não inoculado e óleo, que servirá de controle negativo.

Examinar os tubos todos os dias.

Durante o período de incubação, a cor do meio passa para amarela devido à fermentação da glicose e, ocorrendo a hidrólise da arginina, o meio retorna à cor púrpura devido à produção de aminas primárias e dióxido de carbono.

O tubo controle, sem aminoácido, deve virar para amarelo e assim permanecer.

O *Vibrio cholerae* não hidrolisa a arginina, portanto ambos os tubos devem permanecer amarelos.

5.7.8 Leitura

Serão consideradas como suspeitas de *Vibrio cholerae* as colônias que apresentarem as características abaixo, que deverão ser confirmadas por meio do teste sorológico.

Hugh-Leifson (Meio O/F) glicose - Fermentativo

Fermentação do manitol - Positivo

Fermentação da arabinose - Negativo

Fermentação da manose - Positivo

Fermentação do inositol - Negativo

Descarboxilação da ornitina - Positivo

Hidrólise da arginina - Negativo

5.8 Teste sorológico

Marcar duas seções de aproximadamente 1×2 cm no interior de uma placa de Petri ou em uma lâmina de vidro de 2×3 polegadas ou em uma placa Huddleson.

Colocar uma pequena quantidade da cultura, crescida em ágar T1N1 inclinado, diretamente sobre a placa ou lâmina, na região marcada.

Adicionar uma gota de solução salina 0,85% na parte inferior de cada uma das regiões marcadas. Com auxílio de uma alça ou agulha de níquel-cromo ou de platina, suspender a cultura com solução salina em cada seção.

Adicionar uma gota do anti-soro polivalente de *Vibrio cholerae* a uma das seções com a suspensão da cultura e misturar com a alça. A outra seção contendo antígeno é somente um controle de auto-aglutinação.

Observar a reação em 1 minuto contra um fundo escuro. Uma reação positiva é indicada por uma aglutinação rápida e forte.

Enviar as culturas que se comportem como *Vibrio cholerae*, em ágar estoque, para tipificação à Instituição de Referência designada pela CLA.

6. RESULTADO

Serão consideradas como positivas para *Vibrio cholerae* as culturas que apresentarem os resultados esperados tanto nas provas adicionais de identificação quanto no teste sorológico.

Expressar o resultado como:

Pesquisa de *Vibrio cholerae*: Presença/25g ou mL; ou

Pesquisa de *Vibrio cholerae*: Ausência/25g ou mL

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los Alimentos - Técnicas de Análisis Microbiológico. V.1. 2.ed. Acribia, Zaragoza - Espanha. ELLIOT, E.L.; KAYSNER, C.A.; JACKSON, L. e CEBULLE, T.A. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and Others *vibrio* spp. In Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>.

KAYSNER, C.A.; DePAOLA, A. *Vibrio*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 ed. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), Washington: American Public Health Association, 2001, p. 405 - 420.

CAPÍTULO XVIII

PESQUISA DE *Escherichia coli* O157:H7

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento analítico para a pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos e água.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Enriquecimento seletivo

Baseia-se na incubação de $25 \pm 0,2$ g ou mL da amostra em solução salina peptonada tamponada adicionada de vancomicina, cefixime e cefsulodin (SPT-VCC), por 6 horas em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

O efeito seletivo é exercido pela associação de vancomicina, cefixime e cefsulodin, que visa à inibição da flora acompanhante, especialmente *Proteus* sp e *Aeromonas* sp.

2.2 Separação imunomagnética

Baseia-se em duas ações principais: a captura por ligação imunológica e a separação por ação de forças magnéticas. A aplicação dessas duas ações leva à obtenção de efeitos de concentração e purificação do microrganismo-alvo.

O sistema de separação imunomagnética utiliza microesferas superparamagnéticas cobertas uniformemente com uma fina camada polimérica, biologicamente inerte, que protege o material magnético e oferece uma área de superfície definida para adsorção ou acoplamento de várias moléculas onde estão ligados anticorpos policlonais anti-*E.coli* O157. Na língua inglesa, estas microesferas são denominadas de "beads".

2.2.1 Lavagem das microesferas

Baseia-se em três passos de lavagem com solução salina tamponada, adicionada de tween 20, realizados com a finalidade de retirar microrganismos inespecificamente ligados às partículas imunomagnéticas.

2.3 Isolamento

Baseia-se na semeadura da alíquota imunomagneticamente separada sobre a superfície seca de ágar MacConkey Sorbitol (MCS), o que permite que as células aderidas às microesferas formem colônias.

Normalmente mais de uma célula se adere a cada partícula imunomagnética, o que pode resultar em colônias originárias de mais do que uma célula aderida.

No ágar MCS, o efeito seletivo é exercido pelos sais biliares e pelo cristal violeta presentes no meio, que atuam inibindo a flora Gram positiva. A fermentação do sorbitol é evidenciada pela viragem da cor do indicador de pH (vermelho neutro) para vermelho intenso.

2.4 Identificação bioquímica

Baseia-se na inoculação das culturas suspeitas em uma bateria miniaturizada de testes padronizados. Os microtubos, contendo substratos desidratados para cada teste, são reidratados pela adição da suspensão do microrganismo teste em diluente específico para esta finalidade.

Durante a incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, devido ao metabolismo bacteriano, ocorrem mudanças de coloração dos indicadores contidos no substrato.

Em alguns testes, a leitura final somente se realiza após a adição de reativos específicos.

2.5 Látex teste

O látex-teste para identificação de *Escherichia coli* O157 consiste de dois reagentes à base de látex. O primeiro é formado por partículas de látex, cobertas com anticorpo específico produzido em coelho (látex reagente); o segundo é o reagente controle, que é formado por partículas de látex, cobertas com globulinas de coelho pré-imune (látex controle). Quando cultivos de *Escherichia coli* O157 são submetidos ao látex-teste, ocorre aglutinação do látex-reagente e não do látex-controle.

2.6 Provas complementares

Outras provas complementares são realizadas com a finalidade de identificar e diferenciar *Escherichia coli* O157:H7 de outros membros de sua espécie, tais como motilidade, produção de α -D-glicuronidase, e fermentação de carboidratos.

A verificação da produção de α -hemolisina destina-se à obtenção de um indicativo sobre a verocitotoxigenicidade do isolado, já que existe uma forte correlação positiva entre a produção desta hemolisina e de verotoxina.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e outros materiais básicos para laboratórios de microbiologia de alimentos;

Ágar MacConkey-sorbitol (MCS);

Ágar eosina azul de metileno (EMB);

Ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA);

Ágar soja triptona, com CaCl_2 e eritrócitos lavados de carneiro (ASSTCA);

Ágar soja triptona;

Ágar estoque;

Ágar motilidade;

Solução salina peptonada tamponada com vancomicina, cefsulodin e cefixime (SPT - VCC);

Caldo verde brilhante-bile-lactose 2% - metilumbeliferil-glicuronídeo (BRILA-MUG);

Caldo verde brilhante-bile-lactose 2%;

Caldo vermelho de fenol-base;

Caldo soja triptona;

Caldo EC modificado com novobiocina (Caldo EC + n);

Solução salina tamponada pH 7,2;

Solução salina tamponada 1% adicionada de 0,02% de tween

20;

Solução salina 0,85%;

Solução salina peptonada 0,1%;

Meio SIM;

Solução aquosa de Vancomicina 0,8%;

Solução aquosa de Cefsulodin 1%;

Novobiocina;

Solução aquosa de Cefixime 1%;

Solução de Sorbitol 10%;

Solução de Celobiose 10%;

Solução de Dulcitol 10%;

Reativo para oxidase (N'N'N'-tetrametil-parafenileno-diamina ou oxalato de para-amino-dimetilanelina) ou tiras para teste de oxidase;

Cloreto férrico;

Reativo de Kovačs(ou, opcionalmente, reativo de Ehrlich);

Hidróxido de potássio;

Alfa naftilamina 0,5%;

Alfa naftol;

Ácido sulfanílico 0,8%;

Solução aquosa de Cloreto de Cálcio 10 mmol;

Partículas imunomagnéticas de 280nm cobertas com anticorpo anti-*Escherichia coli* O157;

Sistema miniaturizado para identificação de Enterobactérias.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios para laboratórios de microbiologia;

Câmara UV (366 nm);

Misturador de Amostras;

Separador Imunomagnético;

Pipetadores automáticos ajustáveis (5-50, 50-200, 100-1000 μL) e ponteiros correspondentes, com barreira.

5.PROCEDIMENTOS

5.1 Pesagem e preparo da amostra

Pesar asepticamente $25 \pm 0,2$ g ou pipetar $25 \pm 0,2$ mL de amostra em sacos de "stomacher" ou frascos Erlenmeyer estéreis, seguindo as orientações contidas no Anexo II, "Diluições e soluções", deste Manual.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Pré-enriquecimento

A cada alíquota adicionar 225 mL de SPT-VCC e incubar por 6 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.4 Separação imunomagnética

Após as 6 horas de incubação, de cada amostra pré-enriquecida, transferir 1 mL para tubo eppendorf com tampa apitada. Adicionar a cada eppendorf 20 μL de "beads" 280nm cobertas com anticorpo policlonal anti-*Escherichia coli* O157.

Após homogeneização, por suaves inversões sucessivas do eppendorf, dispor os tubos no equipamento misturador onde deverão permanecer por 30 minutos em baixa velocidade.

Em seguida, colocar os tubos no separador com suporte magnético já acoplado, onde devem permanecer por 5 minutos.

Sem retirar os tubos do separador magnético, extrair todo o líquido dos tubos eppendorf, com o auxílio de pipetas Pasteur ou descartáveis com bulbo, estéreis, tomando o cuidado para não tocar na parede onde as partículas imunomagnéticas estão aderidas.

Descartar o líquido em recipiente com desinfetante.

Retirar o suporte magnético do separador. A cada tubo, adicionar 1 mL de solução salina peptonada 1% tamponada - 0,02% de tween 20 e misturar delicadamente por repetidas inversões.

Recolocar o suporte magnético no separador e deixar por mais 5 minutos.

Repetir esta operação por mais 2 vezes e finalizar com uma lavagem adicional com PBS sem tween, sempre descartando o líquido em recipiente com desinfetante.

Depois da retirada total do líquido, suspender os "beads" em 20 μL de PBS. Esta será denominada "fração imunomagneticamente separada" ou FIS.

5.5 Semeadura, seleção e isolamento

Inocular no centro de uma placa com ágar MCS, previamente seca, 10 μL da FIS. Espalhar com auxílio de Drigalski ou bastão tipo "hokey".

Partindo dos 10 μL restantes da FIS, inocular com alça de 1 μL sobre outra placa com ágar MCS, de forma a obter colônias isoladas.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 30 horas.

Utilizando estereoscópio com luz oblíqua incidente sobre a colônia, selecionar de 3 a 5 colônias sorbitol negativas com superfície suavemente ondulada, com bordas em forma de "saia", irregulares, achatadas, e repicar em placas com ágar VRBA e ágar BEM. Também repicar para tubos com ágar estoque inclinado.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24h. Após o período de incubação, observar a pureza e características das culturas e, quando necessário, reisolador em superfície seca de ágar MCS.

Quando, após dois procedimentos de reisolamento, não forem obtidos cultivos puros, repicar para tubos com caldo EC+n, ou com caldo verde brilhante bile lactose 2% e incubar por 18 a 24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, inoculando posteriormente sobre a superfície seca de ágar MCS e de ágar EMB, independentemente da produção de gás nos tubos de Durhan.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Utilizando estereoscópio com luz oblíqua incidente sobre a colônia, selecionar de 3 a 5 colônias sorbitol negativas com superfície suavemente ondulada, com bordas em forma de "saia", irregulares, achatadas, e repicar em placas com ágar VRBA e ágar EMB.

Também repicar para tubos com ágar estoque inclinado.

Incubar a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

5.6 Teste da oxidase

A partir dos cultivos puros em ágar estoque inclinado, usando palitos de madeira estéreis ou de plástico descartável, alça de platina ou pipeta de Pasteur, realizar a prova da oxidase espalhando a cultura sobre papel filtro impregnado com o reativo para oxidase

com também ser utilizadas tiras para oxidação, comercialmente disponíveis).

O aparecimento de cor azul intensa (N,N,N,N-tetrametil-parafenileno-diamina) ou vermelho escuro (oxalato de para-amino-dimetilanilina) é indicativo de reação positiva.

Não utilizar alças de níquel-cromo ou de aço para realizar a prova de oxidação.

Todas as cepas de *Escherichia coli* O157:H7 apresentam resultado negativo na prova de oxidação.

As culturas que apresentam resultado positivo não pertencem à família *Enterobacteriaceae*, portanto não necessitam ser submetidas a testes complementares para *Escherichia coli* O157:H7.

5.7 Teste de aglutinação de látex

Submeter as culturas puras obtidas conforme item 5.5 ao teste de aglutinação de látex, suspendendo-as em duas gotas de solução salina colocadas sobre o cartão de teste que acompanha o kit.

A primeira, misturar uma gota do látex reagente e sobre a outra uma gota do látex controle. Misturar por um minuto e observar aglutinação.

Considerar como positivas as culturas que, em um minuto ou menos, apresentarem aglutinação apenas no látex reagente. Para os controles positivo e negativo, utilizar os controles que acompanham o kit.

As culturas que apresentarem resultado negativo no teste de aglutinação de látex devem ser descartadas.

5.8 Testes adicionais

5.8.1 Verificação da motilidade das culturas suspeitas

A partir das culturas puras, em ágar estoque inclinado, que apresentarem reação positiva frente ao látex reagente e negativa frente ao látex controle, repicar para tubos contendo ágar motilidade modificado, utilizando agulha de inoculação.

Incubar a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas. Observar o tipo de crescimento: difuso (motilidade positiva) ou apenas na linha de inoculação (motilidade negativa).

As cepas de *Escherichia coli* O157:H7 apresentam motilidade positiva, enquanto que a *E.coli* ATCC 25922 apresenta motilidade negativa.

5.8.2 Verificação da produção de â-D-glicuronidase e de gás em caldo BRILA-MUG.

A partir das culturas isoladas conforme item 5.5, repicar para tubos com caldo verde brilhante bile-lactose-metilumbeliferil-glicuronídeo (BRILA-MUG), com tubos de Durhan invertidos.

Incubar a 36 ± 1°C por 24 a 48 horas.

Observar a produção de gás nos tubos de Durhan. Anotar os resultados.

Em câmara de UV (366nm), verificar a formação de 4-metilumbeliferona a partir do MUG. Considerar como positivo para â-D-glicuronidase as culturas que produzirem fluorescência no meio de cultura.

A *Escherichia coli* O157:H7 não produz â-D-glicuronidase, portanto não se observa fluorescência no caldo BRILA-MUG.

A *Escherichia coli* ATCC 25922 produz fluorescência (reação positiva) neste meio.

OBS.: A cultura de *E.coli* O157:H7 ATCC 43888 (não toxigênica) não produz gás no caldo verde brilhante lactose 2%, enquanto que as *E.coli* O157:H7 verotoxigênicas ATCC 43889, ATCC 43890 e ATCC 43894 são capazes de produzir gás neste meio.

5.8.3 Verificação da fermentação do sorbitol, da celobiose e do dulcitol

A partir das culturas isoladas conforme item 5.5, repicar para tubos contendo 3 mL de caldo vermelho de fenol base adicionado, separadamente, de sorbitol, celobiose e de dulcitol (esterilizados por filtração), de forma a obter uma concentração final do açúcar de 0,1%.

Incubar os tubos a 36 ± 1°C por 24 a 30 horas. Após incubação, observar a produção de ácido, evidenciada pela viragem do indicador vermelho de fenol para amarelo nas culturas fermentadoras dos açúcares presentes.

Os resultados esperados estão na tabela abaixo:

| Cultura | Sorbitol | Celobiose | Dulcitol |
|---------------------------------|----------|-----------|----------|
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 | - | - | + |
| <i>Escherichia hermannii</i> | - | + | -/+ |
| <i>Escherichia fergusonii</i> | - | + | ± |
| <i>Escherichia coli</i> | + | -* | ± |

± : 60% são pos. -/+ : 19% são positivas -*: 2% são positivas

5.8.4 Verificação da produção de enterohemolisina

A partir das culturas puras obtidas conforme item 5.5, repicar em estrias para a superfície seca de ágar soja triptona, com cloreto de cálcio e eritrócitos de carneiro (ASSTCa). Para preparar o ASSTCa, a cada 100 mL de ágar soja triptona adicionar 1 mL CaCl₂ 1M e 5 mL de eritrócitos lavados de carneiro.

Incubar a 36 ± 1°C por 4 horas. Verificar atividade hemolítica e registrar os resultados obtidos. Reincubar até 24 horas repetindo a leitura.

Considerar como positivas para produção de enterohemolisina as culturas que não produzirem hemólise em 4 horas e apresentarem reação hemolítica característica de alfa-hemolisina (coloração esverdeada ao redor das colônias) após 24 horas de incubação.

A grande maioria das cepas de *Escherichia coli* O157:H7 verotoxigênicas são alfa-hemolíticas.

5.9 Provas Opcionais

Adicionalmente, podem ser utilizados sistemas miniaturizados de provas bioquímicas para identificação de enterobactérias, aprovados para uso pela CLA/MAPA.

5.9.1 Sistema miniaturizado para identificação de enterobactérias

Repicar, para tubos com ágar estoque inclinado, as culturas que apresentaram reação positiva frente ao látex reagente, negativas frente ao látex controle, motilidade positiva, β-D-glicuronidase negativa, com ou sem produção de gás a partir da lactose, não fermentadoras do sorbitol e da celobiose, e capaz de fermentar o dulcitol. Incubar a 36 ± 1°C por 18 a 24 horas.

Seguir as recomendações do fabricante do sistema utilizado.

6. RESULTADOS

Considerar o resultado positivo para *Escherichia coli* O157:H7 as amostras em que os isolados se comportarem como abaixo descrito:

a) Colônia característica de *E.coli* em VRBA e BEM;

b) Sorbitol negativo no MCS;

c) Celobiose negativa no caldo vermelho de fenol;

d) Dulcitol positivo no caldo vermelho de fenol;

e) Sorbitol negativo no caldo vermelho de fenol;

f) Aglutinação positiva frente ao látex reagente em um minuto;

g) Aglutinação negativa frente ao látex controle;

h) Motilidade positiva.

i) â-D-glicuronidase negativa

j) Não hemolítica em 4 horas

k) Alfa-hemolítica em 24 horas (presuntivo para verotoxina)

l) Perfil bioquímico correspondente a *Escherichia coli* no sistema para identificação de enterobactérias.

As culturas que se comportarem como *Escherichia coli* O157:H7 devem ser mantidas pelo laboratório e encaminhadas à Instituição de Referência para enterobactérias, designada pela CLA para sorotipificação, inclusive com soro flagelar H7, e teste de verotoxigenicidade.

Os resultados de confirmação sorológica e de verotoxigenicidade podem demorar um tempo relativamente grande. Por este motivo, emitir o resultado de análise considerando os resultados obtidos no laboratório. Quando o resultado sorológico confirmar a presença de *E.coli* O157:H7 (verotoxigênica ou não), comunicar por escrito ao responsável pelo SIF que encaminhou a amostra para análise.

Manter arquivo de todas informações sorológicas realizadas pela Instituição de Referência.

6.1 Expressão do resultado

Expressar o resultado como:

Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7 - Presença /25 g ou mL; ou

Pesquisa de *Escherichia coli* O157:H7 - Ausência/25 g ou mL.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BENNETT, A.R.; MacPHEE, S. BETTS, R.P. The isolation and detection of *Escherichia coli* O157:H7 by use of immunomagnetic separation and immunoassay procedures. Letters in Applied Microbiology. Oxford; v. 22, p. 237-243, 1996.

BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M.A.; OSKOV, I. *et al.* Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology. Washington; v. 27, p. 2559-2564, 1989.

CHAPMAN, P.A. Evaluation of commercial latex slide test for identifying *Escherichia coli* O157. Journal of Clinical Pathology. London, v. 42, p. 1109-1110, 1989.

CUBBON, M.D.; COIA, J.E.; HANSON. M.F. *et al.* A comparison of immunomagnetic separation, direct culture and polymerase chain reaction for the detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in human faeces. Journal of Medical Microbiology. Essex, v.44, p. 219-222, 1996

DYNAL(a). Cell separation and protein purification - technical handbook. 2 ed. Oslo: DYNAL, 1996. 165p.

DYNAL(b). Testing food sample for *Escherichia coli* O157:H7 - IMS vs direct plating. Oslo: DYNAL, 1996.

FRATAMICO, P.M.; SCHULTZ, F.J.; BUCHANAN, R.L. Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of foods using an immunomagnetic separation method. Food Microbiology, London, v. 9, p. 105-113, 1992.

MARCH, S.B.; RATNAM, S. Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O157. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 27, p. 1675-1677, 1989.

OLSVIK, O.; POPOVIK, T.; SKJERVE, E. *et al.* Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 7, p. 43-54, 1994.

SAFARIK, I.; SAFARIKOVÁ, M.; FORSYTHE, S.J. The application of magnetic separations in applied microbiology. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v. 78, p. 576-585, 1995.

WRIGHT, D.J.; CHAPMAN, P.A.; SIDDON, C.A. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. Epidemiology and Infection, Cambridge, v. 113, p. 31-39, 1994.

CAPÍTULO XIX

PESQUISA DE *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer metodologia analítica para a detecção de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (referido no restante do texto como *P. larvae*), agente da enfermidade Cria Pútrida Americana. A metodologia destina-se à verificação da presença de esporos do agente em amostras de produtos da colméia.

2. FUNDAMENTOS

2.1 Preparo da Amostra

O aquecimento da amostra a 45°C visa diminuir a viscosidade, permitir a distribuição homogênea dos esporos e facilitar a manipulação. A diluição com solução salina tamponada, além de viabilizar a concentração dos esporos pela centrifugação que se segue, contribui para bloquear parcialmente a ação inibidora de crescimento bacteriano, exercida por substâncias presentes no mel.

2.2 Centrifugação

Visa concentrar os esporos presentes na amostra por meio de centrifugação a 3.000 x g por 30 minutos (g = 0, 0000118 x raio do rotor (cm) x rpm²).

2.3 Choque Térmico

Por meio do aquecimento, a 80°C por 10 min., do sedimento da amostra obtido por centrifugação, obtém-se a eliminação das formas vegetativas de bactérias que podem interferir no crescimento de *Paenibacillus larvae* e dificultar a seleção de colônias.

2.4 Isolamento e Seleção

Baseia-se na semeadura sobre a superfície seca de ágar *Paenibacillus larvae* (ABL), meio composto por ágar estoque, ágar soja triptona, ágar Cereus (PEMBA) - base, suplementado com emulsão de gema de ovo, ácido nalidíxico e ácido pipemídico. A emulsão de gema de ovo promove a multiplicação de *P.larvae* e permite a diferenciação de microrganismos pela reação da lecitinase. A presença de 0,1% de peptona, associada ao piruvato de sódio (presentes no PEMBA), evidencia a precipitação da lecitina da gema do ovo, provocada por espécies de *Bacillus* que possuem essa propriedade. O manitol, carboidrato presente no meio, não é fermentado pelo *Paenibacillus larvae*. O indicador de pH presente no meio é o azul de bromotimol. O ácido nalidíxico atua inibindo total ou parcialmente o crescimento de *P. alvei*, *B. megaterium*, *P.larvae* subsp. *pulvificiens*, *P. polymyxa* e *B. pumilus*. O ácido pipemídico atua prevenindo o crescimento de *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *P.larvae* subsp. *pulvificiens* e *P. apiarius*.

2.5 Provas confirmativas

Baseiam-se na observação das características morfológicas e tintoriais; na observação da capacidade de decompor a caseína; na incapacidade de produzir catalase; no crescimento escasso em ágar nutriente isento de extrato de levedura e no crescimento típico no ágar leite com tiamina (ALT).

3.REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia;

Tubos para centrífuga tipo Falcon ou similar, com tampa rosqueável, cap. 100 mL;

Ágar cereus (PEMBA) - base* (opcional: ágar manitol gema de ovo poliximina segundo Mossel (MYP) - base);

Ágar estoque*;

Ágar soja triptona*;

Emulsão de gema de ovo 50%*;

Ácido pipemídico solução 0,2%*;

Ácido nalidíxico solução 0,1%*;

Tiamina cloridrato solução aquosa 0,1%**;

Leite desnatado UHT**;

Ágar ágar com extrato de levedura**;

Ágar nutriente sem extrato de levedura;

Caldo cérebro-coração com tiamina (BHIT);

Solução salina fosfatada tamponada pH 7,2 (PBS);

Peróxido de hidrogênio 3%;

Caldo experimental para anaeróbios;

* Componente do ágar *Bacillus larvae* (ABL);

** Componente do ágar leite com tiamina (ALT).

4. EQUIPAMENTOS

Centrífuga (3.000 x g);

Banho-maria a 80°C;

Termômetro 100°C.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Preparo da amostra

Mel e produtos "in natura": Aquecer a amostra em banho-maria a 45°C para facilitar a manipulação da mesma e a homogeneização dos esporos presentes.

Transferir, asepticamente, 20 mL da amostra para tubo de centrífuga estéril e adicionar 30 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS).

Homogeneizar bem.

Produtos da colméia liofilizados: pesar, asepticamente, 5g do produto em tubo de centrífuga estéril e adicionar 45 mL de PBS. Deixar em repouso por 10 a 15 min. Homogeneizar bem.

Pólen: pesar, asepticamente, 5g da amostra e adicionar 45 mL de PBS misturando vigorosamente. Filtrar a mistura em papel filtro nº 2 (Whatman). Deixar em repouso por 2 horas para decantação do pólen residual. Transferir cuidadosamente para tubos de centrífuga estéreis com tampa.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Concentração por centrifugação

Centrifugar a 3.000x g por 30 minutos.

Após centrifugação, descartar cuidadosamente o sobrenadante.

Ressuspender o sedimento em 1 mL de PBS e transferir para tubos com tampa de rosca. Aquecer a 80°C, em banho-maria, por 10 minutos.

5.4 Isolamento

Transferir 0,1 mL da suspensão preparada conforme item 5.3 para a superfície seca de placas com ABL. Com o auxílio de bastão tipo "hockey", espalhar cuidadosamente o inóculo sobre a placa.

Paralelamente, usando alça de 10 µL, inocular a suspensão por estrias sobre a superfície seca de outra placa com ABL.

Incubar as duas placas invertidas a 36 ± 1°C por até 5 dias, observando, após 48h e depois diariamente, o crescimento de colônias típicas de *Paenibacillus larvae*.

No ABL, as colônias típicas de *Paenibacillus larvae* se apresentam planas, com superfície suavemente granulada, achatadas, com ou sem centro elevado de maior densidade, com bordas levemente irregulares, sem brilho, de cor verde- amarelada e diâmetro de 2 a 5 mm, sem halo de precipitação da lecitina, com ou sem halo de lipólise.

Alguns isolados podem apresentar colônias com centro muitas vezes mais denso (opaco) que as bordas (translúcidas).

5.5 Seleção

Selecionar 3 a 10 colônias típicas e testar quanto à presença de catalase.

5.5.1 Prova da Catalase

Com auxílio de uma alça de platina, bastão de vidro, palito de madeira ou pipeta de Pasteur estéreis, retirar uma alíquota do cultivo, transferir para uma lâmina ou placa de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Misturar o inóculo ao peróxido e observar a reação.

A não formação de borbulhas indica prova negativa para catalase.

A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase.

As culturas de *Paenibacillus larvae* são catalase negativas. Repicar as colônias catalase negativas para tubos contendo ágar leite com tiamina inclinado e incubar a 36 ± 1°C por 24 a 48 h. Manter essas culturas para testes complementares, caso sejam necessários.

5.6 Provas Confirmativas

Realizar as provas confirmativas completas em cada uma das colônias catalase negativas.

5.6.1 Coloração de Gram

Das colônias suspeitas, fazer esfregaço e corar pelo método de Gram.

O *P.larvae* se apresenta como bastonete Gram positivo, comumente longo e fino, porém, pode se apresentar de diversos tamanhos, em cadeias de comprimento variável.

As culturas que se apresentarem como suspeitas no Gram e catalase negativas devem ser testadas para:

5.6.2 Crescimento em superfície de ágar nutriente sem extrato de levedura

A partir das colônias catalase negativas, repicar também em tubos com ágar nutriente inclinado isento de extrato de levedura e incubar a 36 ± 1°C por 3 dias.

A maioria dos *Paenibacillus larvae* apresenta escasso crescimento em ágar nutriente sem extrato de levedura após 3 dias.

5.6.3 Decomposição da caseína e verificação de crescimento típico no ALT

A partir das colônias catalase negativas, repicar sobre a superfície seca de placas com ágar leite com tiamina (ALT) e incubar a 36 ± 1°C por 3 dias.

Após incubação, verificar a presença de halo transparente ao redor das colônias.

O *Paenibacillus larvae* decompõe a caseína em até 3 dias. As colônias de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no ALT se apresentam de coloração entre branco e gelo, de aspecto sutil e delicado (pouco densas).

Diferenciação entre *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e outros microrganismos relacionados comumente encontradas em amostras de produtos apícolas.

| Microrganismos | Decomposição da caseína | Catalase | Crescimento em Ágar nutriente sem extrato de levedura |
|--|-------------------------|----------|---|
| <i>P.larvae</i> subsp. <i>larvae</i> | POS * | NEG | NEG ou escasso |
| <i>Paenibacillus alvei</i> | POS | POS | POS |
| <i>Brevibacillus laterosporus</i> | POS | POS | POS |
| <i>P.larvae</i> subsp. <i>Pulvifaciens</i> | POS | NEG | POS |
| <i>Paenibacillus popilliae</i> | NEG | NEG | NEG |
| <i>Paenibacillus lentimorbus</i> | NEG | NEG | NEG |

Associado ao crescimento característico no ALT.

6. RESULTADOS

6.1 Interpretação

Considerar como *P.larvae* subsp. *larvae* as culturas que se apresentarem como bastonetes Gram positivos finos, médios a longos, dispostos em cadeias, catalase negativas, com reação positiva para hidrólise da caseína associada ao crescimento típico no ALT, e com crescimento escasso no ágar nutriente sem extrato de levedura em 3 dias.

6.2 Expressão do Resultado

Expressar o resultado das análises de mel como:

Pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*: Presença / 20 mL de mel; ou

Pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*: Ausência / 20 mL de mel.

Para outros produtos da colméia expressar o resultado como: Presença (ou Ausência) / quantidade de amostra submetida à análise.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

SCHUCH, D.M.T.; MADDEN, R.H.; SATTLER, A. 2001. An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey J. Apicult. Res., 40(2): 59-64.

GOCHNAWER, T. A., CORNER, J. 1974. Detection and identification *Bacullis larvae* in a commercial pollen samples. J. Apicult. Res. 13: 264-267.

DSMZ - Deutsche Sammlungen von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Bacterial Nomenclature Up-to-Date - (Approved Lists, Validation Lists). Nov. 2002. Braunschweig, Germany.Disponível In: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>

CAPÍTULO XX

TESTE DE ESTERILIDADE COMERCIAL PARA ALIMENTOS DE BAIXA ACIDEZ - pH ≥ 4,6

1. OBJETIVOS E ALCANCE

Estabelecer procedimento para a verificação da eficácia do processo de esterilização aplicado a alimentos de baixa acidez, comercialmente estéreis;

Aplica-se a amostras de alimentos comercialmente estéreis de baixa acidez (enlatados).

2. FUNDAMENTOS

Pré-incubação:

Baseia-se na incubação das amostras nas temperaturas de 36 ± 1°C pelo período de 10 dias e a 55 ± 1°C pelo período de 5 a 7 dias, objetivando a detecção de crescimento bacteriano com formação de gás, evidenciado pelo tufamento da embalagem e na verificação de possíveis microfugas.

2.1 Semeadura e incubação

Baseia-se na utilização de meios líquidos não seletivos com capacidade de promover o crescimento de microrganismos por meio da incubação em aerobiose e anaerobiose, em temperaturas ideais para o desenvolvimento de microrganismos mesófilos e termófilos.

2.2 Provas complementares

2.2.1 Coloração pelo método de Gram e de esporos

Baseia-se na observação microscópica das características morfológicas e tintoriais dos microrganismos presentes e de seus esporos.

Prova da Catalase

Baseia-se na verificação da capacidade do microrganismo em teste produzir a enzima catalase, que decompõe o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, o que é evidenciado por meio da formação de borbulhas.

2.2.3 Prova da termofilia estrita

Baseia-se na verificação da germinação e crescimento dos esporos nas temperaturas de 36 ± 1°C e 55 ± 1°C para certificação da exigência absoluta de elevada temperatura para seu desenvolvimento.

A germinação dos esporos a 36 ± 1°C indica a capacidade mesofílica do microrganismo.

O crescimento a 36 ± 1°C e a 55 ± 1°C indica a capacidade termofílica facultativa do microrganismo.

O crescimento somente a 55 ± 1°C indica a capacidade termofílica estrita do microrganismo.

3. REAGENTES E MATERIAIS

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos;

Equipamentos, vidraria e outros;

Abridores metálicos estéreis;

Pinças estéreis;

Caldo de carne cozida (CCC) ou Caldo Tarozzi;

Caldo glicose triptona;

Ágar glicose triptona;

Ágar nutriente;

Ágar nutriente com sulfato de manganês;

Ágar para esporulação;

Ágar cérebro-coração (ABHI);

Corantes para a coloração de esporos;

Corantes para a coloração de Gram;

Peróxido de hidrogênio 3%;

Vaspar ou vaselina ou óleo mineral ou parafina líquida.

4. EQUIPAMENTOS

Equipamentos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Pré-incubação

Seguir os procedimentos para pré incubação no item 3.1.1 do Anexo V, “Procedimento para o preparo, pesagem e descarte de amostras”, deste Manual.

Verificar, após o período de pré-incubação a 36 ± 1°C e 55 ± 1°C, se os recipientes não sofreram tufamento. Verificar se o papel filtro apresenta manchas que possam evidenciar a presença de microfugas ou vazamentos.

Registrar como “sem alteração” quando não se observar qualquer alteração dos recipientes e como “alterado” quando qualquer alteração for detectada. Descrever a alteração, quando ocorrer.

5.1.1 Amostras que sofreram alteração durante a pré-incubação

Ao final da pré-incubação, quando o papel filtro sobre o qual ficaram incubadas as latas estiver manchado, evidenciando a presença de microfugas, submeter a respectiva amostra à análise de aeróbios e anaeróbios, mesófilos ou termófilos, de acordo com a temperatura da pré-incubação. Proceder conforme item 5.3 para a análise destas amostras.

5.2 Procedimentos de controle

Aplicar os procedimentos de controle específicos estabelecidos pelo laboratório.

5.3 Amostras tufadas

As amostras que derem entrada no laboratório com evidências de tufamento e estiverem acompanhadas de ofício com solicitação de análise especial serão analisadas imediatamente, devendo ser preparadas conforme as instruções descritas abaixo:

Fazer desinfecção da embalagem com algodão embebido em solução desinfetante e em seguida com etanol 70% ou etanol 70° GL.

Deixar secar.

Posicionar a lata com borda não codificada para cima e costura lateral voltada para o lado oposto ao analista.

Colocar um chumaço de algodão embebido em solução desinfetante, previamente aprovada pelos testes do laboratório, no local onde será iniciada a abertura da embalagem. Esse procedimento tem o objetivo de proteger o ambiente e o analista contra uma possível contaminação proveniente do alimento em análise pela expulsão de gases e/ou líquidos presentes no recipiente no momento do rompimento da hermeticidade. Outros cuidados como o uso de luvas, máscara, toucas, etc. também deverão ser adotados.

Usando um abridor de latas metálico, previamente esterilizado, abrir um pequeno orifício sob o chumaço de algodão.

Deixar em repouso sem retirar a proteção de algodão sobre o orifício até que a pressão interna do produto esteja equilibrada com a externa.

Com outro abridor estéril, abrir cuidadosamente a lata e transferir porções do conteúdo, tomadas do lado oposto ao local do orifício inicialmente feito, para os meios de cultivo indicados.

Após a retirada das alíquotas estabelecidas pela metodologia específica, fechar cuidadosamente a lata e acondicioná-la em saco plástico autoclavável, fechando-o com fita adesiva. A amostra, assim embalada, deverá ser imediatamente descartada conforme norma específica do laboratório.

As amostras alteradas que chegarem desacompanhadas de ofício com solicitação específica não serão analisadas. Fazer constar no Certificado Oficial de Análise a informação do motivo da não aceitação.

Não flambar os recipientes tufados. Os mesmos deverão ser somente desinfetados com algodão embebido em solução desinfetante.

Manter registros das condições das amostras no momento da sua recepção no laboratório.

5.4 Inoculação das amostras

Utilizando a amostra incubada a 36 ± 1°C, retirar alíquotas de cerca de 1 a 2 gramas ou mL e semear em quatro tubos contendo caldo de carne cozida ou caldo Tarozzi, e também em quatro tubos contendo caldo glicose triptona.

Após a inoculação das amostras, acrescentar, assepticamente, sobre o caldo de carne cozida ou caldo Tarozzi uma camada de aproximadamente 2 cm de vaspar ou vaselina ou óleo mineral ou parafina líquida, estéril, previamente fundido.

5.5 Incubação

Incubar dois tubos de cada meio nas temperaturas de 36 ± 1°C e 55 ± 1°C por 120 horas (5 dias).

5.6 Leitura e Interpretação

Verificar, nos tubos contendo caldo de carne cozida ou caldo Tarozzi, a formação de gás, a turvação do meio e possível alteração na aparência da carne do meio, sinais indicativos de crescimento bacteriano.

Os clostrídios sacarolíticos produzem ácido e gás com odor “ácido”, sem a digestão da carne cozida mas com conseqüente avermelhamento da mesma.

Os clostrídios proteolíticos degradam a proteína em aminoácidos, com a precipitação da tirosina na forma de cristais brancos, produzindo um odor fétido de compostos sulfurados com conseqüente enegrecimento da carne cozida e turvação do caldo.

Verificar, nos tubos com caldo glicose triptona, se ocorreu turvação e/ou formação de película na superfície do caldo, alterações que indicam crescimento bacteriano.

Considerar como negativo o teste para a esterilidade comercial quando não se observar nenhuma das alterações citadas acima e os controles corresponderem aos resultados esperados.

Dar seqüência ao teste quando forem observadas quaisquer das alterações citadas acima e os controles corresponderem aos resultados esperados.

5.6.1 Confirmação de tubos com crescimento positivo ou suspeito

Os tubos suspeitos de apresentarem crescimento devem ser repicados por estriamento em placas de ABHI, conforme segue:

5.6.1.1 Quando o tubo suspeito for o de caldo glicose triptona incubado a 36 ± 1°C (aeróbios mesófilos) repicar concomitantemente para duas placas com ABHI. Incubar uma destas placas a 55 ± 1°C e a outra a 36 ± 1°C por 24 a 48 horas.

5.6.1.2 Quando o tubo suspeito for o de caldo glicose triptona incubado a 55 ± 1°C (aeróbios termófilos) repicar para uma placa com ABHI. Incubar a 55 ± 1°C por 24 a 48 horas.

5.6.1.3 Quando o tubo suspeito for o de caldo de carne cozida (ou de caldo Tarozzi), incubado a 36 ± 1°C (anaeróbio mesófilo) ou a 55 ± 1°C (aeróbios termófilos), repicar para uma placa com ABHI. Incubar por 24 a 48 horas, na mesma temperatura de incubação usada para o tubo de origem (36 ± 1°C ou 55 ± 1°C), em anaerobiose.

5.6.2 Leitura

Após a incubação, verificar o crescimento de microrganismos nas placas.

O não crescimento indicará resultado negativo para o teste de esterilidade comercial.

Quando for verificado crescimento nas placas, repicar as culturas obtidas para tubos com ágar estoque inclinado e incubar nas mesmas condições das placas de origem. Após incubação, realizar os testes complementares a seguir:

5.7 Testes complementares

5.7.1 Coloração de Gram

A partir das colônias que crescerem nas placas, preparar esfregaço e corar pelo método de Gram, conforme instruções constantes do Anexo VII, “Procedimentos de coloração”, deste Manual.

Quando for verificada a presença de bastonetes Gram positivos nos tubos incubados em anaerobiose, a realização da prova de catalase é necessária para a diferenciação entre *Bacillus* sp (catalase positiva) e *Clostridium* sp (catalase negativa).

Registrar no resultado final a morfologia dos cultivos celulares isolados observada.

5.7.2 Prova da catalase

Com auxílio de alça de platina, palito de madeira, bastão de vidro ou Pipeta de Pasteur estéril, transferir a cultura para uma lâmina de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%.

A não formação de borbulhas indica prova negativa para catalase.

A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase.

No caso da presença de bastonetes Gram positivos, resultados de catalase negativos indicam a presença de *Clostridium* sp e resultados positivos indicam a presença de *Bacillus* sp.

Quando for detectada a presença de *Clostridium* sp, guardar as culturas para testes complementares, caso sejam necessários.

5.7.3 Prova da termofilia estrita

Quando forem detectados bastonetes termófilos, realizar prova para confirmação de termofilia estrita do microrganismo isolado.

A partir dos tubos com caldo glicose triptona positivos incubados a 55 ± 1°C, repicar maciçamente para tubos contendo ágar nutriente inclinado com sulfato de manganês (ou ágar para esporulação).

Incubar a 55 ± 1°C de 2 a 10 dias.

A partir do segundo dia, verificar a presença de esporos por meio da aplicação da técnica para coloração de esporos, conforme instruções constantes do Anexo VII, “Procedimentos de coloração”, deste Manual.

Quando forem detectadas culturas esporuladas, preparar suspensão de esporos, lavando o crescimento obtido no tubo com ágar nutriente/sulfato de manganês com 1 mL de água destilada ou deionizada estéril.

Inativar as formas vegetativas por meio da aplicação de um choque térmico a 80°C por 15 minutos na suspensão preparada de 1 mL.

Inocular 0,1 mL do lavado, após o choque térmico, em dois tubos contendo caldo glicose triptona.

Incubar um tubo a 36 ± 1°C e outro a 55 ± 1°C por 2 a 4 dias.

Verificar o crescimento de microrganismos, evidenciado pela turvação do caldo.

O crescimento bacteriano somente no tubo incubado a 55 ± 1°C determina a termofilia estrita do microrganismo isolado.

O crescimento bacteriano nos dois tubos determina a termofilia facultativa do microrganismo isolado.

Registrar no resultado final a característica mesofílica ou termofílica do microrganismo isolado.

5.7.4 Confirmação de microrganismos “flat sour” (opcional)

A partir das culturas obtidas nas placas de ABHI, provenientes dos tubos positivos de caldo glicose triptona incubados a 55 ± 1°C, repicar para a superfície seca de 2 placas com ágar glicose triptona. Incubar uma das placas a 36 ± 1°C por 72 horas e a outra a 55 ± 1°C por 48 horas em câmara úmida.

O crescimento de colônias amarelas, regulares, com diâmetro de aproximadamente 2 a 3 mm, rodeadas de zona de clarificação também amarela, nas placas incubadas a 55 ± 1°C, com núcleo opaco e o não crescimento naquelas incubadas a 36 ± 1°C, confirmará a presença de *Bacillus stearothermophilus* (renomeado - *Geobacillus stearothermophilus*), microrganismo responsável pela deterioração “flat sour”.

6. RESULTADOS

6.1 Pré-incubação

Expressar, no campo referente a emissão do resultado para prova de pré-incubação, nas temperaturas requeridas, o resultado como “sem alteração” quando não se observar qualquer alteração ou anormalidade no recipiente e nas características físicas e/ou sensoriais da amostra, e como “alterado” quando for observada qualquer alteração ou anormalidade no recipiente ou nas características físicas e/ou sensoriais da amostra. Nesse caso, descrever o tipo de alteração observado.

6.2 Pesquisa de aeróbios e anaeróbios termófilos e mesófilos

Expressar, nos campos referentes a emissão dos resultados para as pesquisas de aeróbio e anaeróbio mesófilo e termófilo, o resultado como “negativa”, quando não for observado qualquer desenvolvimento de microrganismos no teste aplicado e como “positiva” quando for observada a presença de microrganismos.

Sempre que possível, fazer constar do resultado final as observações feitas ao microscópio.

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento - Secretaria de Defesa Animal - Departamento Nacional de Defesa Animal - Coordenação Geral de Laboratório Animal - Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos - Teste de Esterilidade Comercial Brasileira, D.F. 1991/1992 - 2ª Revisão, p. 111 - 113.

DEIBEL K. E.; JANTSCHKE, M. Canned Foods - Tests for Commercial Sterility . In: In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p. 577-588.

DENNY C. B.; PARKINSON, N.G. Canned Foods - Tests for cause of spoilage . In: In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.583-600.

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Bacterial Nomenclature Up-to-Date - (Approved Lists, Validation Lists). Nov. 2002. Braunschweig, Germany. Disponível In: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>

ANEXO I

PROCEDIMENTOS DE RECEBIMENTO DE AMOS-

TRAS

1. RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS NO LABORATÓ-

RIO

O setor de recepção fará a triagem das amostras enviadas pelo SIF.

Somente serão aceitas, pelo setor de recepção do laboratório, as amostras lacradas pelo responsável pela colheita que vierem acompanhadas de cinta de identificação no produto (protegida para evitar danificações) e Certificado Oficial de Análise (COA) devidamente preenchido.

1.1 Certificados Oficiais de Análise

Os COAs deverão ser originais, carbonados, carimbados e assinados pelo responsável pela colheita. Cabe a este o correto preenchimento (à mão ou à máquina), legível em todas as vias.

O responsável pela colheita deverá preencher os campos 1, 2 e 4 a 16 do certificado.

Serão recusadas as amostras que vierem acompanhadas de fotocópias dos mesmos ou de Certificado Oficial de Análise (COA) proveniente de outra instituição.

1.2 Número de Protocolo

O setor de recepção de amostras do laboratório deverá registrar o número do protocolo da amostra no laboratório no campo nº 3 do COA.

1.3 Outras verificações e registros

No recebimento das amostras, deverão ser anotadas informações referentes à data, hora e temperatura de recebimento da amostra.

No campo referente à temperatura da amostra no recebimento, deverá ser registrada a condição de resfriamento em que a amostra foi entregue no laboratório, isto é: resfriada, congelada ou em temperatura ambiente.

Quando houver necessidade de verificação da temperatura com termômetro, deverá ser utilizada uma amostra recebida nas mesmas condições das demais e que será usada unicamente para esta finalidade.

1.4 Amostras rejeitadas

O setor de recepção de amostras reterá todos os Certificados Oficiais de Análise das amostras que chegarem fora das condições especificadas nestas normas, os quais serão encaminhados ao Setor de Microbiologia com a informação (código) do motivo da rejeição.

O Setor de Microbiologia fará constar do corpo do certificado (espaços destinados aos resultados) a informação: “Amostra não analisada”, seguida da descrição do motivo pelo qual a análise não foi realizada.

Caberá ao portador das amostras a responsabilidade do retorno das mesmas sempre que rejeitadas por estarem em desacordo com as normas aqui estabelecidas.

As amostras enviadas por transportadora ou correio, que forem rejeitadas pelo laboratório, ficarão à disposição do remetente por 3 (três) dias. Após esse prazo, serão incineradas.

1.4.1 Motivos e respectivos códigos para rejeição de amostras

- 001 / AD - amostra descongelada
- 002 / AP - amostra em putrefação
- 003 / AV - amostra violada (lacre ou embalagem)
- 004 / PV - amostra fora do prazo de validade
- 005 / EP - prazo excedido entre colheita entrada no laboratório

006 / FC - amostra fora do cronograma

007 / CI - certificado incompleto ou incorretamente preenchido

008 / OM - outro motivo - será especificado

2. AMOSTRAS FORA DE CRONOGRAMA

Amostras fora do cronograma somente serão aceitas para análise nos seguintes casos:

Quando houver análise anterior com resultados fora dos padrões;

Quando houver autorização prévia por parte do laboratório ou do Serviço de Inspeção de Produtos (SIPA).

Em ambos os casos, fazer constar do certificado de análise o responsável pela autorização da remessa da amostra.

O SIPA deverá notificar o laboratório com antecedência sobre a autorização e necessidade de análise de amostras fora do cronograma.

3. DEVOLUÇÃO DE AMOSTRAS APÓS ANÁLISE

As amostras que derem entrada no laboratório de microbiologia em nenhuma hipótese serão devolvidas ao interessado, em razão de que nesta área são manipulados microrganismos de risco à saúde pública.

4. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual de métodos microbiológicos para alimentos. Coordenação Geral de Laboratório Animal. 1991/1992 2ª revisão. p.4-5

H. W., ANDREWS, G. A. JUNE. Food sampling and preparation of sample homogenate. In: Bacteriological Analytical Manual. 8.ed. Food and Drug Administration. AOAC International, Gaithersburg, USA. 1995. p. 1-2.

MIDURA, T.F., BRYAN, R.G. Sampling plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.13-23.

ANEXO II

DILUIÇÕES E SOLUÇÕES

1. DILUIÇÕES

Diluição é o procedimento de adição de uma substância a outra para reduzir a concentração de uma das substâncias.

O uso mais comum da palavra diluição ocorre no sentido de que “tantas partes de um material estão sendo diluídas em um número total de partes do produto final (diluyente + material)”.

“Uma diluição é uma expressão de concentração ou proporção, não de volume”.

“Diluição indica a quantidade relativa de substâncias em uma solução”.

Em “frases de diluição”, o menor número sempre se refere ao número de partes da substância que está sendo diluída, enquanto que o maior número sempre se refere ao número de partes que constitui a solução final.

Exemplo:

Frase de Diluição: “Fazer uma diluição 1 para 10 de leite em solução salina peptonada”.

Esta frase poderia ser escrita de outras formas, com o mesmo significado:

“Fazer uma diluição 1 em 10, de leite em solução salina peptonada”.

“Fazer uma diluição 1 para 10, de leite com solução salina peptonada”.

“Fazer uma diluição 1/10, de leite com solução salina peptonada”.

“Fazer uma diluição 1:10, de leite usando solução salina peptonada”.

“Fazer uma diluição de 1 parte de leite e 9 partes de solução salina peptonada”.

1.1 Diluições decimais

Diluições decimais são diluições em que a quantidade de substância a ser diluída corresponde à unidade, ou múltiplos da unidade e o volume final da solução diluída é igual a 10 ou múltiplo de 10 (diluições de base 10).

1.2 Diluições decimais seriadas

São diluições decimais preparadas em série e que possuem um fator de diluição único e igual a 10.

Exemplo:

Preparar diluições decimais de uma cultura bacteriana em fase estacionária até 10⁻³:

a) Preparar uma diluição 1:10 da cultura em fase estacionária em solução salina peptonada, isto é, misturar 1 mL da cultura em fase estacionária com 9 mL de solução salina peptonada (10⁻¹).

b) A partir da diluição 1:10 preparada conforme item 1 deste exemplo, após homogeneização em agitador de tubos, tomar 1 mL e misturar com 9 mL de solução salina peptonada, de forma a obter a diluição 1:100 da cultura em fase estacionária (10⁻²).

c) A partir da diluição 1:100 preparada conforme item 2 deste exemplo, após homogeneização em agitador de tubos, tomar 1 mL e misturar com 9 mL de solução salina peptonada, de forma a obter a diluição 1:1000 da cultura em fase estacionária (10⁻³).

1.3 Cálculos de Diluições

1.3.1 Cálculo envolvendo uma diluição

Para preparar uma diluição 1:100 de carne em solução salina peptonada, devemos misturar uma parte de carne em um volume final de 100 partes, isto é, 1 + 99.

Quando é necessário preparar um determinado volume de uma diluição específica de uma substância, o cálculo se efetua pelo processo razão-proporção, conforme exemplo abaixo:

Substância: NaCl

Volume a ser preparado: 130 mL

Diluição: 1:80 (= 1 parte de NaCl em volume final de 80 partes)

$$\frac{1 \text{ parte de NaCl}}{80 \text{ partes de solução final}} = \frac{X \text{ gramas de NaCl}}{130 \text{ mL de solução final}}$$

$$80 X = 130 \times 1$$

$$X = \frac{130}{80} = 1,625 \text{ partes de NaCl/130 mL de solução}$$

80

ou

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

V_i = volume inicial

C_i = concentração inicial

V_f = volume final

C_f = concentração final

1.3.2 Várias diluições relacionadas

Vários métodos laboratoriais indicam o uso de uma série de diluições, o que nada mais é que um número de soluções obtidas pela diluição de uma substância em um diluyente, e fazendo diluições sequenciais a partir das soluções resultantes.

1.4 Diluições de alimentos para realização de análises microbiológicas

O processo de diluição da amostra, bem como o procedimento técnico utilizado durante esse processo, constituem fatores importantes de interferência nos resultados finais da análise microbiológica.

Em microbiologia de alimentos, comumente são utilizadas diluições decimais da amostra, adotando-se rotineiramente dois critérios: massa por unidade de volume (m/v) e volume por unidade de volume (v/v).

Para a obtenção de uma diluição de base 10, homogeneizam-se porções da amostra com volume de diluente necessário para completar o volume correspondente a 10 vezes o volume (ou peso) da amostra.

Assim, a diluição 1:10 de uma amostra de leite pasteurizado pode ser obtida homogeneizando:

- 1 mL de leite + 9 mL de diluente, ou
- 10 mL de leite + 90 mL de diluente, ou
- 20 mL de leite + 180 mL de diluente, ou
- 25 mL de leite + 225 mL de diluente, e assim por diante.

Em todos os exemplos acima, a amostra resulta diluída à 1:10 (10^{-1}) e, conseqüentemente, em cada mL da diluição teremos uma quantidade de amostra correspondente a um décimo de mL (0,1 mL) e 0,9 mL de diluente.

Sempre que necessário inocular amostras líquidas sem diluir em meios de cultura, considera-se que a amostra se encontra na diluição 10^0 .

Para produtos sólidos há a necessidade de pesar a amostra. Normalmente utilizam-se alíquotas de 10 ou 25 gramas de alimentos sólidos. Dez ou vinte e cinco gramas de alimento não correspondem necessariamente a 10 ou 25 mL de alimento. O volume vai variar com a densidade e temperatura do alimento em análise.

Alimentos sólidos, em pó ou pastosos sempre terão que sofrer diluição antes do início da análise, usando-se o critério massa por unidade de volume (m/v).

Normalmente a diluição inicial de amostras sólidas, em pó ou pastosas, utilizada para análises microbiológicas é 1:10. Outras diluições como 1:2, 1:5, ou outras podem ser usadas em casos especiais.

Antes do início do procedimento de diluição é fundamental que a amostra seja bem homogeneizada (produtos líquidos em pó e pastosos) ou que a alíquota para análise, obtida de produtos sólidos, seja tomada de vários pontos de forma a representar realmente a amostra.

1.5 Pontos críticos do processo de diluição de amostras de alimentos

1.5.1 Homogeneização da amostra e suas diluições

A homogeneização inadequada da diluição inicial, e das subseqüentes, poderá acarretar diferenças muito grandes na contagem das colônias e resultados incoerentes quando do uso de duas ou mais diluições sucessivas.

Para a obtenção de resultados corretos de contagem de microrganismos em amostras de alimentos, a homogeneização de todas as diluições é ponto fundamental.

A homogeneização da diluição inicial (amostra/diluente) deverá ser realizada em "stomacher" entre 30 segundos a 2 minutos, dependendo do tipo de amostra.

A homogeneização das diluições subseqüentes deverá ser realizada com o auxílio de agitador de tubos, por um período de tempo não superior a 1 minuto.

Evitar a homogeneização manual das diluições, pois o processo manual resulta a cada vez em diferentes graus de homogeneidade.

1.5.2 Diluições a utilizar x Intervalo de precisão e repetibilidade

Considerando que o intervalo de precisão e repetibilidade poderá variar de 15 a 150, de 20 a 200, de 25 a 250 e ainda de 30 a 300, dependendo da metodologia analítica empregada, caberá ao analista estabelecer diluições que possibilitem a contagem de colônias nesses intervalos de precisão.

Dessa forma, para alimentos com expectativa de crescimento bacteriano baixo, devido ao seu processo de fabricação e de conservação, as inoculações deverão ser efetuadas a partir da diluição inicial 10^0 para líquidos ou 10^{-1} para sólidos ou pastosos, com no mínimo, duas diluições sucessivas.

Por outro lado, para alimentos que se desconhece o número aproximado de microrganismos existentes, as diluições a serem preparadas deverão garantir condições de realização das contagens. Usualmente, nesses casos, utilizam-se as diluições 10^{-1} a 10^{-6} .

1.5.3 Tempo desde a primeira diluição até a inoculação em meios de cultura

O tempo gasto para a execução das diluições de uma amostra de alimentos até sua inoculação em meios de cultura deverá ser de, no máximo, 20 minutos, de forma a não permitir a multiplicação dos microrganismos contidos nas diferentes diluições, o que acarretaria a obtenção de resultados falsos para a contagem de microrganismos.

1.5.4 Possíveis contaminações acidentais

Ao retirar as pipetas dos cartuchos ou ao desenrolar o papel que envolve individualmente cada uma delas, tomar o máximo de cuidado para não tocar com a pipeta a superfície externa do cartucho, as mãos, as bordas externas dos tubos ou dos recipientes. Esses mesmos cuidados deverão ser tomados quando se estiver efetuando as inoculações nas placas ou nos tubos de ensaio. Caso tal situação ocorra, despreze a pipeta e reinicie o procedimento corretamente.

1.5.5 Aderência do líquido às paredes da pipeta

Não inserir a ponta da pipeta mais do que 2,5 cm abaixo da superfície do líquido dentro dos tubos ou dos recipientes contendo as diluições das amostras, diminuindo assim, a superfície de contato da pipeta com a amostra diluída.

Dispensar lentamente o inóculo, permitindo a drenagem total até a marca final da pipeta por um período de 4 a 6 segundos, nos casos em que o mesmo corresponda ao volume total da pipeta. Preferentemente, usar pipetas que não sejam de esgotamento total.

Quando da dispensa de parte do conteúdo de uma pipeta, deixar que o líquido escorra lentamente. O procedimento de expulsão rápida do líquido contido na pipeta acarreta a retenção de um maior volume de líquido aderido às paredes.

1.5.6 Tipo e capacidade das pipetas

Sempre utilizar pipetas com marcação nítida de volume e, preferencialmente, que permitam a pipetagem do volume desejado sem que seja necessária a expulsão da última porção da pipeta. Quando esse tipo de pipeta não estiver disponível no laboratório, para a pipetagem de 1 mL, é recomendável a utilização de pipetas com capacidade de 2 mL, com graduação de 1/10 ou 1/100, aspirando o inóculo até o volume total da mesma e dispensando a primeira porção (1 mL) no interior da placa ou do tubo.

As pipetas utilizadas não deverão ter capacidade superior a 10 vezes o volume a ser medido, para assegurar que o inóculo dispensado seja o requerido. Por exemplo, se o inóculo for de 0,1 mL, utilizar uma pipeta de 1 mL com graduação de no mínimo 1/10, aspirando o inóculo até o volume total da mesma e dispensando a primeira divisão no interior da placa ou do tubo.

1.5.7 Precisão dos volumes dos inóculos

Manter a pipeta sempre na posição vertical e inclinar o tubo até posição que forme um ângulo de 45° em relação à pipeta, facilitando, desta forma, a leitura na pipeta do "menisco" do volume a ser dispensado.

1.5.8 Uso de pipetas

Sempre utilizar uma pipeta para cada diluição.

Não tocar com a pipeta de uma determinada diluição no diluente da diluição seguinte.

NUNCA enxaguar a pipeta com o diluente da diluição subseqüente.

A mesma pipeta poderá ser utilizada para a semeadura de diluições de amostras, desde que se parta da maior diluição (amostra mais diluída) para a menor diluição (amostra menos diluída).

2. SOLUÇÕES

Soluções são misturas homogêneas unifásicas constituídas de duas ou mais substâncias miscíveis. São formados por dois compostos, o soluto e o solvente.

O soluto é a substância que está dissolvida no solvente e, conseqüentemente, o solvente é a substância que dissolve o soluto.

Nas soluções, os dois componentes não se encontram quimicamente combinados.

2.1 Soluções saturadas

São soluções que contêm a quantidade máxima possível de um soluto, em uma determinada temperatura e pressão, perfeitamente dissolvido no solvente.

Por exemplo, em soluções de Cloreto de sódio, a saturação ocorre quando há aproximadamente 360 g do sal por litro de água.

2.2 Concentração de soluções

Concentração é o quociente entre a quantidade do soluto e a do solvente ou da própria solução. Para determinar esse quociente alguns autores referem-se ao "título de uma solução".

A concentração de uma solução pode ser expressa de 3 maneiras:

- a) Massa por unidade de massa (m/m);
- b) Massa por unidade de volume (m/v);
- c) Volume por unidade de volume (v/v).

A forma mais precisa de se estabelecer a concentração é o de massa por unidade de massa (m/m), porém, nos laboratórios de microbiologia, onde se trabalha rotineiramente com produtos sólidos que necessitam ser diluídos durante a análise, o sistema mais freqüentemente usado é o de massa por volume (m/v).

Para amostras líquidas, o sistema usado é o de volume por volume (v/v), que é o menos preciso dos três, fato que se deve às variações de volume em função das temperaturas do soluto e do solvente (amostra e diluente).

2.2.1 Relação de massa com massa

$$C = \frac{M}{M}$$

Onde:

C = Concentração

m = Massa do soluto

M = Massa do solvente

Neste caso a concentração toma dois nomes particulares:

* Molaridade: É a relação entre o número de moles do soluto e 1000 g do solvente. A concentração expressa em molaridade é utilizada em ebuliometria e criometria.

* Porcentagem de peso: É a relação entre a massa do soluto e 100 g da solução.

Exemplo:

Preparar uma solução de sulfato de sódio a 10% em peso significa que em 100 g da solução existem 10 g do sulfato de sódio e 90 g de água.

Relação de volume com volume

$$C = \frac{V}{V_1}$$

Onde:

C = concentração

V = Volume do soluto

V₁ = Volume da solução

Neste caso, a concentração toma o nome de Porcentagem em volume, desde que o volume da solução seja tomado como 100 mL. É aplicada para as soluções líquido/líquido e gás/gás. Assim o álcool a 90% em volume significa que em 100 mL da solução existem 90 mL de álcool.

Relação de massa com volume

$$C = \frac{M}{V}$$

Onde:

C = concentração

m = massa do soluto

V = volume da solução

Neste caso, a concentração toma diversos nomes conforme a massa do soluto. Pode ser expressa em unidades químicas de massa (o mol e o n° de equivalentes) ou em unidades físicas de massa (o grama); e o volume da solução pode ser expresso em litro ou, no caso particular da porcentagem, em 100 mL. Desta forma, podemos fazer o seguinte resumo:

- a) Unidades Químicas A.Mol/litro = Molaridade (M)
B.Equivalente-gram/litro = Normalidade(N)
- b) Unidades físicas A.Gramas/litro = título (T)
B. Gramas/100 mL = Porcentagem (%)

2.3 Partes

Estabelece uma relação em que a mesma unidade de medida, ou múltiplos da unidade, é usada ao longo de todas as porções relacionadas do processo.

"Partes" não se limita a uma única unidade de medida.

Concentrações de "partes por milhão" ou "ppm" são freqüentemente usadas para aditivos de meios de cultura e soluções de antibióticos.

Exemplo:

Uma parte por milhão (1 ppm) de cloridrato de tetraciclina possui uma parte do princípio ativo dissolvido em 1 milhão de partes da solução.

Medidas que correspondem a 1 ppm são:

- grama por tonelada (g/ton);
- miligrama por quilo (mg/kg);
- micrograma por grama (µg);
- mililitro por litro (mL/L);
- microlitro por mililitro (µL/mL).

2.4 Hidratos

Os sais utilizados no laboratório de microbiologia podem se apresentar na forma anidra ou na forma de um ou mais hidratos, em que uma ou mais moléculas de água estão ligadas à molécula do sal.

Quando se necessita preparar uma solução cuja composição indique o uso de um sal na forma anidra, e somente está disponível no laboratório um hidrato, deve-se determinar quanto do hidrato corresponde à quantidade da forma anidra estabelecida na formulação.

Para esse cálculo é necessário considerar os pesos moleculares e, por "regra de três", estabelecer o peso correspondente.

Exemplo:

Preparar uma solução 10% de CuSO₄. Somente está disponível no laboratório CuSO₄.H₂O.

Sol. 10% = 10 g/100 mL

Peso molecular do CuSO₄ = 160

Peso molecular do CuSO₄.H₂O = 178

10 g (CuSO₄) = 160

X g (CuSO₄.H₂O) = 178

$$X = \frac{10 \times 178}{160} = 11,125 \text{ g}$$

Então, para preparar a solução 10% de CuSO₄ usando a forma monohidratada, seria necessário dissolver 11,125 g de CuSO₄.H₂O em quantidade de água suficiente para completar 100 mL.

O mesmo raciocínio é utilizado para os casos em que a formulação indica o uso da forma hidrato e somente está disponível a forma anidra.

2.5 Potência de antibióticos

A potência de um antibiótico se refere à quantidade de princípio ativo, biologicamente ativo, contido no produto.

Poderá estar expressa em Unidades (U), em porcentagem (%) ou em miligramas de princípio ativo por grama de produto (mg/g).

Exemplos:

Sulfato de Polimixina B 7600 U/mg;

Tetraciclina 80%;

Sulfato de estreptomina 780 mg/g.

As soluções de antibióticos, usadas como padrões referenciais nas provas de determinação de resíduos de antibióticos em alimentos e como aditivos de alguns meios de cultura, podem estar expressas em U/mL, ppm ou ainda em microgramas por mL).

Para preparar uma solução de antibiótico proceder conforme abaixo:

- Sempre verificar a potência no frasco do produto que está se usando.
- Quando, no frasco, a informação disponível for apenas do total de U no frasco, verificar o peso total contido no mesmo e determinar quantas U existem por mg do produto.
- Quando a potência estiver expressa em U/mg, preparar a solução em U/mL ou calcular a conversão para obter soluções em ppm ou µg/mL.
- Se a potência se apresenta na forma de porcentagem, converter para mg (um antibiótico com potência de 80% possui 0,8 mg de princípio ativo por mg do produto).
- Pesar uma quantidade mínima de 10 mg do antibiótico em balança analítica (quanto menor a quantidade pesada, maior será o erro possível de ocorrer).
- Multiplicar o peso obtido pela potência e dividir pela concentração final desejada para obter o volume de diluente a ser adicionado.

$$\text{Volume de diluente a adicionar} = \frac{\text{Peso} \times \text{Potência}}{\text{Concentração final desejada}}$$

Exemplo 1:
Preparar uma solução 4000 U/mL de sulfato de polimixina B em tampão fosfato pH 8.
Potência do produto usado: 7600 U/mg
Peso 23,7 mg (quantidade pesada)

$$\text{Volume} = \frac{23,7 \times 7600}{4000} = 45,03 \text{ mL}$$

Para obter a solução 4000 U/mL, basta dissolver as 23,7 mg de sulfato de polimixina em 45,03 mL de tampão. Cada mL desta solução oferecerá uma concentração de sulfato de polimixina de 4000 U.

OBS.: Para que não seja necessário adicionar volumes fracionados de diluente, conforme o exemplo acima, pode-se estabelecer, de forma inversa, qual a quantidade de antibiótico a ser pesado para um volume de diluente pré-determinado, procedendo conforme indicado no item 2.5.1.

Exemplo 2:
No meio SFP há a indicação da adição de 3 mg/L de sulfato de polimixina e de 12 mg/L de canamicina.

Quando as quantidades do aditivo são tão pequenas quanto estas, preparar soluções-mãe. Adicionar ao meio final, volumes das soluções-mãe que ofereçam uma concentração final, por litro de meio, correspondente ao indicado pelo fabricante.

No caso deste exemplo (meio SFP), preparar:

a) Solução de sulfato de polimixina a 3 mg/mL (potência 7600 U/mg).

Pesar 300 mg de sulfato de polimixina e diluir para 100 mL em água destilada. Esta solução terá concentração de 3 mg de polimixina B com potência de 7600 U/mg por mL.

Neste exemplo seria usado 1 mL desta solução, por litro de meio.

b) Kanamicina - 12 mg/mL

Potência 80%.

1 mg do produto contém 0,8 mg de princípio ativo.

Pesar mais de 100 mg do antibiótico (por exemplo 158 mg).

Multiplicar o peso obtido pela potência e dividir pela concentração final desejada para obter o volume de diluente a ser adicionado.

$$X = \frac{158 \times 0,8}{12} = 10,53 \text{ mL}$$

OBS.: Para que não seja necessário adicionar volumes fracionados de diluente, conforme o exemplo acima, pode-se estabelecer, de forma inversa, qual a quantidade de antibiótico a ser pesado para um volume de diluente pré-determinado, procedendo conforme indicado no item 2.5.1.

Cada mL desta solução conterá 12 mg de kanamicina.

2.5.1 Determinação do peso do antibiótico para a preparação de soluções, priorizando o volume.

Nos exemplos 1 e 2 acima os volumes de diluente a serem adicionados resultaram em números quebrados, o que certamente leva a erros na concentração final do antibiótico.

Para evitar volumes fracionados, fazer o cálculo inverso, pré-estabelecendo o volume de diluente a ser utilizado e calculando a quantidade do antibiótico a ser pesado, usando a mesma fórmula:

$$\text{Peso} = \frac{\text{Vol. de diluente a adicionar} \times \text{Conc. final desejada}}{\text{Potência}}$$

Supondo que se dispõe de um balão volumétrico de 25 mL para a preparação da solução do exemplo 2, acima, proceder conforme segue:

$$\text{Peso (?)} = \frac{25 \times 12}{0,8} = 375 \text{ mg}$$

A quantidade de antibiótico a ser pesada neste caso seria de 375 mg, que serão diluídas em 25 mL de diluente para a obtenção de uma solução com 12 mg/mL.

2.6 Concentração por Centrifugação

Em microbiologia, o processo de centrifugação é frequentemente usado para a concentração de células ou esporos em processos de lavagem ou purificação.

O processo de centrifugação promove a sedimentação de partículas mais densas por meio da aplicação de força centrífuga obtida pela rotação em alta velocidade.

As unidades usadas para indicar centrifugação são "Rotações por minuto" (RPM) e "força gravitacional" (g).

Para calcular g se utiliza a seguinte fórmula:

$$g = 0,000118 \times \text{raio do rotor (cm)} \times (\text{rpm})^2$$

3. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

CAMPBELL, J.M.; CAMPBELL, J.B. Diluições. In.: Matemática de Laboratório - Aplicações Médicas e Biológicas. 3.ed. Editora Roca. São Paulo, SP. 1986. p. 77-88.

CAMPBELL, J.M.; CAMPBELL, J.B. Soluções. In.: Matemática de Laboratório - Aplicações Médicas e Biológicas. 3.ed. Editora Roca. São Paulo, SP. 1986. p. 93-118.

COOPER, T.G. The tools of Biochemistry. John Wiley & Sons, New York. 1977. 422p.

FELTRE, R. Soluções. In.: Química - Físico-Química. 2.ed. São Paulo, SP. Editora Moderna. 1983. p. 1-75.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.53-62.

ANEXO III

PROCEDIMENTOS BÁSICOS DE CONTAGEM

1. TÉCNICAS DE CONTAGEM EM PLACAS

As técnicas de contagem em placas permitem a visualização da formação de colônias a partir de um número "fixo" de células viáveis.

São utilizadas, portanto, para se obter a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes na amostra sob análise.

Os meios de cultura usados para a obtenção do número de colônias em uma amostra podem ser de uso geral (meios com ingredientes nutritivos básicos), enriquecidos (meios com nutrientes adicionais, com sangue, gema de ovo e soro), acrescidos ou não de sistemas inibidores e/ou indicadores.

A aplicação das técnicas de contagem tem por base o uso de diluições seriadas, obtidas a partir da homogeneização de amostras sólidas e semi-sólidas ou a partir de inoculações diretas de amostras líquidas e de suas diluições.

As técnicas básicas de contagem em placas incluem:

1.1 Semeadura em profundidade

Distribuir as alíquotas das diluições escolhidas em placas de Petri estéreis.

Acrescentar 12 a 15 mL do ágar a 46-48°C. Homogeneizar imediata e adequadamente.

Deixar solidificar e incubar as placas (invertidas ou não), de acordo com as exigências de tempo, temperatura, tensão de oxigênio etc, requeridas pelo microrganismo a ser enumerado.

1.2 Semeadura em superfície

Usar placas em que, previamente, tenha sido distribuído o meio específico para o microrganismo a ser enumerado.

Promover a secagem da superfície deixando as placas invertidas, semi-abertas com a base apoiada na tampa, por cerca de 15 minutos em estufa a 45-50°C.

Inocular 0,1 mL, ou no máximo 0,5 mL, das diluições selecionadas, lembrando que 0,1 mL de uma diluição oferece resultado correspondente à diluição seguinte, isto é, 0,1 mL de 10⁻¹ oferece resultado para a diluição 10⁻².

Observar que o inóculo deve ser depositado no centro da superfície do ágar, evitando tocar a ponta da pipeta no meio, mantendo-a, entretanto, o mais próximo possível.

Espalhar o inóculo, com auxílio de alça de Drigalski ou bastão de vidro tipo "hockey", estéreis, por toda a superfície do ágar, até absorção completa.

Inverter as placas após a absorção completa do inóculo e incubar como requerido, o mais rápido possível.

1.3 Semeadura por Sobrecamada

Proceder como para semeadura em profundidade.

Após homogeneização do meio de cultura com o inóculo e solidificação do ágar, acrescentar uma nova camada de 10 a 12 mL do ágar correspondente, fundido e mantido a 46-48°C.

Deixar solidificar sem misturar e incubar conforme requerido.

A técnica por sobrecamada poderá ser feita a partir de uma semeadura em superfície, acrescentando-se uma sobrecamada de 10 a 12 mL de ágar fundido após a semeadura, distribuição e absorção total do inóculo pelo ágar.

Deixar solidificar sem misturar e incubar o mais rápido possível.

Quando se pretende a recuperação de células em "stress", o tempo decorrido entre a inoculação da primeira camada e a adição da sobrecamada pode ser dilatado, deixando as placas invertidas em temperatura ambiente, conforme indicação da metodologia específica.

2. TÉCNICA DE NÚMERO MAIS PROVÁVEL

A técnica de Número Mais Provável (NMP) é um método que permite estimar a densidade de microrganismos viáveis presentes em uma amostra sob análise.

Esta técnica não permite a contagem "fixa" de células viáveis ou de unidades formadoras de colônias (UFC), como acontece com a técnica de contagem em placas.

A análise por NMP é recomendada quando:

a) É esperado, no alimento em análise, um baixo número do microrganismo alvo (<100/g ou mL) ou quando, em função de limitações do método e das diluições necessárias para o alimento específico, o padrão de aceitação/rejeição não pode ser atendido por meio de provas de contagem.

b) Quando, devido ao processo tecnológico sofrido pelo alimento, as células presentes estejam lesadas fisiologicamente (células estressadas), não tendo portanto condições de formar colônias em meios sólidos seletivos.

A técnica de NMP deve ser realizada incluindo as seguintes etapas analíticas:

a) Teste presuntivo (leitura dos resultados obtidos na série de tubos múltiplos).

b) Teste confirmatório (subcultivo dos tubos positivos do teste presuntivo em caldo de maior impedência ou em ágar seletivo-diferencial para o microrganismo pesquisado).

c) Teste completo (identificação bioquímica da(s) espécie(s) microbiana(s) presente(s)).

Esta técnica tem por base a probabilidade estatística relacionada com a frequência da ocorrência de resultados positivos mais prováveis em função do número real de microrganismos presentes. É necessário que a amostra seja preparada de modo que as bactérias não se encontrem agrupadas, que estejam aleatoriamente distribuídas na amostra; e que os meios e condições de incubação permitam a recuperação e detecção de ao menos uma célula viável do organismo alvo.

Para a determinação do NMP, a amostra deverá ser diluída tantas vezes quantas necessárias para que a última diluição de 3, 5 ou 10 tubos apresente todos os resultados negativos. Quanto maior o número esperado do microrganismo pesquisado, maiores deverão ser as diluições usadas.

Quando não se pode estimar qual a diluição do alimento que oferecerá essa situação, são inoculadas mais de 3 séries com diluições decimais (por exemplo 10⁰ até 10⁻⁴, ou mais diluições).

Entretanto, na leitura final do NMP deverão ser consideradas somente as 3 diluições mais significativas.

Como na rotina de laboratórios analíticos esse procedimento aumenta em muito o volume de trabalho e de material a ser usado, normalmente são utilizadas apenas três diluições, considerando a estimativa do número esperado do microrganismo em estudo.

Então, o número de células viáveis presentes é obtido por meio de 3 diluições decimais sucessivas e transferência de alíquotas determinadas (também decimais, como 10 e 1mL) de cada diluição em séries de tubos.

O número de tubos por série é variável, podendo ser de 2 a 10. Mais comumente são usadas séries de 3 ou 5 tubos por diluição.

Quando houver necessidade de inocular grande volume (10 mL) da amostra diluída ou não, na primeira série de tubos, estes deverão conter meio em concentração dupla.

O arranjo de número de tubos positivos das 3 diluições (ou as mais significativas) é transposto para tabelas estatísticas que informam o NMP para as diferentes combinações de tubos positivos e que também incluem os limites de confiança dos números mais prováveis dos microrganismos pesquisados em função da tabela em questão.

Os intervalos de confiança 95% constantes das tabelas de NMP oferecem a informação de que, em pelo menos 95% das vezes, há a chance da concentração real do microrganismo alvo estar incluído no intervalo de confiança calculado para cada arranjo de tubos positivos.

Por exemplo, o arranjo de tubos positivos 3-1-0 oferece como NMP o valor 43/g. Nesse caso, o intervalo de confiança 95% corresponde aos valores compreendidos entre 9 e 180. Isto significa que a chance do número real presente na amostra estar incluído no intervalo de valores entre 9 e 180 UFC/g é de 95%.

A expressão do NMP é feita somente por meio do número mais provável que corresponda ao arranjo de tubos positivos por série.

Em geral, as tabelas já estão corrigidas considerando g ou mL (e consequentemente, as diluições), para a obtenção do NMP.

Os exemplos a seguir permitem a seleção das diluições mais significativas, dentre as possibilidades descritas.

TABELA 1

| Casos | Diluição (g ou mL) | | | | | Combinação de tubos |
|-------|--------------------|-----|------|-------|--------|---------------------|
| | 1,0 | 0,1 | 0,01 | 0,001 | 0,0001 | |
| 1 | 3/3 | 3/3 | 1/3* | | | 3-3-1 |
| 2 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 1/3 | 0/3 | 3-2-1 |
| 3 | 3/3 | 2/3 | 0/3 | 0/3 | | 3-2-0 |
| 4 | 2/3 | 2/3 | 0/3 | | | 2-2-0 |
| 5 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 1/3 | 1/3 | 3-2-2 |
| 6 | 3/3 | 2/3 | 0/3 | 1/3 | 0/3 | 3-2-1 |

Numerador = número de tubos positivos

Denominador = número de tubos inoculados

* 3 diluições consideradas significativas para a obtenção do NMP

2.1 Interpretação dos resultados de NMP

Para a escolha da tabela na qual se verificará o NMP correspondente à combinação de tubos positivos, atentar para a quantidade (g ou mL) de amostra que foi realmente inoculada em cada tubo das diferentes séries e não para o volume inoculado.

Exemplo 1:

| Inoculação de | Quantidade de amostra inoculada em cada série |
|---|---|
| 10 mL da amostra na 1ª série | 10 mL |
| 1,0 mL da amostra na 2ª série | 1,0 mL |
| 1,0 mL da diluição 10 ⁻¹ na 3ª série | 0,1 mL |

A tabela a ser consultada deverá ser a que oferece resultados de NMP para 10, 1,0 e 0,1 g ou mL. Para a água, cujo resultado final deverá ser expresso em NMP por 100 mL, o número constante da tabela deverá ser multiplicado por 10.

Neste Manual, para maior praticidade, a tabela para leitura de resultados de NMP em água já contém os números corrigidos (multiplicado por 10).

A tabela a ser consultada deverá ser a que oferece resultados de NMP para inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL. Poderá também ser usada a tabela de NMP para inóculos de 1, 0,1 e 0,01 mL desde que o resultado da tabela seja multiplicado por 10, já que a quantidade de amostra inoculada neste caso foi 10 vezes menor que a quantidade para a qual a tabela se refere.

2.2 Casos específicos

a) Inoculação de mais de 3 diluições seriadas

Quando da inoculação de mais de 3 diluições seriadas, selecionar a maior diluição na qual todos os tubos inoculados são positivos e considerar as 2 diluições maiores seguintes que a selecionada (casos 2 e 3 da tabela 1 acima e exemplos abaixo).

Exemplo 1: Amostra de alimento líquido que foi inoculada nas diluições abaixo e apresentou os seguintes resultados:

10⁰ 3 tubos positivos
10⁻¹ 3 tubos positivos
10⁻² 3 tubos positivos
10⁻³ 2 tubos positivos
10⁻⁴ 0 tubos positivos
10⁻⁵ 0 tubos positivos

O valor de NMP a ser lido na tabela seria aquele para o arranjo de tubos positivos 3/2/0, que corresponde ao valor 9,3 NMP/g ou mL. Como neste caso a amostra estava diluída a 10⁻², o resultado obtido na tabela deve ser multiplicado por 100 para a obtenção do valor do NMP real por grama ou mL do alimento em análise. Assim, o resultado final seria 930 NMP/g ou mL.

Exemplo 2: Amostra de alimento líquido da qual foram inoculadas apenas as diluições 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³, e os resultados obtidos foram os seguintes:

10⁰ 3 tubos positivos
10⁻¹ 3 tubos positivos
10⁻² 3 tubos positivos
10⁻³ 2 tubos positivos

O valor de NMP a ser lido na tabela seria aquele para o arranjo de tubos positivos 3/3/2, que corresponde ao valor 110 NMP/g ou mL. Como neste caso a amostra estava diluída a 10⁻¹, o resultado deve ser multiplicado por 10 para se obter o valor do NMP por grama ou mL do alimento em análise. Assim, o resultado final seria 1100 NMP/g ou mL.

Exemplo 3: Na análise do mesmo alimento acima, caso as diluições inoculadas fossem as seguintes:

10⁻³ 2 tubos positivos
10⁻⁴ 0 tubos positivos
10⁻⁵ 0 tubos positivos
10⁻⁶ 0 tubos positivos

O valor de NMP a ser lido na tabela seria aquele para o

arranjo de tubos positivos 2/0/0, que corresponde ao valor 0,92 NMP/g ou mL. Como neste caso a amostra estava diluída a 10⁻³, o resultado deve ser multiplicado por 1000 para se obter o valor do NMP/g ou mL do alimento em análise.

Assim, o resultado final seria 920 NMP/g ou mL.

Exemplo 4: No mesmo exemplo acima, se as diluições inoculadas fossem 10⁰, 10⁻¹ e 10⁻², considerando os mesmos resultados:

10⁰ 3 tubos positivos
10⁻¹ 3 tubos positivos
10⁻² 3 tubos positivos

O valor de NMP a ser lido na tabela seria aquele para a combinação de tubos positivos 3/3/3, que corresponde ao valor >110 NMP/g ou mL. Como neste caso a amostra não estava diluída (10⁰), o resultado final a ser emitido é obtido diretamente da tabela.

As diferenças de resultados observadas nos diferentes exemplos de trabalho com a mesma amostra e diluições diferentes demonstram a importância de se fazer diluições da amostra considerando o número estimado do microrganismo teste, pois a mesma amostra analisada conforme os exemplos 4 (sem suficiente diluição) e 1 (com diluições adequadas) apresentam resultados bem diferentes (> 110 NMP/g ou mL e 930 NMP/g ou mL).

O resultado >110 NMP/g ou mL é vago e pode não ser adequado para a tomada de decisão a respeito do destino do lote a que se refere o alimento analisado, especialmente quando há uma tolerância em números maiores que este.

Exemplo 5: Nos casos de inoculação em que se utilizam 5 diluições em séries de 3 tubos e que apresente os resultados abaixo:

10⁰ 3 tubos positivos
10⁻¹ 3 tubos positivos
10⁻² 1 tubo positivo
10⁻³ 0 tubos positivos
10⁻⁴ 0 tubos positivos

Considerar o arranjo 3-1-0, já que o resultado mais próximo do real é obtido quando a primeira série considerada contém os 3 tubos positivos e a última série os 3 tubos negativos.

b) Inoculação de mais de 3 diluições seriadas em que ocorreram tubos positivos em mais de duas diluições subseqüentes à escolhida.

Neste caso, repassar um tubo positivo da maior diluição positiva para a imediatamente anterior, sucessivamente, até obter arranjo de tubos que se enquadre na situação anterior (casos 5 e 6 da tabela 1).

Exemplo 2:

| Inoculação de | Quantidade de amostra inoculada em cada série |
|---|---|
| 10 mL da diluição 10 ⁻¹ na 1ª série | 1,0 g ou mL |
| 1,0 mL da diluição 10 ⁻¹ na 2ª série | 0,1 g ou mL |
| 1,0 mL da diluição 10 ⁻² na 3ª série | 0,01 g ou mL |

A tabela a ser consultada deverá ser a que oferece resultados de NMP para 1, 0,1 e 0,01 g ou mL. Devido ao fato de que a quantidade de amostra inoculada neste caso é igual à quantidade para a qual a tabela se refere, o resultado do NMP será obtido diretamente da tabela.

Exemplo 3:

| Inoculação de | Quantidade de amostra inoculada em cada série |
|---|---|
| 1,0 mL da amostra na 1ª série | 1,0 g ou mL |
| 1,0 mL da diluição 10 ⁻¹ na 2ª série | 0,1 g ou mL |
| 1,0 mL da diluição 10 ⁻² na 3ª série | 0,01 g ou mL |

A tabela a ser consultada deverá ser a que oferece resultados de NMP para 1, 0,1 e 0,01 g ou mL. Devido ao fato de que a quantidade de amostra inoculada neste caso é igual a quantidade para a qual a tabela se refere, o resultado do NMP obtido será o mesmo encontrado na tabela.

Exemplo 4:

| Inoculação de | Quantidade de amostra inoculada em cada série |
|---|---|
| 1,0 mL da diluição 10 ⁻¹ na 1ª série | 0,1 g ou mL |
| 1,0 mL da diluição 10 ⁻² na 2ª série | 0,01 g ou mL |
| 1,0 mL da diluição 10 ⁻³ na 3ª série | 0,001 g ou mL |

Exemplo 6: Amostra de alimento líquido que foi inoculada nas diluições abaixo, apresentando os seguintes resultados:

10⁰ 3 tubos positivos
10⁻¹ 3 tubos positivos
10⁻² 2 tubos positivos
10⁻³ 1 tubo positivo
10⁻⁴ 1 tubo positivo

O resultado final, neste caso, será o valor da tabela NMP correspondente ao arranjo 3-2-2 tubos positivos.

Este arranjo é obtido pela transposição do tubo positivo da diluição 10⁻⁴ para a diluição anterior.

Exemplo 7: Amostra de alimento líquido que foi inoculada nas diluições abaixo, apresentando os seguintes resultados:

10⁰ 3 tubos positivos
10⁻¹ 2 tubos positivos
10⁻² 0 tubos positivos
10⁻³ 1 tubo positivo
10⁻⁴ 0 tubo positivo

O resultado final, neste caso, será o valor da tabela NMP correspondente ao arranjo 3-2-1 de tubos positivos.

Esse arranjo de tubos positivos é obtido pela transposição do tubo positivo da diluição 10⁻³ para a diluição 10⁻².

c) Nos casos de inoculação em que se utilizam 5 diluições em séries de 3 tubos, cujos resultados indicam duas possibilidades de todos os tubos da primeira série serem positivos e todos os da última série serem negativos, considerar o maior valor de NMP apresentado pela tabela correspondente.

10⁰ 3 tubos positivos
10⁻¹ 3 tubos positivos
10⁻² 0 tubos positivos
10⁻³ 0 tubos positivos
10⁻⁴ 0 tubos positivos
3-3-0 - 24 NMP/g ou mL (10⁰, 10⁻¹ e 10⁻²)
3-0-0 - 23 NMP/g ou mL (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³)

O resultado final, neste caso, será o valor NMP correspondente ao arranjo 3-3-0 (24 NMP/g ou mL).

d) Inoculação de somente 3 diluições seriadas

Nos casos de inoculação de somente 3 diluições seriadas, fazer a leitura diretamente na tabela (casos 1 e 4 e exemplo 4).

e) Arranjos inexistentes nas tabelas

Repetir a análise sempre que os resultados dos controles aplicados no processo analítico apontarem para esta necessidade, e/ou os arranjos de tubos positivos, na série de tubos múltiplos, revelarem comportamento incoerente como 0-1-3 ou outros arranjos inexistentes nas tabelas de NMP.

f) Atendendo a legislação

Utilizar a inoculação de 3 séries de 10, 5 ou 3 tubos quando a legislação estabelecer padrão para NMP menor que 1,0, 2,0 ou 3,0, respectivamente.

2.3 Tabelas de NMP

Tabela 1. Número Mais Provável por grama ou mL, para séries de 3 tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL e respectivos intervalos de confiança 95%.

| Número de Tubos Positivos | NMP/g ou mL | Intervalo Confiança (95%) | |
|---------------------------|-------------|---------------------------|----------|
| | | Inferior | Superior |
| 0,1 | 0,01 | 0,001 | |
| 0 | 0 | <3,0 | - |
| 0 | 0 | 3,0 | 0,15 |
| 0 | 0 | 1 | 3,0 |
| 0 | 1 | 0 | 3,0 |
| 0 | 1 | 1 | 6,1 |
| 0 | 2 | 0 | 6,2 |
| 0 | 3 | 0 | 9,4 |
| 1 | 0 | 0 | 3,6 |
| 1 | 0 | 1 | 7,2 |
| 1 | 0 | 2 | 11 |
| 1 | 1 | 0 | 7,4 |

| | | | | | |
|---|---|---|-----|-----|----|
| 1 | 1 | 1 | 11 | 3,6 | 38 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 3,6 | 42 |
| 1 | 2 | 1 | 15 | 4,5 | 42 |
| 1 | 3 | 0 | 16 | 4,5 | 42 |
| 2 | 0 | 0 | 9,2 | 1,4 | 38 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 3,6 | 42 |
| 2 | 0 | 2 | 20 | 4,5 | 42 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 3,7 | 42 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 4,5 | 42 |
| 2 | 1 | 2 | 27 | 8,7 | 94 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 4,5 | 42 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | 8,7 | 94 |
| 2 | 2 | 2 | 35 | 8,7 | 94 |
| 2 | 3 | 0 | 29 | 8,7 | 94 |
| 2 | 3 | 1 | 36 | 8,7 | 94 |

| | | | | | |
|---|---|---|-------|-----|------|
| 3 | 0 | 0 | 23 | 4,6 | 94 |
| 3 | 0 | 1 | 38 | 8,7 | 110 |
| 3 | 0 | 2 | 64 | 17 | 180 |
| 3 | 1 | 0 | 43 | 9 | 180 |
| 3 | 1 | 1 | 75 | 17 | 200 |
| 3 | 1 | 2 | 120 | 37 | 420 |
| 3 | 1 | 3 | 160 | 40 | 420 |
| 3 | 2 | 0 | 93 | 18 | 420 |
| 3 | 2 | 1 | 150 | 37 | 420 |
| 3 | 2 | 2 | 210 | 40 | 430 |
| 3 | 2 | 3 | 290 | 90 | 1000 |
| 3 | 3 | 0 | 240 | 42 | 1000 |
| 3 | 3 | 1 | 460 | 90 | 2000 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 180 | 4100 |
| 3 | 3 | 3 | >1100 | 420 | - |

Fonte: Bacteriological Analytical Manual Online, 2001.

OBS.: Para obter o NMP/g ou mL, para séries de 3 tubos, com inóculos de 1,0, 0,1 e 0,01 g ou mL, e respectivos intervalos de confiança 95%, dividir por 10 os valores da Tabela 1 correspondente ao arranjo de tubos positivos obtido na análise.

Tabela 2. Número Mais Provável por 100mL, para séries de 3 tubos com inóculos de 10 mL, 1,0 mL e 0,1 mL, e respectivos intervalos de confiança 95%.

| Número de Tubos Positivos | | | NMP/100 mL | Intervalo Confiança (95%) | |
|---------------------------|-----|-----|------------|---------------------------|----------|
| 10 | 1,0 | 0,1 | | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | <3,0 | - | 9,5 |
| 0 | 0 | 1 | 3,0 | 0,15 | 9,6 |
| 0 | 1 | 0 | 3,0 | 0,15 | 11 |
| 0 | 1 | 1 | 6,1 | 1,2 | 18 |
| 0 | 2 | 0 | 6,2 | 1,2 | 18 |
| 0 | 3 | 0 | 9,4 | 3,6 | 38 |
| 1 | 0 | 0 | 3,6 | 0,17 | 18 |
| 1 | 0 | 1 | 7,2 | 1,3 | 18 |
| 1 | 0 | 2 | 11 | 3,6 | 38 |
| 1 | 1 | 0 | 7,4 | 1,3 | 20 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 3,6 | 38 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 3,6 | 42 |
| 1 | 2 | 1 | 15 | 4,5 | 42 |
| 1 | 3 | 0 | 16 | 4,5 | 42 |
| 2 | 0 | 0 | 9,2 | 1,4 | 38 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 3,6 | 42 |
| 2 | 0 | 2 | 20 | 4,5 | 42 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 3,7 | 42 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 4,5 | 42 |
| 2 | 1 | 2 | 27 | 8,7 | 94 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 4,5 | 42 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | 8,7 | 94 |
| 2 | 2 | 2 | 35 | 8,7 | 94 |
| 2 | 3 | 0 | 29 | 8,7 | 94 |
| 2 | 3 | 1 | 36 | 8,7 | 94 |
| 3 | 0 | 0 | 23 | 4,6 | 94 |
| 3 | 0 | 1 | 38 | 8,7 | 110 |
| 3 | 0 | 2 | 64 | 17 | 180 |
| 3 | 1 | 0 | 43 | 9 | 180 |
| 3 | 1 | 1 | 75 | 17 | 200 |
| 3 | 1 | 2 | 120 | 37 | 420 |
| 3 | 1 | 3 | 160 | 40 | 420 |
| 3 | 2 | 0 | 93 | 18 | 420 |
| 3 | 2 | 1 | 150 | 37 | 420 |
| 3 | 2 | 2 | 210 | 40 | 430 |
| 3 | 2 | 3 | 290 | 90 | 1000 |
| 3 | 3 | 0 | 240 | 42 | 1000 |
| 3 | 3 | 1 | 460 | 90 | 2000 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 180 | 4100 |
| 3 | 3 | 3 | >1100 | 420 | - |

Fonte: Bacteriological Analytical Manual Online, 2001.

Tabela 3. NMP por grama ou mL para séries de 10 tubos com inóculos de 10 mL, 1,0 mL e 0,1mL e respectivos intervalos de confiança 95%.

| Número de Tubos Positivos | | | NMP/100 mL | Intervalo Confiança (95%) | |
|---------------------------|-----|-----|------------|---------------------------|----------|
| 10 | 1,0 | 0,1 | | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | <0,9 | -- | 3,1 |
| 0 | 0 | 1 | 0,9 | 0,04 | 3,1 |
| 0 | 0 | 2 | 1,8 | 0,33 | 5,1 |
| 0 | 1 | 0 | 0,9 | 0,04 | 3,6 |
| 0 | 1 | 1 | 1,8 | 0,33 | 5,1 |
| 0 | 2 | 0 | 1,8 | 0,33 | 5,1 |
| 0 | 2 | 1 | 2,7 | 0,8 | 7,2 |
| 0 | 3 | 0 | 2,7 | 0,8 | 7,2 |
| 1 | 0 | 0 | 0,94 | 0,05 | 5,1 |
| 1 | 0 | 1 | 1,9 | 0,33 | 5,1 |
| 1 | 0 | 2 | 2,8 | 0,8 | 7,2 |
| 1 | 1 | 0 | 1,9 | 0,33 | 5,7 |
| 1 | 1 | 1 | 2,9 | 0,8 | 7,2 |
| 1 | 1 | 2 | 3,8 | 1,4 | 9 |
| 1 | 2 | 0 | 2,9 | 0,8 | 7,2 |
| 1 | 2 | 1 | 3,8 | 1,4 | 9 |
| 1 | 3 | 0 | 3,8 | 1,4 | 9 |
| 1 | 3 | 1 | 4,8 | 2,1 | 11 |
| 1 | 4 | 0 | 4,8 | 2,1 | 11 |
| 2 | 0 | 0 | 2 | 0,37 | 7,2 |
| 2 | 0 | 1 | 3 | 0,81 | 7,3 |
| 2 | 0 | 2 | 4 | 1,4 | 9 |

| | | | | | |
|---|---|---|-----|------|-----|
| 2 | 1 | 0 | 3 | 0,82 | 7,8 |
| 2 | 1 | 1 | 4 | 1,4 | 9 |
| 2 | 1 | 2 | 5 | 2,1 | 11 |
| 2 | 2 | 0 | 4 | 1,4 | 9,1 |
| 2 | 2 | 1 | 5 | 2,1 | 11 |
| 2 | 2 | 2 | 6,1 | 3 | 14 |
| 2 | 3 | 0 | 5,1 | 2,1 | 11 |
| 2 | 3 | 1 | 6,1 | 3 | 14 |
| 2 | 4 | 0 | 6,1 | 3 | 14 |
| 2 | 4 | 1 | 7,2 | 3,1 | 15 |
| 2 | 5 | 0 | 7,2 | 3,1 | 15 |
| 3 | 0 | 0 | 3,2 | 0,9 | 9 |
| 3 | 0 | 1 | 4,2 | 1,4 | 9,1 |
| 3 | 0 | 2 | 5,3 | 2,1 | 11 |
| 3 | 1 | 0 | 4,2 | 1,4 | 10 |
| 3 | 1 | 1 | 5,3 | 2,1 | 11 |
| 3 | 1 | 2 | 6,4 | 3 | 14 |
| 3 | 2 | 0 | 5,3 | 2,1 | 12 |
| 3 | 2 | 1 | 6,4 | 3 | 14 |
| 3 | 2 | 2 | 7,5 | 3,1 | 15 |
| 3 | 3 | 0 | 6,5 | 3 | 14 |
| 3 | 3 | 1 | 7,6 | 3,1 | 15 |
| 3 | 3 | 2 | 8,7 | 3,6 | 17 |
| 3 | 4 | 0 | 7,6 | 3,1 | 15 |
| 3 | 4 | 1 | 8,7 | 3,6 | 17 |
| 3 | 5 | 0 | 8,8 | 3,6 | 17 |
| 4 | 0 | 0 | 4,5 | 1,6 | 11 |
| 4 | 0 | 1 | 5,6 | 2,2 | 12 |
| 4 | 0 | 2 | 6,8 | 3 | 14 |
| 4 | 1 | 0 | 5,6 | 2,2 | 12 |
| 4 | 1 | 1 | 6,8 | 3 | 14 |
| 4 | 1 | 2 | 8 | 3,6 | 17 |
| 4 | 2 | 0 | 6,8 | 3 | 15 |
| 4 | 2 | 1 | 8 | 3,6 | 17 |
| 4 | 2 | 2 | 9,2 | 3,7 | 17 |
| 4 | 3 | 0 | 8,1 | 3,6 | 17 |
| 4 | 3 | 1 | 9,3 | 4,5 | 18 |
| 4 | 3 | 2 | 10 | 5 | 20 |
| 4 | 4 | 0 | 9,3 | 4,5 | 18 |
| 4 | 4 | 1 | 11 | 5 | 20 |
| 4 | 5 | 0 | 11 | 5 | 20 |
| 4 | 5 | 1 | 12 | 5,6 | 22 |
| 4 | 6 | 0 | 12 | 5,6 | 22 |
| 5 | 0 | 0 | 6 | 2,5 | 14 |
| 5 | 0 | 1 | 7,2 | 3,1 | 15 |
| 5 | 0 | 2 | 8,5 | 3,6 | 17 |
| 5 | 0 | 3 | 9,8 | 4,5 | 18 |
| 5 | 1 | 0 | 7,3 | 3,1 | 15 |
| 5 | 1 | 1 | 8,5 | 3,6 | 17 |
| 5 | 1 | 2 | 9,8 | 4,5 | 18 |
| 5 | 1 | 3 | 11 | 5 | 21 |
| 5 | 2 | 0 | 8,6 | 3,6 | 17 |
| 5 | 2 | 1 | 9,9 | 4,5 | 18 |
| 5 | 2 | 2 | 11 | 5 | 21 |
| 5 | 3 | 0 | 10 | 4,5 | 18 |
| 5 | 3 | 1 | 11 | 5 | 21 |
| 5 | 3 | 2 | 13 | 5,6 | 23 |
| 5 | 4 | 0 | 11 | 5 | 21 |
| 5 | 4 | 1 | 13 | 5,6 | 23 |
| 5 | 4 | 2 | 14 | 7 | 26 |
| 5 | 5 | 0 | 13 | 6,3 | 25 |
| 5 | 5 | 1 | 14 | 7 | 26 |
| 5 | 6 | 0 | 14 | 7 | 26 |
| 6 | 0 | 0 | 7,8 | 3,1 | 17 |
| 6 | 0 | 1 | 9,2 | 3,6 | 17 |
| 6 | 0 | 2 | 11 | 5 | 20 |
| 6 | 0 | 3 | 12 | 5,6 | 22 |
| 6 | 1 | 0 | 9,2 | 3,7 | 18 |
| 6 | 1 | 1 | 11 | 5 | 21 |
| 6 | 1 | 2 | 12 | 5,6 | 22 |
| 6 | 1 | 3 | 14 | 7 | 26 |
| 6 | 2 | 0 | 11 | 5 | 21 |
| 6 | 2 | 1 | 12 | 5,6 | 22 |
| 6 | 2 | 2 | 14 | 7 | 26 |
| 6 | 2 | 3 | 15 | 7,4 | 30 |
| 6 | 3 | 0 | 12 | 5,6 | 23 |
| 6 | 3 | 1 | 14 | 7 | 26 |
| 6 | 3 | 2 | 15 | 7,4 | 30 |
| 6 | 4 | 0 | 14 | 7 | 26 |
| 6 | 4 | 1 | 15 | 7,4 | 30 |
| 6 | 4 | 2 | 17 | 9 | 34 |
| 6 | 5 | 0 | 16 | 7,4 | 30 |
| 6 | 5 | 1 | 17 | 9 | 34 |
| 6 | 5 | 2 | 19 | 9 | 34 |
| 6 | 6 | 0 | 17 | 9 | 34 |
| 6 | 6 | 1 | 19 | 9 | 34 |
| 6 | 7 | 0 | 19 | 9 | 34 |
| 7 | 0 | 0 | 10 | 4,5 | 20 |
| 7 | 0 | 1 | 12 | 5 | 21 |

| | | | | | |
|---|---|---|----|-----|-----|
| 7 | 0 | 2 | 13 | 6.3 | 25 |
| 7 | 0 | 3 | 15 | 7.2 | 28 |
| 7 | 1 | 0 | 12 | 5 | 22 |
| 7 | 1 | 1 | 13 | 6.3 | 25 |
| 7 | 1 | 2 | 15 | 7.2 | 28 |
| 7 | 1 | 3 | 17 | 7.7 | 31 |
| 7 | 2 | 0 | 13 | 6.4 | 26 |
| 7 | 2 | 1 | 15 | 7.2 | 28 |
| 7 | 2 | 2 | 17 | 7.7 | 31 |
| 7 | 2 | 3 | 19 | 9 | 34 |
| 7 | 3 | 0 | 15 | 7.2 | 30 |
| 7 | 3 | 1 | 17 | 9 | 34 |
| 7 | 3 | 2 | 19 | 9 | 34 |
| 7 | 3 | 3 | 21 | 10 | 39 |
| 7 | 4 | 0 | 17 | 9 | 34 |
| 7 | 4 | 1 | 19 | 9 | 34 |
| 7 | 4 | 2 | 21 | 10 | 39 |
| 7 | 4 | 3 | 23 | 11 | 44 |
| 7 | 5 | 0 | 19 | 9 | 34 |
| 7 | 5 | 1 | 21 | 10 | 39 |
| 7 | 5 | 2 | 23 | 11 | 44 |
| 7 | 6 | 0 | 21 | 10 | 39 |
| 7 | 6 | 1 | 23 | 11 | 44 |
| 7 | 6 | 2 | 25 | 12 | 46 |
| 7 | 7 | 0 | 23 | 11 | 44 |
| 7 | 7 | 1 | 26 | 12 | 50 |
| 8 | 0 | 0 | 13 | 5.6 | 25 |
| 8 | 0 | 1 | 15 | 7 | 26 |
| 8 | 0 | 2 | 17 | 7.5 | 30 |
| 8 | 0 | 3 | 19 | 9 | 34 |
| 8 | 1 | 0 | 15 | 7.1 | 28 |
| 8 | 1 | 1 | 17 | 7.7 | 31 |
| 8 | 1 | 2 | 19 | 9 | 34 |
| 8 | 1 | 3 | 21 | 10 | 39 |
| 8 | 2 | 0 | 17 | 7.7 | 34 |
| 8 | 2 | 1 | 19 | 9 | 34 |
| 8 | 2 | 2 | 21 | 10 | 39 |
| 8 | 2 | 3 | 23 | 11 | 44 |
| 8 | 3 | 0 | 19 | 9 | 34 |
| 8 | 3 | 1 | 21 | 10 | 39 |
| 8 | 3 | 2 | 24 | 11 | 44 |
| 8 | 3 | 3 | 26 | 12 | 50 |
| 8 | 4 | 0 | 22 | 10 | 39 |
| 8 | 4 | 1 | 24 | 11 | 44 |
| 8 | 4 | 2 | 26 | 12 | 50 |
| 8 | 4 | 3 | 29 | 14 | 58 |
| 8 | 5 | 0 | 24 | 11 | 44 |
| 8 | 5 | 1 | 27 | 12 | 50 |
| 8 | 5 | 2 | 29 | 14 | 58 |
| 8 | 5 | 3 | 32 | 15 | 62 |
| 8 | 6 | 0 | 27 | 12 | 50 |
| 8 | 6 | 1 | 30 | 14 | 58 |
| 8 | 6 | 2 | 33 | 15 | 62 |
| 8 | 7 | 0 | 30 | 14 | 58 |
| 8 | 7 | 1 | 33 | 17 | 73 |
| 8 | 7 | 2 | 36 | 17 | 74 |
| 8 | 8 | 0 | 34 | 17 | 73 |
| 8 | 8 | 1 | 37 | 17 | 74 |
| 9 | 0 | 0 | 17 | 7.5 | 31 |
| 9 | 0 | 1 | 19 | 9 | 34 |
| 9 | 0 | 2 | 22 | 10 | 39 |
| 9 | 0 | 3 | 24 | 11 | 44 |
| 9 | 1 | 0 | 19 | 9 | 39 |
| 9 | 1 | 1 | 22 | 10 | 40 |
| 9 | 1 | 2 | 25 | 11 | 44 |
| 9 | 1 | 3 | 28 | 14 | 58 |
| 9 | 1 | 4 | 31 | 14 | 58 |
| 9 | 2 | 0 | 22 | 10 | 44 |
| 9 | 2 | 1 | 25 | 11 | 46 |
| 9 | 2 | 2 | 28 | 14 | 58 |
| 9 | 2 | 3 | 32 | 14 | 58 |
| 9 | 2 | 4 | 35 | 17 | 73 |
| 9 | 3 | 0 | 25 | 12 | 50 |
| 9 | 3 | 1 | 29 | 14 | 58 |
| 9 | 3 | 2 | 32 | 15 | 62 |
| 9 | 3 | 3 | 36 | 17 | 74 |
| 9 | 3 | 4 | 40 | 20 | 91 |
| 9 | 4 | 0 | 29 | 14 | 58 |
| 9 | 4 | 1 | 33 | 15 | 62 |
| 9 | 4 | 2 | 37 | 17 | 74 |
| 9 | 4 | 3 | 41 | 20 | 91 |
| 9 | 4 | 4 | 45 | 20 | 91 |
| 9 | 5 | 0 | 33 | 17 | 73 |
| 9 | 5 | 1 | 37 | 17 | 74 |
| 9 | 5 | 2 | 42 | 20 | 91 |
| 9 | 5 | 3 | 46 | 20 | 91 |
| 9 | 5 | 4 | 51 | 25 | 120 |
| 9 | 6 | 0 | 38 | 17 | 74 |
| 9 | 6 | 1 | 43 | 20 | 91 |

| | | | | | |
|----|----|----|-------|------|------|
| 9 | 6 | 2 | 47 | 21 | 100 |
| 9 | 6 | 3 | 53 | 25 | 120 |
| 9 | 7 | 0 | 44 | 20 | 91 |
| 9 | 7 | 1 | 49 | 21 | 100 |
| 9 | 7 | 2 | 54 | 25 | 120 |
| 9 | 7 | 3 | 60 | 26 | 120 |
| 9 | 8 | 0 | 50 | 25 | 120 |
| 9 | 8 | 1 | 55 | 25 | 120 |
| 9 | 8 | 2 | 61 | 26 | 120 |
| 9 | 8 | 3 | 68 | 30 | 140 |
| 9 | 9 | 0 | 57 | 25 | 120 |
| 9 | 9 | 1 | 63 | 30 | 140 |
| 9 | 9 | 2 | 70 | 30 | 140 |
| 10 | 0 | 0 | 23 | 11 | 44 |
| 10 | 0 | 1 | 27 | 12 | 50 |
| 10 | 0 | 2 | 31 | 14 | 58 |
| 10 | 0 | 3 | 37 | 17 | 73 |
| 10 | 1 | 0 | 27 | 12 | 57 |
| 10 | 1 | 1 | 32 | 14 | 61 |
| 10 | 1 | 2 | 38 | 17 | 74 |
| 10 | 1 | 3 | 44 | 20 | 91 |
| 10 | 1 | 4 | 52 | 25 | 120 |
| 10 | 2 | 0 | 33 | 15 | 73 |
| 10 | 2 | 1 | 39 | 17 | 79 |
| 10 | 2 | 2 | 46 | 20 | 91 |
| 10 | 2 | 3 | 54 | 25 | 120 |
| 10 | 2 | 4 | 63 | 30 | 140 |
| 10 | 3 | 0 | 40 | 17 | 91 |
| 10 | 3 | 1 | 47 | 20 | 100 |
| 10 | 3 | 2 | 56 | 25 | 120 |
| 10 | 3 | 3 | 66 | 30 | 140 |
| 10 | 3 | 4 | 77 | 34 | 150 |
| 10 | 3 | 5 | 89 | 39 | 180 |
| 10 | 4 | 0 | 49 | 21 | 120 |
| 10 | 4 | 1 | 59 | 25 | 120 |
| 10 | 4 | 2 | 70 | 30 | 150 |
| 10 | 4 | 3 | 82 | 38 | 180 |
| 10 | 4 | 4 | 94 | 44 | 180 |
| 10 | 4 | 5 | 110 | 50 | 210 |
| 10 | 5 | 0 | 62 | 26 | 140 |
| 10 | 5 | 1 | 74 | 30 | 150 |
| 10 | 5 | 2 | 87 | 38 | 180 |
| 10 | 5 | 3 | 100 | 44 | 180 |
| 10 | 5 | 4 | 110 | 50 | 210 |
| 10 | 5 | 5 | 130 | 57 | 220 |
| 10 | 5 | 6 | 140 | 70 | 280 |
| 10 | 6 | 0 | 79 | 34 | 180 |
| 10 | 6 | 1 | 94 | 39 | 180 |
| 10 | 6 | 2 | 110 | 50 | 210 |
| 10 | 6 | 3 | 120 | 57 | 220 |
| 10 | 6 | 4 | 140 | 70 | 280 |
| 10 | 6 | 5 | 160 | 74 | 280 |
| 10 | 6 | 6 | 180 | 91 | 350 |
| 10 | 7 | 0 | 100 | 44 | 210 |
| 10 | 7 | 1 | 120 | 50 | 220 |
| 10 | 7 | 2 | 140 | 61 | 280 |
| 10 | 7 | 3 | 150 | 73 | 280 |
| 10 | 7 | 4 | 170 | 91 | 350 |
| 10 | 7 | 5 | 190 | 91 | 350 |
| 10 | 7 | 6 | 220 | 100 | 380 |
| 10 | 7 | 7 | 240 | 110 | 480 |
| 10 | 8 | 0 | 130 | 60 | 250 |
| 10 | 8 | 1 | 150 | 70 | 280 |
| 10 | 8 | 2 | 170 | 80 | 350 |
| 10 | 8 | 3 | 200 | 90 | 350 |
| 10 | 8 | 4 | 220 | 100 | 380 |
| 10 | 8 | 5 | 250 | 120 | 480 |
| 10 | 8 | 6 | 280 | 120 | 480 |
| 10 | 8 | 7 | 310 | 150 | 620 |
| 10 | 8 | 8 | 350 | 150 | 620 |
| 10 | 9 | 0 | 170 | 74 | 310 |
| 10 | 9 | 1 | 200 | 91 | 380 |
| 10 | 9 | 2 | 230 | 100 | 480 |
| 10 | 9 | 3 | 260 | 120 | 480 |
| 10 | 9 | 4 | 300 | 140 | 620 |
| 10 | 9 | 5 | 350 | 150 | 630 |
| 10 | 9 | 6 | 400 | 180 | 820 |
| 10 | 9 | 7 | 460 | 210 | 970 |
| 10 | 9 | 8 | 530 | 210 | 970 |
| 10 | 9 | 9 | 610 | 280 | 1300 |
| 10 | 10 | 0 | 240 | 110 | 480 |
| 10 | 10 | 1 | 290 | 120 | 620 |
| 10 | 10 | 2 | 350 | 150 | 820 |
| 10 | 10 | 3 | 430 | 180 | 970 |
| 10 | 10 | 4 | 540 | 210 | 1300 |
| 10 | 10 | 5 | 700 | 280 | 1500 |
| 10 | 10 | 6 | 920 | 350 | 1900 |
| 10 | 10 | 7 | 1200 | 480 | 2400 |
| 10 | 10 | 8 | 1600 | 620 | 3400 |
| 10 | 10 | 9 | 2300 | 810 | 5300 |
| 10 | 10 | 10 | >2300 | 1300 | -- |

Fonte: Adaptado Bacteriological Analytical Manual Online, 2001.

3. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA
 BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual de métodos microbiológicas para alimentos. Coordenação Geral de Laboratório Animal. 1991/1992 2ª revisão. 136p.
 MATURIN,L.J.; PEELER, J.T. Aerobic Plate Count. In: Bacteriological Analytical Manual. 8 ed. Arlington, AOAC International, 1995. p. 3.01 - 3.10.
 SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture Methods for Enumeration of Microorganisms. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 ed. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), Washington: American Public Health Association, 2001. p. 53-62.
 FDA. Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: [http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)

ANEXO IV PROCEDIMENTOS PARA CONTAGEM DE COLÔNIAS 1. INTRODUÇÃO

A aplicação de procedimentos de controle durante o processo analítico visa à garantia da confiabilidade do resultado final, assegurando a sua repetibilidade, precisão e exatidão.

A precisão e a exatidão do método também dependerão da correta observação e aplicação dos procedimentos padronizados estabelecidos para a área analítica.

A garantia da validade dos resultados da contagem estará assegurada quando os resultados dos controles indicarem não haver qualquer falha em nenhuma etapa do processo analítico.

2. RECOMENDAÇÕES GERAIS

2.1 Sempre utilizar mais de uma placa, seja uma duplicata da mesma diluição, seja duas ou mais diluições diferentes.

2.2 As contagens deverão ser realizadas imediatamente após o período de incubação das placas.

2.3 Na impossibilidade de realizar a contagem imediatamente após o período de incubação, manter as placas sob refrigeração em temperatura de 4°C a 7°C por um período não superior a 24 horas.

Esse procedimento não deve tornar-se uma prática rotineira.

2.4 Para a contagem, selecionar placas que contenham um número de colônias que se encontre dentro do intervalo de precisão e repetibilidade estabelecido pelo método em uso (por exemplo, 20 a 200 colônias, 25 a 250 colônias, etc).

2.5 As colônias deverão ser contadas com o auxílio de contador de colônias equipado com placa de vidro ou acrílico, com diâmetro compatível com o das placas utilizadas, dividido milimetricamente em quadrantes com 1 cm² de área e com iluminação artificial uniforme.

2.6 O contador de colônias deverá ter capacidade para aumento de 1 a 2 vezes, com dispositivo de regulagem de altura para melhor ajuste do foco, podendo ainda dispor de sistema eletrônico ou manual de registro das contagens.

2.7 O contador de colônias deverá estar localizado em local onde não haja incidência direta de luz sobre a plataforma de apoio da placa, para evitar possíveis enganos na identificação das colônias.

2.8 Utilizar o estereoscópio para observação de características morfológicas das colônias, para diferenciar microrganismos de partículas da amostra ou do meio e para seleção e isolamento de colônias.

2.9 Verificar sempre a proporcionalidade dos resultados obtidos nas diluições sucessivas.

3. REGRAS GERAIS PARA CÁLCULO E REGISTROS

3.1 Expressão de resultados de contagem

No cálculo das contagens, o resultado final será expresso em UFC/g ou mL, levando-se em conta a diluição empregada, da seguinte maneira:

$$R = a \times 10^b \text{ UFC/g ou mL}$$

R = resultado

a = os dois primeiros algarismos significativos, números de 0

a 9

b = expoente (0 a 10)

UFC = unidade formadora de colônias

g = grama e mL= mililitro

Exemplos:

Diluição 10⁻² (1:100)

Média das contagens: 25 UFC

Resultado: 25 x 100 = 2.500 = 2,5 x 10³ UFC/g ou mL

Diluição 10⁻³ (1:1.000)

Média das contagens: 38 UFC

Resultado: 38 x 1.000 = 38.000 = 3,8 x 10⁴ UFC/g ou mL

O resultado final será expresso considerando-se os dois primeiros algarismos representativos, separados por vírgula. Os algarismos subsequentes, quando existirem, deverão ser arredondados e transformados em potência de 10.

3.2 Arredondamento de resultados

Quando se fizer necessário, e visando não criar uma falsa idéia de precisão, aplicar a seguinte regra para a aproximação dos resultados:

3.2.1 Arredondar para cima o segundo algarismo ou o subsequente quando o algarismo imediatamente após for superior a 5.

Exemplo:

Diluição 10⁻²

Média das contagens: 186 UFC

Arredondando-se o terceiro algarismo para cima tem-se como resultado:

$$190 \times 100 = 19.000 = 1,9 \times 10^4 \text{ UFC/g ou mL}$$

3.2.2 Arredondar para baixo o segundo algarismo ou o subsequente quando o algarismo imediatamente após for inferior a 5.

Exemplo:

Diluição 10⁻²

Média das contagens: 184 UFC

Arredondando o terceiro algarismo para baixo tem-se como resultado:

$$180 \times 100 = 18.000 = 1,8 \times 10^4 \text{ UFC/g ou mL}$$

3.2.3 Nos casos em que o terceiro algarismo ou o subsequente for igual a cinco, arredondar para baixo quando o segundo ou o subsequente for menor ou igual a 5 e para cima quando for maior que 5.

Exemplos:

Diluição 10⁻²

Média das contagens: 185 UFC

Arredondando o terceiro algarismo para cima tem-se como resultado:

$$190 \times 100 = 19.000 = 1,9 \times 10^4 \text{ UFC/g ou mL}$$

Média das contagens: 145 UFC

Arredondando o terceiro algarismo para baixo tem-se como resultado:

$$140 \times 100 = 14.000 = 1,4 \times 10^4 \text{ UFC/g ou mL}$$

Média das contagens: 155 UFC

Arredondando o terceiro algarismo para baixo tem-se como resultado:

$$150 \times 100 = 15.000 = 1,5 \times 10^4 \text{ UFC/g ou mL}$$

3.2.4 Arredondamento de resultados obtidos pela contagem de placas em duplicata de duas diluições diferentes.

Nas contagens de placas de duas diluições diferentes, o procedimento de arredondamento é semelhante ao da contagem de mesma diluição, isto é, só poderá ser efetuado após o cálculo da média das contagens, que será explicado a seguir nas regras específicas para contagem de colônias.

3.3 Resultados estimados

Nas contagens, em que em todas as placas o número de colônias encontrado estiver fora do intervalo de precisão e repetibilidade da metodologia aplicada, incluir no registro do resultado final a expressão "estimado" ou "por estimativa", por meio da abreviatura " est.", após o g ou mL.

Quando houver condições para efetuar a contagem, expressar o número obtido. Pode-se ainda expressar o resultado como o limite inferior com o sinal de menor ou o superior com o sinal de maior, por estimativa ou estimado.

Exemplos, com limite entre 15 e 150:

Diluição 10⁻²

Média das contagens:160 UFC

Resultado: 160 x 100 = 16.000 = 1,6 x 10⁴ UFC/g ou mL

est.

ou >1,5 x 10⁴ UFC/g ou mL est.

Média das contagens: 11 UFC

Resultado: 11 x 100 = 1.100 = 1,1 x 10³ UFC/g ou mL

est.

ou <1,5 x 10³ UFC/g ou mL est.

Nas contagens de amostras líquidas inoculadas diretamente, ou seja, diluição 10⁰, quando não houver crescimento ou a contagem for menor que 10 UFC, o resultado será expresso por estimativa e na potência 10⁰.

Caso a contagem seja superior a 10 UFC o resultado será expresso de acordo com o número obtido, ou seja, potência de 10¹ ou 10².

Exemplo 1

Diluição 10⁰:

Intervalo de seleção: 15 a 150

Nº de colônias contadas:12

Resultado: 12 x 1 = 12 = 1,2 x 10¹ UFC/mL est. ou <1,5 x

10¹ UCF/mL est.

Exemplo 2

Diluição 10⁰:

Intervalo de seleção: 15 e 150

Nº de colônias contadas: 232

Resultado: 232 x 1 = 232 = 2,3 x 10² UFC/mL est. ou

> 1,5 x 10² UFC/mL est.

4. REGRAS ESPECÍFICAS PARA CONTAGEM DE COLÔNIAS

As contagens se realizam de maneira similar para os casos em que os limites de números de colônias para as placas selecionadas se encontram em diversos intervalos como 15 a 150, 20 a 200, 30 a 300 ou outro.

4.1 Situações nas quais o número de colônias, nas diversas diluições, se encontra dentro dos limites do intervalo de precisão e de repetibilidade.

Para os exemplos abaixo, foi considerada a seleção de placas com número de colônias contido no intervalo de precisão e repetibilidade de 25 a 250 colônias.

4.1.1 Mesma diluição - placas em duplicata

Calcular a média aritmética dos resultados encontrados e multiplicar pela diluição correspondente.

Exemplo:

Dil: 10⁻³ = 130 colônias

Dil: 10⁻³ = 224 colônias

(130 + 224) /2 = 177 x 1.000 = 177.000 → 180.000 UFC

Resultado: 1,8 x 10⁵ UFC/g ou mL

4.1.2 Diluições Diferentes

Multiplicar o resultado encontrado em cada placa pela respectiva diluição e calcular a média aritmética.

Exemplo:

Dil: 10⁻³ = 210 colônias

210 x 1.000 = 210.000

Dil: 10⁻⁴ = 32 colônias

32 x 10.000 = 320.000

Fazer a média das diluições diferentes

$$(210.000 + 320.000) /2 = 265.000 \rightarrow 270.000$$

Resultado: 2,7 x 10⁵ UFC/g ou mL

4.2 Situações nas quais o número de colônias se encontra dentro dos limites do intervalo de precisão e de repetibilidade em uma só diluição.

Para os exemplos abaixo, foi considerada a seleção de placas com número de colônias contido no intervalo de precisão e repetibilidade de 25 a 250 colônias.

Quando, nas diversas diluições, o número de colônias em uma diluição encontra-se dentro do limite de 25 a 250 colônias e na outra diluição encontra-se fora deste limite, o resultado não será expresso como estimado.

4.2.1 Mesma Diluição - placas em duplicata

Calcular a média aritmética dos resultados encontrados e multiplicar pela diluição correspondente.

Exemplo:

Dil: 10⁻³ = 230 colônias

Dil: 10⁻³ = 261 colônias

(230+261) /2 = 245,5 x 1.000 = 245.500 → 240.000

Resultado: 2,4 x 10⁵ UFC/g ou mL

4.2.2 Diluições diferentes

Exemplo 1:

Dil: 10⁻³ = 232 colônias

232 x 1.000 = 232.000

Dil: 10⁻⁴ = 15 colônias

15 x 10.000 = 150.000

(232.000 + 150.000) /2 = 191.000

Resultado final: 1,9 x 10⁵ UFC/g ou mL

Exemplo 2:

Dil: 10⁻³ = 270 colônias

270 x 1.000 = 270.000

Dil: 10⁻⁴ = 29 colônias

29 x 10.000 = 290.000

(270.000 + 290.000) /2 = 280.000

Resultado final: 2,8 x 10⁵ UFC/g ou mL

4.3 Situações nas quais as placas apresentam resultados de contagem acima do intervalo de precisão e repetibilidade

4.3.1 Quando for possível realizar a contagem em pelo menos uma das placas:

Para os exemplos abaixo, foi considerada a seleção de placas com número de colônias contido no intervalo de precisão e repetibilidade de 25 a 250 colônias.

Quando todas as placas apresentarem mais de 250 colônias na maior diluição, multiplicar o resultado encontrado em cada placa pelas respectivas diluições e calcular a média aritmética.

Expressar o resultado como estimado.

Exemplo:

Dil: 10⁻⁴ = 380 colônias

380 x 10.000 = 3.800.000

Resultado: 3,8 x 10⁶ UFC/g ou mL est.

4.3.2 Quando o número for excessivamente alto para contar

Nunca expressar o resultado como “muito numeroso para contar” ou “TNTC” (too numerous to count).

Escolher porções da placa que sejam representativas da distribuição das colônias em toda placa e estimar o número de colônias presentes.

4.3.2.1 Se houver menos de 10 colônias por cm²

Contar as colônias em 12 cm² selecionando 6 quadrados consecutivos dispostos horizontalmente e 6 quadrados consecutivos dispostos em ângulo reto com os quadrados horizontais escolhidos.

Somar as contagens obtidas nos 12 quadrados e dividir o valor obtido por 12, de forma a obter a média de colônias por cm² da placa.

Multiplicar o valor encontrado para cada cm² pela área da placa utilizada (placas padrão de plástico de 15 x 100 mm possuem área aproximada de 56 cm²) e, finalmente, multiplicar pela diluição usada.

Expressar o resultado como estimado.

Exemplo:

Área das placas: 56 cm²

Maior diluição inoculada: 10⁻³

| | | |
|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Quadrado 1: 7 colônias | Quadrado 5: 6 colônias | Quadrado 9: 8 colônias |
| Quadrado 2: 7 colônias | Quadrado 6: 8 colônias | Quadrado 10: 6 colônias |
| Quadrado 3: 6 colônias | Quadrado 7: 8 colônias | Quadrado 11: 9 colônias |
| Quadrado 4: 8 colônias | Quadrado 8: 8 colônias | Quadrado 12: 7 colônias |

$$7+7+6+8+6+8+8+8+8+8+6+9+7 = 88/12 = 7,3 \text{ UFC por cm}^2$$

$$7,3 \times 56 \times 1.000 = 408.800$$

Resultado final = 4,1 x 10⁵ UFC/g ou mL estimado.

4.3.2.2 Quando o número de colônias por cm² exceder a 10

Contar as colônias em 4 quadrados representativos, somar os valores encontrados e dividir por 4 para obter a média de colônias por cm² da placa.

Multiplicar o valor encontrado para cada cm² pela área da placa utilizada (placas padrão de plástico de 15 x 100 mm possuem área aproximada de 56 cm²) e, finalmente, multiplicar pela diluição usada.

Expressar o resultado como estimado.

Exemplo:

Área das placas: 56 cm²

Maior diluição inoculada: 10⁻³

Quadrado 1: 35 colônias

Quadrado 2: 40 colônias

Quadrado 3: 32 colônias

Quadrado 4: 37 colônias

35 + 40 + 32 + 37 = 144 / 4 = 36 UFC por cm²

36 x 56 x 1.000 = 2.016.000

Resultado final = 2,0 x 10⁶ UFC/g ou mL est.

4.3.2.3 Quando o número de colônias por cm² exceder a

100

Multiplicar a área da placa por 100 e após multiplicar pela maior diluição usada. Expressar o resultado como "maior que" (>) o número obtido.

Exemplo:

Placa de área de 56 cm².

Diluições usadas: 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴.

Observou-se mais de 100 colônias por cm² nas placas onde foi inoculada a maior diluição.

56 x 100 x 10.000 = 56.000.000

Resultado final = > 5,6 x 10⁷ UFC/g ou mL est.

OBS: Nas situações descritas acima, nos itens 4.2 e 4.3, o resultado também pode ser expresso como "maior que 250 vezes a maior diluição utilizada". Expressar o resultado como número estimado.

Exemplo:

10⁻² (> 250)

10⁻³ (> 250) = > 2.500.000

10⁻⁴ (> 250)

Resultado: > 2,5 x 10⁶ UFC/g ou mL est.

4.4 Placas com colônias invasoras

4.4.1 Quando a área invadida exceder 1/4 da área total, expressar o resultado como "presença de colônias invasoras".

4.4.2 Quando a área invadida for inferior a 1/4 da área total, contar tanto as invasoras como as normais. Quando as colônias invasoras estiverem aglutinadas, contar como uma colônia e quando estiverem isoladas, contar uma a uma.

4.5 Contagem incoerentes

Quando o resultado da contagem da maior diluição for duas ou mais vezes maior que o resultado obtido na diluição anterior, ou o da menor diluição for duas ou mais vezes maior que o resultado obtido na diluição posterior, considerar como resultado final o valor da menor diluição.

Exemplo 1:

Dil: 10⁻² = 140 colônias (14.000)

Dil: 10⁻³ = 52 colônias (52.000)

Resultado: 1,4 x 10⁴ UFC/g ou mL

Exemplo 2:

Dil: 10⁻² = 95 colônias (9.500)

Dil: 10⁻³ = 2 colônias (2.000)

Resultado: 9,5 x 10⁴ UFC/g ou mL

4.6 Situações nas quais todas as placas encontram-se com números de colônias abaixo dos limites do intervalo de precisão e repetibilidade.

Para os exemplos abaixo, foi considerada a seleção de placas com número de colônias contido no intervalo de precisão e repetibilidade de 25 a 250 colônias.

Neste caso, o resultado deve ser expresso pelo número de colônias da placa de menor diluição, por estimativa.

Exemplo:

Dil: 10⁻² = 21 UFC

Dil: 10⁻³ = 2 UFC

21 x 100 = 2.100

Resultado 2,1 x 10³ UFC/g ou mL est.

4.6.1 Situações nas quais todas as placas não apresentem crescimento de colônias, independente do intervalo de seleção

Quando em nenhuma placa for observado o crescimento de colônias, emitir o resultado como estimado: <1,0 vezes a menor diluição utilizada.

Ex.: <1,0 x 10¹ UFC/g ou mL est.

4.7 Cálculo de contagens quando é necessária a confirmação de colônias Típicas (T) e Atípicas (A)

Verificar qual das situações descritas anteriormente deverá ser aplicada.

Seguir a regra específica para cada caso, contando e registrando, separadamente, colônias típicas (T) e atípicas (A).

4.7.1 Quando todas as colônias repicadas são confirmadas pelos testes confirmativos

O resultado final da contagem será igual ao número obtido na contagem inicial multiplicado pela diluição (de acordo com o determinado pela regra de contagem aplicada).

4.7.2 Quando não se confirmam todas as colônias repicadas

Quando o número de colônias confirmadas é diferente do número de colônias repicadas, calcular o resultado final utilizando a seguinte fórmula:

$R = \frac{C \times r \times d}{R}$

R = Resultado

C = número de colônias contadas

r = número de colônias confirmadas

r = número de colônias repicadas

d = diluição utilizada

Exemplo:

Diluição 10⁻² = 30 colônias contadas, das quais 20 eram típicas e 10 atípicas.

Para confirmação, foram repicadas 5 colônias de cada tipo. Quatro colônias típicas e duas atípicas apresentaram resultado positivo nos testes confirmativos.

Aplicando-se a fórmula, teremos para colônias típicas:

$$R_T = \frac{20 \times 4 \times 100}{5} = 1.600$$

Aplicando-se a fórmula, teremos para colônias atípicas:

$$R_A = \frac{10 \times 2 \times 100}{5} = 400$$

O resultado final será igual à soma das colônias típicas e atípicas confirmadas:

Resultado final = R_T + R_A = 1600 + 400 = 2000 = 2,0 x 10³ UFC/g ou mL.

4.7.3 Quando for necessário contar colônias típicas e atípicas em placas de diferentes diluições

Nunca somar colônias típicas ou atípicas de diferentes diluições, pois colônias atípicas em uma determinada diluição poderão se apresentar típicas em diluições subsequentes. Submeter aos testes confirmativos, segundo a metodologia específica para cada caso, 3 a 5 colônias típicas e 3 a 5 colônias atípicas da diluição escolhida.

Calcular o número de UFC/g ou mL somente após a confirmação de cada tipo (T e A) em uma mesma diluição.

Exemplo:

Diluição 10⁻² = 240 colônias contadas, das quais 50 eram típicas e 190 atípicas.

Diluição 10⁻³ = 20 colônias típicas e 5 atípicas.

Como na diluição 10⁻³ o número de colônias se encontra fora do intervalo de precisão e repetibilidade, a diluição escolhida para confirmação foi 10⁻². Destas, foram repicadas 5 colônias típicas e 5 colônias atípicas. Todas as colônias típicas e 4 atípicas apresentaram resultado positivo nos testes confirmativos.

$$10^{-2} R_T = \frac{50 \times 5 \times 100}{5} = 5000$$

Aplicando-se a fórmula, teremos para colônias atípicas:

$$10^{-2} R_A = \frac{190 \times 4 \times 100}{5} = 15.200$$

Colônias confirmadas na diluição 10⁻² = 20.200 colônias

Resultado final será a soma do número de colônias confirmadas na diluição escolhida:

$$\text{Res final} = 5.000 + 15.200 = 2,0 \times 10^4 \text{ UFC/g ou mL.}$$

5. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual de métodos microbiológicos para alimentos. Coordenação Geral de Laboratório Animal. 1991/1992 2ª revisão. 136p.

SWANSON, K.M.J.; PETRAN, R.L.; HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.53-62.

ANEXO V PROCEDIMENTOS PARA O PREPARO, PESAGEM E DESCARTE DE AMOSTRAS

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 A pesagem e o preparo de amostras são pontos críticos de controle do processo analítico.

1.2 O local deve estar higienizado antes do início da pesagem, conforme norma específica do laboratório.

1.3 Deve ser feito um controle do ambiente, conforme norma específica do laboratório.

1.4 O responsável pelo procedimento deve, antes do início dos trabalhos, realizar a assepsia das mãos e antebraços.

1.5 Deve ser usado uniforme de uso exclusivo para a área analítica e Equipamento de Proteção Individual (EPI), conforme estabelecido em normas específicas do laboratório.

1.6 Devem ser aplicados os procedimentos de verificação de balanças, conforme procedimento específico do laboratório.

1.7 O trabalho deve ser realizado perto da chama do bico de Bunsen, no caso de uso de bancada, ou em fluxo laminar específico para tal atividade.

1.8 A superfície de trabalho deve estar protegida por pano de campo embebido em solução desinfetante não inflamável, previamente testada.

1.9 Todo o material deve estar organizado e em condições adequadas de uso antes do início dos trabalhos.

1.10 Não deve ser permitida a entrada e a permanência de pessoas estranhas no local, principalmente durante a pesagem das amostras.

2. INSTRUÇÕES PARA MANUTENÇÃO E DESCARTE DE AMOSTRAS NO LABORATÓRIO

2.1 No laboratório, após o recebimento, as amostras devem ser estocadas até o momento da análise, conforme abaixo:

2.1.1 Refrigeradas perecíveis

As refrigeradas perecíveis devem ser mantidas sob refrigeração e analisadas o mais rapidamente possível. Aguardar no máximo até o dia seguinte.

2.1.2 Congeladas

As amostras congeladas devem ser mantidas no máximo a -18 °C e analisadas em um prazo máximo de 7 dias da colheita.

2.1.3 Não perecíveis

Amostras não perecíveis devem ser estocadas em lugar fresco, protegidas da umidade e da luz, de forma que suas características originais sejam mantidas, e analisadas o mais rapidamente possível.

2.2 Registros

Manter registros completos sobre as amostras recebidas e analisadas, conforme estabelecido em procedimento específico do laboratório.

2.3 Manutenção das amostras após a análise

Após a retirada das alíquotas para análise, as amostras devem ser embaladas em sacos plásticos de primeiro uso, perfeitamente identificadas e mantidas congeladas, conforme item 2.1.2.

As amostras estéveis em temperatura ambiente devem ser mantidas identificadas, protegidas por saco plástico de primeiro uso ou adequadamente fechadas na embalagem original, em temperatura ambiente e em local apropriado previamente estabelecido, conforme item 2.1.3.

Todas as amostras, exceto água, leite e outros produtos líquidos, os quais devem ser descartados logo após a realização do procedimento analítico, devem ser mantidas nas condições acima especificadas por 10 dias. Após esse prazo, as amostras devem ser descartadas conforme item 2.4.

2.4 Descarte de amostras analisadas

Todas as amostras que derem entrada no laboratório de microbiologia devem ser descartadas conforme procedimento específico estabelecido pelo laboratório.

3. PREPARO DA AMOSTRA

Quando a metodologia indicar diluentes diferentes, como por exemplo para provas de: Contagem de Microrganismos, Pesquisa de *Salmonella*, Pesquisa de *Listeria monocytogenes*, Pesquisa de *Vibrio cholerae*, etc., fazer tantas pesagens por amostra quantas forem necessárias.

3.1 Enlatados

No recebimento de amostras de conservas enlatadas, verificar a integridade das embalagens, observando se estão amassadas, levemente tufadas ou com microfugas aparentes.

Quando forem observadas quaisquer dessas alterações, proceder conforme estabelecido no Capítulo 20 "Teste de Esterilidade Comercial para Alimentos de baixa acidez".

3.1.1 Pré-incubação de amostras visualmente normais

As amostras de conservas visualmente normais devem ser incubadas a 36 ± 1°C por 10 dias a 55 ± 1°C por um período de 5 a 7 dias, conforme instruções abaixo:

- Retirar cuidadosamente a cinta de identificação;
- Lavar a lata com água e detergente, usando esponja;
- Secar com flanela limpa e seca;
- Identificar a amostra com o número de protocolo do laboratório;
- Recolocar a cinta de identificação usando fita adesiva para prendê-la na amostra;
- Forrar a prateleira das estufas com papel filtro e incubar as amostras de forma que a recravação fique em contato com o papel filtro.

Verificar, após o período de pré-incubação a 36 ± 1°C e 55 ± 1°C, se os recipientes não sofreram tufamento. Verificar se o papel filtro apresenta manchas que possam evidenciar a presença de microfugas ou vazamentos.

Registrar como "sem alteração" quando não se observar qualquer alteração dos recipientes e como "alterado" quando qualquer alteração for detectada. Descrever a alteração, quando ocorrer.

3.1.2 Amostras que sofreram alteração durante a pré-incubação

Ao final da pré-incubação, quando o papel filtro sobre o qual ficaram incubadas as latas estiver manchado, evidenciando a presença de microfugas, submeter a respectiva amostra à análise de aeróbios e anaeróbios, mesófilos ou termófilos, de acordo com a temperatura da pré-incubação.

3.1.3 Preparo das amostras após a pré-incubação

Fazer desinfecção da embalagem com algodão embebido em solução desinfetante e etanol 70% ou etanol 70° GL.

Posicionar a lata com borda não codificada para cima e costura lateral voltada para o lado oposto ao analista.

Usando um abridor de latas metálico, previamente esterilizado, abrir um pequeno orifício.

Abriu a lata e transferir porções do conteúdo para os meios de cultivo indicados.

3.2 Produtos UHT

No recebimento das amostras, verificar a integridade e al-
terações

As amostras que apresentarem qualquer alteração não devem ser analisadas. Fazer constar do COA "amostra alterada", incluindo informações sobre o tipo de alteração detectada.

3.2.1 Pré-incubação das amostras visualmente normais

Após sofrerem limpeza e desinfecção, as amostras devem ser incubadas sobre folhas de papel filtro, em estufa a 36 ± 1°C, por um período de 7 dias.

As amostras cujas embalagens mostrarem qualquer alteração após o período de incubação não devem ser analisadas. Emitir o resultado como "amostra alterada", incluindo informações sobre o tipo de alteração observada.

3.2 Preparo das amostras após a pré-incubação
Produtos UHT líquidos:
Agitar ou inverter o recipiente com a amostra por 25 vezes.

Antes da abertura da embalagem, proceder à assepsia da mesma usando algodão embebido em solução desinfetante e em seguida etanol 70% ou etanol 70° GL. Deixar secar. Com auxílio de tesouras ou bisturis previamente esterilizados, cortar a embalagem e iniciar a análise conforme indicado no Capítulo 3 “Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis capazes de causar alteração em produtos lácteos líquidos UHT”.

Produtos UHT pastosos e viscosos :

Antes da abertura da amostra, proceder à assepsia da embalagem usando algodão embebido em solução desinfetante e em seguida etanol 70% ou etanol 70° GL.

Com auxílio de tesoura, previamente esterilizada, abrir a embalagem, e, usando espátulas ou colheres estéreis, pesar, assepticamente, $25 \pm 0,2$ g da amostra e transferi-la para sacos de “stomacher” ou para frascos estéreis apropriados.

3.3 Produtos sólidos

Antes da abertura da amostra, proceder à assepsia da embalagem usando algodão embebido em solução desinfetante e etanol 70% ou etanol 70° GL.

Com auxílio de pinças, tesouras ou bisturis, previamente esterilizados, cortar e pesar, assepticamente, $25 \pm 0,2$ g da amostra colhida de vários pontos (superfície e profundidade) em sacos para “stomacher”.

No caso de análise de mexilhões, antes de abrir as conchas, escová-las com água e sabão, enxaguar bem em água corrente e após em água estéril. Secá-las com gaze esterilizada e abri-las assepticamente com o auxílio de faca ou bisturi. Preparar uma amostra composta, em recipiente estéril, misturando de 10 a 12 exemplares e incluindo o líquido das conchas. Pesar 50 g dessa amostra composta e homogeneizar com 450 mL do diluente específico. Dividir em duas alíquotas de 250 mL e transferir para recipientes estéreis.

Frango inteiro resfriado - Pesar, assepticamente, alíquotas dos seguintes locais para o preparo da amostra: peito, coxas ou asas, proximidades da cloaca e dorso, até completar as $25 \pm 0,2$ g da amostra, em sacos para “stomacher”.

Frango inteiro congelado - Antes da pesagem, as amostras devem ser descongeladas em refrigerador por, no máximo, 18 horas. Pesar da mesma forma que o frango inteiro resfriado.

Outros produtos cárneos congelados - Antes da pesagem, as amostras devem ser descongeladas em refrigerador por, no máximo, 18 horas. Pesar, então, assepticamente, $25 \pm 0,2$ g da amostra em sacos para “stomacher”.

3.4 Semi-conservas

Antes da abertura da amostra, proceder à assepsia da embalagem usando algodão embebido em solução desinfetante e etanol 70% ou etanol 70° GL.

Com auxílio de pinças, tesouras, abridores metálicos ou bisturis, previamente esterilizados, pesar assepticamente $25 \pm 0,2$ g da amostra, colhida de vários pontos, em sacos para “stomacher”.

3.5 Produtos pastosos e viscosos

Antes da abertura da amostra, proceder à assepsia da embalagem usando algodão embebido em solução desinfetante e etanol 70% ou etanol 70° GL.

Amostras de produtos pastosos: com auxílio de espátulas ou colheres, previamente esterilizadas, pesar assepticamente $25 \pm 0,2$ g da amostra colhida de vários pontos (superfície e profundidade), em frascos erlenmeyer estéreis ou em sacos para “stomacher”.

Amostra de produtos líquidos densos (ex: iogurte): Agitar o recipiente que contém a amostra para homogeneização. Realizar à assepsia da embalagem usando algodão embebido em solução desinfetante e etanol 70% ou etanol 70° GL.

Com auxílio de espátulas ou colheres, previamente esterilizadas, pesar assepticamente $25 \pm 0,2$ g em frasco erlenmeyer estéril ou em sacos plásticos para “stomacher”.

3.6 Água

Agitar ou inverter o recipiente com a amostra por 25 vezes, ou ainda aspirar o conteúdo deste por 10 vezes com pipeta, auxiliado por pipetador, quando não houver espaço livre para a homogeneização.

Antes da abertura da embalagem, proceder à assepsia da mesma usando algodão embebido em solução desinfetante e etanol 70% ou etanol 70° GL.

Para pesquisa de *Salmonella* em água usada em aquicultura e em água de “chiller”, homogeneizar bem a amostra invertendo o recipiente por 25 vezes, e transferir 100 mL da amostra para um frasco contendo 50 mL de água peptonada 1% tamponada em concentração tripla.

3.7 Outros Produtos Líquidos

Agitar ou inverter o recipiente com a amostra por 25 vezes.

Antes da abertura da embalagem, proceder à assepsia da mesma usando algodão embebido em solução desinfetante e etanol 70% ou etanol 70° GL.

Quando não houver espaço livre dentro do recipiente para homogeneização da amostra, aspirar o conteúdo deste por 10 vezes com pipeta, auxiliado por pipetador.

Com auxílio de tesouras ou bisturis previamente esterilizados, cortar a embalagem e retirar a alíquota analítica.

3.8 Produtos gordurosos

Antes da abertura da embalagem, proceder à assepsia da mesma, usando algodão embebido em solução desinfetante e etanol 70% ou etanol 70° GL.

Com auxílio de espátula estéril, pesar assepticamente $25 \pm 0,2$ g da amostra, retirando alíquotas de vários pontos da superfície e profundidade, em frasco erlenmeyer previamente esterilizado, ou em sacos “stomacher”.

Colocar em banho-maria a $46 \pm 1^\circ\text{C}$, por um período máximo de 15 minutos.

Somente após a liquefação da amostra, adicionar o diluente previamente aquecido a $46 \pm 1^\circ\text{C}$.

Agitar, de forma a obter uma suspensão homogênea.

Para amostras de produtos gordurosos, utilizar o diluente especificado na técnica, adicionado de 1% de Tween 80.

3.9 Produtos em pó e granulados

Agitar ou inverter o produto por 25 vezes.

Antes da abertura da embalagem que contém a amostra, proceder à assepsia da mesma usando algodão embebido em solução desinfetante e etanol 70% ou etanol 70° GL.

Pesar, assepticamente, $25 \pm 0,2$ g da amostra e transferir, cuidadosamente, para um frasco erlenmeyer ou saco para “stomacher”.

OBS: Quando as embalagens forem sacos de 25 kg ou mais, ou quando as amostras forem colhidas em vidros onde não exista espaço livre para homogeneização, transferir cerca de 500g do produto para um saco estéril, e em seguida agitar ou inverter o saco com a amostra por 25 vezes.

Com o auxílio de tesouras ou bisturis previamente esterilizados, cortar a embalagem e em seguida pesar, assepticamente, $25 \pm 0,2$ g da amostra em sacos para stomacher, utilizando espátula ou colher estéril.

3.10 Ovos

Ovos com casca: Lavar a casca de 5 a 7 ovos com escova e secar bem. Colocá-los de molho em solução de ácido peracético 0,02% por 15 minutos. Após, secar com algodão embebido em etanol 70% ou etanol 70° GL.

Quebrar a casca assepticamente, transferindo a gema para recipiente estéril. Descartar as claras. Misturar as gemas com auxílio de bastão de vidro estéril. Pesar $25 \pm 0,2$ g da mistura de gemas em sacos para “stomacher”.

No caso de ovos de codorna, pesar $25 \pm 0,2$ g de gema com a clara.

Ovo líquido integral e ovo em pó: Pesar assepticamente $25 \pm 0,2$ g da amostra em frasco erlenmeyer ou saco para “stomacher”.

4. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ANDREWS, J.R.; JUNE, G.A. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. In: Bacteriological Analytical Manual Online. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em:

[http:// www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual de métodos microbiológicos para alimentos. Coordenação Geral de Laboratório Animal. 1991/1992 2ª Revisão. 136p.

ANEXO VI

PROCEDIMENTOS DE MICROSCOPIA

1. COMPONENTES BÁSICOS DO MICROSCÓPIO

1.1 Estativa

É o corpo do microscópio que dá suporte aos outros componentes.

1.2 Revólver porta objetivas

Suporte rotativo de objetivas, acoplado no braço da estativa.

1.3 Objetivas

Tubos de lentes que formam a primeira imagem ampliada do objeto. Fornecida geralmente nos aumentos 10x (vezes), 20x, 40x e 100x. As objetivas modernas de 40x vêm com a lente frontal móvel para evitar danos à lâmina e à lente frontal. A objetiva de 40x moderna possui diafragma-íris acionada por anéis para correção da espessura da lamínula.

1.4 Tubo de observação

Suporte de oculares. Existem três tipos: monoculares, binoculares e trioculares. Neste último caso, o terceiro tubo serve para fixação da máquina fotográfica.

1.4.1 Ajuste de dioptria

Dioptria é a diferença de capacidade visual de cada olho. Nos tubos destinados às oculares, existem controles giratórios que permitem o ajuste da dioptria.

1.4.2 Ajuste da distância interpupilar

Os tubos das oculares são móveis, para permitir o ajuste da distância interpupilar, que varia individualmente.

1.5 Oculares

Tubos com lentes por onde se realizam as observações microscópicas. Fornecidos com aumentos de 10x e 16x.

Para maior comodidade dos usuários de óculos, existem as oculares de campo amplo que permitem a observação com os óculos.

Estas lentes aumentam a imagem virtual formada pelas objetivas. Se a objetiva for de 100x e a ocular de 10x, o resultado será um aumento de 1.000x (10×100).

1.6 Platina

Mesa onde são colocadas as preparações para observações microscópicas. Nelas, se encontram acopladas o “charriot”, com comandos coaxiais que permitem a movimentação nas coordenadas X e Y.

1.7 Chariot

O “charriot” serve para fixar a lâmina microscópica e movimentá-la em todas as direções.

1.8 Condensador

É um conjunto de lentes colocado logo abaixo da platina do microscópio que concentra e fornece luz necessária à iluminação do objeto em estudo.

O diafragma-íris do condensador (diafragma de abertura) é crítico na formação da imagem.

Se estiver totalmente aberto, a imagem torna-se menos nítida devido à reflexão da luz ao longo do trajeto ótico e a outros fatores.

Quando muito fechado, se obtém menor resolução e diminuição da nitidez com o aumento da refração do material. Para se obter uma boa imagem, o condensador deverá estar mais próximo possível da lâmina.

Organismos de maior tamanho e mais refringentes, como ovos de helmintos e protozoários, tornam-se mais facilmente evidenciados com o condensador um pouco baixo e o diafragma de abertura mais fechado.

1.9 Lentes auxiliares

Existentes em alguns modelos de microscópio que possuem lentes auxiliares abaixo do condensador. Quando disponíveis são somente utilizadas junto com as objetivas de 10x e 20x. Sem estas lentes, não é possível obter uma boa iluminação do campo microscópico.

1.10 Diafragma de campo

Situado na base da estativa e serve para controlar a intensidade luminosa. Possui um diafragma-íris que pode ser aberto ou fechado através do anel de controle.

1.11 Lente fosca

Está localizada sobre o diafragma de campo e se destina a melhorar a difusão do feixe luminoso.

1.12 Lente luz do dia

Lente cinza azulada utilizada para que o feixe luminoso se aproxime da aparência da luz natural. Geralmente é colocada sobre o diafragma de campo.

1.13 Controles de ajuste macrométrico e micrométrico

O controle macrométrico serve para focalização inicial do objeto e o micrométrico para ajustes finos de focalização.

1.14 Freio do controle macrométrico

Encontrado na maioria dos microscópios modernos junto ao controle macrométrico, permitindo a regulação de sua pressão.

1.15 Iluminador

Situado na parte posterior da base da estativa. O feixe luminoso emitido pela lâmpada é conduzido através de um sistema de lentes até o espelho, situado abaixo do diafragma de campo luminoso, que o conduz para o condensador, passando pela lâmina, objetiva e ocular.

1.16 Voltímetro

Para redução da energia elétrica de rede para a voltagem da lâmpada.

1.17 Lâmpadas

Existem dois tipos: incandescentes e de halogênio. As de halogênios fornecem uma iluminação mais eficiente.

2. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

A microscopia de campo claro tem como aplicações a observação de microrganismos e tecidos corados, a observação de objetos com bastante contraste a fresco, como helmintos e seus ovos, e a observação de suspensões de bactérias sem tratamento prévio em lâminas escavadas.

Este tipo de microscopia baseia-se na formação de imagem pela multiplicação do aumento da objetiva pelo aumento da ocular.

A formação de uma imagem nítida está relacionada não só com o grande aumento das objetivas, mas também com sua capacidade de resolução, que é o poder de separar dois pontos muito próximos.

Uma ocular de grande capacidade pode produzir uma imagem maior que uma ocular padrão de 10x, mas como não haverá um aumento correspondente do poder de resolução, não mostrará maiores detalhes.

2.1 Acessórios

Os acessórios necessários para microscopia de campo claro são:

- a) Lente fosca;
- b) Lente luz do dia;
- c) Oculares de campo amplo.

2.2 Procedimento

Ligar o cabo elétrico na tomada.

Ligar a lâmpada.

Colocar o preparado no microscópio.

Ajustar a distância interpupilar (ver 1.4.2) e a dioptria (ver

1.4.1).

Colocar a objetiva de 10x no trajeto de luz.

Encostar o condensador na lâmina.

Regular a intensidade luminosa com o botão de ajuste correspondente, quando existir este dispositivo. A intensidade luminosa deve ser ajustada para cada tipo de objetiva. Quanto maior a capacidade de aumento, maior será a necessidade de iluminação.

Colocar a lente auxiliar em posição, nos microscópios com este dispositivo.

Fixar o preparado microscópico, montado em lâminas perfeitamente limpas, no “charriot” e colocar na posição desejada por meio dos controles coaxiais (Controles nas coordenadas X e Y).

Focalizar com o macrométrico.

Realizar a focalização fina com o controle micrométrico.

Movimentar o controle micrométrico para evidenciar estruturas existentes em vários níveis do preparado.

Movimentar toda lâmina através dos controles coaxiais de modo regular até encontrar a estrutura procurada.

Se necessitar de maior aumento, colocar as lentes correspondentes em posição e focalizar.

Nota: Não utilizar lentes auxiliares em observações com objetivas de 40x e 100x, pois prejudicam a nitidez da imagem.

A lente frontal do condensador deverá estar na sua posição mais alta para que se possa aproveitar toda a sua capacidade.

2.3 Observação com aumento de 10x e 20x

Geralmente utilizada para organismos grandes como helmintos e seus ovos e para focalização de lâminas.

2.4 Observação com aumento de 40x

É possível a observação de alguns organismos maiores ou células neste aumento.

É utilizado para pré-focagem do campo, pois torna mais cômoda a focalização fina com a objetiva de 100x.

Para observação com este aumento é necessário a utilização de lâminulas.

A espessura da lâminula não deve ultrapassar a 0,17 mm. Esta medida vem gravada na objetiva de 40x.

A espessura da montagem da peça (corte histológico ou esfregão mais meio de montagem e lâminula) deve ser o mais fina possível.

A espessura excessiva interfere na formação da imagem devido à difração da trajetória do feixe luminoso.

2.5 Observação com aumento de 100x (em óleo de imersão)

É necessário utilizar óleo de imersão para que os raios luminosos não sejam desviados pela camada de ar entre a lente e a lâmina.

- Focalizar o preparado com a objetiva de 40x;

- Colocar uma gota de óleo de imersão sobre o preparado (o óleo de imersão deve apresentar índice de refração $n_e = 1,518$ e de dispersão de $\gamma = 43$);

- Colocar a objetiva de imersão (100x) em posição;

- Encostar a lente frontal da objetiva no óleo por meio da manipulação dos controles coaxiais do “charriot”;

- Focalizar através do controle micrométrico.

2.6 Observação de preparados frescos em lâminas escavadas

Esta técnica se utiliza para a observação de movimento bacteriano em suspensão sem tratamento prévio;

- Colocar uma gota de suspensão bacteriana sobre uma lâminula, com uma pipeta de Pasteur;

- Colocar uma pequena quantidade de vaselina sólida nos cantos da lâminula com a gota;

- Colar a lâminula com a gota para baixo na área da escavação da lâmina;

- Focalizar com aumento de 10x e depois de 40x, com a área escavada da lâmina para cima.

Os organismos apresentam-se estáticos ou com movimentos retilíneos, ondulantes, espiralados, sempre progressivos.

Os movimentos trêmulos são causados pelo movimento browniano que é provocado por fenômeno físico observado em meio fluido se diferenciando do movimento microbiano.

3. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

A microscopia de contraste de fase é utilizada para a observação de preparados sem tratamento prévio com corantes (movimentos bacterianos, presença de flagelos, estruturas celulares).

Nesta técnica, a formação de imagem segue o princípio físico da interferência de ondas luminosas em diferentes fases que se intensificam ou se anulam entre si.

3.1 Acessórios de microscopia de contraste de fase

3.1.1 Objetivas anulares de 10x, 20x, 40x e 100x

São lentes com uma série de anéis concêntricos (anéis de fase).

3.1.2 Discos de diafragmas anulares

São discos acoplados sobre o condensador onde podemos colocar os diafragmas anulares em posição, por meio de movimento em revólver. Os anéis de cada um correspondem aos espaços existentes entre os anéis de fase da objetiva correspondente. Existem modelos em que o condensador vem conjugado neste disco.

O disco contém marcas indicando o aumento da objetiva correspondente na sua borda externa, além da marca zero onde nenhum diafragma encontra-se no trajeto luminoso.

3.1.3 Lente ou microscópio auxiliar

Usado para centralização dos anéis de fase do diafragma anular. Tubo tipo telescópio colocado no tubo de observação para centralização dos diafragmas anulares.

3.1.4 Filtro verde para diafragma de campo

3.2 Procedimento

- Colocar o disco de diafragma anular correspondente ao aumento de cada objetiva;

- Ligar o microscópio;

- Colocar o disco na posição zero e centralizar o diafragma de campo com a objetiva de 10x em posição;

- Colocar a lente auxiliar no tubo de observação;

- Soltar o parafuso de fixação da lente frontal telescópica da lente auxiliar e movimentá-la para cima e para baixo, até obter uma imagem nítida dos anéis de fase das objetivas e dos diafragmas anulares; fixar o tubo telescópico;

- Fazer com que os anéis de fase coincidam entre si através dos controles existentes nas laterais de cada diafragma anular com auxílio da pequena chave que o acompanha. Realizar este ajuste em todos os aumentos;

- Colocar o filtro verde sobre o diafragma de campo;

- Colocar uma gota da suspensão de microrganismos em meio líquido ou diluída em solução fisiológica com uma pipeta de Pasteur, e cobrir com uma lâminula;

- Seguir o mesmo procedimento para microscopia de campo claro, sempre utilizando o diafragma anular com a objetiva correspondente.

Observações:

- *Listeria* spp apresentam movimentos de tombamento sobre o seu próprio eixo. *Campylobacter* apresenta movimento típico espiral (saca-rolha);

- O microscópio de contraste de fase pode ser utilizado para observações em campo claro com o disco de diafragmas anulares colocado na posição zero.

4. MICROSCOPIA DE CAMPO ESCURO

A microscopia de campo escuro aplica-se à observação de microrganismos vivos, sem preparação prévia.

Os raios luminosos são projetados obliquamente sobre o preparado pela ação do condensador cardióide e, quando encontram obstáculos com capacidade de desviá-los, como por exemplo bactérias, são refratados e atingem a objetiva, formando uma imagem com contorno brilhante no campo microscópico.

Quando não existe nenhum corpo que desvie estes raios, o campo microscópico aparece escuro porque os raios oblíquos não conseguem penetrar na objetiva.

4.1 Acessório de microscopia de campo escuro

4.1.1 Condensador cardióide

São condensadores que desviam obliquamente o trajeto dos raios luminosos originários da fonte luminosa. Existem dois tipos: o seco e o úmido.

O condensador úmido necessita de um meio líquido entre a lente frontal e a lâmina, para que o feixe luminoso possa atingir de forma correta a preparação.

O condensador seco é mais prático, mas a imagem formada não é muito nítida.

4.2 Procedimentos

- Colocar o condensador cardióide;

- Colocar uma gota de óleo de imersão sobre a lente frontal do condensador; no caso de condensador seco, este procedimento é dispensável, entretanto a utilização na forma úmida aumenta a nitidez da imagem. O condensador seco é bastante útil para exames rotineiros de grande quantidade de amostras como nos testes de microaglutinação para leptospiros.

- Colocar uma gota da suspensão de microrganismos em meio líquido ou diluída em solução fisiológica;

- Encostar a lente frontal do condensador na lâmina;

- Focalizar com a objetiva de 10x;

- Fechar o diafragma de campo;

- Centralizar a imagem do diafragma de campo acionando os parafusos de centralização;

- Colocar outras objetivas em posição e realizar o exame.

Observações

- A visualização é de um campo escuro com microrganismos com halos brilhantes, em movimentos retilíneos, ondulatórios ou espiralados;

- As objetivas acima de 20x não são eficientes para este tipo de observação devido à pequena capacidade de captação de luz;

- As lâminas para campo escuro devem medir entre 0,8 a 1,1 mm.

5. ILUMINAÇÃO DE KÖEHLER PARA MICROSCÓPIO DE CAMPO CLARO

Esta técnica refere-se aos procedimentos gerais de regulagem do sistema ótico de microscópios.

Por meio deste método de iluminação, pode ser evitada a formação da imagem do filamento da lâmpada no campo luminoso, com a obtenção de melhor rendimento do sistema ótico.

5.1 Procedimento

Centralização da lâmpada: nos microscópios que possuem parafusos para centralização da lâmpada, retirar as oculares e observar a imagem do filamento da lâmpada.

Se não estiver centralizada, atuar sobre os parafusos de controles, até que a imagem fique no centro do campo, ou, nos aparelhos em que isto não seja possível, fechar o diafragma-iris do condensador e movimentar o suporte da lâmpada para frente e para trás até que a imagem do filamento da lâmpada seja projetada nitidamente no diafragma-iris.

Fixar o suporte da lâmpada e depois centralizar a imagem.

- Colocar em posição a objetiva de 10x;

- Colocar a lâmina com o preparado microscópico;

- Focalizar a lâmina;

- Realizar o ajuste da distância interpupilar;

- Focalizar através da objetiva sem o controle de ajuste de dioptria e depois ajustar o foco para o outro olho por meio de manobras no controle de ajuste da dioptria;

- Afastar a lente auxiliar, quando existir;

- Fechar o diafragma de campo;

- Baixar e levantar o condensador até que a imagem da borda do diafragma de campo surja nitidamente em foco;

- Centralizar a imagem do diafragma de campo através dos parafusos de controles existentes no condensador;

- Levantar o condensador até a sua posição máxima;

- Para que o condensador funcione com o máximo rendimento, abrir totalmente o diafragma de campo e fechá-lo até que comece a diminuir a intensidade luminosa;

- Centralização do diafragma-iris do condensador:

Alguns modelos possuem diafragma-iris que precisam ser centralizados e possuem quatro parafusos de controle, sendo dois para centralização do condensador e dois para centralização do diafragma-iris do condensador.

A centralização do diafragma-iris pode ser realizada seguindo o processo de centralização do condensador.

O diafragma-iris do condensador deve ser fechado em torno de 1/3 de sua abertura máxima para melhor eficiência do sistema ótico.

O condensador deve ser colocado na sua posição mais alta para aproveitamento de toda a sua eficiência.

6. UTILIZAÇÃO DE LÂMINAS E LÂMINULAS

As lâminas devem ser transparentes, livres de manchas e devem medir um milímetro de espessura. As lâminulas devem medir 0,17 mm de espessura para permitir a formação de uma boa imagem.

7. Preparo

- Lavar as lâminas e lamínulas com detergente comum, esfregando uma a uma;

- Enxagüar em água destilada duas vezes para retirar os resíduos;

- Secar e manter em frascos com álcool etílico comercial até o momento do uso.

6.2 Descarte

As técnicas de coloração nem sempre são suficientes para inativar o organismo presente na lâmina ou lamínula.

As lâminas e lamínulas devem ser tratadas como as demais vidrarias de laboratório, depositadas em frascos contendo desinfetante após o uso e descartadas por meio de tratamento pelo calor úmido.

7. CUIDADOS COM O MICROSCÓPIO

7.1 Durante o uso

- 7.1.1 Nunca soprar as lentes para retirar a poeira, pois micropartículas de saliva podem se depositar nas lentes.

- 7.1.2 Nunca usar lenços faciais para limpeza de lentes pois estes podem conter filamentos de vidro que riscam a lente. Poderão ser usados tecido de linho ou algodão hidrófilo.

- 7.1.3 Nunca limpar as lentes com o tecido especial para limpeza de lentes seco.

- 7.1.4 Seguir rigorosamente as instruções do fabricante do equipamento quanto ao uso de solventes para a limpeza.

- 7.1.5 Nunca usar álcool para limpeza de lentes, pois a cola usada na montagem das mesmas é freqüentemente solúvel em álcool.

- 7.1.6 Limpar o óleo residual das objetivas ao final de cada uso com algodão hidrófilo, ou uma flanela macia, umedecido em xilol ou em éter-acetona 1:1.

- 7.1.7 Nunca deixar os orifícios de conexão das objetivas e oculares abertos.

- Mantê-los fechados por plug de proteção adequados ou com as próprias oculares ou objetivas.

- 7.1.8 Não tocar nas lentes com as mãos.

- 7.1.9 Somente usar óleo de imersão que atenda a especificação estabelecida pelo fabricante.

- 7.1.10 Nunca usar óleo de imersão para trabalhos com objetivas que não sejam de imersão. Estes óleos danificam as substâncias de montagem destas objetivas.

- 7.1.11 Os microscópios devem ser colocados em superfícies isentas de vibrações e não são recomendadas mudanças de localização.

7.2 Limpeza

7.2.1 Corpo

Usar álcool ou uma flanela levemente umedecida com água para limpeza do corpo do microscópio.

Quando usar a flanela úmida, secar imediatamente com uma flanela seca.

Lubrificar as partes móveis com lubrificante derivado do petróleo, como a vaselina, ou outro lubrificante recomendado pelo fabricante.

7.2.2 Lentes e partes óticas

Retirar a poeira usando ar expulso por bulbo de borracha. Para limpar as lentes, usar tecido especial para limpeza de lentes levemente umedecido em solução limpadora (ex.: Kodak), específica para lentes de microscópios e equipamentos óticos.

Resíduos de corantes podem ser retirados com algodão hidrófilo embebido em xilol.

8. CONSERVAÇÃO DE MICROSCÓPIOS

Esta instrução se destina a estabelecer procedimentos de limpeza e conservação de microscópios e a prevenção contra fungos nos componentes óticos.

8.1 Materiais necessários

- Pincéis de pêlo natural desengordurado com álcool-éter;

- Panos de algodão macio;

- Xilol ou benzina;

- Sílica-gel;

- Tabletes de paraformaldeído;

- Vaselina líquida.

- Óleo lubrificante fino para máquina de costura.

- Solução Éter-acetona 1:1.

8.2 Procedimento

- Retirar a poeira das lentes com pincel. Não usar espanador, pano ou camurça para este fim.

- As marcas de dedos ou manchas de gorduras devem ser removidas com panos embebidos em benzina ou xilol. Não utilizar álcool que pode dissolver a cola que une as lentes.

- A limpeza das objetivas deve ser limitada às lentes frontais e posteriores, roscas e superfícies externas.

- Imediatamente após finalização do trabalho, limpar o óleo de imersão da objetiva com flanela limpa e macia, embebida em solução 1:1 de éter-acetona.

- Manter o instrumento em local ventilado e seco.

- Os microscópios devem ser mantidos em ambiente com umidade relativa abaixo de 65%.

- Os microscópios devem ser submetidos periodicamente ao arejamento, colocando-os próximos a um ventilador.

- Os pequenos componentes que não se encontram em uso devem ser guardados em compartimentos bem secos com sílica-gel no seu interior, salvo instruções em contrário do fabricante.

- A sílica-gel hidratada toma a cor rósea e pode ser regenerada em estufa à temperatura de 120°C por algumas horas, recuperando a cor azulada.

- Instrumentos quando guardados em caixas devem ser protegidos com tabletes de paraformaldeído.

- Cobrir os instrumentos que são mantidos no local de trabalho com protetor que permita a ventilação e colocar tabletes de paraformaldeído sobre a platina.

As partes brilhantes, foscas ou fosfatadas devem ser protegidas com vaselina líquida neutra.

Os parafusos de controle e de fixação de componentes devem ser retirados pelo menos anualmente, lavados com solvente e lubrificados com óleo, pois a graxa utilizada pelo fabricante seca e dificulta a manobra com estas peças. O mesmo deve ser realizado com a engrenagem do “charriot”.

8.3 Condições consideradas inadequadas para o armazenamento

- Ambiente com umidade relativa do ar acima de 75%;
- Escurecimento e falta de movimento de ar;
- Pó e marcas de dedos nas superfícies de vidro;
- Estocagem em caixa de madeira por longo período sem proteção de desinfetantes ou agentes dissecantes.

9. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRYCE, J.R.; POELMA, P.L. Microscopic Examination of Foods and Care and Use of the Microscope. In: Bacteriological Analytical Manual. 8.ed. Food and Drug Administration. AOAC International, Gaithersburg, USA. 1995. p. 2.01-2.06.

CLARRIDGE, J.E.; MULLINS, J.M. Microscopy and Staining. In: Clinical and Pathogenic Microbiology. Howard, B.J. et al. 2nd Ed. Mosby. St. Louis, 1994, p. 101-115.

FAO. Manuales para el control de calidad de los alimentos. 14/12 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma 199. p.37-52.

ANEXO VII

PROCEDIMENTOS DE COLORAÇÃO

1. OBJETIVO

As técnicas de coloração usadas em microbiologia se destinam à observação de estruturas morfológicas como esporos, flagelos e forma das células, diferenciando microrganismos.

2. PREPARAÇÃO DE ESFREGAÇO

Para sucesso na observação, é necessário que o esfregaço seja bem feito, apresentando-se em monocamadas, suficientemente concentrado de forma a facilitar a visualização.

A secagem dos esfregaços deve ocorrer ao ar. Depois de secos, os esfregaços podem ser fixados com calor, passando rapidamente 2 a 3 vezes através da chama de bico de Bunsen.

3. COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de Gram utiliza características diferenciais das células bacterianas. Estas características diferenciais se referem à estrutura da parede celular dos microrganismos.

Os microrganismos que contêm altos teores de ácido teicóico em sua parede celular se coram, pela coloração de Gram, em azul intenso e são chamados de “Gram positivos”.

Os microrganismos que contêm lipopolissacarídeos na membrana externa somente se coram com o contracorante, mostrando-se da cor do mesmo (vermelho), e são denominados “Gram negativos”.

3.1 Reagentes

3.1.1 Cristal Violeta

Este composto cora toda a célula em azul intenso.

Preparo Solução A

Cristal violeta (90-95% de pureza) - 2 g

Etanol 95% - 20 mL

Filtrar em papel de filtro.

Preparo Solução B

Oxalato de amônio - 0,2 g

Água destilada - 80 mL

Preparo Solução de trabalho

Misturar as soluções colocando-se a solução B sobre a A. Deixar em repouso por 24 horas, filtrando em seguida. Estocar em frasco âmbar.

3.1.2 Solução de lugol (íodo iodeto de potássio)

O iodeto substitui o cloro do cristal violeta, formando um complexo insolúvel em água.

Preparo da solução de trabalho:

Cristais de iodo (ou ressublimado) - 1 g

Iodeto de potássio - 2 g

Água destilada. - 300 mL

Misturar e deixar em repouso até dissolução.

3.1.3 Descorante

A solução de etanol 95% - acetona atua como descorante. A descoloração ocorre apenas nas células de microrganismos Gram negativos. Alguns autores sugerem que o álcool altera a permeabilidade da membrana externa dos organismos Gram negativos, devido à sua ação sobre a membrana lipopolissacarídica, permitindo a retirada do complexo cristal violeta-iodeto da célula.

Preparo da solução descorante de etanol - acetona:

Acetona - 10 mL

Etanol 95% - 100 mL

3.1.4 Safranina (contracorante)

A safranina atua como contracorante tornando as células Gram negativas coradas e visíveis. As células de microrganismos Gram positivos provenientes de culturas velhas, lesadas por qualquer motivo ou mortas, também podem ser coradas pela safranina.

Preparo do contracorante - Safranina O - Solução estoque

Safranina O - 2,5 mL

Etanol 95% - 100 mL

Solução de trabalho

Solução estoque de safranina O - 10 mL

Água destilada - 90 mL

3.2 Procedimento de coloração de Gram modificado por Hucker

Originalmente, a coloração descrita por Christian Gram usa violeta de genciana, que é uma mistura de cristal violeta com outros componentes. Hucker modificou o método substituindo a violeta genciana pelo cristal violeta puro, que é muito estável e permite uma melhor diferenciação dos microrganismos.

a) Cobrir o esfregaço com cristal violeta por 1 minuto;

b) Retirar o excesso de cristal violeta;

c) Cobrir com lugol por 1 minuto;

d) Escorrer e lavar suavemente em água;

e) Descorar com álcool-acetona ou etanol 95% por 1 a 5 segundos (até que a maior parte do cristal violeta seja removido);

d) Lavar delicadamente em água;

e) Adicionar solução de contracorante - safranina - por 30 segundos;

f) Lavar delicadamente em água;

g) Deixar secar no ambiente.

4. COLORAÇÃO DE GRAM PARA ANAERÓBIOS

Esta coloração se baseia na substituição da safranina por carbol fucsina, que é mais efetiva para a coloração de alguns anaeróbios Gram negativos e *Legionella*.

O aumento do tempo de exposição ao contracorante (carbol fucsina) permite uma maior penetração do mesmo dentro destas células, o que as tornará mais facilmente visíveis.

Para anaeróbios o descorante usado é o etanol.

4.1 Procedimento de coloração

a) Corar o esfregaço por 30 segundos com cristal violeta;

b) Retirar o excesso de cristal violeta;

c) Cobrir com lugol por 30 segundos;

d) Escorrer e lavar com água corrente (fluxo suave);

e) Descorar com etanol 95% por 30 segundos;

f) Lavar com água corrente (fluxo suave);

g) Adicionar solução de contracorante carbol fucsina por 1 minuto ou mais (solução aquosa de fucsina básica 0,8% (m/v);

h) Deixar secar em ambiente.

5. TÉCNICAS DE COLORAÇÃO PARA FLAGELOS

5.1 Coloração para flagelos

Os flagelos são organelas das bactérias responsáveis pela motilidade, os quais possuem, em sua constituição, moléculas protéicas denominadas “flagelinas”. O flagelo é formado por milhares de monômeros polimerizados de flagelina ordenados de maneira a formar um único flagelo.

Algumas dificuldades podem ser encontradas quando se deseja demonstrar este tipo de estrutura em uma bactéria:

a) A produção de flagelos nas bactérias não é contínua e é dependente de vários fatores como temperatura, substrato, estágio do crescimento, etc;

b) Os flagelos podem ser acidentalmente removidos da bactéria pela pipetagem ou homogeneização muito vigorosa;

c) O flagelo se depolimeriza facilmente, isto é, se dissocia em monômeros de flagelina com frequência (quando a temperatura alcança mais de 60°C, quando o pH se torna muito ácido (pH 4,0) e quando a célula está em presença de álcalis, de uréia e de solventes orgânicos);

d) É necessária a aplicação de técnicas para aumentar o diâmetro dos flagelos, de forma a torná-los visíveis pelas técnicas microscópicas usualmente adotadas em laboratórios microbiológicos.

O ácido tânico contido no corante se ligará ao flagelo, tornando-o mais grosso. A demonstração do flagelo ocorrerá devido à ligação do corante ao ácido tânico.

5.2 Procedimento

a) Preparar cultura da bactéria em estudo sobre a superfície de ágar infusão de cérebro ou em ágar soja triptona (com ou sem sangue), incubando em temperatura e tempo adequados;

b) Transferir delicadamente uma alçada do crescimento para tubo contendo cerca de 3mL de água destilada. Inverter o tubo uma vez para homogeneizar a suspensão. Colocar uma gota desta suspensão sobre uma lâmina e deixar secar ao ar;

c) Cobrir a lâmina com o corante e deixar por 5 minutos, até que um brilho metálico esverdeado cubra metade da área. Não deixar o corante secar sobre a lâmina;

d) Retirar o corante enxaguando com água;

e) Secar;

f) Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

5.3 Preparo do corante - Solução A

Fucsina (certificada para coloração de flagelo) - 0,5 g

Álcool etílico 95% - 50 mL

Misturar e deixar em repouso de um dia para o outro para dissolução.

Preparo do corante - Solução B

Cloreto de sódio - 0,75 g

Ácido tânico - 1,5 g

Água destilada - 100 mL

Misturar vigorosamente as soluções A e B.

A mistura de corantes pode ser usada até 2 meses após o preparo, se mantida sob refrigeração. Poderá se formar um precipitado. O precipitado não deve ser homogeneizado com o restante da solução durante procedimento de coloração.

6. TÉCNICA PARA COLORAÇÃO DE ESPOROS (Wirtz-Conklin)

6.1 Coloração com verde malaquita

A parede dos esporos constitui uma barreira eficaz contra a entrada e a saída de materiais do esporo.

O tempo prolongado de exposição ao corante (verde malaquita), associado ao aquecimento, permite o rompimento desta barreira obtendo-se, então, o esporo corado em verde intenso. Como contracorante é utilizada a safranina, que cora outras estruturas em rosa, facilitando a diferenciação dos esporos.

6.1.1 Preparo de soluções

Solução A : Verde malaquita 5%

Verde malaquita - 2,5 g

Água destilada - 50 mL

Misturar e deixar em repouso de um dia para o outro para dissolução.

Solução B: Safranina - Solução estoque

Safranina O - 50 g

Etanol 95% - 2000 mL

Solução B: Safranina - Solução de trabalho

Solução estoque de safranina O - 300 mL

Água destilada - 2700 mL

6.1.2 Procedimento

a) Preparar esfregaço e fixar pelo calor;

b) Cobrir o esfregaço com o corante verde malaquita;

c) Aquecer água em um becker até começar a sair vapor.

Colocar a lâmina sobre este becker, mantendo o corante aquecido por 5 minutos. Alternativamente, cobrir a lâmina com verde malaquita e aproximar o máximo possível de uma chama de bico de Bunsen e deixar até que desprenda vapor. Afastar do fogo e após 1 a 2 minutos repetir a operação por 3 a 4 vezes;

d) Lavar suavemente com água. Evitar o choque térmico que poderá quebrar a lâmina;

e) Contracorar com solução de safranina por 30 segundos;

f) Lavar e secar;

g) Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

7. COLORAÇÃO PARA CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO CRISTALINA

A detecção de corpúsculos de inclusão cristalina é uma das provas usadas para caracterizar algumas variedades de *Bacillus thuringiensis*, sendo utilizada como prova diferencial de *Bacillus cereus*.

Os corpúsculos de inclusão cristalina de algumas variedades de *Bacillus thuringiensis* são cristais tetragonais de toxina, abundantes em culturas velhas (3-4 dias), que somente são liberados após a lise do esporângio.

Dois métodos estão descritos para esta finalidade: coloração a quente, com solução de fucsina básica 0,5%, e coloração a frio, com solução corante à base de azul de Coomasie.

7.1 Coloração com fucsina básica

a. Repicar a cultura em ágar nutriente inclinado;

b. Incubar a 30 ± 1°C por 24 horas e posteriormente em ambiente por 2 a 3 dias;

c. Preparar esfregaço em lâmina de vidro limpa;

d. Secar ao ar e fixar rapidamente passando sobre uma chama de bico de Bunsen;

e. Mergulhar em álcool metílico, deixando em contato por 30 segundos. Retirar e deixar secar ao ar.

f. Corar com solução de fucsina básica 0,5% a quente (aproximar o máximo possível de uma chama de bico de Bunsen e deixar até que desprenda vapor. Afastar do fogo e após 1 a 2 minutos repetir a operação;

g. Esperar cerca de 30 segundos para que a lâmina esfrie e lavá-la com água;

h. Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

Os corpúsculos de inclusão cristalina do *Bacillus thuringiensis* se apresentam como pequenos discos de bordas convexas (em forma de grão de lentilha) de cor rosa intensa.

7.2 Coloração com azul de Coomasie

7.2.1 Preparo da solução Corante - azul de Coomasie

Azul coomasie - 0,25 g

Metanol - 50 mL

Ácido acético glacial - 7 mL

Água destilada - 100 mL

7.2.2 Procedimento

a) Repicar a cultura em ágar nutriente inclinado;

b) Incubar a 30 ± 1°C por 24 horas e, posteriormente, em ambiente por 3 a 4 dias;

c) Preparar esfregaço em lâmina de vidro limpa;

d) Secar ao ar e fixar rapidamente passando sobre uma chama de bico de Bunsen;

e) Cobrir o esfregaço com a solução de azul de Coomasie por 3 minutos;

f) Escorrer e lavar suavemente com água corrente;

g) Secar;

h) Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

Os corpúsculos de inclusão cristalina do *Bacillus thuringiensis* se apresentam como estruturas tetragonais de cor azul intensa.

7.3 Alternativamente, pode ser utilizada a coloração de Wirtz-Konklin (verde malaquita) para corar os corpúsculos de inclusão cristalina.

Os corpúsculos de inclusão cristalina do *Bacillus thuringiensis* se apresentam como estruturas tetragonais de cor rosa, enquanto os esporos se coram em verde.

8. COLORAÇÃO DE GRAM - CARBOL FUCSINA MODIFICADA POR HÜCKER PARA *Campylobacter*

8.1 Procedimento

a) Preparar esfregaço dos cultivos suspeitos;

b) Deixar secar ao ar e fixar delicadamente passando sobre uma chama de bico de Bunsen;

c) Corar pelo método de Gram modificado por Hucker;

d) Corar por 1 minuto com cristal violeta oxalato de amônio;

e) Lavar com água;

f) Cobrir com lugol por 1 minuto;

g) Lavar com água;

h) Descorar com etanol 95% até que saia todo o corante;

i) Lavar com água;

- j) Contratar com carbol fucsina por 10 a 20 segundos;
k) Lavar com água;
l) Secar e examinar em microscópio de campo claro com objetiva de imersão.

Todos os cultivos de *Campylobacter* se apresentam como bastonetes Gram negativos, curvos ou espiralados, com arranjo típico em forma de asa de gaivota.

Preparo dos corantes de Gram modificados por Hucker para *Campylobacter*

8.2.1 Solução Corante Cristal violeta-oxalato de amônio

Solução A

Cristal violeta (90-95% de pureza) - 2,0 g

Etanol 95% - 200 mL

Solução B

Oxalato de Amônio - 8,0 g

Etanol 95% - 800 mL

Preparo da solução final

Misturar a solução A e B . Deixar em repouso por uma noite ou mais em temperatura ambiente. Filtrar em filtro de papel grosso.

8.2.2 Preparo da solução de lugol para coloração de *Campylobacter*

Cristais de iodo ou iodo ressilimado - 1,0 g

Iodeto de potássio - 2,0 g

Água destilada - 300 mL

8.2.3 Descorante

Etanol 95%

8.2.4 Preparo da carbol Fucsina 0,3%

Solução A:

Fucsina básica - 0,3 g

Álcool etílico - 10 mL

Solução B:

Fenol (cristais fundidos) - 5,0 mL

Água destilada - 95 mL

Misturar as soluções A e B.

9. COLORAÇÃO PARA OBSERVAÇÃO DE MOVIMENTO BROWNIANO DE ESPOROS (*Paenibacillus larvae*)

a) Preparar o esfregaço em uma lâmina limpa;

b) Secar ao ar ou sob o calor de uma lâmpada;

c) Fixar sob o calor de uma lâmpada ou fixar passando, rapidamente, por 2 ou 3 vezes, sobre uma chama de bico de Bunsen.

Os esporos de *P. larvae* não se fixam na lâmina;

d) Corar com solução carbol-fucsina por 10 segundos;

e) Tirar o excesso de corante, deixando escorrer;

f) Cobrir uma lâmina de vidro com uma camada fina de óleo de imersão e sobre esta colocar a lâmina ainda úmida, em posição invertida, preparada conforme descrito acima;

g) Observar em microscópio com objetiva de imersão.

Os esporos se coram em rosa mais intenso que as células e apresentam movimento vibratório (movimento Browniano).

10. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ACUFF, G.R. Media, Reagents, and Stains. In: Compendium of Method for the Microbiological Examination of Foods, American Public Health Association. 3. ed. Washington DC. Carl Vanderzant & Don F.Splittsoesser, 1992, p. 1093-1208

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Manual de métodos microbiológicos para alimentos. Coordenação Geral de Laboratório Animal. 1991/1992 2ª revisão. 136p.

BRYCE, J.R.; POELMA, P.L. Microscopic Examination of Foods and Care and Use of the Microscope. In: Bacteriological Analytical Manual. 8.ed. Food and Drug Administration. AOAC International, Gaithersburg, USA. 1995. p. 2.01-2.06.

CLARRIDGE, J.E.; MULLINS, J.M. Microscopy and Staining. In: Clinical and Pathogenic Microbiology, Howard, B.J. et all. 2nd Ed. Mosby. St. Louis, 1994, p. 101-115.

HARMON, S.M.; GOEPFERT, J.M.; BENNETT, R.W. *Bacillus cereus*. In: Compendium of Method for the Microbiological Examination of Foods, American Public Health Association. 3. ed. Washington DC. Carl Vanderzant & Don F.Splittsoesser, 1992, p. 593-604.

HUNT, J.M.; ABEYTA.C. *Campylobacter*. In: Bacteriological Analytical manual. 8.ed.Food and Drug Administration. AOAC International, Gaithersburg, USA. 1995. p. 7.01 - 7.27.

SHIMANUKI, H.; KNOX, D.A.; FURGALA, B.; CARON, D.M.; WILLIAMS, J.L. Diseases and Pests of Honey Bees. In: The Hive and the Honey Bee. J.M.Graham (Ed). Dadant & Sons . Hamilton, Illinois. 1992. P.1083-1150.

ANEXO VIII

PROCEDIMENTOS PARA EMISSÃO DE RESULTADOS CERTIFICADO OFICIAL DE ANÁLISE (COA)

Os resultados das análises microbiológicas deverão ser emitidos à mão, no próprio Certificado Oficial de Análise (COA) que acompanha a amostra.

No COA deverão constar as assinaturas do analista e do responsável pelo setor de microbiologia e seus respectivos carimbos, bem como as datas do início e término das análises.

Caso haja necessidade de se fazer alguma observação pertinente à análise além do resultado , utilizar o campo destinado a “observações”.

No caso de rasura durante o preenchimento, danificação ou inutilização (por qualquer motivo) do COA, substituí-lo por outro em branco, copiando todas as informações do certificado original. Neste caso, no campo 16, deverá constar “COA substituído no laboratório” e a assinatura ou rubrica da pessoa que o substituiu.

2. CÓDIGOS DAS ANÁLISES

No campo referente aos resultados, deverá constar o nº de código de cada análise realizada. Os códigos a serem usados são os seguintes:

M01 - Contagem de *Bacillus cereus*;

M02 - Pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*;

M03 - Pesquisa de *Listeria monocytogenes*;

M04 - Contagem de *Clostridium* Sulfito Redutores;

M05 - Contagem de *Clostridium perfringens*;

M06 - Contagem de coliformes totais;

M07 - Contagem de coliformes termotolerantes;

M08 - Contagem de bolores e leveduras;

M09 - Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis;

M14 - Contagem de *Staphylococcus aureus*;

M15 - NMP de *Staphylococcus aureus*;

M16 - NMP de coliformes totais;

M17 - NMP de coliformes termotolerantes;

M19 - NMP de *Vibrio parahaemolyticus*;

M20 - Pesquisa de *Salmonella*;

M21 - Pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbios;

M22 - Pesquisa de microrganismos termófilos aeróbios;

M23 - Pesquisa de microrganismos mesófilos anaeróbios;

M24 - Pesquisa de microrganismos termófilos anaeróbios;

M25 - Pré-incubação a 35°C por 10 dias em produtos en-

latados;

M26 - Pré-incubação a 55°C por 5 a 7 dias em produtos enlatados;

M29 - Pré-incubação por 7 dias a 36°C em produtos UHT;

M30 - Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis a 30°C;

M31 - NMP de microrganismos mesófilos aeróbios viáveis a 30°C;

M32 - Contagem total de Enterobactérias.

3. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados deverão ser expressos de acordo com o indicado abaixo:

3.1 Resultados de provas de contagem

O resultado final será expresso em UFC/g ou mL, levando-se em conta a diluição empregada, seguindo as orientações contidas no Anexo IV, “Procedimentos para contagem de colônias”, deste Manual.

3.2 Resultados de provas de NMP

O resultado final será expresso em NMP/ mL ou g , ou ainda NMP/100 mL, no caso de análise de água de abastecimento e gelo, de acordo com o Anexo III, “Procedimentos básicos de contagem”, deste Manual.

3.3 Resultados de provas de pesquisa

O resultado final deverá ser expresso como:

Ausência ou Presença em 20 mL (*P.larvae* subsp. *larvae*).

Ausência ou Presença em 25 g ou mL (outros microrganismos).

Ausência ou Presença em 100 mL (para águas de estabelecimentos exportadores para a Comunidade Econômica Europeia).

3.4 Provas de Pré-incubação de enlatados e produtos UHT Expressar o resultado como “Alterado” ou “Sem alteração”.

3.4.1 Teste de esterilidade comercial

Para as análises M21, M22, M23 e M24, expressar o resultado como “Negativa” ou “Positiva”.

3.5 EMISSÃO DE RESULTADOS POR LABORATÓRIOS CREDENCIADOS

Cada laboratório credenciado pela Coordenação de Laboratório Animal (CLA) para realização de análises microbiológicas deverá elaborar um certificado para emissão dos resultados oficiais e submetê-los à aprovação da CLA, pois estes laboratórios não poderão emitir os resultados de análise no Certificado Oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, encaminhado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) juntamente com as amostras oficiais.

Os laboratórios credenciados deverão seguir os mesmos critérios aqui estabelecidos para a emissão de resultados oficiais.

ANEXO IX

MEIOS DE CULTURA

Meios de cultura desidratados fornecidos por diferentes fabricantes podem apresentar pequenas diferenças em suas composições.

Observar atentamente a quantidade necessária de meio desidratado, em gramas por litro de meio a ser preparado, o modo de preparo, o tempo e a temperatura de esterilização em cada caso.

Ao adquirir meios de cultura, observar atentamente a formulação, comparando-a com aquela indicada neste manual. Às vezes, as diferentes marcas utilizam diferentes termos para uma mesma substância. Por exemplo, os termos triptona e tripticase referem-se à peptona de caseína obtida por digestão triptica ou pancreática. Assim, os produtos Ágar tripticase soja, Ágar soja triptona, Caso Ágar (antigo Casoy) referem-se à um produto que contém peptona de caseína (obtida por digestão triptica ou pancreática) e peptona de farinha de soja.

Como medida de segurança, as substâncias componentes dos meios de cultura, das soluções e dos reagentes incluídas nos anexos estão sinalizados com uma letra, indicando o grupo de risco ao qual pertencem, sendo:

N = nocivo;

I = irritante;

T = tóxico;

H = hidropolvente;

P = perigoso para o meio ambiente;

C = corrosivo;

O = oxidante;

F = inflamável;

E = explosivo;

M = mutagênico;

Co = comburentes.

Recomenda-se que, antes da manipulação e descarte das referidas substâncias, sejam consultadas fichas próprias ou manuais de segurança, visando o reconhecimento dos principais riscos inerentes e das medidas indispensáveis para prevenir ou evitar a ocorrência de acidentes e minimizar os danos à saúde do usuário e ao meio ambiente.

1. Ágar azul de toluidina - DNA

Pesar separadamente os seguintes ingredientes:

Ágar DNase - 4,2 g

Cloreto de sódio - 1,0 g

Tris (Hidroximetil) aminometano⁽¹⁾. - 0,61 g

Solução de Azul de Toluidina^(H) 1 % - 0,92 mL

pH 9,0±0,2

^(H) -hidropolvente

⁽¹⁾ - irrita os olhos e a pele

Adicionar 100 mL de água destilada/deionizada aos componentes da formulação, com exceção do azul de toluidina.

Agitar com auxílio de bastão de vidro até completa dissolução.

Deixar repousar por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Adicionar a solução de azul de orto-toluidina.

Não é necessário esterilizar.

Distribuir em placas cerca de 25 mL e deixar solidificar em superfície plana.

2. Ágar *Bacillus larvae* (ABL)

Preparar, separadamente, alíquotas de 100 mL de ágar cereus (PEMBA) base, ágar soja triptona e ágar estoque de acordo com o descrito neste capítulo para cada um dos meios específicos.

Fundir os meios e resfriar até 47 ±1°C, mantendo em banho-maria.

Em um erlenmeyer estéril, com capacidade mínima de 500 mL, misturar:

Ágar cereus (PEMBA) base - 100,0 mL

Ágar soja triptona (TSA) - 100,0 mL

Ágar estoque - 100,0 mL

Emulsão de gema de ovo a 50% estéril (*) - 30,0 mL

Solução de ácido pipemídico^(H) 0,2% (**)- 3,0 mL

Solução de ácido nalidíxico^(H) 0,1% (**)- 3,0 mL

(*) - último ingrediente a ser misturado para evitar a formação excessiva de espuma.

(**) - esterilizadas por filtração

^(H) - hidropolvente.

Homogeneizar bem e distribuir cerca de 20 mL em placas estéreis.

Deixar solidificar em superfície plana.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

Antes do uso, secar as placas invertidas, semi-abertas, em estufa a 45-50°C por cerca de 15 minutos.

3. Ágar Baird-Parker

Pesar o ágar Baird-Parker de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em frascos apropriados, datar e identificar o volume.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.

A composição básica do ágar Baird Parker deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de carne - 5,0 g

Triptona - 10,0 g

Extrato de levedura - 1,0 g

Piruvato de sódio - 10,0 g

Glicina - 12,0 g

Cloreto de lítio^(N)- 5,0 g

Ágar - 20,0 g

pH 6,8 ± 0,2

^(N) - nocivo por ingestão ⁽¹⁾ - irrita os olhos e a pele

Antes do plaqueamento, fundir e resfriar até cerca de 50°C.

A cada litro de meio base, adicionar 50 mL de emulsão de gema de ovo 50% e 3 mL de solução de telurito de potássio 3,5% esterilizada por filtração.

Homogeneizar bem e distribuir em placas, tomando o cuidado de evitar a formação de espuma.

Antes do uso, secar as placas a 45-50°C por cerca de 15 minutos, abertas e invertidas, apoiando a base com a superfície do ágar invertido sobre a borda da tampa da placa.

Pode-se ainda utilizar o fluxo laminar para secar as placas de Baird Parker, mantendo-as semi-abertas, sem invertê-las, pelo tempo necessário para a secagem completa de sua superfície.

4. Ágar batata glicose 2%

Pesar o ágar batata glicose 2% de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.
Distribuir volumes de acordo com a necessidade.
Identificar e datar.
Esterilizar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar batata glicose 2% deverá ser a seguinte, por litro de meio:
Infusão de 200g de batata - 4,0 g
Glicose - 20,0 g
Agar - 15,0 g
pH 5,6 ± 0,1
Fundir o ágar batata e resfriar até a 46-48°C.
Adicionar cerca de 1,5 mL de solução aquosa de ácido tartárico 10% para cada 100 mL, de forma a baixar o pH até 3,5.
Homogeneizar. Verter nas placas cerca de 15 a 20 mL.
Deixar solidificar em superfície plana.
Identificar, datar e armazenar adequadamente.
Antes do uso, secar as placas a 45-50°C por cerca de 15 minutos, abertas e invertidas, apoiando a base com a superfície do ágar invertido sobre a borda da tampa da placa ou em fluxo laminar expondo a superfície pelo tempo necessário para a completa secagem.

5. Ágar cérebro-coração (ABHI)
Pesar o ágar cérebro-coração (ABHI) de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.
Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.
Distribuir volumes de acordo com a necessidade e tampar.
Identificar e datar.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos. Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar cérebro-coração deverá ser a seguinte, por litro de meio:
Infusão de cérebro de carneiro - 12,5 g
Infusão de coração - 5,0 g
Proteose-peptona - 10,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
D (+) glicose - 2,0 g
Agar - 15,0 g
pH 7,4 ± 0,2

6. Ágar cereus (PEMBA)
Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.
Deixar em repouso por 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 90 mL em frascos.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
A composição básica do ágar cereus (PEMBA) base deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona - 1,0 g
Manitol - 10,0 g
Cloreto de sódio - 2,0 g
Sulfato de magnésio - 0,1 g
Fosfato de sódio bibásico - 2,5 g
Fosfato de potássio monobásico - 0,25 g
Azul de bromotimol - 0,12 g
Piruvato de sódio - 10,0 g
Agar - 14,0 g
Ph 7,2 ± 0,2

No momento da utilização, adicionar a 90 mL de ágar base e resfriado a 49-50°C:

a) 10 mL de emulsão de gema de ovo a 50%;
b) 1 mL de sulfato de polimixina B^(H) a 0,1% esterilizada por filtração.

^(H) - hidropolvente

Homogeneizar, tomando o cuidado para não formar espuma, e distribuir cerca de 15 mL em placas estéreis.
Deixar solidificar em superfície plana.
Identificar e datar.
Manter as placas sob refrigeração, protegidas de modo a evitar desidratação.

Antes do uso, secar as placas a 45-50°C por cerca de 15 minutos, abertas e invertidas, apoiando a base com a superfície do ágar invertido sobre a borda da tampa da placa ou em fluxo laminar expondo a superfície pelo tempo necessário para a completa secagem.

7. Ágar Columbia-base
Preparar o ágar Columbia-base de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.
Distribuir volumes de acordo com a necessidade.
Identificar e datar.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.
A composição básica do ágar Columbia-base deverá ser a seguinte, por litro de meio:
Peptona especial - 23,0 g
Amido solúvel - 1,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Agar - 15,0 g
pH 7,3 ± 0,2
8. Ágar Columbia-CNA com sangue desfibrinado de carneiro ou de cobaio.

Preparar o ágar Columbia-base de acordo com o indicado no item anterior, e adicionar 2 mL de solução 1% de ácido nalidíxico por litro de meio.

Antes da utilização, fundir o meio e deixar resfriar em banho-maria até 49-50°C.
Distribuir cerca de 12 mL do ágar base em placas de Petri estéreis.

Deixar solidificar em superfície plana.
Com pipeta, distribuir sobre a superfície do ágar previamente distribuído e solidificado 5 mL de ágar Columbia-CNA adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro ou de cobaio, tomando o cuidado para que se distribua homogeneamente sobre toda a superfície.

Deixar solidificar e manter sob refrigeração, protegidas de modo a evitar e desidratação, por até duas semanas.

9. Ágar com extrato de levedura
Pesar, separadamente, os componentes do ágar com extrato de levedura conforme a formulação abaixo de acordo com o volume de meio a ser preparado.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.
Verificar necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.
Distribuir volumes de acordo com a necessidade, tampar e identificar adequadamente.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
A composição básica do ágar com extrato de levedura deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Agar - 20,0 g
Extrato de levedura - 10,0 g
pH 7,4 ± 0,2
10. Ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA)
Pesar o ágar cristal violeta vermelho neutro bile de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.
Deixar repousar por 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.
Normalmente, não é necessário esterilizar este meio, porém, se for preciso, este meio pode ser autoclavado a 121°C ± 1°C por 5 minutos.

A composição básica de ágar cristal violeta vermelho neutro bile deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 7,0 g
Extrato de levedura - 3,0 g
Lactose - 10,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Sais biliares n° 3 - 1,5 g
Vermelho neutro ^(N°) - 0,03 g
Cristal violeta ^(N/HP) - 0,002 g
Agar - 15,0 g
pH 7,4 ± 0,2

^(N°) - nocivo por ingestão, por contato com os olhos e pele

^(N) - nocivo por ingestão

^(I) - pode causar lesões oculares graves

^(H) - muito tóxico para os organismos aquáticos

^(P) - a longo prazo, pode causar efeitos negativos no meio ambiente aquático

11. Ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBG)

Pesar o ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por 15 minutos.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.
Aquecer até completa dissolução.
Normalmente, não é necessário esterilizar este meio, porém, se for preciso, este meio pode ser autoclavado a 121°C ± 1°C por 5 minutos.

A composição básica de ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 7,0 g
Extrato de levedura - 3,0 g
Glicose - 10,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Sais biliares n° 3 - 1,5 g
Vermelho neutro ^(N°) - 0,03 g
Cristal violeta ^(N/HP) - 0,002 g
Agar - 13,0 g
pH: 7,4 ± 0,2

^(N°) - nocivo por ingestão, por contato com os olhos e pele

^(N) - nocivo por ingestão

^(I) - pode causar lesões oculares graves

^(H) - muito tóxico para os organismos aquáticos

^(P) - a longo prazo pode causar efeitos negativos no meio ambiente aquático

12. Ágar eosina azul de metileno (EMB)
Pesar o ágar EMB de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.
Distribuir volumes de acordo com a necessidade.
Identificar e datar.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar EMB deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 10,0 g
Lactose - 10,0 g
Fosfato de potássio bibásico - 2,0 g
Eosina amarela - 0,4 g
Azul de metileno ^(N/H) - 0,065 g
Ágar - 15,0 g
pH 7,0 ± 0,2

^(N) - nocivo por ingestão

^(H) - substância muito perigosa para água

13. Ágar esculina
Pesar o ágar esculina de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução do ágar.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 3 a 5 mL em tubos.
Identificar e datar.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.
A composição básica do ágar bile esculina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de carne - 3,0 g
Peptona de carne - 5,0 g
Esculina - 0,1 g
Citrato férrico - 0,5 g
Agar - 14,5 g
pH 6,6 ± 0,2

14. Ágar estoque
Pesar, separadamente, os ingredientes de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada em sua formulação.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em tubos volumes que permitam a formação de um bisel longo.

Identificar e datar.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Após autoclavação, deixar os tubos solidificarem em posição inclinada.

Quando o meio for destinado à estocagem de culturas referenciais, distribuir em tubos pequenos com tampa de rosca ou em frascos tipo penicilina, deixando solidificar em posição vertical.
Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar estoque deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona bacteriológica - 13,8 g
Extrato de levedura - 6,0 g
Extrato de carne - 12,2 g
Cloreto de sódio - 10,0 g
Fosfato de sódio bibásico - 2,0 g
Agar - 15,0 g
pH 7,4 ± 0,2

15. Ágar fenilalanina
Pesar o ágar fenilalanina de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos. Aquecer até completa dissolução do ágar. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório. Distribuir em tubos volumes de 3 a 5 mL. Identificar e datar. Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Armazenar adequadamente. A composição básica do ágar fenilalanina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de levedura - 3,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
DL-Fenilalanina - 2,0 g
Fosfato de sódio monobásico - 1,0 g
Agar - 15,0 g
pH $7,3 \pm 0,2$

16. Ágar ferro dois açúcares (Ágar Kligler)
Pesar o ágar ferro dois açúcares de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por cerca de 15 minutos. Aquecer, sob agitação, até completa dissolução do meio.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volume compatível com o tubo disponível, capaz de, quando inclinado, formar uma base de $\pm 3,0$ cm de altura e, sobre ela, um bisel de 2 a 3 cm.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

A composição básica de ágar ferro dois açúcares deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de carne - 3,0 g
Extrato de levedura - 3,0 g
Peptona de caseína - 15,0 g
Peptona de carne - 5,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Lactose - 10,0 g
D (+)Glicose - 1,0 g
Citrate férrico - 0,3 g
Tiosulfato de sódio - 0,3 g
Vermelho de fenol - 0,05 g
Agar - 12,0 g
pH $7,4 \pm 0,2$

17. Ágar ferro dois açúcares (Ágar Kligler) sal 3%
Proceder conforme o indicado pelo fabricante para o preparo do Ágar Kligler, acrescentando 25 g de cloreto de sódio a cada litro de meio preparado.

18. Ágar ferro três açúcares (TSI)

Pesar o ágar TSI de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por cerca de 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volume compatível com o tubo disponível, capaz de formar uma base de $\pm 3,0$ cm de altura e, sobre ela, um bisel de 2 a 3 cm quando inclinado.

Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar TSI deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de carne - 3,0 g
Extrato de levedura - 3,0 g
Peptona de caseína - 15,0 g
Peptona de carne - 5,0 g
Lactose - 10,0 g
Sacarose - 10,0 g
D (+) Glicose - 1,0 g
Citrate de amônio e ferro - 0,5 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Tiosulfato de sódio - 0,3 g
Vermelho de fenol - 0,024 g
Agar - 12,0 g
pH $7,4 \pm 0,1$

19. Ágar ferro três açúcares (TSI) sal 3%
Proceder conforme o indicado pelo fabricante para o preparo do Ágar TSI, acrescentando 25 g de cloreto de sódio a cada litro de meio preparado.

A composição básica do ágar gelatina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 5,0 g
Extrato de carne - 3,0 g
Gelatina - 120,0 g
pH $6,9 \pm 0,1$

20. Ágar glicose triptona

Pesar o ágar glicose triptona de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por cerca de 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de acordo com a necessidade.

Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar glicose triptona deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Triptona - 10,0 g
Glicose - 5,0 g
Púrpura de bromocresol - 0,04 g
Agar - 12,0 g
pH $6,8 \pm 0,2$

21. Ágar leite com tiamina (ALT)

Dissolver o ágar com extrato de levedura, preparado conforme o item anterior, e deixar em banho-maria até atingir $45 \pm 50^\circ\text{C}$. Em um erlenmeyer estéril, com capacidade mínima de 500 mL, misturar a cada 300 mL de ágar com extrato de levedura, 100 mL de leite UHT desnatado e 6 mL de solução de tiamina 0,1% esterilizada por filtração.

Após homogeneização, distribuir cerca de 20 mL assepticamente em placas estéreis deixando solidificar em superfície plana. A composição básica do ágar leite com tiamina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Agar com extrato de levedura - 300 mL
Leite UHT desnatado - 100 mL
Tiamina cloridrato sol. a 0,1% - 6 mL
22. Ágar lisina ferro (LIA)

Pesar o ágar lisina ferro (LIA) de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por cerca de 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em tubos, em volumes compatíveis com a formação de uma base de cerca de 3 cm e bisel de aproximadamente 2 cm quando inclinados. Datar e identificar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar LIA deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 5,0 g
Extrato de Levedura - 3,0 g
L-lisina - 10,0 g
Glicose - 1,0 g
Citrate Férrico Amoniacal - 0,5 g
Tiosulfato de Sódio - 0,04 g
Púrpura de Bromocresol - 0,02 g
Agar - 12,5 g
pH $6,7 \pm 0,1$

23. Ágar MacConkey-sorbitol (MCS)

Pesar o ágar MacConkey-sorbitol (MCS) de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por cerca de 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 100 mL em frascos adequados.

Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar MacConkey-sorbitol deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de caseína - 17,0 g
Peptona de carne - 3,0 g
Sorbitol - 10,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Sais biliares - 1,5 g
Vermelho neutro ^(N^o) - 0,03 g
Cristal violeta ^(N^o/H/P) - 0,001 g
Agar - 13,5 g
pH $7,1 \pm 0,1$

^(N^o) - nocivo por ingestão, por contato com os olhos e pele

^(N) - nocivo por ingestão

^(I) - pode causar lesões oculares graves

^(H) - muito tóxico para os organismos aquáticos

^(P) - a longo prazo, pode causar efeitos negativos no meio ambiente aquático

24. Ágar manitol-gema de ovo-polimixina segundo Mossel (MYP)

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 90 mL em frascos adequados.

Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar manitol-gema de ovo-polimixina segundo Mossel deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de carne - 1,0 g
Peptona de carne e peptona de caseína (1:1) - 10,0 g
D-manitol - 10,0 g
Cloreto de sódio - 10,0 g
Vermelho de fenol - 0,025 g

Agar - 15,0 g

pH $7,1 \pm 0,1$

Fundir o meio e resfriar em banho-maria até $49-50^\circ\text{C}$.

Adicionar a cada 90 mL de ágar fundido e resfriado:

a) 10 mL de emulsão de gema de ovo a 50%;

b) 1 mL de solução de sulfato de polimixina B 0,1% esterilizada por filtração.

25. Ágar manitol lisina cristal violeta verde brilhante (MLCB)

Pesar o ágar MLCB de acordo com volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por cerca de 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Evitar superaquecimento.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Não autoclavar.

Deixar resfriar até $49-50^\circ\text{C}$, em banho-maria.

Distribuir em placas estéreis.

Deixar solidificar em superfície plana.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

Manter as placas sob refrigeração, invertidas e protegidas contra desidratação.

Antes do uso, secar a superfície do meio, colocando as placas semi-abertas e invertidas em estufa a $45-50^\circ\text{C}$ por cerca de 15 minutos.

A composição básica do ágar MLCB deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de Levedura - 5,0 g
Peptona - 10,0 g
Extrato de carne - 2,0 g
Cloreto de sódio - 4,0 g
Manitol - 3,0 g
L-Lisina cloridrato - 5,0 g
Tiosulfato de sódio - 4,0 g
Citrate de ferro e amônio - 1,0 g
Verde brilhante ^(N^o) - 0,0125 g
Cristal violeta ^(N^o/H/P) - 0,01 g

Ágar - 15,0 g

pH $6,8 \pm 0,1$

^(N^o) - nocivo por ingestão, por contato com os olhos e pele

^(N) - nocivo por ingestão

^(I) - pode causar lesões oculares graves

^(H) - muito tóxico para os organismos aquáticos

^(P) - a longo prazo, pode causar efeitos negativos no meio ambiente aquático

26. Ágar motilidade

Pesar, separadamente, os ingredientes de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Distribuir em tubos. Identificar e datar.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Solidificar em posição vertical.

Armazenar adequadamente.

A composição básica de ágar motilidade deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Triptose - 10 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Agar - 5,0 g
pH $7,2 \pm 0,2$

27. Ágar motilidade-nitrato

Pesar, separadamente, os ingredientes de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada em sua formulação.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em tubos. Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Deixar solidificar o meio em posição vertical.

A composição básica de ágar motilidade-nitrato deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 8,6 g
Cloreto de sódio - 6,4 g
Nitrato de potássio^(Co) - 1,5 g
Agar - 3,0 g
pH $7,0 \pm 0,2$

^(Co) - perigo de fogo em contato com materiais combustíveis

28. Ágar motilidade-nitrato tamponado
Pesar, separadamente, os ingredientes de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada em sua formulação.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em tubos. Identificar e datar.
Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.
Deixar o meio solidificar em posição vertical.

A composição básica do ágar motilidade-nitrato tamponado deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de carne - 3,0 g
Peptona de carne - 5,0 g
Nitrato de potássio^(Co) - 1,0 g
Fosfato de sódio bibásico - 2,5 g
Agar - 3,0 g
Galactose - 5,0 g
Glicerina - 5,0 mL
pH $7,0 \pm 0,2$

^(Co) - perigo de fogo em contato com materiais combustíveis

29. Ágar motilidade sal 3%
Pesar, separadamente, os ingredientes de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada em sua formulação.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em tubos. Identificar e datar.
Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.
Deixar solidificar o meio em posição vertical.

A composição básica de ágar motilidade sal 3% deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 8,6 g
Cloreto de sódio - 30,0 g
Agar - 3,0 g
pH $7,0 \pm 0,2$

30. Ágar Mueller-Hinton sal 3%
Pesar o ágar Mueller-Hinton de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por 15 minutos.

Aquecer, sob agitação, até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 100 mL em frascos apropriados.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

A composição básica do ágar Mueller-Hinton sal 3% deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Infusão de carne bovina - 300,0 g
Peptona de caseína ácida - 17,5 g
Cloreto de sódio - 30,0 g
Amido - 1,5 g
Agar - 17,0 g
pH $7,3 \pm 0,2$

31. Ágar nutriente
Pesar o ágar nutriente de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução do ágar.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir alíquotas de 10 mL em tubos apropriados.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Após autoclavagem, deixar solidificar em posição inclinada, de forma a obter um bisel longo.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar nutriente deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona - 5,0 g
Extrato de carne - 1,0 g
Extrato de levedura - 2,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Agar - 15,0 g
pH $7,4 \pm 0,2$

32. Ágar nutriente com sulfato de manganês
Preparar o ágar nutriente conforme descrito no item anterior e adicionar 300 mg de sulfato de manganês a cada litro de meio.

Fundir o meio e deixar resfriar em banho-maria até $45-50^\circ\text{C}$.

Distribuir cerca de 10 mL em tubos.
Deixar solidificar de forma inclinada, de maneira a obter um bisel maior ou igual a 4 cm.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

33. Ágar nutriente isento de extrato de levedura

Pesar o ágar nutriente de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução do ágar.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir alíquotas de 10 mL em tubos apropriados.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Após autoclavagem, deixar solidificar em posição inclinada, de forma a obter um bisel longo.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar nutriente isento de extrato de levedura deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 5,0 g
Extrato de carne - 1,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Agar - 15,0 g
pH $7,4 \pm 0,2$

34. Ágar nutriente sal 3%
Preparar conforme descrito para o ágar nutriente e adicionar cloreto de sódio, por litro de meio.

Fundir o meio e deixar resfriar em banho-maria até $45-50^\circ\text{C}$.

Distribuir em placas ou tubos, conforme a necessidade.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

35. Ágar Oxford (AO)
Pesar o meio ágar Oxford base de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução do ágar.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de acordo com a necessidade. Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar Oxford deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Ágar Columbia base - 39,0 g
Esculina - 1,0 g
Citrate de amônio e ferro III - 0,5 g
Cloreto de lítio^(NI) - 15,0 g
pH $7,0 \pm 0,2$

^(NI) - nocivo por ingestão

^(I) - irrita os olhos e a pele

Fundir o ágar Oxford e resfriar em banho-maria até $45-48^\circ\text{C}$.

Dissolver o suplemento seletivo (vial) em 5 mL de etanol/água (1:1). Agitar cuidadosamente.

Adicionar, a cada 500 mL de meio, 1 vial de suplemento.

Distribuir em placas de Petri estéreis.

Identificar, datar e armazenar sob refrigeração, protegidas da luz e envoltas em sacos plásticos, por até 4 semanas.

OBS.: O suplemento para o ágar Oxford contido em cada vial, comercialmente disponível, tem em sua composição as seguintes substâncias:

Cicloheximide - 200 mg
Sulfato de Colistina - 10 mg
Acriflavina^(T) - 2,5 mg
Cefotetan - 1,0 mg
Fosfomicina - 5,0 mg

^(T) - tóxico por ingestão e por inalação

36. Ágar padrão para contagem (PCA)
Pesar o ágar padrão para contagem de acordo com o volume a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução do ágar.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de acordo com a necessidade.

Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Identificar e armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar padrão para contagem deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de levedura - 2,5 g
Triptona - 5,0 g
Glicose - 1,0 g
Agar - 15,0 g
pH $7,0 \pm 0,2$

37. Ágar PALCAM (AP)
Pesar o ágar PALCAM base de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução do ágar.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de acordo com a necessidade. Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar PALCAM deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Ágar Columbia base - 39,0 g
Extrato de levedura - 3,0 g
Esculina - 0,8 g
D(-)manitol - 10,0 g
Citrate de amônio e ferro III - 0,5 g
Glicose - 0,5 g

Cloreto de lítio^(NI) - 15,0 g
Vermelho de fenol - 0,08 g
Ágar - 13,0 g

pH $7,0 \pm 0,1$

^(NI) - nocivo por ingestão

^(I) - irrita os olhos e a pele

Fundir o meio e deixar esfriar até $45-48^\circ\text{C}$.

Dissolver o suplemento seletivo de cada vial em 2 mL de água destilada estéril e misturar até completa dissolução.

Adicionar um vial para cada 500 mL de meio.

Distribuir em placas estéreis, deixando solidificar em superfície plana.

Identificar, datar e armazenar sob refrigeração, protegidas da luz, por até 4 semanas.

O suplemento para o ágar PALCAM contido em cada vial, comercialmente disponível, tem em sua composição as seguintes substâncias:

Sulfato de Polimixina B - 5,0 mg
Ceftazidina - 10 mg
Acriflavina^(T) - 2,5 mg

^(T) - tóxico por ingestão e por inalação

38. Ágar para ensaio de DNase com verde de metila
Pesar separadamente os seguintes ingredientes:

Ágar DNase - 4,2 g
Verde de metila^(H) - 0,05g
pH $7,3 \pm 0,2$

^(H) - hidropolvente

Adicionar 100 mL de água destilada/deionizada ao ágar DNase.

Agitar com auxílio de bastão de vidro até completa dissolução.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Adicionar o verde de metila.

Não é necessário esterilizar.

Distribuir em placas cerca de 25 mL e deixar solidificar em superfície plana.

39. Ágar para esporulação
Pesar o ágar para esporulação de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de acordo com a necessidade. Identificar e datar.

Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 20 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar para esporulação deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Polipeptona - 15,0 g
Extrato de levedura - 3,0 g
Amido solúvel - 3,0 g
Sulfato de manganês - 0,1 g
Tioglicolato de sódio - 1,0 g
Fosfato de sódio bibásico - 11,0 g
Agar - 15,0 g
pH $7,8 \pm 0,1$

40. Ágar para fermentação de carboidratos - base com púrpura de bromocresol

Pesar os componentes da formulação de acordo com o volume de meio a ser preparado.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em frascos, identificar o volume.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

A composição básica do ágar para fermentação de carboidratos deverá ser a seguinte por litro de meio:

Triptona - 10,0 g
Extrato de carne - 5,0 g
Púrpura de bromocresol^(H) (solução 1,6%) - 2,5 mL
Agar - 15,0 g
pH $6,7 \pm 0,2$

^(H) - hidropolvente

Antes do uso, adicionar ao meio, dissolvido e resfriado a 46-48°C, o carboidrato desejado (previamente esterilizado por filtração), na concentração e proporção indicadas na técnica.

Verter cerca de 20 mL nas placas. Identificar, datar e armazenar adequadamente.

41. Ágar Rambach

Hidratar a quantidade de meio Rambach, de acordo com o volume de meio necessário (o meio é fornecido em frações suficientes para preparar 250 mL).

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Aquecer até completa dissolução.

Evitar aquecimento excessivo.

Adicionar 1 vial de suplemento para cada 250 mL de meio preparado.

Homogeneizar bem.

Não autoclavar.

Resfriar a 49-50°C em banho-maria.

Distribuir em placas de Petri estéreis.

Deixar solidificar em superfície plana.

Identificar e datar.

Armazenar invertidas, protegidas em sacos plásticos, sob refrigeração.

O meio se mantém estável em temperatura ambiente por 12 horas e em refrigeração por 3 semanas.

Antes do uso, secar a superfície do meio, colocando as placas semi-abertas e invertidas em estufa a 45-50°C por cerca de 15 minutos.

A composição básica do ágar Rambach deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona - 8,0 g

Cloreto de sódio - 5,0 g

Desoxicolato de sódio ^(N), - 1,0 g

Mistura cromógena - 1,5 g

Propilenoglicol - 10,5 g

Agar - 15,0 g

pH final: 7,3 ± 0,2

^(N) - *nocivo por ingestão*

42. Ágar Sahid Ferguson perfringens (SFP)

Pesar o ágar SFP de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em frascos apropriados.

Identificar e datar.

Esterilizar em autoclave a 121 ± 1°C por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar SFP deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 15,0 g

Peptona de soja - 5,0 g

Extrato de levedura - 5,0 g

Bissulfito de sódio - 1,0 g

Citrato de amônio e ferro III - 1,0 g

Agar - 20,0 g

pH 7,4 ± 0,2

Para a preparação das placas de ágar SFP, incorporar 3 mg de polimixina B e 12 mg de kanamicina, a cada 1000 mL do meio fundido e resfriado a 45-50°C.

43. Ágar sal triptona (T1N1)

Pesar separadamente os seguintes componentes:

Triptona - 10,0 g

Cloreto de sódio - 10,0 g

Agar - 20,0 g

pH 7,2 ± 0,2

Transferir para recipiente apropriado.

Adicionar 1000 mL de água destilada/deionizada.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.

Aquecer, sob agitação, até completa dissolução do meio.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.

Deixar solidificar em posição inclinada, de forma a obter um bisel de cerca de 4 cm.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

44. Ágar soja triptona (TSA)

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 100 mL em frascos adequados.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.

A composição básica do ágar soja triptona deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Triptona (Peptona de caseína-digestão triptica ou pancreática) - 15,0 g

Peptona de farinha de soja - 5,0 g

Cloreto de sódio - 5,0 g

Agar - 15,0 g

pH 7,3 ± 0,2

45. Ágar soja triptona (TSA) com CaCl₂ e eritrócitos lavados de carneiro

Manter frascos com 200 e 100 mL de TSA base, preparado conforme o item anterior, em banho-maria a 45°C.

Usar 200 mL dos frascos para preparar placas com uma camada base de cerca de 10 mL.

Deixar solidificar em superfície plana.

A 100 mL de TSA base, adicionar 5 mL de eritrócitos lavados de carneiro e 1 mL de uma solução de cloreto de cálcio 1M, mantendo o meio em banho-maria a 45°C no máximo por 15 minutos.

Pipetar uma segunda camada de 5 mL de ágar TSA com eritrócitos de carneiro e cloreto de cálcio sobre a camada base solidificada.

46. Ágar soja triptona (TSA) sal 3%

Preparar o ágar soja triptona de acordo com as recomendações contidas neste capítulo e adicionar 25 g de cloreto de sódio para cada litro de meio.

47. Ágar tiosulfato-citrato-sacarose-sais biliares (TCBS)

Pesar o ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS) de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Não autoclavar.

Distribuir, assepticamente, volumes de 15 mL em placas de Petri previamente esterilizadas.

Antes do uso, secar a superfície do meio, colocando as placas semi-abertas e invertidas em estufa a 45-50°C por cerca de 15 minutos.

A composição básica de ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de levedura - 5,0 g

Peptona de carne - 5,0 g

Peptona de caseína - 5,0 g

Tiosulfato de sódio - 10,0 g

Citrato de sódio - 10,0 g

Bile - 5,0 g

Sacarose - 20,0 g

Colato de sódio - 3,0 g

Cloreto de sódio - 10,0 g

Citrato férrico - 1,0 g

Azul de bromotimol - 0,04 g

Azul de timol - 0,04 g

Agar - 15,0 g

pH 8,6 ± 0,2

48. Ágar tirosina

Pesar, separadamente, os ingredientes de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada em sua formulação.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 100 ou 50 mL em frascos adequados.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.

A composição do ágar tirosina base deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de carne - 8,6 g

Peptona - 1,0 g

Agar - 15,0 g

pH 7,0 ± 0,2

A 100 mL do meio base, fundido e resfriado a 45-50°C, adicionar 10 mL de solução aquosa estéril de tirosina a 5% e misturar bem.

Distribuir cerca de 10 mL em tubos de ensaio estéreis, agitando para evitar a separação da tirosina.

Este meio também pode ser distribuído em placas.

49. Ágar triptose (AT)

Pesar o meio ágar triptose de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Adicionar a cada litro de meio 2 mL de solução de ácido nalidíxico a 1%.

Homogeneizar.

Deixar repousar por 15 minutos.

Aquecer, sob agitação, até completa dissolução do meio. Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir porções de 100 e 50 mL em frascos apropriados.

Aquecer até completa dissolução.

Identificar e datar.

Autoclavar a 121 ± 1°C, por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar AT deverá ser a seguinte por litro de meio:

Bacto triptose - 20,0 g

Cloreto de sódio - 5,0 g

Dextrose - 1,0 g

Extrato de levedura - 6,0 g

Ágar - 15,0 g

pH 7,4 ± 0,2

^(N) - *nocivo por ingestão*

50. Ágar Triptose com ácido nalidíxico (ATN)

Preparar o AT de acordo com o item anterior.

Adicionar a cada litro de meio 2 mL de solução de ácido nalidíxico a 1%.

Homogeneizar.

51. Ágar triptose sulfito cicloserina (TSC)

Pesar o ágar TSC de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por 15 minutos.

Aquecer, sob agitação, até completa dissolução do meio.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em frascos. Identificar e datar.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica de ágar TSC deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 15,0 g

Peptona de soja - 5,0 g

Extrato de levedura - 5,0 g

Bissulfito de sódio - 1,0 g

Citrato de amônio e ferro III - 1,0 g

Agar - 20,0 g

pH 7,4 ± 0,2

No momento do uso, fundir o Ágar e resfriar até 46-48°C em banho-maria.

Incorporar ao meio fundido e resfriado 10 mL de uma solução a 5% de cicloserina esterilizada por filtração, por cada litro de meio.

52. Ágar uréia

Pesar o ágar uréia base de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Homogeneizar até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em frascos. Identificar e datar.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar uréia deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de Carne - 1,0 g

Fosfato de potássio monobásico - 2,0 g

D+Glicose - 1,0 g

Vermelho de fenol - 0,012 g

Cloreto de sódio - 5,0 g

Agar - 12,0 g

pH 6,8 ± 0,2

Antes do uso, fundir o ágar uréia e resfriar até 50°C em banho-maria.

Assepticamente, adicionar 50 mL de solução de uréia 40% esterilizada por filtração, por litro de meio.

Distribuir de acordo com o uso.

53. Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS)

Pesar o ágar BPLS, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de acordo com a necessidade.

Identificar e datar.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar BPLS deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 5,0 g

Peptona de caseína - 5,0 g

Extrato de levedura - 3,0 g

Lactose - 10,0 g

Sacarose - 10,0 g

Cloreto de sódio - 5,0 g

Fosfato de sódio bibásico - 2,0 g

Verde brilhante ^(N), - 0,0125 g

Vermelho de fenol - 0,08 g

Agar - 12,0 g

pH 6,9 ± 0,1

^(N) - *nocivo por ingestão*

Antes do uso, após dissolução do meio e reestriamento até cerca de 50°C, adicionar a cada 100 mL de meio 0,1 mL de solução de novobiocina a 4%.

Distribuir em placas estéreis.
Deixar solidificar em superfície plana.
Manter as placas sob refrigeração, invertidas e protegidas contra desidratação.

Antes do uso, secar a superfície do meio, colocando as placas semi-abertas e invertidas em estufa a 45-50°C por cerca de 15 minutos.

54. Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD)

Pesar o ágar XLD de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.
Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução. Evitar superaquecimento.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Não autoclavar.
Distribuir em placas estéreis.
Deixar solidificar em superfície plana.
Antes do uso, secar a superfície do meio, colocando as placas semi-abertas e invertidas em estufa a 45-50°C por cerca de 15 minutos.

A composição básica do ágar XLD deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de levedura - 3,0 g
L(+)-Lisina - 5,0 g
Lactose - 7,5 g
D(+)-Xilose - 3,5 g
Sacarose - 7,5 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Desoxicolato de sódio - 2,5 g
Vermelho de fenol - 0,08 g
Tiosulfato de sódio - 6,8 g
Citrato de amônio e ferro III - 0,8 g
Agar - 13,5 g
pH 7,4 ± 0,2

55. Ágar XLT4

Pesar o ágar XLT4 de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.
Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.
Adicionar 4,6 mL do suplemento (solução a 26-28% de Tetragitol-4/Tetradecylsulfato de Sódio) a cada litro de meio preparado.
Aquecer até completa dissolução, evitando superaquecimento.

OBS. O meio não deve ser mantido mais do que 45 minutos a 50°C para evitar formação de precipitados.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Não autoclavar.
Distribuir em placas estéreis.
Deixar solidificar em superfície plana.
Antes do uso, secar a superfície do meio, colocando as placas semi-abertas e invertidas em estufa a 45-50°C por cerca de 15 minutos.

A composição básica do ágar XLT4 deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de levedura - 3,0 g
Proteose peptona - 1,6 g
L-Lisina - 5,0 g
Lactose - 7,5 g
D + Xilose - 3,75 g
Sacarose - 7,5 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Vermelho de fenol - 0,08 g
Tiosulfato de Sódio - 6,8 g
Citrato de Amônio e Ferro III - 0,8 g
Ágar - 18,0 g
pH 7,4 ± 0,2

56. Água peptonada alcalina para *Vibrio cholerae* (APHA 3ª ed.)

Pesar o meio água peptonada alcalina de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante ou composto a formulação no laboratório.
Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.
Alcalinizar até pH 8,6 ± 0,2
Distribuir volume de 10 mL em tubos.
Identificar e datar.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.

A composição básica da água peptonada deverá ser a seguinte por litro de meio:

Peptona - 10,0 g
Cloreto de sódio - 10,0 g
pH 8,6 ± 0,2

57. Caldo para fermentação de carboidratos - base com púrpura de bromocresol

Pesar o caldo base de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.
Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Homogeneizar até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 90 mL em frascos apropriados.
Este meio base pode ser autoclavado a 121 ± 1°C por 15 minutos. Nesse caso, a solução de carboidrato a ser adicionada deverá ser previamente esterilizada por filtração.

Após a adição dos carboidratos, distribuir 3 a 10 mL em tubos estéreis apropriados.

Identificar os tubos com informação sobre o carboidrato que foi adicionado ao meio.

Manter sob refrigeração até o momento do uso.
OBS.: Quando o meio base não for autoclavado, prepará-lo conforme instruções acima e adicionar, a cada fração de 90 mL, 10 mL da solução a 5 ou 10% do carboidrato desejado (ver instruções específicas sobre o preparo das soluções de carboidratos no capítulo de “soluções e reagentes” deste anexo.

Esterilizar por filtração, dispensando de 3 a 10 mL diretamente em tubos estéreis.

A composição básica do caldo para fermentação - base com púrpura de bromocresol deverá ser a seguinte por litro de meio:

Extrato de carne - 3,0 g
Peptona - 10,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Púrpura de bromocresol - 0,04 g
pH 7,0 ± 0,2

58. Caldo cérebro-coração (BHI)

Pesar o meio caldo cérebro-coração (BHI) de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Homogeneizar até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir 10 mL em tubos com tampa de rosca.
Identificar e datar.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.

A composição básica do caldo cérebro-coração (BHI) deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Infusão de cérebro de carneiro - 12,5 g
Infusão de coração de boi - 5,0 g
Proteose-peptona - 10,0 g
D (+) glicose - 2,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Fosfato dissódico - 2,5 g
pH 6,6 ± 0,2

59. Caldo cérebro-coração concentração dupla-sal 0,65%-extrato de levedura 0,6%(BHI-SE)

Pesar 2 vezes a quantidade de meio caldo cérebro-coração (BHI) indicada pelo fabricante, adicionando 1,5 g de Cloreto de sódio e 6,0 g por litro de meio a ser preparado.

60. Caldo cérebro-coração nitrato (BHI-NO₃)

Pesar o meio caldo cérebro-coração, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Adicionar 1,5 g de nitrato de potássio^(Co) para cada litro de meio.

^(Co) - *perigo de fogo em contato com materiais combustíveis*

61. Caldo cérebro-coração-sal 0,65%- extrato de levedura 0,6%(BHI-SE)

Pesar o meio caldo cérebro-coração (BHI), de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Adicionar 1,5 g de Cloreto de sódio e 6,0 g de extrato de levedura, por litro de meio a ser preparado.

62. Caldo Cérebro-coração tiamina (BHI-T)

Pesar o meio caldo cérebro-coração (BHI), de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Antes do uso, adicionar, em cada tubo com 10 mL, 0,2 mL de solução aquosa de tiamina a 0,01%, esterilizada por filtração.

63. Caldo de carne cozida (CCC)

Em cada tubo selecionado para uso, distribuir 10 mL de água destilada/deionizada e 1 g do granulado (ou conforme a indicação do fabricante).

Identificar e datar.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.
A composição básica do caldo de carne cozida deverá ser a seguinte por litro de meio:

Músculo cardíaco de boi - 454,0 g
Proteose peptona - 20,0 g
D (+) Glicose - 2,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
pH 7,4 ± 0,1

64. Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB)

Pesar os componentes da formulação do meio LEB de acordo com o volume de meio a ser preparado.

Transferir para recipiente adequado. Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Agitar até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 225 mL. Identificar e datar.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos. Esfriar logo após a esterilização e manter sob refrigeração.

A composição básica do caldo LEB deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Proteose peptona - 5,0 g
Triptona - 5,0 g
Extrato de carne purificado - 5,0 g
Extrato de levedura - 5,0 g
Cloreto de sódio - 20,0 g
Fosfato de potássio monobásico - 1,35 g
Fosfato de sódio bibásico - 12,0 g
Ácido Nalidíxico sol. a 1% - 2,0 mL
pH 7,4 ± 0,2

Imediatamente antes do uso adicionar 0,25 mL de solução aquosa a 1,0% de acriflavina cloridrato ^(T) por frasco de 225 mL.

^(T) - tóxico por ingestão e por inalação

65. Caldo de enriquecimento para *Listeria* (UVM)

Pesar o meio UVM de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Agitar até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir em frascos, volumes de 225 mL. Identificar e datar.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos. Esfriar logo após a esterilização e manter sob refrigeração.

A composição básica do caldo UVM deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Proteose peptona - 5,0 g
Triptona - 5,0 g
Extrato de carne purificado - 5,0 g
Extrato de levedura - 5,0 g
Cloreto de sódio - 20,0 g
Fosfato de potássio monobásico - 1,35 g
Fosfato de sódio bibásico - 12,0 g
Esculina - 1,0 g
pH 7,4 ± 0,2

Imediatamente antes do uso, assepticamente adicionar 1 vial de suplemento específico para cada 500 mL de caldo.

Na ausência do suplemento vial, adicionar 1,2 mL de solução aquosa a 1,0% de acriflavina cloridrato ^(T) e 2 mL de ácido nalidíxico solução 1% em NaOH 0,1N (esterilizadas por filtração) por litro de caldo.

^(T) - tóxico por ingestão e por inalação
^(N) - nocivo por ingestão

OBS: Algumas marcas já contêm os suplementos. Outras contêm o ácido nalidíxico, necessitando apenas a complementação com acriflavina.

O conteúdo do suplemento vial para o caldo UVM, comercialmente disponível, é o seguinte:

Acriflavina^(TH) - 6,0 mg
Ácido nalidíxico^(NH) - 10,0 mg
Água destilada ou deionizada - 5,0 mL
^(T) - tóxico por ingestão e por inalação
^(N) - nocivo por ingestão, e em contato com a pele e com olhos

^(H) - hidropolvente classe 3

66. Caldo EC

Pesar o caldo EC de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Agitar até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio previamente preparados com tubos de Durhan invertidos.

Identificar e datar.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.

A composição básica de caldo EC deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona - 20,0 g
Lactose - 5,0 g
Bile bovina - 1,5 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Fosfato de potássio bibásico - 4,0 g
Fosfato de potássio monobásico - 1,5 g
pH 6,9 ± 0,2

67. Caldo EC com novobiocina (EC + n)

Pesar o caldo EC de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Após preparo e autoclavação, adicionar, a cada tubo com 10 mL de meio, 0,5 mL de uma solução de novobiocina a 4 mg/mL.

68. Caldo experimental para anaeróbios segundo R.F. Corseuil (caldo Rogert)

Pesar separadamente os seguintes ingredientes:

Peptona - 20,0 g
Extrato de levedura - 5,0 g
Extrato de carne - 3,0 g
Glicose - 12,5 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
L-cisteína - 0,5 g
Caldo de fígado - 500 mL
pH 7,6 ± 0,2

Transferir para recipiente adequado. Adicionar 500 mL de água destilada/deionizada.

Agitar até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 20 minutos.

OBS. Para preparar o caldo de fígado, ferver durante uma hora o fígado bovino moído na proporção de 500g para cada litro de água. Filtrar em papel filtro, fracionar em alquotas de 500 mL e congelar até a sua utilização.

Pode-se substituir o extrato de carne e a água destilada por caldo de carne, previamente preparado da mesma forma que o caldo de fígado, utilizando-se músculo bovino.

69. Caldo Fraser

Pesar o caldo fraser base, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Misturar até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos. Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Resfriar imediatamente após a autoclavação. Armazenar sob refrigeração.

A composição básica do caldo Fraser deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Proteose peptona - 5,0 g

Triptona - 5,0 g

Extrato de carne - 5,0 g

Extrato de levedura - 5,0 g

Cloreto de sódio - 20,0 g

Fosfato de potássio monobásico - 1,35 g

Fosfato de sódio bibásico - 12,0 g

Esculina - 1,0 g

Cloreto de lítio ^(NT) - 3,0 g

pH $7,2 \pm 0,1$

^(N) - *nocivo por ingestão*

^(I) - *irrita os olhos e a pele*

Imediatamente antes do uso, adicionar asepticamente a cada tubo 0,1 mL do suplemento (vial) dissolvido em 5 mL de água/etanol 1:1.

* O vial comercialmente disponível contém suplemento su-

ficiente para 500 mL de meio. A composição do vial é a seguinte:

Citrato de Amônio e Ferro III - 250 mg

Acriflavina - 12,5 mg

Ácido Nalidíxico - 10 mg

OBS: Algumas marcas deste meio já incluem em sua formulação uma ou mais das substâncias do suplemento. Nesse caso, os componentes ausentes na formulação deverão ser adicionados individualmente na seguinte proporção: para cada tubo de 10 mL do caldo:

- 0,1 mL da solução de citrato de amônio e ferro III a 5%;

- 0,25 mL de solução de acriflavina cloridrato a 0,1%;

- 0,2 mL da solução de ácido nalidíxico a 0,2%.

Manter o meio protegido da luz.

70. Caldo gelatina fosfato sal (GPS)

Pesar separadamente os seguintes componentes:

Gelatina - 10,0 g

Cloreto de sódio - 10,0 g

Fosfato de potássio bibásico - 5,0 g

pH: $7,2 \pm 0,2$

Transferir para recipiente apropriado.

Adicionar 1000 mL de água destilada/deionizada.

Aquecer, sob agitação, até completa dissolução do meio.

Distribuir de acordo com a utilização.

Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

71. Caldo Glicose-sal 3%-teepol (GSTB)

Pesar o meio caldo glicose sal 3% teepol, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Homogeneizar até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir 10 mL em tubos com tampa de rosca.

Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do caldo glicose-sal 3%-teepol deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de carne - 3,0 g

Peptona - 10,0 g

Cloreto de sódio - 30,0 g

Glicose - 5,0 g

Violeta de Metila - 0,002 g

Teepol - 4,0 mL

pH $8,8 \pm 0,2$

72. Caldo glicose triptona (caldo dextrose triptona)

Pesar o meio glicose triptona, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Homogeneizar até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos com tampa de rosca.

Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do caldo dextrose triptona deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Triptona - 10,0 g

Glicose - 5,0 g

Extrato de carne - 5,0 g

pH $6,7 \pm 0,2$

73. Caldo Horie arabinose violeta de etila (HAEB)

Pesar separadamente os seguintes ingredientes:

Peptona - 5,0 g

Cloreto de sódio - 30,0 g

Extrato de carne - 3,0 g

Violeta de Etila - 0,001 g

Azul de Bromotimol - 0,03 g

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar 900 mL de água destilada/deionizada.

Agitar até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Preparar separadamente 100 mL de uma solução aquosa a 5% de arabinose, esterilizar por filtração e adicioná-la asepticamente aos 900 mL do caldo.

Distribuir asepticamente 10 mL em tubos estéreis de 15 x 180 mm.

74. Caldo lauril sulfato de sódio simples

Pesar o caldo lauril sulfato de sódio de acordo com o volume a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Agitar até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

A composição básica de caldo lauril sulfato de sódio deverá ser a seguinte por litro de meio:

Triptona - 20,0 g

Lactose - 5,0 g

Cloreto de sódio - 5,0 g

Lauril sulfato de sódio - 0,1 g

Fosfato de potássio bibásico - 2,7 g

Fosfato de potássio monobásico - 2,75 g

pH $6,8 \pm 0,2$

75. Caldo lauril sulfato de sódio concentração dupla

Seguir o procedimento do caldo simples (item anterior), dobrando a quantidade dos ingredientes para o mesmo volume de água.

76. Caldo lisina descarboxilase

Pesar o caldo lisina descarboxilase de acordo com o volume a ser preparado.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Homogeneizar até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir 5 mL em tubos de ensaio.

Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do caldo lisina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona - 5,0 g

Extrato de levedura - 3,0 g

Glicose - 1,0 g

L-Lisina - 5,0 g

Púrpura de bromocresol - 0,02 g

pH $6,1 \pm 0,2$

77. Caldo ONPG

Preparar a solução de água peptonada 1% de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante ou compando a formulação de acordo com as orientações contidas neste anexo. Ajustar o pH, se necessário. Distribuir em frascos.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Esfriar e reservar.

Preparar a solução de ONPG dissolvendo 0,6 g de O-nitrofenil-Beta-D-Galactopiranosídeo em 100 mL de solução 0,01 M de Fosfato de Sódio Bibásico. Esterilizar por filtração. Manter sob refrigeração, envolvido em papel alumínio.

Preparo do Caldo ONPG: Misturar asepticamente 25 mL da solução ONPG em 75 mL da água peptonada.

Distribuir 0,5 mL do caldo em tubos esterilizados.

OBS.: não usar se ficar amarelo.

Validade: 30 dias sob congelamento.

78. Caldo ONPG sal 3%

Preparar a solução de água peptonada 1% de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante ou compando a formulação de acordo com as orientações contidas neste capítulo. Adicionar 25,0 g de cloreto de sódio por litro de meio.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Esfriar e reservar.

Preparo do Caldo ONPG sal 3%:

Misturar asepticamente 25 mL da solução ONPG em 75 mL da água peptonada-sal 3%.

OBS. Ver preparo da solução de ONPG item anterior.

79. Caldo peptonado sem sal

Pesar, em recipiente apropriado, o seguinte componente:

Peptona (ou triptona) - 10,0 g

Água destilada/deionizada - 1000 mL

pH $7,4 \pm 0,2$

Agitar até a completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio.

Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

80. Caldo peptonado sal (3%, 6%, 8% ou 10%)

Pesar, em recipiente apropriado, os seguintes componentes:

Peptona (ou triptona) - 10,0 g

Cloreto de sódio para atingir a concentração desejada - qsp

Água destilada/deionizada - 1000 mL

pH $7,4 \pm 0,2$

Agitar até a completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio.

Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.

81. Caldo Rappaport Vassiliadis

Pesar o caldo Rappaport Vassiliadis, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Agitar até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir 10 mL em tubos de ensaio.

Identificar e datar.

Autoclavar a $115 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos.

Armazenar adequadamente.

A composição básica do caldo Rappaport Vassiliadis deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de soja - 5,0 g

Cloreto de sódio - 8,0 g

Fosfato de potássio monobásico - 1,6 g

Cloreto de magnésio* - 40,0 g

Verde malaquita* ^(N) - 0,04 g

pH $5,2 \pm 0,2$

^(N) - *nocivo por contato com a pele e por ingestão*

* - algumas marcas de meio Rappaport Vassiliadis não incluem cloreto de magnésio e verde malaquita em sua formulação. Ao utilizar este meio, verificar a necessidade de suplementação.

OBS. O meio preparado pode ser estocado em refrigeração por até 7 meses (Vassiliadis *et al.* 1985)

82. Caldo selenito cistina

Pesar o caldo selenito cistina, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Aquecer, se necessário, até no máximo 60°C, para completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir 10 mL em tubos de ensaio.

Não autoclavar.

Usar imediatamente após o preparo.

Descartar o meio que não for utilizado.

A composição básica do caldo selenito cistina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de caseína - 5,0 g

L (-) cistina - 0,01 g

Lactose - 4,0 g

Fosfato de sódio bibásico - 2,0 g

Bi-selenito de sódio ^(T) - 4,0 g

pH $7,0 \pm 0,2$

^(T) - *tóxico por inalação e ingestão / pode ter efeitos cumulativos*

83. Caldo soja triptona (TSB)

Pesar o caldo TSB, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Agitar, com auxílio de bastão de vidro ou agitador magnético, até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de acordo com a necessidade.
Identificar e datar.
Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.
A composição básica do caldo TSB deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Triptona (peptona de caseína-digestão pancreática) - 17,0 g
Peptona de farinha de soja - 3,0g
D(+) glicose - 2,5 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Fosfato de potássio bibásico - 2,5 g
pH $7,3 \pm 0,1$
84. Caldo soja triptona (TSB)- NaCl 10% - piruvato de sódio

1%
Pesar o caldo TSB de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.
Adicionar 95,0 g de cloreto de sódio e 10,0 g de piruvato de sódio, por litro de meio a ser preparado.
85. Caldo telurito manitol glicina segundo Giolitti-Cantoni
Pesar o meio caldo telurito-manitol-glicina de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Homogeneizar até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir 19 mL em tubos com tampa de rosca.
Identificar e datar.
Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.

A composição básica do caldo telurito manitol glicina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Triptona - 10,0 g
Extrato de carne - 5,0 g
Extrato de levedura - 5,0 g
Cloreto de lítio ^(N/D) - 5,0 g
D - manitol - 20,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Glicina - 1,2 g
Piruvato de sódio - 3,0 g
pH $6,9 \pm 0,2$

^(N) - *nocivo por ingestão*
^(I) - *irrita os olhos e a pele*

No momento da utilização, adicionar 0,1 mL de uma solução de telurito de potássio a 1% a cada tubo de meio.

OBS. O meio base (sem a adição de telurito de potássio) pode ser armazenado por duas semanas sob refrigeração.

86. Caldo tetrationato
Pesar o caldo tetrationato base de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Aquecer brevemente, até 60°C no máximo, e resfriar rapidamente.

Distribuir asépticamente em tubos estéreis.
Identificar, datar e armazenar adequadamente.

Não autoclavar.
A composição do caldo tetrationato base deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de caseína - 2,5 g
Peptona de carne - 2,5 g
Mistura de sais biliares - 1,0 g
Carbonato de cálcio - 10,0 g
Tiosulfato de sódio - 30,0 g
pH $8,4 \pm 0,2$

No momento do uso, adicionar 20 mL de solução iodo-iodeto e 10 mL de solução verde brilhante a 0,1%, por litro de meio.

OBS. Ao dispensar o meio, certifique-se de que qualquer precipitado formado esteja suspenso. Este meio apresenta-se turvo e verde, com sedimento branco de carbonato de cálcio.

87. Caldo Triptose Fosfato (TPB)
Pesar o caldo TPB de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Aquecer, se necessário, até no máximo 60°C , para completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes conforme a necessidade.
Identificar e datar.
Autoclavar a $115 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos.
Armazenar adequadamente.

A composição básica do Caldo Triptose Fosfato deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Triptose - 20,0 g
Glicose - 2,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Fosfato de sódio bibásico - 2,5 g
pH $7,3 \pm 0,2$
88. Caldo uréia

Pesar o caldo uréia de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Homogeneizar até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Esterilizar por filtração, distribuindo volumes de cerca de 3 mL diretamente em tubos estéreis.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.
A composição básica do caldo uréia deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Extrato de levedura - 0,1 g
Fosfato de potássio monobásico - 9,1 g
Fosfato de sódio bibásico - 9,5 g
Uréia - 20,0 g
Vermelho de fenol - 0,1 g
pH $6,8 \pm 0,1$

89. Caldo Verde brilhante bile lactose 2%
Pesar o caldo Verde brilhante bile lactose 2%, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente. Agitar até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio com tubos de Durhan invertidos.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

A composição básica de caldo Verde brilhante-bile 2%-lactose deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona - 10,0 g
Lactose - 10,0 g
Bile Bovina - 20,0 g
Verde brilhante ^(N) - 0,0133 g
pH $7,4 \pm 0,2$

^(N) - *nocivo por ingestão*
90. Caldo Verde brilhante-bile-lactose 2% - MUG (BRILA-MUG)

Pesar o caldo Brila-MUG de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Misturar até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio com tubos de Durhan invertidos.

Identificar e datar.
Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Armazenar adequadamente.
A composição básica do caldo Brila-MUG deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona - 10,0 g
Lactose - 10,0 g
L-triptofano - 1,0 g
Bile concentrado - 20,0 g
Verde brilhante ^(N) - 0,0133 g
4 - Metilumbeliferil - β - D- glicuronídeo - 0,1 g
pH $7,2 \pm 0,1$

^(N) - *nocivo por ingestão*
91. Caldo vermelho de fenol - base (para fermentação de carboidratos)

Pesar o caldo vermelho de fenol - base de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Agitar até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 90 mL em frascos.
Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos ou esterilizar por filtração após a adição da solução de carboidrato.

A composição básica de caldo vermelho de fenol base deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Proteose peptona - 10,0 g
Extrato de carne - 1,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Vermelho de fenol - 0,018 g
pH $7,4 \pm 0,2$
Adicionar aos frascos com 90 mL de meio autoclavado e resfriado a $45-50^\circ\text{C}$ 10 mL de solução de carboidrato esterilizada por filtração; caso se opte por não autoclavar o meio base, adicionar a solução de carboidrato e esterilizar a mistura por filtração. As soluções de carboidratos deverão estar em concentração final de 5,0 a 10,0 g por litro de meio.

O preparo das soluções de carboidratos poderá ser verificada no capítulo "Reagentes e Soluções", deste Anexo.

Distribuir em tubos, de acordo com a necessidade.
Tampar e identificar os tubos.

Manter sob refrigeração até o momento do uso.
92. Caldo Vermelho de fenol sal 3%

Preparar o caldo vermelho de fenol base de acordo com o indicado, adicionando 30 g de cloreto de sódio por litro de meio.

93. Caldo vermelho de fenol sal 3%-lisina
Preparar o caldo vermelho de fenol-sal de acordo com o indicado.

Adicionar 1 mL de solução de lisina a 10% esterilizada por filtração a cada tubo com 10 mL de meio básico.

94. Caldo VM-VP
Pesar o caldo VM-VP de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Agitar até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos de ensaio.
Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

A composição básica de caldo VM-VP deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Proteose peptona - 7,0 g
Glicose - 5,0 g
Fosfato de potássio bibásico - 5,0 g
pH $6,9 \pm 0,2$

95. Meio gelatina
Pesar o ágar gelatina, de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante ou compondo a formulação.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.

Distribuir volumes de acordo com a necessidade.
Identificar e datar.

Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar gelatina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de carne - 5,0 g
Extrato de carne - 3,0 g
Gelatina - 120,0 g
pH $6,9 \pm 0,1$

96. Meio gelatina sal 3%
Preparar o ágar gelatina de acordo com o item anterior, adicionando 30 g de cloreto de sódio por litro de meio.

97. Meio leite com ferro
Preparar uma solução 2% de sulfato ferroso heptahidratado e adicionar, lentamente, 50 mL desta solução a um litro de leite integral.

Autoclavar a $118 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 12 minutos.
Observação: este meio deve ser preparado imediatamente antes do uso.

A composição básica do meio leite com ferro deverá ser a seguinte:

Leite integral - 1000 mL
Sulfato ferroso heptahidratado - 1,0 g
Água destilada - 50 mL
98. Meio lactose-gelatina

Pesar os componentes de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção estabelecida na formulação abaixo descrita.

Suspender os componentes no volume de água destilada/deionizada.

Deixar em repouso por 15 minutos. Aquecer até completa dissolução.

Distribuir em tubos.
Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 minutos.

Antes do uso colocar o meio em banho-maria a $50-70^\circ\text{C}$ por 2 horas para eliminar o oxigênio.

A composição básica do meio lactose gelatina deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Triptose - 15,0 g
Extrato de levedura - 10,0 g
Lactose - 10,0 g
Vermelho fenol - 0,05 g
Gelatina - 120,0 g
pH $7,5 \pm 0,2$

99. Meio O/F (Hugh-Leifson) sal 3%
Pesar o meio OF glicose de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante, adicionando 30 g de cloreto de sódio por litro de meio a ser preparado.

Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar repousar por 15 minutos.
Aquecer, sob agitação, até completa dissolução do meio.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 4 mL em tubos de ensaio.
Autoclavar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

A composição básica de meio OF glicose deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Triptona - 2,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Fosfato de potássio bibásico - 0,3 g
Azul de bromotimol - 0,08 g
Glicose - 10,0 g

Agar - 2,0 g
pH 6,8 ± 0,2
100. Meio SIM
Pesar o meio SIM de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.
Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos.
Identificar e datar.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.
A composição básica do meio SIM deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona de caseína - 20,0 g
Peptona de carne - 6,6 g
Citrato de amônio e ferro III - 0,2 g
Tiosulfato de sódio - 0,2 g
Ágar - 3,0 g
pH: 7,3 ± 0,1
101. Meio tioglicolato

Pesar o meio tioglicolato de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.
Transferir para recipiente adequado.
Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Homogeneizar.
Deixar em repouso por cerca de 15 minutos.
Aquecer até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 10 mL em tubos.
Identificar e datar.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.

OBS.: Algumas marcas deste meio, vendidas na forma desidratada, não incluem o ágar em sua formulação. Nesses casos, deverá ser adicionada quantidade de ágar que, no meio pronto, corresponda a 0,75 g/L.

A composição básica do meio tioglicolato deverá ser a seguinte, por litro de meio:

Peptona caseína - 15,0 g
Extrato de levedura - 5,0 g
D(+) glicose - 5,5 g
L(+) cisteína - 0,5 g
Cloreto de sódio - 2,5 g
Tioglicolato de sódio - 0,5 g
Resazurina sódica - 0,001 g
Agar - 0,75 g
pH 7,2 ± 0,2

102. Solução salina 0,85%
Pesar 8,5 g de cloreto de sódio.
Transferir para um recipiente adequado.
Adicionar 1L de água destilada/deionizada.
Agitar com auxílio de bastão de vidro até dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir de forma a garantir o volume desejado após a autoclavação.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Identificar, datar e armazenar adequadamente.
103. Solução salina 2%
Pesar 20,0 g de Cloreto de sódio.
Transferir para um recipiente adequado.
Adicionar 1L de água destilada/deionizada.

Agitar com auxílio de bastão de vidro até dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir de acordo com a utilização, de forma a garantir o volume desejado após a autoclavação.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Identificar, datar e armazenar adequadamente.
104. Solução salina fosfatada tamponada pH 7,2 (PBS)
Preparo das soluções estoque:
Solução fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 0,15M
Dessecar o KH₂PO₄ a 110°C por 1 (uma) hora.
Pesar 20,41g do sal e dissolver em água deionizada.
Completar o volume para 1000 mL em balão volumétrico.
Solução fosfato de sódio bibásico (Na₂HPO₄) 0,15M
Dessecar o Na₂HPO₄ a 130°C por 2 (duas) horas.
Pesar 21,29g do sal e dissolver em água deionizada.
Completar o volume para 1000 mL em balão volumétrico.
A composição básica da solução salina fosfatada tamponada deverá ser a seguinte, por litro:

Cloreto de sódio - 1,7 g
Solução fosfato de potássio monobásico 0,15M - 24 mL
Solução de fosfato de sódio bibásico 0,15 M - 76 mL
Água destilada/deionizada - qsp 1000 mL
pH 7,2 ± 0,2
Distribuir volumes conforme a necessidade.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
105. Solução salina peptonada 0,1%
Pesar separadamente os seguintes componentes:
Cloreto de sódio - 8,5 g
Peptona - 1,0 g

Água destilada/deionizada - 1000 mL
pH 7,0 ± 0,2
Transferir para recipiente adequado.
Agitar com auxílio de bastão de vidro até dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.
Distribuir de forma a garantir o volume desejado após a autoclavação.
Identificar e datar.
Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.
106. Solução salina peptonada 0,1%-sal 3%
Seguir o procedimento do item anterior, adicionando 30 g de Cloreto de sódio por litro de solução.

107. Solução salina peptonada 1% tamponada (ISO 6579, 1993)

Pesar, separadamente, os ingredientes de acordo com a formulação, respeitando a proporção adequada para o volume de meio a ser preparado.

Transferir para um recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Agitar com auxílio de bastão de vidro até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir 225 mL em frascos erlenmeyer com capacidade para 500 mL.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.

A composição básica da solução Salina peptonada 1% tamponada deverá ser a seguinte, por litro:

Peptona de carne - 10,0 g
Cloreto de sódio - 5,0 g
Fosfato de sódio bibásico anidro (Na₂HPO₄) - 3,5 g
Fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄) - 1,5 g
pH 7,0 ± 0,2

108. Solução salina peptonada 1% tamponada, adicionada de 0,02% de tween 20

Preparar o meio de acordo com o descrito para solução salina peptonada 1% tamponada.

A cada litro da solução, adicionar 0,2 mL de Tween 20 (concentração final 0,02%).

Distribuir alíquotas de 100 mL em frascos.
Identificar e datar.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.

109. Solução salina peptonada 1% tamponada adicionada de 1% de tween 80

Preparar o meio de acordo com o descrito para solução Salina peptonada 1% tamponada.

A cada litro da solução, adicionar 10,0 mL de Tween 80 (concentração final 1%).

Distribuir alíquotas de 225 mL em frascos e tampar.
Identificar e datar.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 15 minutos.
Armazenar adequadamente.

110. Solução salina peptonada 1% tamponada, adicionada de vancomicina, cefsulodin e cefixime

Preparar a solução salina peptonada 1% tamponada (ISO 6579, 1993) conforme descrito no item anterior.

Transferir para um recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Imediatamente antes do uso, adicionar, a cada litro de meio, as soluções abaixo relacionadas, esterilizadas por filtração:

1 mL de solução de vancomicina a 0,8%;
1 mL de solução de cefixime a 1%;
1 mL da solução de cefsulodin a 1%.

REAGENTES E SOLUÇÕES
GRUPOS DE RISCO DAS SUBSTÂNCIAS

Como medida de segurança, as substâncias componentes das soluções e reagentes constantes do Anexo IX estão sinalizados com uma letra, indicando o grupo de risco ao qual pertencem, sendo:

N = nocivo;
I = irritante;
T = tóxico;
H = hidropolvente;
P = perigoso para o meio ambiente;
C = corrosivo;
O = oxidante;
F = inflamável;
E = explosivo;
M = mutagênico.

Recomenda-se que, antes da manipulação e descarte das referidas substâncias, sejam consultadas as fichas próprias de cada substância ou os manuais de segurança, visando ao reconhecimento dos principais riscos inerentes e das medidas indispensáveis para prevenir ou evitar a ocorrência de acidentes e minimizar os danos à saúde do usuário e ao meio ambiente.

Quando houver manipulação de materiais corrosivos, usar sempre luvas adequadas e máscaras; sendo material tóxico, utilizar sempre a cabine química.

CONVENÇÕES

As soluções preparadas por meio da dissolução do reativo em álcool, seguida ou não da adição de água destilada/deionizada, neste anexo serão denominadas como “solução alcoólica”.

Ex.: Alfa-naftol solução alcoólica 5%.

As soluções preparadas por meio da dissolução do reativo em água destilada/deionizada, neste anexo serão denominadas como “solução aquosa”.

Ex.: Novobiocina solução aquosa 4%.

As soluções preparadas por meio da dissolução do reativo em meio alcalino ou ácido, neste anexo serão acompanhadas da indicação do diluente usado para sua preparação.

Ex.: Ácido nalidíxico solução 2% em NaOH 0,1 N.

Alfa-naftilamina solução 0,5% em ácido acético 5N.

Onde houver a indicação “Esterilizar por Filtração” utilizar filtro com membrana de 0,22 micrômetros previamente preparado e esterilizado.

PREPARO DE REAGENTES E SOLUÇÕES

1. Ácido acético 5N

Adicionar 28,75 mL de ácido acético glacial^(C/F) a 71,25 mL de água destilada/deionizada. Armazenar em frasco de vidro. Identificar e datar.

^(C) - corrosivo / provoca queimaduras graves
^(F) - inflamável

2. Ácido clorídrico 0,01N

Adicionar a 10 mL de ácido clorídrico 0,1N quantidade de água destilada/deionizada suficiente para completar 100 mL. Usar vidraria volumétrica para a preparação. Armazenar em frasco de vidro. Identificar e datar.

3. Ácido clorídrico 0,1N

Adicionar a 10 mL de ácido clorídrico 1N quantidade de água destilada/deionizada suficiente para completar 100 mL. Usar vidraria volumétrica para a preparação. Armazenar em frasco de vidro. Identificar e datar.

4. Ácido clorídrico 1N

Dissolver 82,3 mL de ácido clorídrico fumegante^(C/I) (concentração 37%) em volume de água destilada/deionizada suficiente para completar 1000 mL. Armazenar em frasco de vidro. Identificar e datar.

^(C) - corrosivo / provoca queimaduras
^(I) - irrita as vias respiratórias

5. Ácido nalidíxico solução 0,1% em PBS pH 7,2

Transferir 10 mL da solução de ácido nalidíxico 1% para balão volumétrico de capacidade para 100 mL e completar o volume com tampão fosfato pH 7,2.

Esterilizar por filtração.

Distribuir em alíquotas de 20 mL, em frascos de vidro estéreis identificados e datados.

Manter a -20°C por até 6 meses.

Manter uma das alíquotas sob refrigeração, para uso diário. Usar 1 mL desta solução para cada 100 mL de ágar ABL.

6. Ácido nalidíxico solução 1% em NaOH 0,1N

Pesar 1,0 g de ácido nalidíxico^(N), colocar em balão volumétrico de 100 mL e adicionar NaOH 0,1 N, agitando para dissolução, até completar o volume.

Distribuir em frasco plástico identificado e datado, e manter protegido da luz.

7. Ácido nalidíxico solução 2% em NaOH 0,1 N

Pesar 2,0 g de ácido nalidíxico^(N), colocar em balão volumétrico de 100 mL e adicionar NaOH 0,1 N, agitando para dissolução, até completar o volume.

Distribuir em alíquotas de 10 mL, em frascos plásticos identificados e datados, protegidos da luz.

Manter a -20°C por até 12 meses.

Manter uma das alíquotas sob refrigeração para utilização diária.

^(N) - nocivo por ingestão

8. Ácido peracético solução aquosa 0,02%

Diluir 6,5 mL de ácido peracético^(C/I/E) (produto comercial a 15%) em 5 litros de água destilada/deionizada.

Manter em frasco de plástico identificado e datado.

Utilizar a solução preparada, no máximo, em 48 horas.

^(C) - corrosivo / provoca queimaduras
^(I) - irritante para o aparelho respiratório, pele e olhos
^(E) - potencialmente explosivo

9. Ácido pipemídico solução 0,2% em PBS pH 7,2

Transferir 10 mL da solução de ácido pipemídico 2% para balão volumétrico de capacidade 100 mL e completar o volume com tampão fosfato pH 7,2.

Esterilizar por filtração.

Distribuir em alíquotas de 20 mL, em frasco de vidro estéril identificado e datado.

Manter a -20°C por até 6 meses.

Manter uma das alíquotas sob refrigeração, para uso diário. Usar 1 mL desta solução para cada 100 mL de ágar ABL.

10. Ácido pipemídico solução 2% em NaOH 0,1N

Pesar 2,0 g de ácido pipemídico e adicionar NaOH 0,1N até que se dissolva completamente.

Transferir para balão volumétrico de capacidade para 100 mL e completar o volume com NaOH 0,1N.

Distribuir em frasco plástico identificado e datado, e manter protegido da luz, sob refrigeração.

11. Ácido sulfanílico solução 0,8% em ácido acético 5N

Dissolver 0,8 g de ácido sulfanílico^(N) em 100 mL de ácido acético 5N.

Manter em frasco de vidro, protegido da luz, sob refrigeração.

^(N) - nocivo por ingestão, por inalação e por contato com a pele

12. Ácido tartárico solução aquosa 10%

Pesar 10 gramas de ácido tartárico^(I). Transferir para um recipiente adequado. Adicionar 90 mL de água destilada/deionizada. Agitar com auxílio de bastão de vidro até dissolução.

Esterilizar por filtração.

Distribuir em frasco de vidro estéril.

Identificar, datar e manter sob refrigeração, protegido da luz.

^(I) - irrita a pele

13. Acriflavina solução aquosa 0,25%
Pesar 0,25 g de acriflavina^(T) em frascos separados com capacidade para 100 mL.

Completar os volumes a 100 mL com água destilada/deionizada.

Esterilizar por filtração.

Distribuir em frasco de vidro estéril.

Identificar, datar e manter sob refrigeração, por até 4 semanas.

^(T) - tóxico por ingestão e por inalação

14. Acriflavina solução aquosa 1%
Pesar 1,0 g de acriflavina^(T) em frasco apropriado.
Completar o volume para 100 mL com água destilada/deionizada.

Esterilizar por filtração.

Distribuir em frasco âmbar estéril.

Identificar, datar e manter sob refrigeração por até 4 semanas.

^(T) - tóxico por ingestão e por inalação

15. Acriflavina solução aquosa 2%
Pesar 2,0 g de acriflavina^(T) em frasco apropriado.
Completar o volume para 100 mL com água destilada/deionizada.

Esterilizar por filtração.

Distribuir em frasco de vidro estéril.

Identificar, datar e manter sob refrigeração, por até 4 semanas.

^(T) - tóxico por ingestão e por inalação

16. Alfa-naftilamina solução 0,5% em ácido acético 5N
Dissolver 0,5 g de alfa-naftilamina^(T) em 100 mL de ácido acético 5N.

Identificar, datar e manter sob refrigeração, protegido da luz.

^(T) - tóxico por ingestão e por contato com a pele

17. Alfa-naftol solução alcoólica 5%
Pesar 5,0 g de alfa-naftol^(NI) e dissolver em 100 mL de etanol.

Identificar, datar e manter sob refrigeração, protegido da luz.

^(N) - nocivo por contato com a pele e por ingestão

^(I) - irrita as vias respiratórias e a pele / risco de lesões oculares graves

18. Azul de toluidina solução aquosa 1%
Pesar 1,0 grama de azul de orto-toluidina.
Transferir para um recipiente adequado.
Adicionar 100 mL de água destilada/deionizada.
Agitar com auxílio de bastão de vidro até dissolução.
Identificar, datar e armazenar sob refrigeração, protegido da luz.

19. Carboidratos-soluções

Para as provas de fermentação de carboidratos, recomenda-se o uso das soluções nas concentrações de 5,0 g ou 10 g por litro de meio.

Arabinose 10%; Glicose 10%; Manitol 10%; Maltose 10%; Rafinose 10%; Ramnose 5%; Sacarose 10%; Xilose 5%I.
Dissolver 5 ou 10 g do carboidrato desejado em 100 mL água destilada/deionizada.

Esterilizar por filtração.

Distribuir volumes de 10 ou 20 mL em frascos estéreis.

Identificar e datar adequadamente.

Manter sob refrigeração.

20. Cefixime solução aquosa 1%
Dissolver 1,0 g de cefixime em 100 mL de água destilada/deionizada.

Esterilizar por filtração.

Distribuir em alíquotas de 10 mL, em frasco de vidro estéril identificado e datado, protegido da luz.

Manter a -20°C por até 2 meses.

Manter uma das alíquotas sob refrigeração, para utilização diária.

21. Cefsulodin solução aquosa 1%
Dissolver 1,0 g de cefsulodin em 100 mL de água destilada/deionizada.

Esterilizar por filtração.

Distribuir em alíquotas de 10 mL, em frasco de vidro estéril identificado e datado, protegido da luz.

Manter a -20°C por até 2 meses.

Manter uma das alíquotas sob refrigeração, para utilização diária.

22. Cicloserina solução aquosa 5%
Pesar 1,0 g de cicloserina e dissolver em 20 mL de água destilada/deionizada.

Esterilizar por filtração.

Identificar, datar e armazenar sob refrigeração, protegido da luz.

23. Cloreto de cálcio 1 M
Dissolver 11,09 g de CaCl₂^(I) p.a em 100 mL de água destilada/deionizada, usando balão volumétrico.

Esterilizar por filtração.

Distribuir em alíquotas de 10 mL, em frasco de vidro estéril identificado e datado.

Manter em temperatura ambiente.

Usar 1 mL/100 mL de meio para obter uma concentração final de 10mmol de cloreto de cálcio.

^(I) - irritante para o aparelho respiratório, pele e olhos

24. Cloreto férrico solução aquosa 10% (prova de TDA)

Pesar 10,0 g de cloreto férrico^(C) frasco adequado. Adicionar quantidade de água destilada/deionizada suficiente para completar 100 mL.

Identificar, datar e armazenar sob refrigeração.

^(C) - corrosivo

25. Cloreto de Magnésio 40%

Cloreto de Magnésio - 40,0 g

Água destilada ou deionizada q.s.p. - 100 mL

26. Cloreto de Potássio 0,1N

Cloreto de Potássio - 7,5 g

Água destilada ou deionizada q.s.p. - 1000 mL

Acidificar a pH 4,0 com solução de HCl 1N

27. Cloreto de Potássio 3 M

Cloreto de Potássio - 24,4 g

Água destilada ou deionizada q.s.p. - 100 mL

Dessecar o KCl em estufa a 110°C por 2 horas.

Acrescentar a água destilada/deionizada fervida.

28. Desoxicolato de sódio solução 0,5%

Pesar separadamente, em recipiente adequado, os seguintes componentes:

Cloreto de sódio - 0,85 g

Desoxicolato de sódio - 0,5 g

Adicionar 100 mL de água destilada/deionizada.

Agitar até a completa dissolução.

Esterilizar por filtração, em membrana filtrante de 0,22 µm.

Armazenar sob refrigeração.

29. Emulsão de gema de ovo 50%

Não havendo emulsão comercialmente disponível, escolher ovos com casca perfeita e lavar com água morna.

Secar, imergir em etanol a 70°C durante cerca de 10 minutos ou em solução de ácido peracético a 0,02% por cerca de 15 minutos.

Secar com toalha estéril.

Quebrar a casca asepticamente e separar a gema da clara, transferindo a gema para frasco estéril.

Adicionar o mesmo volume de solução salina 0,85%.

Misturar bem, até a completa homogeneização da solução.

Pasteurizar a emulsão obtida durante 30 minutos a 63 ± 2°C em banho-maria, com agitação suave e freqüente.

Realizar o controle de esterilidade da emulsão de gema de ovo conforme abaixo especificado:

Inocular 0,1 mL da emulsão de gema de ovo em um tubo contendo caldo BHI.

Incubar a 36 ± 1°C por 48 horas.

Após incubação, repicar com alça para a superfície seca de ágar Baird Parker e PCA incubar a 36 ± 1°C por 48 horas.

Verificar a presença de crescimento bacteriano.

Em caso de crescimento, descartar a emulsão.

30. Eritrócitos lavados de carneiro

A partir de sangue de carneiro desfibrinado, fazer tripla lavagem dos eritrócitos com PBS pH 7,2 estéril, centrifugando a 14.000 rpm por 30 minutos a cada lavagem.

Re-suspender em volume de PBS igual ao volume original de sangue.

Identificar, datar e armazenar sob refrigeração.

31. Etanol 70% (Etanol 70° GL)

Adicionar 271 mL de água destilada a 729 mL de etanol^(F)

96° GL.

Armazenar em frasco de plástico, identificar e datar.

^(F) - facilmente inflamável

32. Hidróxido de potássio solução aquosa 40%

Pesar 40 g de hidróxido de potássio (KOH)^(C) e dissolver em 100 mL de água destilada/deionizada.

Identificar, datar e manter em frasco plástico, em temperatura ambiente.

^(C) - corrosivo / provoca queimaduras graves

33. Hidróxido de sódio solução aquosa 1N

Pesar 40g de hidróxido de sódio^(C) em recipiente adequado e adicionar quantidade de água destilada/deionizada suficiente para completar 1000 mL.

Identificar, datar e manter em frasco plástico, em temperatura ambiente.

^(C) - corrosivo / provoca queimaduras graves

34. Hidróxido de sódio solução aquosa 40%

Pesar 40g de hidróxido de sódio^(C) em recipiente adequado e adicionar quantidade de água destilada/deionizada suficiente para completar 100 mL.

Identificar, datar e manter em frasco plástico, em temperatura ambiente.

^(C) - corrosivo / provoca queimaduras graves

35. Novobiocina solução aquosa 1,25%

Dissolver 1,25 g de novobiocina em volume de água destilada/deionizada suficiente para completar 100 mL.

Esterilizar por filtração e manter protegido da luz, sob refrigeração.

Utilizar a solução por até um mês do preparo.

36. Novobiocina solução aquosa 4%

Dissolver 4,0 g de novobiocina em volume de água destilada/deionizada suficiente para completar 100 mL.

Esterilizar por filtração e manter protegido da luz, sob refrigeração.

Utilizar a solução por até um mês do preparo.

37. Oxitetraciclina solução 1% (para ágar OGY)

Pesar 500 mg de Oxitetraciclina. Transferir para balão volumétrico de 50 mL de capacidade. Completar o volume com ácido clorídrico (HCl) 0,1 N.

Agitar com auxílio de bastão de vidro até dissolução.

Esterilizar por filtração. Distribuir 10 mL em frascos de vidro estéril.

Identificar e datar. Manter a -20°C, protegido da luz.

Manter uma alíquota sob refrigeração para o trabalho rotineiro, protegida da luz.

38. Peróxido de hidrogênio solução aquosa 3% (10V)

O peróxido de hidrogênio 3% pode ser adquirido em farmácias ou pode-se preparar a solução 3% a partir de peróxido de hidrogênio^(C/I/E) 20V ou 100V conforme abaixo:

A partir de peróxido de hidrogênio^(C/I/E) 100V (= 30%): pesar 10g do peróxido e diluir para 100 mL com água destilada/deionizada.

Peróxido de hidrogênio^(C/I/E) 20V (= 6%): medir em proveta 50 mL do peróxido e completar o volume a 100 mL com água destilada/deionizada.

Identificar e datar. Manter sob refrigeração, protegida da luz.

^(C) - corrosivo / provoca queimaduras

^(I) - extremamente irritante às vias respiratórias e olhos

^(E) - potencialmente explosivo

39. Púrpura de bromocresol solução alcoólica 1,6 %

Adicionar a 1,6 g de púrpura de bromocresol quantidade de etanol suficiente para completar 100 mL.

Identificar e datar. Manter sob refrigeração, protegido da luz.

Manter sob refrigeração.

40. Reagentes para a coloração de esporos

Solução A. Verde malaquita solução aquosa 5%

Verde malaquita^(N)- 2,5 g

Água destilada ou deionizada - 50 mL

^(N) - nocivo por contato com a pele e por ingestão

Misturar e deixar em repouso durante uma noite para dissolver.

Identificar, datar e armazenar protegido da luz.

Solução B. Safranina solução alcoólica 2,5%

B.1. Solução estoque

Safranina O - 50 g

Etanol(95%)^(F) - 2000 mL

^(F) - facilmente inflamável

Identificar, datar e armazenar protegido da luz.

B.2. Solução de trabalho

Solução estoque de safranina O - 300 mL

Água destilada ou deionizada - 2700 mL

Identificar, datar e armazenar protegido da luz.

41. Reagentes para coloração de Gram

A. Cristal violeta fenicada solução alcoólica 4%

Solução A₁ .:

Cristal violeta^(NI/H/P) - 0,4 g

Álcool ^(F) - 10 mL

^(N) - nocivo por ingestão

^(I) - pode causar lesões oculares graves

^(H) - muito tóxico para os organismos aquáticos

^(P) - a longo prazo pode causar efeitos negativos no meio ambiente aquático

^(F) - facilmente inflamável

Solução A₂ .:

Fenol fundido^(T/C) - 1 g

Água destilada ou deionizada - 100 mL

^(T) - tóxico por contato com a pele e por ingestão

^(C) - corrosivo / provoca queimaduras

Misturar A₁ e A₂ .

Identificar, datar e armazenar protegido da luz.

Usa-se, não diluída, na coloração de Gram.

B. Solução aquosa de lugol

B.1. Solução estoque

Cristais de iodo^(NI) (ou iodo ressublimado^(NI)) - 25 g

Iodeto de potássio - 50 g

Água destilada ou deionizada - 500 mL

^(N) - nocivo por inalação

^(I) - irrita a pele, olhos e mucosas

Misturar e deixar em repouso até dissolução.

B.2. Solução de trabalho

Solução estoque de lugol - 100 mL

Água destilada ou deionizada - 1400 mL

Identificar, datar e manter protegido da luz.

C. Fucsina fenicada

Fucsina básica - 1,0 g

Álcool a 95^{o(F)} - 10 mL

Fenol fundido^(T/C) - 5,0 g

Água destilada ou deionizada - 100 mL

^(F) - facilmente inflamável

^(T) - tóxico por contato com a pele

^(C) - corrosivo / provoca queimaduras

Identificar, datar e manter protegido da luz

42. Reativo de Kovaçs

Pesar 5,0 g de para-dimetil-amino-benzaldeído em recipiente adequado. Dissolver em 75 mL de álcool isoamílico. Adicionar 25 mL de ácido clorídrico.

Identificar, datar e manter protegido da luz, sob refrigeração.

43. Reativo de Ehrlich

Pesar 2,0 g de para-dimetil-amino-benzaldeído em recipiente adequado. Dissolver em 190 mL de álcool etílico (absoluto). Adicionar 40 mL de ácido clorídrico concentrado.

44. Reativo para Oxidase I - N,N,N,N-tetrametil-parafenilenodiamina

Dissolver 0,5g de N' N' N' N' - tetrametil-parafenilenodiamina em 50 mL de água destilada/deionizada.

Distribuir volumes de 5 mL em frascos de cor âmbar ou envoltas em papel alumínio.

Identificar e datar. Manter a -20°C.

A alíquota em utilização deve ser mantida sob refrigeração, protegida da luz.

Não utilizar o reativo se este apresentar coloração azul.

45. Reativo para Oxidase II - Oxalato de para-amino-dimetilanilina

Pesar 0,5g de oxalato de paramino-dimetilanilina^(N/F), em recipiente apropriado. Adicionar 50 mL de água destilada/deionizada.

Agitar até completa dissolução.

Distribuir volumes de 5 mL em frascos de cor âmbar ou envoltas em papel alumínio.

Identificar e datar. Manter a -20°C.

A alíquota em utilização deve ser mantida sob refrigeração, protegida da luz.

Não utilizar o reativo se este apresentar coloração vermelha ou marrom.

46. Sangue desfibrinado de carneiro, coelho, cobaio ou cavalo

Coletar o sangue em frasco com pérolas de vidro (estéreis), movimentando suavemente até que a fibrina fique aderida às pérolas.

Deixar repousar em temperatura ambiente por 1 a 2 horas. Separar o sangue desfibrinado e distribuir em frascos estéreis. Guardar sob refrigeração.

Não utilizar sangue desfibrinado que apresente evidências de contaminação ou hemólise.

47. Sangue de cavalo desfibrinado lisado

Proceder como no item anterior, utilizando somente sangue recentemente colhido.

Congelar por 1 a 2 dias.

Para lisar e/ou manter, misturar e distribuir 100 mL em frascos de polipropileno estéril.

Congelar a -20°C.

Descongelar e recongelar uma vez mais.

O congelamento inibe a absorção de oxigênio pela hemoglobina.

Manter sob congelamento, descongelando a cada vez que necessite.

Pode ser descongelado e recongelado várias vezes.

Usar o sangue por até 6 meses.

48. Solução aquosa de iodo-iodeto

Dissolver 8,0 g de iodo^(N/I) e 10 g de iodeto de potássio em 40 mL de água destilada/deionizada.

Manter em frasco escuro, em local fresco.

^(N) - nocivo por inalação

^(I) - irrita a pele, olhos e mucosas

49. Telurito de potássio 3,5%

Pesar 3,5 g de telurito de potássio^(T/I). Transferir para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar aproximadamente 50 mL de água destilada/deionizada. Agitar até completa dissolução. Completar o volume com água destilada/deionizada.

Esterilizar por filtração. Distribuir em frasco estéril. Tampar adequadamente.

Identificar, datar e armazenar sob refrigeração.

Usar a solução estocada entre 0 e 5°C por 6 meses.

^(T) - tóxico por ingestão

^(I) - Irrita os olhos e a pele

50. Tiamina cloridrato solução 0,01%

Pesar 100 mg de tiamina e transferir para balão volumétrico de capacidade para 100 mL e completar o volume com água destilada/deionizada. Esta é a solução 0,1%.

Transferir 5 mL da solução 0,1% para balão volumétrico de capacidade para 50 mL e completar o volume com água destilada/deionizada.

Esterilizar por filtração. Distribuir em frascos estéreis.

Manter protegida da luz, em refrigeração, por até 3 meses.

51. Tiosulfato de sódio 2%

Tiosulfato de sódio - 2,0g

Água destilada ou deionizada q.s.p. - 100 mL

52. Tirosina suspensão aquosa 5%

Pesar 5,0 g de tirosina em recipiente adequado. Adicionar 100 mL de água destilada/deionizada.

A tirosina não deve dissolver e, na solução deixada, a tirosina deve decantar.

Misturar bem de forma que a tirosina fique homogeneamente distribuída na suspensão e imediatamente distribuir volumes de 10 mL em frascos apropriados. Tampar.

Esterilizar em autoclave a 121 ± 1°C por 15 minutos.

53. Tween 80

Tween 80 - 80mL

Água destilada/deionizada q.s.p. - 1000 mL

Adicionar o tween 80 à água morna, sob agitação. Cuidar quando acrescentar a água.

54. Vancomicina solução aquosa 0,8%

Dissolver 200 mg de vancomicina em 25 mL de água para laboratório/deionizada.

Esterilizar por filtração. Dispensar em frasco de vidro estéril.

Manter sob refrigeração, protegida da luz.

55. Vaselina

Dissolver a vaselina em copo de Becker sob fogo indireto, usando tela de amianto, e distribuir em frascos de Erlenmeyer na quantidade pedida.

56. Vaspar

Composição por 1 kg de vaspar:
Vaselina sólida - 400 g

Parafina - 600 g

Pesar separadamente a parafina e a vaselina.

Misturar as duas partes e dissolver no fogo indireto utilizando tela de amianto.

Aquecer até completa fusão. Homogeneizar.

Distribuir em frascos apropriados.

Autoclavar a 121 ± 1°C por 45 minutos.

Identificar, datar e armazenar em temperatura ambiente.

57. Verde brilhante solução aquosa 0,1%

Dissolver 0,1g de verde brilhante^(N) em 100 mL de água destilada/deionizada.

Esterilizar por filtração, dispensando em frasco adequado.

Identificar e datar. Manter sob refrigeração protegido da luz.

^(N) - nocivo por ingestão

58. Verde malaquita solução aquosa 5%

Adicionar a 5,0 g de verde malaquita^(N) quantidade de água destilada/deionizada suficiente para completar 100 mL.

Identificar, datar e manter sob refrigeração, protegido da luz.

^(N) - nocivo por ingestão

59. Vermelho de fenol solução aquosa 1%

Dissolver 1,0 g de vermelho de fenol em 100 mL de água destilada/deionizada.

Identificar e datar. Manter sob refrigeração protegido da luz.

60. Vermelho de metila solução alcoólica 0,06%

Pesar 0,04 de vermelho de metila e dissolver em 60 mL de etanol absoluto^(F).

Identificar e datar. Manter protegido da luz, em local fresco.

^(F) - facilmente inflamável