

**Programa Nacional de Monitoramento
da Prevalência e da Resistência Bacteriana em
Frango - PREBAF**



MANUAL DE PROCEDIMENTOS

Coordenação-Geral (ANVISA)

GERÊNCIA-GERAL DE ALIMENTOS - **GGALI**

GERÊNCIA DE AÇÕES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - **GACTA**

GERÊNCIA DE INSPEÇÃO E CONTROLE DE RISCO DE ALIMENTOS – **GICRA**

Coordenação Técnica

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE – **INCQS**

Primeira versão revisada - julho/2004

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO	4
1 HISTÓRICO.....	5
2 INFORMAÇÕES TÉCNICAS.....	6
3 OBJETIVOS.....	6
3.1 GERAL.....	6
3.2 ESPECÍFICO.....	7
4 PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM.....	7
5 COLHEITA DE AMOSTRAS.....	8
6 RECEBIMENTO, ISOLAMENTO, ACONDICIONAMENTO E ENVIO DE CEPAS.....	8
6.1 RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS.....	8
6.2 ISOLAMENTO.....	8
6.3 ACONDICIONAMENTO E ENVIO DE CEPAS.....	8
7 ANÁLISE DE RESULTADOS E INTERVENÇÃO.....	9
7.1 ANÁLISE DE ROTULAGEM.....	9
7.2 ANÁLISE DE SALMONELLA E ENTEROCOCCUS.....	9
8 IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA.....	9
9 DEFINIÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	9
10 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS.....	10
11 ANTIMICROBIANOS ELEITOS PARA A VALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE SALMONELLA SP E ENTEROCOCCUS SP.....	10
12 BANCO DE CEPAS.....	10
13 SELEÇÃO DE LABORATÓRIOS.....	10
REFERÊNCIAS.....	12
FLUXOGRAMA I - ANÁLISE LABORATORIAL.....	16
FLUXOGRAMA II – RESULTADOS.....	17
ATIVIDADES DO PREBAF	18

ANEXOS

METODOLOGIAS (PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO - POPs)

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1. Colheita de carcaças congeladas de frango | POP GICRA
/GGALI-001 |
| 2. Recepção e processamento inicial de amostras de carcaças congeladas de frango e emissão de laudo. | POP INCQS
65.3210.043 |
| 3. Pesquisa e contagem de <i>Salmonella</i> sp em carcaças congeladas de frango. | POP INCQS
65.3210.044 |
| 4. Detecção de Enterococos em carcaças congeladas de frango. | POP IAL
S/nr. |
| 5. Manutenção de cepa de Enterococos para ser enviada ao lab. de referência. | POP IAL
ASMI5-01 |
| 6. Transporte de substâncias infecciosas para o laboratório de referência. | POP IAL
PSMIB2-01 |
| 7. Encaminhamento das cepas de <i>Salmonella</i> spp, para caracterização antigênica e avaliação da suscetibilidade antimicrobiana. | POP
LABENT/IOC
S/nr. |

APRESENTAÇÃO

Com avanço das informações científicas sobre a resistência microbiana, há uma crescente preocupação da população brasileira e mundial em relação ao impacto desse fator de risco na saúde pública. Neste contexto os medicamentos veterinários, em especial os antimicrobianos usados com fins profiláticos e de ganho de peso como aditivos nas rações, passam a ser alvo de uma avaliação científica pela possibilidade que têm em contribuir para a disseminação da resistência por intermédio do consumo de alimentos provenientes de animais tratados, e, conseqüentemente, para a diminuição da eficácia de medicamentos utilizados na medicina humana.

A partir de 2000 a ANVISA iniciou a discussão desse tema na área de alimentos, com a formação de um Grupo Técnico criado pela Resolução RDC nº 05/2000 que teve a participação de setores organizados da sociedade, incluindo a indústria de medicamentos veterinários, universidades, institutos de pesquisas, órgãos de vigilância sanitária e laboratórios oficiais de saúde pública, além do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No âmbito internacional a Agência tem acompanhado as discussões e avanços sobre o assunto, especialmente no Codex Alimentarius, Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE).

As referências internacionais acima têm encorajado os países membros a desenvolverem programas de vigilância e controle na área de alimentos, num esforço mundial para minimizar e conter a resistência microbiana. Um passo importante nessa direção está sendo dado pela ANVISA com a implementação desse Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango - PREBAF, desenvolvido em parceria com o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS (coordenação técnica), Instituto Oswaldo Cruz – IOC e Instituto Adolfo Lutz – IAL (laboratórios de referência), Órgãos de Vigilância Sanitária – VISAs e Laboratórios Oficiais de Saúde Pública – LACENS.

O PREBAF encampa mais de uma ação programática da Gerência-Geral de Alimentos/ANVISA e terá abrangência em 14 Estados (Alagoas, Amapá, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo), a partir da colheita mensal de amostras de frango no comércio, durante 18 meses, totalizando 2.700 amostras a serem analisadas nos respectivos laboratórios. Os parâmetros de análise são os seguintes: 1 - verificação da adequação dos dizeres de rotulagem do produto quanto às exigências legais; 2 - pesquisa e contagem de *Salmonella* sp; 3 - pesquisa de *Enterococcus* sp; 4 – tipificação de espécies de *Salmonella* e *Enterococcus* com identificação do nível de sensibilidade a antimicrobianos (perfil de resistência microbiana).

O presente manual tem a finalidade de uniformizar os Procedimentos Operacionais Padrões (POPs) a serem observados no PREBAF, com base em metodologias previamente validadas, bem como de definir um fluxograma de atividades e resultados.

Ricardo Oliva

Diretor

PROGRAMA NACIONAL DE MONITORAMENTO DA PREVALÊNCIA E DA RESISTÊNCIA BACTERIANA EM FRANGO - PREBAF

1 Histórico

Como resultado das discussões do Grupo de Trabalho sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos, instituído pela ANVISA através da Resolução-RDC nº 5/2000, foram apresentadas propostas e recomendações com foco na avaliação de risco quanto ao uso de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos. Tais proposições constam do documento de base denominado “Medicamentos Veterinários e Saúde Pública: uma Proposta de Ação para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária”, apresentado à ANVISA em agosto/2001.

Destaca-se como principal recomendação para as ações de vigilância sanitária em relação ao assunto, a implantação de dois programas de monitoramento, sendo um para avaliação de resíduos em alimentos de origem animal (leite, carnes, ovos, pescados e mel) e outro para avaliação do perfil de resistência de bactérias isoladas em carne de frango. Especificamente em relação a este último, deveria ser instituído um programa de abrangência nacional, onde seria pesquisada a resistência de *Salmonella* sp e *Enterococcus* sp aos antimicrobianos em amostras colhidas no ponto de exposição ao consumo, ficando a cargo da GACTA/GGALI.

A referida proposta tem interface com outras ações programáticas da GGALI. Com aprovação da Resolução - RDC ANVISA nº 12, de 02/01/01 que excluiu a obrigatoriedade da pesquisa de *Salmonella* sp em carnes *in natura* de aves, devido as limitações tecnológicas que impossibilitam garantir a ausência desse microrganismo no produto, tornou-se necessário implementar um Programa Nacional capaz de determinar a prevalência e a quantificação das espécies do gênero *Salmonella* nesse tipo de carne. Os resultados deste Programa irão subsidiar o estabelecimento de novos limites de aceitação que protejam a saúde do consumidor e que sejam compatíveis com a realidade tecnológica. Como contrapartida à exclusão do parâmetro *Salmonella* sp determinou-se, por meio da Resolução - RDC nº 13, de 02/01/01, a exigência de apor dizeres de rotulagem, instruindo o consumidor sobre o adequado uso, preparo e conservação das carnes de aves.

Nesse contexto, a ANVISA desenhou um programa em nível nacional destinado à determinação da prevalência e quantificação das espécies do gênero *Salmonella* sp em carne de frango exposta ao consumo humano, bem como a verificação do cumprimento das disposições constantes da Resolução-RDC ANVISA nº 13/01. Num esforço para racionalizar recursos e otimizar resultados, definiu-se em um único Programa, abordar a pesquisa da prevalência e da resistência bacteriana dos microrganismos *Salmonella* sp e *Enterococcus* sp em carne de frango, bem como a adequação da rotulagem dos produtos comercializados.

Com isso, as Gerências envolvidas (GACTA e GICRA) elaboraram o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango - PREBAF. Nesse sentido, o presente documento fornece um detalhamento sobre o Programa, definindo uma estratégia de ação da ANVISA para lidar com as questões em parceria com os Estados por meio dos órgãos de vigilância sanitária (VISA) e laboratórios oficiais de saúde pública (LACEN).

2 Informações Técnicas

A prevenção da contaminação das aves apresenta como fatores limitantes a ampla distribuição da bactéria no ambiente e a existência freqüente de portadores assintomáticos. Nenhum outro processo de tratamento, exceto irradiação ionizante, eliminará *Salmonella* sp da carcaça mantendo as características originais da carne crua. No entanto, a adoção de medidas higiênico-sanitárias no manuseio e processamento de aves, o controle de rações e alimentos desses animais, a rígida adoção de práticas higiênicas na criação, transporte e abate a distinta separação em nível industrial das operações com matérias-primas daquelas com produtos em processo ou terminados, a rigorosa adoção de programas de limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos e a prevenção de contaminações cruzadas são medidas importantes que contribuem para a redução dos níveis de contaminação.

Muitos antimicrobianos, incluindo alguns de importância para a medicina humana, são usados como aditivos nas rações para animais produtores de alimentos com fins profiláticos e de ganho de peso (promotores de crescimento). Embora essa alternativa tecnológica proporcione uma melhora de desempenho dos animais, em especial de aves e suínos, é crescente a preocupação mundial quanto ao aumento da resistência adquirida por espécies de bactérias a algumas moléculas com ação antimicrobiana de uso humano na produção de animais, reduzindo a disponibilidade de substâncias eficazes e indispensáveis ao tratamento e prevenção de doenças infecciosas. O aumento do uso dos antimicrobianos associados às inovações na tecnologia de produção, os novos métodos no processamento da carne de frango e sua grande comercialização contribuíram para o aumento da produtividade e a diminuição do tempo de produção e do custo. Por essa razão, esse alimento mais acessível passou a integrar significativamente a dieta brasileira e, conseqüentemente, aumentou a exposição do consumidor a agentes que podem significar um risco à saúde humana.

Microorganismos do gênero *Enterococcus*, por sua vez, são bactérias consideradas agentes comensais comumente isolados do intestino grosso dos seres humanos, animais e meio ambiente. Nos últimos anos, entretanto, as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* têm provocado surtos hospitalares de difícil controle, podendo causar infecções com limitadas opções terapêuticas, notadamente no caso de cepas resistentes a antimicrobianos tais como beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídios. Estudos sobre a cadeia epidemiológica têm mostrado que animais produtores de alimento, quando tratados com antimicrobianos, podem tornar-se reservatórios de *Enterococcus* sp resistentes e, assim, contribuírem para a disseminação da resistência bacteriana e dificultar o controle do microorganismo.

3 Objetivos

3.1 Geral

Elaborar diagnóstico sobre aspectos microbiológicos e de rotulagem da carne de frango comercializada no Brasil com vistas a definição de medidas de intervenção.

3.2 Específicos

Avaliar a prevalência, o número de organismos e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Salmonella* sp isoladas a partir de carcaças congeladas de frango expostas ao consumo.

Avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de cepas de *Enterococcus* isoladas a partir de carcaças congeladas de frango expostas ao consumo.

Verificar a adequação dos dizeres de rotulagem do produto quanto às exigências legais, com destaque à Resolução - RDC ANVISA nº 13/01.

4 Procedimentos de Amostragem

Para determinar o número de amostras a serem testadas, a fim de obter uma prevalência estatisticamente confiável, deve-se considerar a prevalência esperada de resistência na população bacteriana.

Neste programa de monitoramento, os parâmetros selecionados são a prevalência esperada de 10%, um nível de confiança de 90% e margem de erro admitido de 1%. Isso significaria processar 2429 amostras. Para atendimento desses parâmetros, utilizando-se como referência a Tabela 1, e aos critérios estabelecidas no item 6, serão analisadas 2700 amostras (10 amostras/mês x 15 cidades x 18 meses).

Tabela 1. Número de amostras em função da prevalência de resistência esperada na população.

Prevalência esperada	Nível de confiança					
	90%			95%		
	Margem de erro admitida			Margem de erro admitida		
	10%	5%	1%	10%	5%	1%
10%	24	97	2429	35	138	3445
20%	43	173	4310	61	246	6109
30%	57	227	5650	81	323	8003
40%	65	260	6451	92	369	9135
50%	68	270	6718	96	384	9512
60%	65	260	6451	92	369	9135
70%	57	227	5650	81	323	8003
80%	43	173	4310	61	246	6109
90%	24	97	2429	35	138	3445

Fonte: OIE – 2000

5 Colheita de amostras

Serão colhidas 2700 unidades de carcaças de frango congelado no período de 18 meses, conforme estabelecido no PREBAF.

Os procedimentos de colheita e amostragem a serem realizados pela VISA estão descritos no *POP 001: Colheita de carcaças congeladas de frango – GICRA/GGALI*.

As amostras serão colhidas pelos órgãos de vigilâncias sanitárias - VISA de Alagoas, Amapá, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Capital e Ribeirão Preto).

6 Recebimento das amostras, isolamento, acondicionamento e envio de cepas

6.1 Recebimento das amostras

As amostras deverão ser recebidas e processadas conforme estabelecido no POP INCQS nº. 65.3210.043 Rev. 01 – *Recepção e Processamento Inicial de Amostras de Carcaças Congeladas de Frango e Emissão do Laudo de Análise*.

6.2 Isolamento

Cada amostra será composta de 5 (cinco) unidades de produto da mesma marca, mesmo lote, prazo de validade e data de fabricação. Cada unidade do produto será analisada individualmente, não sendo possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral.

***Salmonella* sp:** as 05 unidades da amostra serão analisadas utilizando-se metodologia qualitativa, e apenas uma unidade será submetida ao ensaio quantitativo, conforme descrito no POP INCQS nº. 65.3210.044 Rev. 00 – *Pesquisa e Contagem de Salmonella sp em Carcaças Congeladas de Frango*.

***Enterococcus*:** todas as unidades da amostra serão analisadas utilizando-se metodologia qualitativa conforme descrito no POP do Instituto Adolfo Lutz / IAL - *Detecção de Enterococcus em Carcaças Congeladas de Frango*.

6.3 Acondicionamento e Envio de Cepas

Os isolados de *Salmonella* sp e *Enterococcus* sp devem ser encaminhados, respectivamente, ao Instituto Oswaldo Cruz – IOC e Instituto Adolfo Lutz – IAL, acompanhadas do Formulário de Envio dos Isolados, de acordo com os respectivos POPs “Encaminhamento das cepas de *Salmonella* sp, para caracterização antigênica e avaliação da suscetibilidade antimicrobiana”; “Manutenção de Cepa de *Enterococcus* sp para ser Enviada ao Laboratório de Referência”; e “Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)”.

7 Análise de resultados e Intervenção

7.1 Análise de Rotulagem

O Laboratório avaliará os dizeres de rotulagem conferindo o enquadramento legal de acordo o disposto no item quatro da Resolução RDC – ANVISA nº 13 de 02 de janeiro de 2001, conforme quadro abaixo.

Este alimento se manuseado incorretamente e ou consumido cru pode causar danos à saúde. Para sua segurança, siga as instruções abaixo:

-Mantenha refrigerado ou congelado. Descongele somente no refrigerador ou no microondas.

-Mantenha o produto cru separado dos outros alimentos. Lave com água e sabão as superfícies de trabalho (incluindo as tábuas de corte), utensílios e mãos depois de manusear o produto cru.

-Consuma somente após cozido, frito ou assado completamente.

7.2 Análise de *Salmonella* sp e *Enterococcus* sp

Cada laboratório enviará mensalmente as “Fichas de Controle dos Resultados” com os dados referentes às análises quantitativas e qualitativas de *Salmonella* sp e qualitativa de *Enterococcus* sp para o INCQS.

Os “Laudos de Análise” deverão ser preenchidos segundo o POP INCQS nº 65.3210.043 Rev. 01 – *Recepção e Processamento Inicial de Amostras de Carcaças Congeladas de Frango e Emissão do Laudo de Análise* e encaminhados à VISA. A VISA encaminhará posteriormente as informações dos laudos para a ANVISA/GACTA.

O Laboratório de Enterobactérias do IOC e o Laboratório de Referência de Enterococos do IAL enviarão ao INCQS os resultados referentes à identificação e perfil de sensibilidade dos isolados.

8 Identificação de genes de resistência

A identificação de genes de interesse tanto em *Salmonella* sp quanto em *Enterococcus* sp será realizada por PCR (Protein Chain Reaction).

9 Definição da sensibilidade a antimicrobianos

O nível de sensibilidade a antimicrobianos, dos microorganismos *Enterococcus* e *Salmonella*, será avaliado por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por micro diluição em caldo ou diluição em agar, com base na metodologia recomendada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003).

10 Critérios de seleção dos antimicrobianos

A seleção dos antimicrobianos a serem testados foi baseada nos seguintes critérios:

- importância de seu uso em medicina humana;
- situação de resistência ocorrente e de interesse do país;
- utilização de antimicrobianos em medicina veterinária que possam desenvolver resistência cruzada a antimicrobianos usados em medicina humana.

11 Antimicrobianos eleitos para a avaliação da resistência de *Salmonella sp.* e *Enterococcus*.

Para *Salmonella sp.* ampicilina, ceftriaxona, ceftazidina, cefepime, tetraciclina, ceftazidima/ác. clavulâmico, cefotaxima/ác. clavulâmico, gentamicina, estreptomicina, cloranfenicol, florfenicol, sulfonamida, trimetoprim, sulfametoxazol/trimetoprim, ác. nalidixo, ciprofloxacina, enrofloxacina, imipenem, meropenem, nitrofurantoína, aztreonam, bacitracina de zinco, espiramicina, fosfato de tilosina e virginamicina.

Para *Enterococcus sp.* ampicilina, vancomicina, teicoplanina, gentamicina, estreptomicina, enrofloxacina, ciprofloxacina, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina, linezolida, oxitetraciclina, virginamicina, quinopristina/dalfopristina, bacitracina de zinco, espiramicina e fosfato de tilosina.

12 Banco de Cepas

As cepas de *Enterococcus sp.* serão armazenadas após processo de liofilização e as de *Salmonella sp.* em meio de caldo BHI acrescido de 15% de glicerol, a – 70°C.

13 Seleção dos Laboratórios

Considerando os critérios de localização geográfica, capacidade operacional - recursos humanos, equipamentos e instalações físicas (lay out básico), adequação ao sistema de garantia da qualidade e relação com a Vigilância Sanitária, foram selecionados os seguintes laboratórios:

Laboratório	<i>Enterococcus</i>				<i>Salmonella</i>			
	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)
1 IAL	x	x	X	x	x			
2 IOC						x	x	x
3 LACEN AL	x				x			
4 LACEN AP	x				x			
5 LACEN CE	x				x			
6 LACEN DF	x				x			
7 LACEN GO	x				x			
8 LACEN MG	x				x			
9 LACEN MS	x				x			
10 LACEN PR	x				x			
11 LACEN RJ	X				X			
12 LACEN RN	x				x			
13 LACEN ES	X				X			
14 LACEN RS	x				x			
15 LACEN SC	x				x			
16IAL Rib. Preto	x				x			

Legenda: (1) Isolamento; (2) Identificação de espécies; (3) Testes de sensibilidade; (4) Identificação de genes.

Referências:

1. Almeida IC et al. Isolamento e identificação de *Salmonella* em carcaças de frango congeladas e frescas, através de método rápido. Revista Higiene Alimentar 2000, 14(70): 59-62.
2. Bager F et al. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. Prev Vet Med 1997, 31(1-2):95-112.
3. Baldy, JLS Estreptococcias. In Veronesi, R & Focaccia, R. Tratado de Infectologia, Ed. Ateneu, São Paulo, 1997, p. 669-688.
4. Banerjee SN et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. Am J Med 1991, 91(suppl. 3B):86-89.
5. Barros E et al. Antimicrobianos: consulta rápida. 3. ed. Porto Alegre, ArtMed Editora, 2001.
6. Bates J. Epidemiology of vancomycin –resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. J Hosp Infect 1997, 37:89-101.
7. BRASIL, Decreto-lei n.º 986, de 21 de outubro de 1969 – Institui normas básicas sobre alimentos
8. BRASIL, Instrução Normativa n.º 14, de 29 de junho de 1999 – Aprova as Normas técnicas para Importação e Exportação de Aves de um dia e Ovos Férteis para incubação destinados a reprodução.
9. BRASIL, Instrução Normativa n.º 22, de 12 de agosto de 1999 – Aprova as “Normas Técnicas para controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como Livre de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livre ou Controlado para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*.”
10. BRASIL, Lei n.º 6.198, de 26 de dezembro de 1974 – Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação animal e dá outras providências.
11. BRASIL, Lei n.º 6.437, de 20 de agosto de 1977 – Configura as infrações à legislação sanitária federal, estabelece sanções respectivas e dá outras providências.
12. BRASIL, Portaria n.º 1.428, de 26 de novembro de 1993 – Aprova o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, as Diretrizes para Boas Práticas de Produção, o Regulamento Técnico para estabelecimento de Padrões de Identidade e Qualidade.
13. BRASIL, Portaria n.º 542, de 16 de novembro de 1998 – Adota as “Normas de Higiene e Segurança Sanitária para Habilitação de Estabelecimentos Avícolas de Criação de Aves e Incubatórios Avícolas para o Intercâmbio no Mercosul.”

14. BRASIL, Portaria n.º 448, de 10 de setembro de 1998 – Proíbe a presença de resíduos de cloranfenicol, flurazolidona e nitrofurazona em carne, leite e ovos oriundo de animais tratados.
15. BRASIL, Portaria SVS/MS n.º 326, de 30 de julho de 1997 - Aprova o Regulamento Técnico "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos".
16. BRASIL, Resolução RDC n.º 12, de 02 de janeiro de 2001 - Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.
17. BRASIL, Resolução RDC n.º 13, de 02 de janeiro de 2001 - Aprova o Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carne de Aves e seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados.
18. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin – United States, 1989-1993. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1993, 42:597-9.
19. Cereda RF et al. In vitro susceptibility testing of 446 clinical isolates of gram-positive bacteria to new quinolones, carbapenems and cephalosporins. Rev Assoc Med Bras 1996, 42(3):130-4.
20. Codex Alimentarius, Perfil de riesgos de las bacterias con resistencia a los agentes antimicrobianos em los alimentos, 2000.
21. DANMAP 99. The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme. Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Mensagem disponível na Internet via <http://www.sva.dk>.
22. Denmark – The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP), 1998.
23. Dutka-Malen S; Evers S & Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *Enterococci* by PCR. J Clin Microb 1995, 33(1):24-27.
24. Falcklam RR & Collins, M.D Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by conventional test scheme. J Clin Microb 1989, 27:731-34.
25. FDA (U.S. Food and Drug Administration) – A proposed framework for evaluating and assuring the human safety of the microbial effects of antimicrobial new animal drugs intended for use in food-producing animals.
26. FDA (U.S. Food and Drug Administration) – A public health action plan to combat antimicrobial resistance, 2000.
27. FDA (U.S. Food and Drug Administration) – Enrofloxacin for poultry; opportunity for hearing, 2000.
28. FDA (U.S. Food and Drug Administration) – Risk assessment of the public health impact of *Streptogramin* resistance in *Enterococcus faecium* attributable to the use of Streptogramins in animals, 2000.

29. Fernandes, AT. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. 1ª. edição. São Paulo, Ed. Atheneu, 2000.

Franco, BDGM & Langraf, M. Microrganismo patogênicos de importância em alimentos. In: Microbiologia dos Alimentos, ed. Atheneu, p.33-83, 1996.

30. IBGE/DPE/DEAGRO.
<http://www.ibge.gov.br/ibge/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao.../default.sht>
18/12/2000.

31. Ike Y et al. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. Lancet 1999, 353:1854.

32. Kirk M et al. Isolation of vancomycin-resistant enterococci from supermarket poultry. Advances in Experimental Medicine and Biology 1997, 418:289-291.

33. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of *beta*-hemolytic streptococci. J Exp Med 1933, 57:571-95.

34. Martins SCS et al. *Salmonella* sp. em miúdos de aves: resistência a antibióticos. Revista higiene Alimentar 2000 14 (78, 79):74-76.

35. McDonald LC et al. Vancomycin-resistant *Enterococci* outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. Emerging Infect Dis 1997, 3(3):311-7.

36. Métodos de Análise Microbiológica Para Alimentos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento – Brasília - Distrito Federal. 1991/1992 –2º revisão.

37. Moellering RC Emerging of *Enterococcus* as a significant pathogen. Clin Infect Dis 1992, 14:1173-8.

38. Moellering, RC *Enterococcus specie*, *streptococcus bovis* and *leuconostoc specie*. In Mandell, GL et al. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. Churchill Livingstone, New York, 1995, p. 1826-1835.

39. Murray BE. Problems and perils of vancomycin resistant enterococci. Braz J Infect Dis 2000b, 4(1):9-14.

40. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N Engl J Med 2000a., 342(10):710-21.

41. Musher, DM *Streptococcus pneumoniae* In Mandell, GL et al. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. Churchill Livingstone, New York, 1995, p. 1811-1826.

42. Nauta, MJ, Van de Giessen, AW & Henken, AM. A model form evaluating intervention strategies to control *Salmonella* in the poultry meat production chain. Epidemiol. Infect. 2000, 124(3): 365-73.

43. National Committee For Clinical Laboratory Standards. NCCLS M100 –A11– V23, 2003.

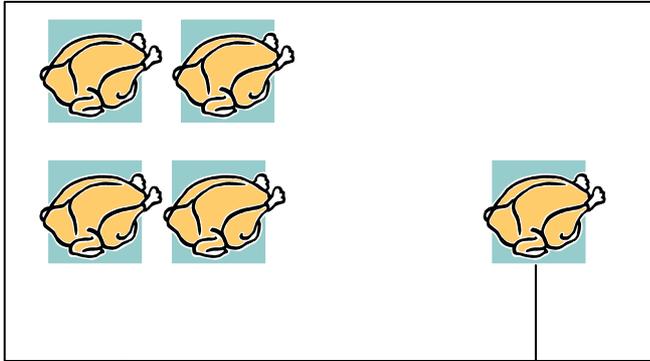
44. National Committee For Clinical Laboratory Standards. NCCLS M 31^A, 1999.

45. OIE (Organização Internacional de Epizootias) – Risk analysis methodology for the potential impact on public health of antimicrobial resistant bacteria of animal origin, 2000.
46. OIE (Organização Internacional de Epizootias) – The role of international trade in animals, animal products and feed in the spread of transferable antibiotic resistance and possible methods for control of the spread of infectious agent resistance factors, 1998.
47. Patel, R. et al. Multiplex PCR detection of van A, van B, van C-1, and van C-2/3 genes in Enterococci. J Clin Microbiol 1996, 36(3):703-7.
48. Pinto, PSA Aspectos sanitários da Salmonelose como uma zoonose. Revista Higiene Alimentar 2000, 14(71):32-33.
49. Robredo B et al. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. Int J Food Microb 2000, 54:197-204.
50. Schwalbe RS et al. Isolation of vancomycin-resistant enterococci from animal feed in USA. Lancet 1999, 353:722. Schlosser W et al. Analysis of *Salmonella* serotypes from selected carcasses and raw ground products sampled prior to implementation of the pathogen reduction; Hazard analysis and critical control point final rule in the US. Int. J. Food Microbiol 2000, 58(1-2):107-11.
51. WHO (World Health Organization) – WHO Global Principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food, 2000.
52. WHO (World Health Organization)- Global strategy for containment of antimicrobial resistance, 2000.
53. Zanella RC et al. First confirmed case of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with vanA phenotype from Brazil: isolation from meningitis case in São Paulo. Microb Drug Res 1999, 5(2):159-162.
54. ZANELLA, Rosemeire COBO; BRANDILEONE, Maria Cristina C.; BOKERMANN, Sérgio; ALMEIDA, Samanta C.G.; VALDETARO, Fábio; VITÓRIO, Fábio; MOREIRA, Maria De Fátima A.; VILLINS, Margarete; SALOMÃO, Reinaldo; PIGNATARI, Antonio Carlos C. Phenotypic and Genotypic Characterization of VanA *Enterococcus* Isolated During the First Nosocomial Outbreak in Brazil. Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology And Disease, Estados Unidos, v. 9, n.3, p. 283-291, 2003.

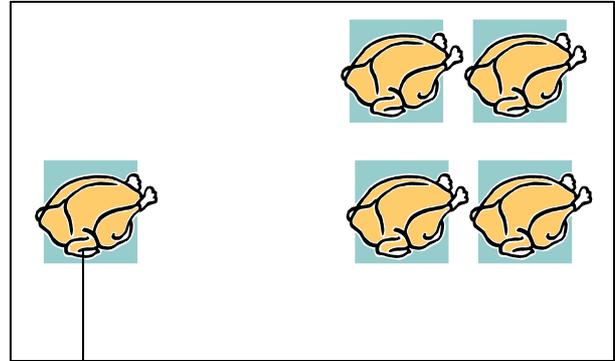
FLUXOGRAMA I – ANÁLISE LABORATORIAL

Amostra 1 Marcas “x” e “y”

Amostra 1 – Marca “x”



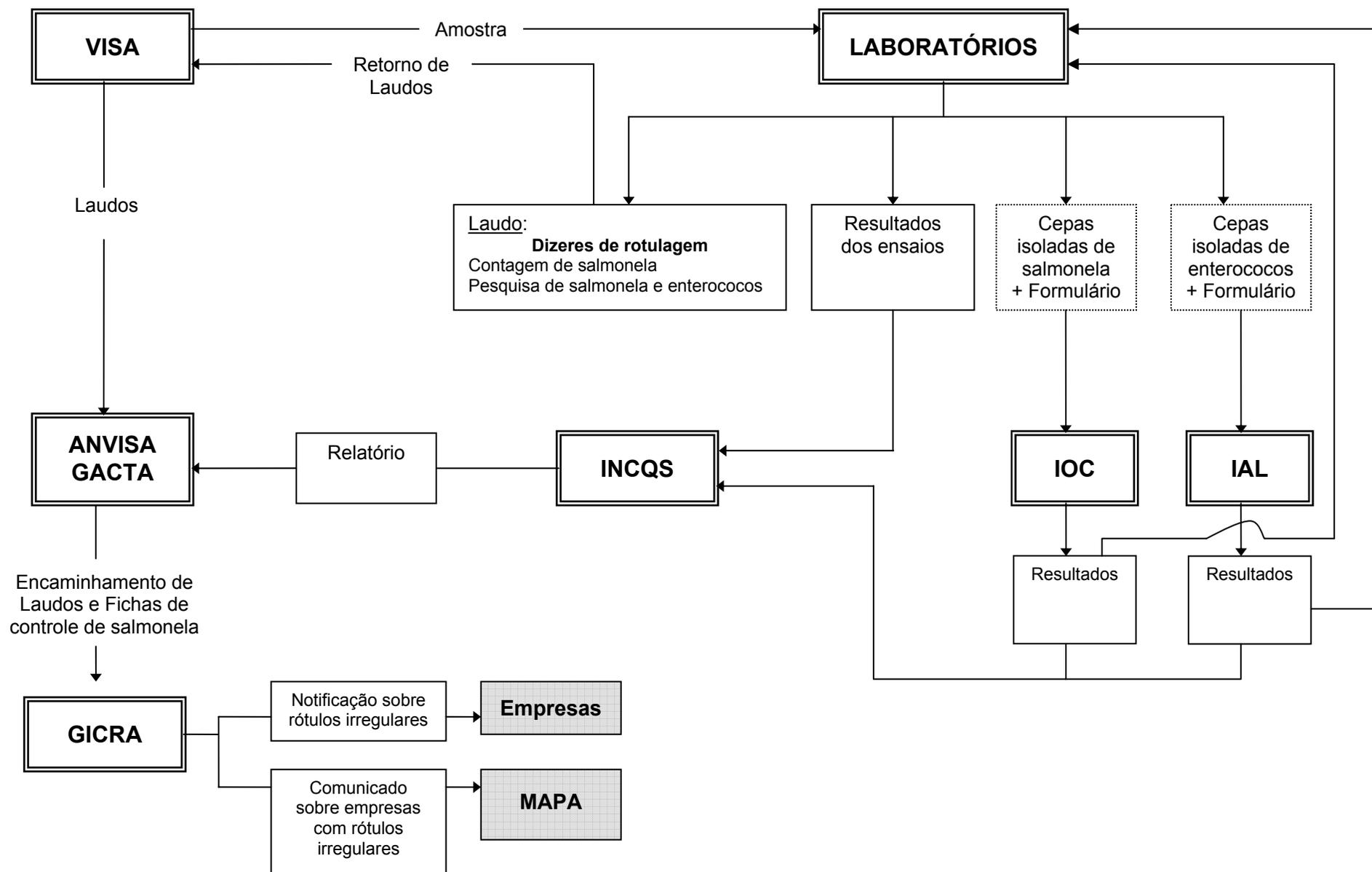
Amostra 2 – Marca “y”



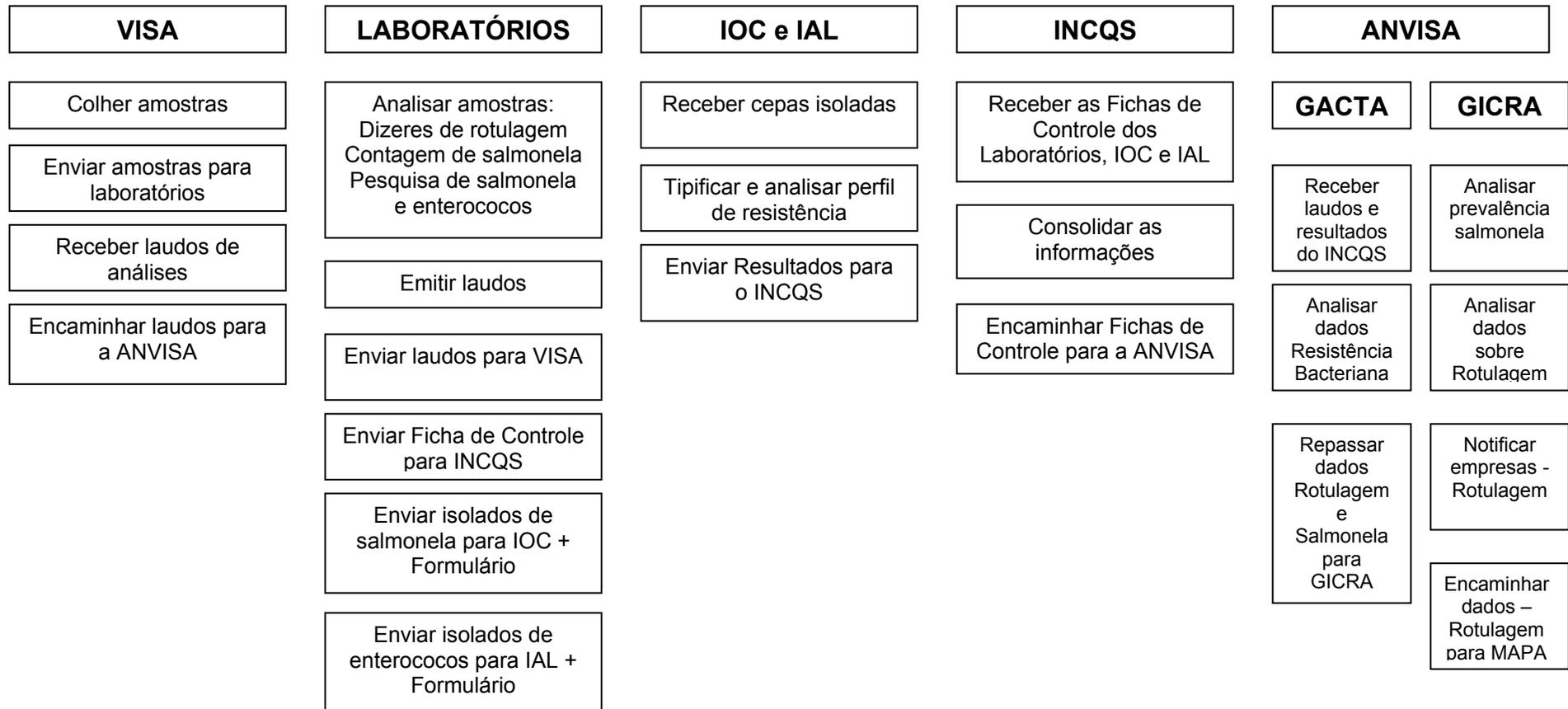
CONTAGEM DE *Salmonella sp*:
Utilizar uma das 5 unidades da amostra, conforme POP – Pesquisa e Contagem de Salmonella sp. em Carcaças Congeladas de Frango

Pesquisa de *Salmonella sp* e de *Enterococcus sp*:
Utilizar todas as 5 unidades da amostra, conforme POP's: Pesquisa e contagem de Salmonella sp em carcaças congeladas de Frango/ Pesquisa de Enterococcus sp em Carcaças Congeladas de Frango.

FLUXOGRAMA II - RESULTADOS



ATIVIDADES DO PREBAF



	PROCEDIMENTO OPERACIONAL				Data da Revisão:
	Número: POP- 001	Localizador: GICRA/GGALI	Revisão: 0	Folha: 01/02	Data para Revalidação:
Título: Colheita de Carcaças Congeladas de Frango					
Descrição da Revisão:			Palavra(s) Chave: Salmonella - Frango - Rotulagem		
Elaborador: Gerência de Inspeção e Controle de Riscos de Alimentos Cargo: Técnicos			Aprovador: Ana Virgínia de Almeida Figueiredo Cargo: Gerente de Inspeção e Controle de Riscos de Alimento		

1. OBJETIVO

Determinar procedimentos para colheita de amostras de carcaças congeladas de frango, destinadas ao Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango - PREBAF, e para a análise de resultados e intervenção.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este Procedimento Operacional Padrão estabelece os procedimentos a serem observados pelos órgãos de vigilância sanitária dos Estados envolvidos no PREBAF, para a colheita de amostras de carcaças congeladas de frango.

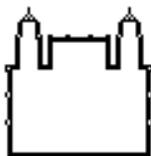
3. PROCEDIMENTOS

3.1 COLHEITA DE AMOSTRAS

- 3.1.1 Colher, no comércio local, duas amostras, de marcas distintas, compostas por 05 (cinco) unidades de frango inteiro congelado e sem tempero, por mês. A seleção das amostras deve ser baseada na disponibilidade das marcas no mercado, priorizando os produtos processados em frigoríficos locais.
- 3.1.2 As cinco unidades da amostra devem apresentar as mesmas especificações quanto a marca, ao lote, data de fabricação e prazo de validade. As unidades de amostra não devem apresentar sinais de violação na embalagem primária.
- 3.1.3 Colher amostras com, no mínimo, 60 dias para expirar a validade. Deve ser dispensada a colheita da amostra sempre que o produto estiver visivelmente adulterado ou deteriorado, ou armazenado em temperatura inadequada.
- 3.1.4 Para cada amostra deve ser emitido um Termo de Colheita de Amostras (TCA) e especificado o motivo de colheita (PREBAF) e a modalidade de análise (Orientação).
- 3.1.5 O TCA deve ser preenchido em letra legível, preferencialmente em letra de forma.
- 3.1.6 Enviar as amostras ao laboratório devidamente identificadas, contendo as seguintes informações: a data, a hora da colheita, a temperatura do produto e/ou do equipamento de exposição (gôndola, freezer) no momento da colheita, as condições da amostra no ponto de colheita e outros dados que possam auxiliar as atividades analíticas.
- 3.1.7 As amostras colhidas devem ser entregues no mesmo dia ao laboratório, devidamente lacradas, sendo mantidas em caixa isotérmica, com gelo reciclável durante o transporte. As amostras devem permanecer congeladas desde a colheita até a entrega no laboratório.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL				Data da Revisão:
	Número: POP- 001	Localizador: GICRA/GGALI	Revisão: 0	Folha: 02/02	Data para Revalidação:
Título: Colheita de Carcaças Congeladas de Frango					
Descrição da Revisão:			Palavra(s) Chave: Salmonella - Frango - Rotulagem		
Elaborador: Gerência de Inspeção e Controle de Riscos de Alimentos Cargo: Técnicos			Aprovador: Ana Virgínia de Almeida Figueiredo Cargo: Gerente de Inspeção e Controle de Riscos de Alimento		

- 3.1.8 Excepcionalmente, quando não for possível entregar as amostras ao laboratório no mesmo dia da colheita, as mesmas devem ser mantidas em freezer garantindo a sua integridade.
- 3.1.9 O prazo máximo de entrega das amostras (congeladas) ao laboratório não deve exceder a 72 horas após colheita, respeitando os dias previamente acordados no cronograma de amostragem entre o órgão de vigilância sanitária e o laboratório.



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

**NÚMERO
65.3210.043**

PALAVRAS-CHAVE

TÉCNICA DE ENXAGUADURA - CARÇAÇAS DE FRANGO - LAUDOS

REVISÃO

01

SEÇÃO DO
MANUAL

10

ELABORADO

Carla de O. Rosas

VERIFICADO

Márcia B. Warnken

APROVADO

Marise S. de Magalhães

REFERENDADO

Eduardo Chaves Leal

DATA

13/07/2004

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de aplicação
3. Siglas
4. Condições Gerais
5. Condições Específicas
6. Bibliografia
7. Anexos
 - A. Meios de Cultura
 - B. Soluções e Reagentes

1. OBJETIVO

Este Procedimento Operacional Padronizado estabelece condições e procedimentos para a recepção, armazenamento e processamento das amostras a serem submetidas à pesquisa e contagem de *Salmonella* sp e à pesquisa de *Enterococcus* sp. Este POP também padroniza os dados que devem constar no laudo de análise e destinatário de encaminhamento.

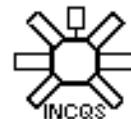
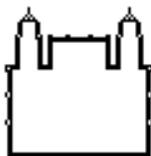
2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se ao PREBAF e visa uniformizar as metodologias de análise, bem como a elaboração de laudos a serem encaminhados aos órgãos de Vigilância Sanitária, pelos laboratórios participantes.

3. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

PREBAF - Programa Nacional de monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

NÚMERO 65.3210.043

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - American Type Culture Collection

IAL - Instituto Adolfo Lutz

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

4. CONDIÇÕES GERAIS

4.1 – Materiais e equipamentos

- a) balança com capacidade para 3000g e sensibilidade de 0,01g;
- b) bandejas inox
- c) bisturis
- d) bolsa plástica estéril com capacidade de 5 L;
- e) frasco erlenmeyer com capacidade de 5 L ou frasco similar;
- f) papel indicador de pH.

Nota:

Esterilizar os materiais em forno Pasteur a 180 °C durante 2 horas.

4.2 – Meios de cultura (ver Anexo A)

- a) água peptonada tamponada (APT)

4.3 – Soluções e reagentes (ver Anexo B)

- a) ácido clorídrico 1N;
- b) álcool a 70%
- c) hidróxido de sódio 1N;
- d) triton x-100

5. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

Duas amostras de carcaças congeladas de frango sem tempero, compostas cada uma, por cinco unidades são coletadas mensalmente pela Vigilância Sanitária. As unidades de cada amostra devem pertencer à mesma marca comercial e apresentar a mesma data de embalagem e/ou prazo de validade do produto.

As amostras são acondicionadas, identificadas e enviadas ao laboratório de análise, sob refrigeração, no menor período de tempo possível.

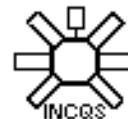
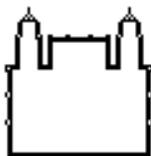
Cada Termo de Colheita de Amostras corresponde a cinco unidades do produto de uma única marca comercial, conforme descrito acima.

REVISÃO

01

PÁGINA

2 / 8



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

NÚMERO 65.3210.043

5.1 – Recepção e estocagem no laboratório

Observar o aspecto geral da amostra. Verificar se o produto não contém tempero, se todas as unidades apresentam a mesma data de embalagem e/ou prazo de validade do produto e se as mesmas estão congeladas.

Armazenar as unidades da amostra no laboratório, em freezer. Para iniciar as análises, proceder ao descongelamento das mesmas em refrigerador, na embalagem original, durante 18 horas.

5.3 – Enxaguadura da amostra

A etapa de enxaguadura da amostra é comum para os ensaios de pesquisa e contagem de *Salmonella* sp e também para pesquisa de *Enterococcus* sp .

Proceder a limpeza da superfície externa da embalagem utilizando gaze embebida em álcool a 70%. Abrir a embalagem com bisturi estéril. Desprezar os miúdos e transferir a carcaça para saco plástico estéril.

Pesar a amostra e adicionar, para cada 1 g do frango, 1 mL de APT. Fazer a enxaguadura, cuidadosamente e de maneira uniforme, em toda a superfície da carcaça.

Transferir o caldo de enxaguadura para erlenmeyer de 5 L.

Deixar em repouso durante 60 minutos à temperatura ambiente. Verificar o pH do homogenato com papel indicador de pH. Se necessário, ajustar o pH para $6,8 \pm 0,2$ utilizando ácido clorídrico 1N e hidróxido de sódio 1N.

Após o ajuste do pH, proceder à sementeira dos meios para enterococos a partir do caldo de enxaguadura.

Para os ensaios de *Salmonella* sp, acrescentar ao caldo de enxaguadura, Triton X – 100 (submetido a vapor fluente durante 15 minutos). A utilização desse surfactante deve ser limitada à menor quantidade suficiente para iniciar a formação de espuma.

Nota:

Cada 1 mL do caldo de enxaguadura corresponde a 1 g da amostra.

Proceder à pesquisa de *Salmonella* sp (POP INCQS nº 65.3210.044) e à pesquisa de *Enterococcus* sp (POP IAL) nas 5 unidades da amostra. Realizar a contagem de *Salmonella* sp (POP INCQS nº 65.3210.044) em apenas uma unidade da amostra.

5.4 – Análise de Rotulagem

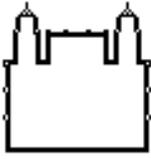
Proceder à análise de rotulagem, segundo a Resolução RDC - ANVISA n.º 13 de 02/01/2001, que estabelece a obrigatoriedade para os produtores de carnes de aves e seus

REVISÃO

01

PÁGINA

3 / 8



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

**NÚMERO
65.3210.043**

miúdos crus, resfriados ou congelados, de incluir na rotulagem destes produtos as instruções de uso, preparo e conservação dos mesmos.

5.5 – Laudo de análise

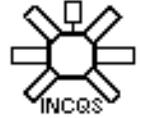
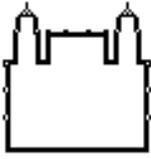
5.5.1 – Elaborar o “Laudo de Análise” com as informações listadas abaixo.

a) informações sobre a amostra:

- Número de Cadastro da Amostra no Laboratório;
- Modalidade de Análise: Orientação;
- Programa;
- Nome do Produto: Carcaça Congelada de Frango;
- Quantidade Recebida;
- Data de Fabricação;
- Data de Validade;
- Número do Lote;
- Termo de Apreensão;
- Motivo da Apreensão: Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF;
- Registro;
- Fabricante;
- Logradouro;
- País;
- Local de Coleta;
- Requerente;
- Pessoa de Contato;
- Documento;
- Data de Entrada;
- Descrição da Amostra.

b) resultado da análise:

- Nome do Ensaio: Análise de Rotulagem:
Referência: Resolução RDC n.º 13 de 02/01/2001-ANVISA
Resultado: Satisfatório/Insatisfatório
- Nome do Ensaio: Pesquisa de *Salmonella* sp
Referência : POP INCQS nº 65.3210.044
Resultado: Presente/Ausente
Unidade da Amostra A _____
Unidade da Amostra B _____
Unidade da Amostra C _____
Unidade da Amostra D _____
Unidade da Amostra E _____



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

NÚMERO
65.3210.043

- Nome do Ensaio: Contagem de *Salmonella* sp
Referência: POP INCQS n.º 65.3210.044
Unidade da Amostra _____
Resultado: _____ (NMP) LIC= _____ ; LSC= _____
- Nome do Ensaio: Pesquisa de *Enterococcus* sp
Referência: POP IAL – Detecção de Enterococos em Carcaças congeladas de Frango
Meio com vancomicina:
Resultado: Presente/Ausente
Unidade da Amostra A _____
Unidade da Amostra B _____
Unidade da Amostra C _____
Unidade da Amostra D _____
Unidade da Amostra E _____
Meio sem Vancomicina:
Resultado: Presente/Ausente
Unidade da Amostra A _____
Unidade da Amostra B _____
Unidade da Amostra C _____
Unidade da Amostra D _____
Unidade da Amostra E _____

5.5.2 – No final do laudo de análise deve constar a seguinte mensagem padrão:

“Este laudo não pode ser utilizado em publicidade, propaganda ou para fins comerciais. Os resultados deste laudo referem-se única e exclusivamente à amostra encaminhada pelo solicitante.”

5.5.3 – Os Laudos de Análise devem ser encaminhados à VISA responsável pela colheita da amostra.

6. BIBLIOGRAFIA

ANDREWS, Wallace H. & June, Geraldine A. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. In: **BACTERIOLOGICAL Analytical Manual Online**. [S.l.]; FDA, 2003. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-1.html>>. Acesso em: 12 Jul. 2004.

DETECÇÃO de Enterococos em Carcaças Congeladas de Frango. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

ISO – 6579:1993. Microbiology – General guidance on methods for the detection of *Salmonella*.

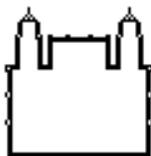
MESSER, Russel S.; Midura, Thaddeus F.; Peeler, James T. Sampling plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. In: COMPENDIUM of Methods for the

REVISÃO

01

PÁGINA

5 / 8



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

**NÚMERO
65.3210.043**

Microbiological Examination of Foods. 4 ed. Washington, D.C: American Public Health Association (APHA), 2001. cap.2, p. 13-23.

PESQUISA e Contagem de *Salmonella* sp em Carcaças Congeladas de Frango. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3210.044).

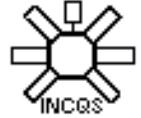
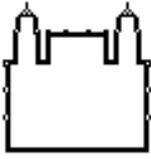
Brasil. Resolução RDC nº 13 de 2 de janeiro de 2001- Aprova o regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carnes de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados e seu anexo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília.

CÓPIA NÃO CONTROLADA

/ANEXO A

REVISÃO
01

PÁGINA
6 / 8



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS
DE CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO
DO LAUDO DE ANÁLISE

NÚMERO
65.3210.043

ANEXO A

MEIOS DE CULTURA

A.1 – Água peptonada tamponada

Peptona -----	10 g
Cloreto de sódio -----	5 g
Fosfato de sódio dibásico -----	3,5 g
Fosfato de potássio monobásico -----	1,5 g
Água destilada -----	1000 mL

Suspender e dissolver os componentes em água destilada. Distribuir alíquotas de 3000 mL em frascos Erlenmeyers de 5 L ou frasco similar. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

pH final: 7,2 ± 0,2 a 25°C.

Nota:

O meio pronto deve ser estocado a temperatura de 15 a 30°C.

Para o preparo a partir do meio desidratado, obedecer as recomendações do fabricante.

CÓPIA NÃO CONTROLADA

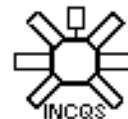
/ANEXO B

REVISÃO

01

PÁGINA

7 / 8



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS
DE CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO
DO LAUDO DE ANÁLISE

NÚMERO
65.3210.043

ANEXO B

SOLUÇÕES E REAGENTES

B.1 – Ácido clorídrico 1N

Ácido clorídrico concentrado ----- 89 mL
Água destilada q.s.p. ----- 1000 mL

Esterilizar em autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Nota: Estocar a temperatura ambiente.

B.2 – Hidróxido de sódio 1N

Hidróxido de Sódio ----- 40 g
Água destilada q.s.p. ----- 1000 mL

Esterilizar em autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Nota: Estocar a temperatura ambiente.

B.3 – Triton X-100

Transferir um volume de aproximadamente 50mL de Triton X-100 para frasco escuro de 250mL ou frasco similar. Esterilizar sob vapor fluente por 15 minutos.

Nota: Estocar a temperatura ambiente.

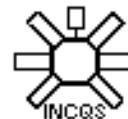
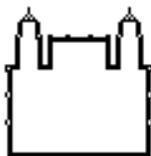
CÓPIA NÃO CONTROLADA

REVISÃO

01

PÁGINA

8 / 8



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO:

**PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM
CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO**

**NÚMERO
65.3210.044**

PALAVRAS-CHAVE

SALMONELLA SP - ALIMENTOS - CARÇAÇAS DE FRANGO

REVISÃO

00

**SEÇÃO DO
MANUAL**

10

ELABORADO

Carla de O. Rosas

VERIFICADO

Márcia B. Warnken

APROVADO

Marise S. de Magalhães

REFERENDADO

André L. Gemal

DATA

21/10/2003

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de aplicação
3. Siglas
4. Condições Gerais
5. Condições Específicas
6. Bibliografia
7. Anexos
 - A. Meios de Cultura
 - B. Soluções e Reagentes
 - C. Tabela NMP
 - D. Ficha de Controle dos Ensaios de *Salmonella* sp

1. OBJETIVO

Este Procedimento Operacional Padronizado (POP) estabelece as condições e procedimentos para a pesquisa e contagem de *Salmonella* sp em carcaças congeladas de frango sem tempero.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

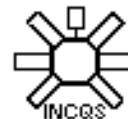
Este POP aplica-se ao Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango INCQS / ANVISA e visa uniformizar as metodologias de análise para os laboratórios participantes.

3. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

4. CONDIÇÕES GERAIS

4.1 – Materiais e equipamentos

- a) agitador de tubos;
- b) alça e agulha de platina ou níquel-cromo número 25 (diâmetro de 3 mm);
- c) banho termostático a $42 \pm 1^\circ\text{C}$;
- d) frascos erlenmeyers com capacidade de 250 mL; 500 mL e 1000 mL;
- e) estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$;
- f) lâminas de vidro;
- g) palitos de madeira;
- h) pipetas graduadas de 1, 5 e 10 mL;
- i) placas de Petri;
- j) tubos de ensaio 13 x 100 mm;
- k) tubos de ensaio 16 x 160 mm.

Nota:

Esterilizar o material em forno Pasteur a 180°C durante 2 horas.

4.2 – Meios de cultura (ver Anexo A)

- a) ágar entérico Hektoen;
- b) ágar lisina ferro;
- c) ágar nutriente;
- d) ágar triplice açúcar ferro;
- e) ágar xilose lisina desoxicolato;
- f) água peptonada tamponada (APT);
- g) caldo tetrionato;
- h) caldo uréia;
- i) meio Rappaport – Vassiliadis.

4.3 – Soluções e reagentes (ver Anexo B)

- a) antissoro polivalente para *Salmonella* sp;
- b) solução de iodo-iodeto de potássio;
- c) solução de verde brilhante a 0,1%;
- d) solução salina 0,85%;
- e) tampão fosfato de Butterfield.

4.4 – Microrganismos de referência

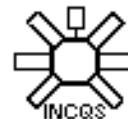
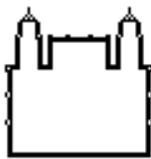
- a) *Salmonella* Typhimurium INCQS 150 (ATCC 14028);
- b) *Escherichia coli* INCQS 033 (ATCC 25922);
- c) *Proteus vulgaris* INCQS 106 (ATCC 13315).

REVISÃO

00

PÁGINA

2 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

Para a utilização das culturas de microrganismos de referência seguir as especificações do POP (65.3210.041) – “Utilização de Bactérias de Referência da Coleção de Culturas do INCQS no Controle Microbiológico de Alimentos” - INCQS/FIOCRUZ.

5. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

Para os ensaios de pesquisa e contagem de *Salmonella* sp utilizar o caldo de enxaguadura obtido a partir da metodologia descrita no POP (65.3210.043) – “Recepção e Processamento Inicial de Amostras de Carçaças Congeladas de Frango” – INCQS/FIOCRUZ.

5.1 – Pré-enriquecimento

5.1.1 – Pesquisa de *Salmonella* sp (Ensaio qualitativo)

Transferir 25 mL do caldo de enxaguadura (volume correspondente a 25 g da amostra) para frasco erlenmeyer contendo 225 mL de APT. Agitar com movimentos circulares, cuidadosamente.

Incubar a 35°C ± 2°C durante 18 a 24 horas.

5.1.2 – Determinação do Número Mais Provável de *Salmonella* sp (Ensaio quantitativo)

Preparar a diluição 10⁻¹ transferindo 50 mL do caldo de enxaguadura para frasco erlenmeyer contendo 450 mL de tampão de Butterfield (diluição 10⁻¹).

A partir da diluição 10⁻¹ preparar diluições decimais seriadas, acrescentando 10 mL da última diluição, em frasco contendo 90 mL de tampão de Butterfield.

Preparar 5 séries de diluições com 3 tubos cada (correspondendo de 10 g a 0,001 g do alimento), como descrito abaixo:

1ª série (10 g) - Distribuir alíquotas de 10 mL do caldo de enxaguadura em 3 tubos de ensaio vazios e estéreis;

2ª série (1 g) - Distribuir alíquotas de 1 mL do caldo de enxaguadura em 3 tubos contendo 10 mL de APT;

3ª série (0,1 g) - Distribuir alíquotas de 1 mL da diluição 10⁻¹ em 3 tubos contendo 10 mL de APT;

4ª série (0,01 g) - Distribuir alíquotas de 1 mL da diluição 10⁻² em 3 tubos contendo 10 mL de APT;

5ª série (0,001 g) - Distribuir alíquotas de 1 mL da diluição 10⁻³ em 3 tubos contendo 10 mL de APT.

Notas:

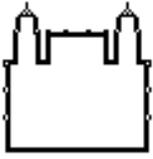
- em cada série de tubos identificar as diluições e classificar os tubos como A, B e C;
- incubar os tubos a 35°C ± 2°C durante 18 a 24 horas.

REVISÃO

00

PÁGINA

3 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

5.2 – Enriquecimento seletivo

Para o ensaio quantitativo, selecionar apenas os tubos que apresentarem turvação para proceder à etapa de enriquecimento seletivo.

A partir da etapa de enriquecimento seletivo aplicar o procedimento descrito abaixo tanto para a metodologia de pesquisa (ensaio qualitativo), quanto para a determinação do Número Mais Provável (ensaio quantitativo) de *Salmonella* sp.

Semear os meios de enriquecimento seletivo a partir da APT.

- transferir 0,1 mL do caldo de pré-enriquecimento, previamente homogeneizado por movimentos circulares, para tubos contendo 10 mL de meio Rappaport - Vassiliadis;
- transferir 1 mL do caldo de pré-enriquecimento, previamente homogeneizado por movimentos circulares, para tubos contendo 10 mL de caldo tetrionato;

Nota:

No momento da utilização do caldo tetrionato acrescentar 0,1 mL de solução de verde brilhante a 0,1% e 0,2 mL de solução iodo - iodeto de potássio (Anexo B). Homogeneizar utilizando agitador de tubos.

Incubar os tubos em banho termostático a $42 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 18 a 24 horas.

5.3 – Isolamento

Semear, por esgotamento, uma alçada de cada uma das culturas de enriquecimento seletivo, previamente homogeneizadas em agitador de tubos, para a superfície dos seguintes meios seletivo-indicadores: ágar entérico Hektoen e ágar xilose lisina desoxicolato.

Incubar as placas em posição invertida a $35^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$, durante 18 a 24 horas.

5.3.1 – Controle dos meios seletivo-indicadores

Semear, por esgotamento, as cepas controle de *Salmonella* Typhimurium e *E. coli* (item 4.4) em placas contendo ágar entérico Hektoen e ágar xilose lisina desoxicolato.

Incubar a $35^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$, durante 18 a 24 horas.

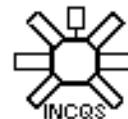
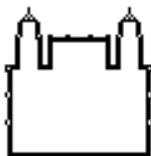
Observar o crescimento dos microrganismos de referência nas placas de meios seletivos, que devem apresentar as características descritas a seguir:

REVISÃO

00

PÁGINA

4 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia. coli</i>
Ágar Hektoen	Colônias negras ou verde-azuladas com centro negro	Colônias vermelhas ou salmão, com halo de precipitação
Ágar XLD	Colônias negras ou transparentes, da cor do meio, com centro negro	Colônias amarelas, opacas, com halo de precipitação

5.4 – Seleção das colônias

Observar as placas de cada meio seletivo que contenham colônias típicas de *Salmonella* sp. Selecionar de duas a cinco colônias e semear em tubo contendo ágar nutriente.

Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 18 a 24 horas.

5.5 – Triagem Bioquímica

5.5.1 – Semeadura de colônias suspeitas de *Salmonella* sp em ágar TSI e ágar LIA

Com o auxílio de uma agulha bacteriológica tocar o crescimento do ágar nutriente. Perfurar a base do ágar TSI em profundidade e realizar movimentos de estrias na superfície. Sem flambar a agulha, perfurar a base do ágar LIA em dois diferentes pontos e, em seguida, deslizar a agulha pelo centro da superfície do ágar.

Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 18 a 24 horas.

5.5.1.1 – Controle dos meios TSI e LIA

Proceder à semeadura dos microrganismos de referência : *Salmonella Typhimurium* e *E.coli* (item 4.4), em ágar TSI e ágar LIA.

Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 18 a 24 horas.

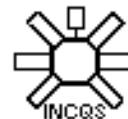
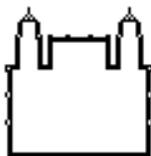
Observar o comportamento bioquímico das cepas de referência, que devem apresentar as características descritas a seguir:

REVISÃO

00

PÁGINA

5 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Escherichia coli</i>
Ágar TSI	Superfície alcalina (vermelha) e base ácida (amarela) com H ₂ S	Superfície ácida e base ácida (amarelo)
Ágar LIA	Superfície alcalina e base alcalina (violeta) com H ₂ S	Superfície alcalina (violeta) e base ácida (amarela)

5.5.1.2 – Leitura dos meios TSI e LIA

Selecionar as culturas com comportamento bioquímico característico de *Salmonella* sp, como descrito acima.

5.5.2 – Semeadura das culturas suspeitas de *Salmonella* sp em caldo uréia

Com o auxílio de uma alça bacteriológica semear o crescimento, a partir do ágar TSI em caldo uréia.

Incubar a 35°C ± 2° C, durante 18 a 24 horas

5.5.2.1 – Controle do caldo uréia

Utilizar como controle as cepas de *Salmonella* Typhimurium e *P. vulgaris* (item 4.4)

Incubar a 35°C ± 2° C, durante 18 a 24 horas, juntamente com um tubo contendo o meio não semeado, para controle negativo.

	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Proteus vulgaris</i>
Caldo uréia	Urease negativa: não ocorre mudança na coloração do meio	Urease positiva: a coloração do meio é alterada para rosa intenso

5.5.2.2 – Leitura da prova da urease

Selecionar as culturas com comportamento bioquímico característico de *Salmonella* sp, como descrito acima.



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

5.6 – Sorologia Polivalente

Submeter as culturas suspeitas de *Salmonella* sp a soroaglutinação em lâmina. Utilizar cepa de referência de *Salmonella* Typhimurium (item 4.4), como controle.

Semear a cultura suspeita em ágar nutriente inclinado, a partir do ágar TSI.

Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 18 a 24 horas.

Adicionar 1,5 mL de salina 0,85% à cultura de ágar nutriente e suspender o crescimento. A suspensão bacteriana deve ser homogênea, sem grumos e deve apresentar uma turvação que se enquadre entre os tubos 2 e 3 da escala de McFarland.

Na extremidade de uma lâmina limpa e desengordurada com álcool, depositar uma gota da suspensão e uma gota de salina 0,85%. Homogeneizar utilizando palito de madeira.

As culturas que apresentarem aglutinação com salina devem ser classificadas como auto-aglutináveis. Prosseguir o ensaio somente com as culturas que não aglutinarem com salina.

Na outra extremidade da lâmina adicionar uma gota da suspensão bacteriana e uma gota do antissoro polivalente. Misturar com palito de madeira estéril. Incliná-la com movimentos leves e circulares, continuamente por 1 minuto.

A formação de grumos na mistura que contém o antissoro polivalente caracteriza o resultado como positivo. Classificar a cultura como *Salmonella* sp.

5.7 – Preparo e envio dos isolados para o Laboratório de Referência

As culturas classificadas como *Salmonella* sp devem ser enviadas ao Laboratório de Enterobactérias/IOC/FIOCRUZ para caracterização antigênica.

Enviar ao Laboratório de Referência somente os isolados obtidos a partir do ensaio qualitativo. Seguir os procedimentos descritos no POP LABENT/IOC - FIOCRUZ: "Encaminhamento das cepas de *Salmonella* spp, para caracterização antigênica e avaliação da suscetibilidade antimicrobiana"

5.8 – Expressão dos Resultados

5.8.1 – Pesquisa de *Salmonella* sp (ensaio qualitativo)

Expressar o resultado como presença ou ausência de *Salmonella* sp em 25g da amostra.

5.8.2 – Determinação do NMP de *Salmonella* sp (ensaio quantitativo)

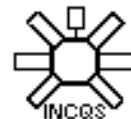
Avaliar os tubos positivos de cada série. Fazer a leitura final considerando as três últimas diluições que apresentarem *Salmonella* sp. Proceder à leitura do resultado utilizando as

REVISÃO

00

PÁGINA

7 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

tabelas de NMP (Anexo C).

5.9 – Preenchimento e envio da “Ficha de Controle dos Ensaios de *Salmonella* sp”

Ao término das análises, preencher na “Ficha de Controle dos Ensaios de *Salmonella* sp” (Anexo D) e enviá-la à Coordenação do Programa Nacional da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango.

6. BIBLIOGRAFIA

ANDREWS, W. H. and HAMMACK, T.S. *Salmonella*. In: BACTERIOLOGICAL Analytical Manual. 8 ed. – Revision A, 1998. Arlington: AOAC/FDA, cap. 5, p. 5.01 – 20 Updated: October 2001 (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html).

ENCAMINHAMENTO das Cepas de *Salmonella* spp, para Caracterização Antigênica e Avaliação da Suscetibilidade Antimicrobiana. Rio de Janeiro: LABENT/IOC-FIOCRUZ.

FLOWERS, Russel S. et al. *Salmonella*. In: COMPENDIUM of methods for the microbiological examination of foods. 3. ed. Washington, D.C: American Public Health Association (APHA), 1992. 1219p. cap. 25, p. 371-422.

RECEPÇÃO e Processamento Inicial de Amostras de Carcaças Congeladas de Frango. In : MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3210.043).

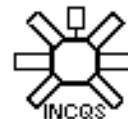
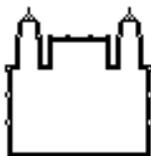
Robert Blodgett. Most Probable Number from Serial Dilutions. In: BACTERIOLOGICAL Analytical Manual. 8 ed. – Revision A, 1998. Arlington: AOAC/FDA, Appendix 2, p. App 2.01 – 2.12; Updated: January 2001. (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html).

UTILIZAÇÃO de Bactérias de Referência da Coleção de Culturas do INCQS no Controle Microbiológico de Alimentos. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3210.041)

/ANEXO A

REVISÃO
00

PÁGINA
8 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO A

MEIOS DE CULTURA

O Anexo A apresenta as formulações dos meios de cultura a serem utilizados neste POP. Para o preparo a partir dos meios desidratados, obedecer às recomendações dos fabricantes.

A.1 – Ágar entérico Hektoen

Peptona	12g
Sais de bile	3g
Extrato de levedura	9g
Lactose	12g
Sacarose	12g
Salicina	2g
Cloreto de sódio	5g
Tiosulfato de sódio	5g
Citrato férrico amoniacal	1,5g
Azul de bromotimol	0,065g
Fucsina ácida	0,1g
Ágar	14g
Água destilada	1000mL

Dissolver os ingredientes em banho termostático com freqüente agitação. Evitar que o meio ferva por mais de 1 minuto. Não autoclavar Distribuir alíquotas de aproximadamente 20 mL em placas de Petri estéreis.

pH final $7,5 \pm 0,2$ a 25°C.

A.2 -Ágar Lisina Ferro

Peptona	5,0g
Extrato de levedura	3,0g
Glicose	1,0g
L-Lisina	10,0g
L-arginina	10g
Citrato férrico amoniacal	0,5g
Tiosulfato de sódio	0,04g
Púrpura de bromocresol	0,02g
Ágar	15,0g
Água destilada	1000 mL

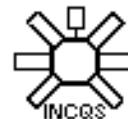
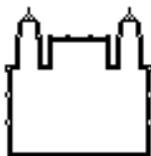
/ANEXO A – Cont.

REVISÃO

00

PÁGINA

9 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO A – Cont.

Dissolver os ingredientes em banho termostático com freqüente agitação. Distribuir alíquotas de 5 mL em tubos 13X100 mm. Esterilizar a 121°C / 15 min. Inclinor os tubos de maneira a se obter uma base de 4 cm e uma inclinação de 2,5 cm.
 pH final 6,8 ± 0,2 a 25°C.

A.3 – Ágar nutriente

Peptona -----	5 g
Extrato de carne -----	3 g
Ágar -----	15 g
Água destilada -----	1000 mL

Suspender os componentes em água destilada e dissolver em banho termostático até a dissolução do ágar. Distribuir alíquotas de 3 mL em tubos 13 x 100 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos e deixar o ágar solidificar em posição inclinada.
 pH final: 6,8 ± 0,2 a 25°C.

A.4 – Agar três açúcares e ferro (TSI)

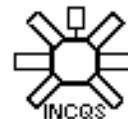
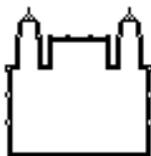
Extrato de carne -----	3 g
Extrato de levedura -----	3 g
Peptona de caseína -----	15 g
Peptona de carne -----	5 g
Lactose -----	10 g
Sacarose -----	10 g
Glicose -----	1 g
Sulfato ferroso -----	0,2 g
Cloreto de sódio -----	5 g
Tiosulfato de sódio -----	0,3 g
Vermelho de fenol -----	0,024 g
Ágar -----	12 g
Água destilada -----	1000 mL

Suspender os componentes em água destilada e dissolver por aquecimento até a total dissolução do ágar. Distribuir 3 mL em tubos 13 x 100 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Inclinor os tubos de maneira a se obter uma base de 2 a 3 cm e uma inclinação de 4 a 5 cm.
 pH final: 7,4 ± 0,2 a 25°C.

/ANEXO A – Cont.

REVISÃO
00

PÁGINA
10 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO A – Cont.

A.5 – Agar xilose lisina desoxicolato

Extrato de levedura -----	3 g
L-lisina -----	5 g
Xilose -----	3,75 g
Lactose -----	7,5 g
Sacarose -----	7,5 g
Desoxicolato de sódio -----	2,5 g
Citrato férrico amoniacal -----	0,8 g
Cloreto de sódio -----	5 g
Tiosulfato de sódio -----	6,8 g
Vermelho de fenol -----	0,08 g
Ágar -----	15 g
Água destilada -----	1000 mL

Suspender os componentes em água destilada e dissolver por aquecimento com agitação até a ebulição. Evitar o aquecimento excessivo. Não autoclavar. Distribuir alíquotas de aproximadamente 20 mL em placas de Petri.

pH final: $7,4 \pm 0,2$ a 25°C.

A.6 –Água peptonada tamponada (APT)

Peptona -----	10 g
Cloreto de sódio -----	5 g
Fosfato de sódio dibásico -----	3,5 g
Fosfato de potássio monobásico -----	1,5 g
Água destilada -----	1000 mL

Suspender e dissolver os componentes em água destilada. Distribuir alíquotas de 225 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 500 mL e alíquotas de 10 mL em tubos de ensaio. 16 x 160mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

pH final: $7,2 \pm 0,2$ a 25°C.

Nota:

O meio pronto deve ser estocado em temperatura de 15 a 30°C.

/ANEXO A – Cont.

REVISÃO

00

PÁGINA

11 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO A – Cont.

A.7 – Caldo uréia

Extrato de levedura	-----	0,1g
Fosfato dibásico de sódio	-----	9,5g
Fosfato monobásico de potássio	-----	9,1g
Uréia bacteriológica	-----	20,0g
Vermelho de fenol	-----	0,01g
Água destilada	-----	1000 mL

Suspender os ingredientes em água destilada e homogeneizar até a total dissolução. Esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 3 mL em tubos de ensaio 13 x 100 mm. pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C.

A.8 – Caldo tetratonato

Polipeptona	-----	5 g
Sais biliares	-----	1 g
Carbonato de cálcio	-----	10 g
Tiosulfato de sódio (pentahidratado)	-----	30 g
Água destilada	-----	1000 mL

Suspender os componentes em água destilada e dissolver por aquecimento até a ebulição. Distribuir alíquotas de 10 mL em tubos de ensaio 16 x 160 mm estéreis. Não autoclavar. Estocar por até duas semanas a 5-10°C. pH final $8,4 \pm 0,2$ a 25°C.

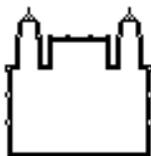
No momento da utilização do meio adicionar para cada 10 mL de caldo tetratonato 0,2 mL de solução de iodo-iodeto de potássio e 0,1 mL de solução de verde brilhante a 0,1% (Anexo B).

O meio não deverá ser estocado após o acréscimo das soluções descritas acima.

/ANEXO A – Cont.

REVISÃO
00

PÁGINA
12 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO A – Cont.

A.9 – Meio Rappaport Vassiliadis

Meio base

Triptona -----	5 g
Cloreto de sódio -----	8 g
Fosfato monobásico de potássio -----	1,6 g
Água destilada -----	1000 mL

O meio base deverá ser preparado no dia da sua utilização.

Solução de Cloreto de Magnésio

Cloreto de magnésio hexahidratado -----	400g
Água destilada -----	1000 mL

Estocar em frasco escuro a temperatura ambiente por até 1 ano.

Solução de verde malaquita oxalato

Verde malaquita oxalato -----	0,4 g
Água destilada -----	100 mL

Estocar em frasco escuro a temperatura ambiente por até 6 meses.

Meio completo :

Para o preparo do meio completo acrescentar para cada 1000 mL do meio base : 100 mL de solução de cloreto de magnésio e 10 mL de solução de verde malaquita oxalato. Dispensar alíquotas de 10 mL em tubos 16 x 160 mm. Autoclavar a 115°C por 15 minutos. Estocar o meio completo em refrigerador e utilizar em até 1 mês após o preparo.

pH final $5,5 \pm 0,2$ a 25°C

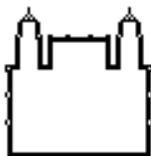
/ANEXO B

REVISÃO

00

PÁGINA

13 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO B

SOLUÇÕES E REAGENTES

B.1 – Solução de iodo-iodeto de potássio

Iodeto de potássio ----- 5 g
Iodo ressublimado ----- 6 g
Água destilada estéril ----- 20 mL

Dissolver o iodeto de potássio em 5 mL de água destilada estéril. Adicionar o iodo e dissolver por agitação. Diluir para um volume final de 20 mL.

B.2 – Solução de Verde Brilhante a 0,1%

Corante verde brilhante ----- 0,1 g
Água destilada estéril ----- 100 mL

Dissolver o corante em água estéril.

B.3 – Tampão de Butterfield

Solução estoque

Fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4) ----- 34g
Água destilada ----- 500mL

Ajustar o pH a 7,2 com NaOH 1N. Completar o volume para 1 litro, adicionando água destilada. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Estocar sob refrigeração.

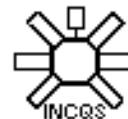
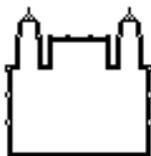
Preparo

Retirar 1,25 mL da solução estoque, descrita acima e acrescentar volume necessário de água destilada para completar 1 litro. Distribuir alíquotas de 225 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 500 mL e 90 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 250 mL. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

/ANEXO B – Cont.

REVISÃO
00

PÁGINA
14 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO B – Cont.

B.4 – Solução salina a 0,85%

Cloreto de sódio-----8,5g

Água destilada-----1000 mL

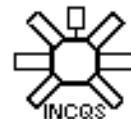
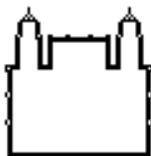
Dissolver o cloreto de sódio em água. Autoclavar a 121°C / 15 minutos. Resfriar a temperatura ambiente.

CÓPIA NÃO CONTROLADA

/ANEXO C

REVISÃO
00

PÁGINA
15 / 17



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE Salmonella SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

**NÚMERO
65.3210.044**

ANEXO C

TABELA NMP

TABELA PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Tabela 1 – Para 3 séries de 3 tubos, contendo cada série 0.1, 0.01 e 0.001g de inóculo, correlacionados com a tabela de NMP/g e com intervalos de confiança de 95%

Tubos positivos			NMP/g	Limites de Confiabilidade		Tubos positivos			NMP/g	Limites de Confiabilidade	
0.10	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.10	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	39	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,1
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

/ANEXO D

REVISÃO
00

PÁGINA
16 / 17

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 1/11

SUMÁRIO

1. OBJETIVO	1
2. CAMPO DE APLICAÇÃO.....	1
3. REFERÊNCIAS.....	1
3.1 Normativas.....	1
3.2 Cruzadas	2
4. DEFINIÇÕES E SIGLAS	2
5. PROCEDIMENTO	2
5.1 Equipamentos	2
5.2 Materiais	2
5.3 Meios de cultura	2
5.4 Soluções e reagentes	3
5.5 Microrganismo de referência	3
6. Condições específicas	3
6.1 Recepção e estocagem no laboratório	3
6.2- Enxaguadura da amostra	3

1. OBJETIVO

Estabelecer as condições e procedimentos para a detecção de *Enterococcus* sp em carcaças congeladas de frango.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se ao Programa Nacional de Monitoramento de Enterococos em carcaças congeladas de frango (IAL/ANVISA) e visa uniformizar as metodologias de análise para os laboratórios participantes.

3. REFERÊNCIAS

3.1 - Normativas

Hartman. P. A.; Deibel, R.H.; Sieverding. M. Enterococci. n: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Ed. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), 2001. cap. 9, p. 83-87.

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		
REVISÃO		
APROVAÇÃO		

CÓPIA NÃO CONTROLADA

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 2/11

3.2 - Cruzadas

Anexo 1 - Meios de cultura para detecção de Enterococos em carcaças congeladas de frango

Anexo 2 – Soluções e reagentes para detecção de Enterococos em carcaças congeladas de frango

4. DEFINIÇÕES E SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collection

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

IAL – Instituto Adolfo Lutz

5. PROCEDIMENTO

5.1 - Equipamentos

- a) balança com capacidade para 3.000 g e sensibilidade de 0,01g;
- b) estufa bacteriológica a 35°C ± 2°C;
- c) banho-maria a 45°C ± 0,2°C.

5.2 - Materiais

- a) placas de Petri;
- b) pipetas graduadas de 1, 5, 10 e 25 mL;
- c) tubos de ensaio 16 X 160 mm;
- d) tubos de ensaio de 12 X 120 mm;
- e) erlenmeyer com capacidade de 4.000 mL;
- f) erlenmeyer com capacidade de 300 mL;
- g) saco plástico esterilizado com capacidade de 3k ;
- h) papel indicador de pH;
- i) algodão;
- j) alça e agulha de níquel cromo número 25 (diâmetro de 3 mm);
- k) lâminas de vidro.

Nota: Esterilizar os materiais em forno Pasteur a 170°C durante 2 horas.

5.3 - Meios de cultura (Anexo - 1)

- a) água peptonada 1% (APT);
- b) ágar bile esculina;
- c) caldo Enterococcosel;
- d) caldo Enterococcosel com vancomicina (6µg/ml);
- e) ágar Enterococcosel;
- f) ágar Enterococcosel com vancomicina (6µg/ml);

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 3/11

- g) caldo infusão Cérebro Coração (BHI);
- h) caldo BHI contendo 6,5 % de NaCl.

5.4 - Soluções e reagentes (Anexo-2)

- a) peróxido de hidrogênio a 3%;
- b) reagentes para coloração de Gram;
- c) ácido clorídrico 1 N;
- d) hidróxido de sódio 1 N;
- e) solução de vancomicina;
- f) reagentes para a coloração de Gram.

5.5 - Microrganismo de referência

- a) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- b) *S. aureus* ATCC - 25923

6. Condições específicas

As amostras são coletadas pela Vigilância Sanitária, acondicionadas e enviadas em caixas isotérmicas ao laboratório, no menor período de tempo possível.

Cada termo de coleta corresponde a cinco unidades do produto de uma única marca comercial. As cinco unidades devem apresentar a mesma data de embalagem e/ou data de vencimento do produto.

Proceder a pesquisa de Enterococos nas 5 unidades da amostra.

6.1 - Recepção e estocagem no laboratório

Observar o aspecto geral das amostras. Verificar se as mesmas encontram-se congeladas e se todas as unidades apresentam a mesma data de embalagem e/ou vencimento da validade.

Manter as amostras congeladas no laboratório. Proceder o descongelamento das mesmas na embalagem original durante 18 horas no refrigerador.

6.2 - Enxaguadura da amostra

Proceder a limpeza da superfície externa da embalagem utilizando algodão embebido em álcool 70%. Transferir a amostra para saco plástico estéril.

Desprezar os miúdos de frango. Pesar a amostra e adicionar para cada 1 g do frango 1 mL do APT. Fazer a enxaguadura, cuidadosamente, em toda a superfície

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 4/11

do frango de maneira uniforme. Transferir o caldo de enxaguadura para erlemeyer de 4.000 mL.

Deixar em repouso durante 60 minutos à temperatura ambiente. Verificar o pH do homogeneizado com papel indicador. Se necessário, ajustar o pH para $6,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ utilizando ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N.

Nota: Cada 1 mL do caldo de enxaguadura corresponde a 1 g da amostra.

6.3 - Detecção de Enterococos

Retirar duas alíquotas de 25 mL do caldo APT e transferi-las cada uma para um frasco contendo 225 mL de caldo Enterococcosel e para um frasco de caldo Enterococcosel com vancomicina ($6\mu\text{g/ml}$). Incubar a 35°C por até 48h.

6.3.2 - Análise Confirmatória

Se houver enegrecimento do meio Enterococcosel sem vancomicina, repicar uma alçada, utilizando a técnica de sementeira por esgotamento, em uma placa de ágar Enterococcosel sem vancomicina. O mesmo procedimento deve ser realizado quando houver crescimento no caldo acrescido de vancomicina, sendo repicada uma alçada para uma placa de ágar Enterococcosel com vancomicina. Incubar a 35°C -24h.

6.3.3 - Seleção das colônias

Observar as placas de cada meio seletivo que contenham colônias típicas de *Enterococcus* sp, colônias com halo enegrecido devido a hidrólise da esculina. Selecionar duas colônias de cada meio, sem e com vancomicina e, repicar em caldo BHI. Incubar a $35^{\circ}\text{C}/18\text{-}24\text{h}$ e proceder aos seguintes testes:

- Coloração de Gram. Preparar esfregaço a partir de caldo BHI. Os enterococos são cocos Gram positivos alongados, arranjados em pares ou pequenas cadeias.
- Teste de crescimento na presença de bile e hidrólise da esculina. Semear uma alçada de cultura em um tubo de ágar bile esculina e incubar a $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. Crescimento indica resistência à bile e escurecimento do ágar indica hidrólise da esculina. Os enterococos crescem na presença de bile e hidrolisam a esculina.
- Teste de crescimento em 6,5% de NaCl. Semear uma alçada de cultura em caldo BHI contendo 6,5% de NaCl e incubar a $35^{\circ}\text{C}/72\text{h}$. A maioria dos enterococos cresce em 6,5% de NaCl.

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 5/11

- Teste de crescimento a 45°C. Semear uma alçada de cultura em caldo BHI e incubar a 45°C/72h. Todos os enterococos crescem a 45°C.
- Teste de catalase. Adicionar em caldo BHI, 1 mL de peróxido de hidrogênio 3% e observar produção de bolhas de gás (teste positivo) ou não (teste negativo). Os enterococos apresentam reação negativa para o teste da catalase.

Nota: Todas as etapas dos testes devem ser realizadas em paralelo com a cepa de referência.

6.3.4 - Avaliação de resistência antimicrobiana

As colônias identificadas como *Enterococcus* sp, devem ser enviadas para o Instituto Adolfo Lutz – Seção de Bacteriologia - A/C da Dra Rosemeire Zanella para avaliação de resistência antimicrobiana, no endereço:

Seção de Bacteriologia
 Av. Dr Arnaldo, 351, 9º andar
 CEP: 01246-902
 Cerqueira César
 São Paulo - Capital

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 6/11

ANEXO 1

MEIOS DE CULTURA

ÁGUA PEPTONADA TAMPONADA 1% (APT)

Peptona	10,0g
NaCl	5,0g
Fosfato dissódico (Na ₂ H PO ₄)	3,5g
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	1,5g
Água destilada	1 litro

Preparação: dissolver os ingrediente, ajustar o Ph 7,2 +/- 0,2 e esterilizar a 121°C/15minutos.

ÁGAR BILE ESCULINA

Extrato de carne	3,0g
Peptona	5,0g
Sais biliares	40,0g
Esculina	1,0g
Citrato férrico	0,5g
□gar	15,0g
Água destilada	1 litro
Ph final: 6,6.	

Preparação dissolver os ingredientes, ajustar o Ph e aquecer até a completa fusão do □gar. Distribuir em tubos de 12 x 120 mm, esterilizar a 121°C/15 min e inclinar.

CALDO ENTEROCOCCOSEL

Caseína (digestão pancreática)	17,0g
Peptídeo	3,0g
Extrato de levedura	5,0g
Oxagal	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Citrato de sódio	1,0g
Esculina	1,0g
Citrato de ferro amoniacal	0,5g
Azida sódica	0,25g
Água destilada	1 litro

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 7/11

Preparação: Dissolver os ingredientes, ajustar o Ph 7,1+/- 0,2 e esterilizar a 121°C/15min.

ÁGAR ENTEROCOCCOSEL

□gar

Caseína (digestão pancreática)	17,0g
Peptídeo	3,0g
Extrato de levedura	5,0g
Oxagal	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Citrato de sódio	1,0g
Esculina	1,0g
Citrato de ferro amoniacal	0,5g
Azida sódica	0,25g
Água destilada	1 litro

Preparação: Dissolver os ingredientes, ajustar o Ph 7,1+/- 0,2 e esterilizar a 121°C/15min. Distribuir em placas de Petri estéreis e identificar o meio de cultura na placa. Manter em geladeira por no máximo 15 dias.

CALDO ENTEROCOCCOSEL COM VANCOMICINA (6 µg/ml)

Adicionar em 225 ml do caldo 0,54 ml de vancomicina preparada na concentração de 2.500 µg/ml. Homogeneizar o meio de cultura.

Nota: adicionar a solução de vancomicina, no meio de cultura, somente no dia que será feita a pesquisa de Enterococo na carcaça do frango.

ÁGAR ENTEROCOCCOSEL COM VANCOMICINA (6 µg/ml)

Preparar 150 ml da base e quando o □gar atingir a temperatura de 40-45°C, adicionar 0,4 ml de vancomicina preparada na concentração de 2.500 µg/ml. Homogeneizar o meio de cultura e distribuir em placas de Petri estéreis e identificar o meio de cultura na placa.

Nota: preparar o meio de cultura próximo a data de uso e mantê-lo sempre em geladeira por no máximo 15 dias e embrulhado para evitar ressecamento.

CALDO INFUSÃO CÉREBRO CORAÇÃO (BHI)

Infusão de cérebro de bezerro 200,0g

CÓPIA NÃO CONTROLADA

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 8/11

Infusão de coração de boi	250,0g
Proteose peptona	10,0g
Dextrose	2,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5g
Água destilada	1 litro

Preparação: Dissolver os ingredientes, ajustar o Ph 7,4 distribuir 90 MI em frascos de 250 MI de capacidade e esterilizar a 121°C/15min.

CALDO INFUSÃO CÉREBRO CORAÇÃO (BHI) com 6,5% de NaCl

Infusão de cérebro de bezerro	200,0g
Infusão de coração de boi	250,0g
Proteose peptona	10,0g
Dextrose	2,0g
Cloreto de sódio	65,0g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5g
Água destilada	1 litro

Preparação: Pesar 37,0g do meio desidratado “Brain Heart Infusion Broth”, acrescentar 65g de NaCl e 1 litro de água fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até completa dissolução do meio. Distribuir 5 MI em tubos de 12 mm x 120mm. Esterilizar a 121°C/15min.

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 9/11

ANEXO 2

SOLUÇÕES E REAGENTES

ÁCIDO CLORÍDRICO 1N

Ácido clorídrico concentrado	89 mL
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min. Estocar à temperatura ambiente.

HIDRÓXIDO DE SÓDIO 1N

Hidróxido de sódio	40g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min. Estocar à temperatura ambiente.

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 3%

Peróxido de hidrogênio 30%	3,0 mL
Água destilada	completar para 100 mL

Preparação: dissolver a água oxigenada 30% em água destilada, completando o volume para 100 mL. **Cuidado!** O peróxido de hidrogênio a 30% pode provocar queimaduras dolorosas, devendo ser manuseado com luvas e óculos protetores. Em caso de respingos na pele, lavar com etanol 70% em abundância. Não lavar com água.

REAGENTES PARA COLORAÇÃO DE GRAM

SOLUÇÃO DE CRISTAL VIOLETA DE HUCKER

Solução A	
Cristal violeta (90% pureza)	2,0g
Etanol 95%	20,0 mL

Solução B	
Oxalato de amônio monohidratado	0,2g
Água destilada	20,0 mL

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 10/11

Misturar as soluções A e B, deixar em repouso por 24h e filtrar em papel de filtro comum. Estocar em frasco escuro.

SOLUÇÃO DE IODO (LUGOL)

Iodo	1,0g
Iodeto de potássio (KI)	2,0g
Água destilada	300 mL

Colocar o iodeto de potássio num almofariz, adicionar o iodo e homogeneizar com pistilo. Adicionar, porções de 1 mL, 5 mL e 10 mL de água destilada, homogeneizando a solução após cada adição. Em seguida, transferir a solução para um frasco escuro, lavando o almofariz e o pistilo com o restante da água destilada.

SOLUÇÃO DE SAFRANINA

Safranina O	0,25g
Etanol 95%	10,0 mL
Água destilada	100,0 mL

Dissolver a safranina no álcool e adicionar a solução resultante aos 100 mL de água destilada. Estocar em frasco escuro.

SOLUÇÃO DE VANCOMICINA

Preparar a solução de vancomicina, distribuir em alíquotas para uso e manter em freezer -20°C por até 6 meses. Descongelar somente a alíquota para o uso e a sobra deve ser desprezada.

Nota: importante verificar antes do uso a potência do antibiótico, que varia a cada lote de purificação.

Cálculo para preparo da solução

Exemplo: Sigma : V-2002 Potência : 1.132 µg/mg
Cálculo usando a fórmula : Volume x [] µg/ml

$$\text{Peso} = \frac{\text{Volume} \times \text{Potência}}{\text{Potência}}$$

$$\text{Peso} = \frac{50 \text{ ml} \times 2.500 \text{ µg/ml}}{1132 \text{ µg/ml}} = \frac{125.000 \text{ µg}}{1132 \text{ µg/mg}} = 110,42 \text{ mg} = \mathbf{0,11 \text{ g/ 50 ml de H}_2\text{O d estéril}}$$

Preparo das alíquotas

CÓPIA NÃO CONTROLADA

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO	Número
		Revisão
PALAVRA CHAVE:	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 11/11

Preparar alíquotas de 0,7 ml para serem utilizadas tanto para o preparo do caldo Enterococcosel como para o preparo das placas de ágar.

	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	TÍTULO MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	PÁGINA 1/6

SUMÁRIO

1. OBJETIVO	1
2. CAMPO DE APLICAÇÃO:.....	1
3. REFERÊNCIAS:.....	1
3.1 Normativas.....	1
3.2 Complementares:.....	1
3.3 Cruzadas:.....	1
4. DEFINIÇÕES E SIGLAS	2
5. PROCEDIMENTO	2
5.1 Equipamentos, vidraria, material.....	2
5.2 Meios de Cultura	2
5.3 Procedimento.....	2

1. OBJETIVO

Estabelecer as condições e procedimentos para a manutenção de cepas de *Enterococcus* sp no laboratório até o envio para o laboratório de referência.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO:

Aplica-se ao Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (IAL / ANVISA) e visa uniformizar as metodologias de análise para os laboratórios participantes.

3. REFERÊNCIAS:

3.1 Normativas

Não se aplica

3.2 Complementares:

Facklan, R.R.; Sahm, D.F.; Teixeira, M.M. *Enterococcus*. In Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, F.V.; Tenover, F.V.; Tenover, F.V.; Tenover, F.V.; Tenover, F.V.; Tenover, F.V.; Tenover, F.V. (ed). Manual of Clinical Microbiology, 7th edition. American Society for Microbiology, Washington, 199: p297-305.

3.3 Cruzadas:

POP: Detecção de Enterococos em Carcaças Congeladas de Frango

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA

	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	TÍTULO MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	PÁGINA 2/6

Anexo - 1- Meios de cultura para detecção de Enterococos em Carcaça de Frango

4. DEFINIÇÕES E SIGLAS

IAL – Instituto Adolfo Lutz

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI – Brain heart infusion (infusão de cérebro e coração)

cepa – cultura pura do crescimento bacteriano.

5. PROCEDIMENTO

5.1 Equipamentos, vidraria, material

- a) placa de Petri;
- b) erlemeyer com capacidade de 500ml;
- c) tubos de 16 x 160 mm;
- d) estufa bacteriológica a 35°C +/- 2°C;
- e) swab estéril, com haste flexível e embalados individualmente;
- f) pipetas graduadas de 5, 10 e 25ml;
- g) geladeira;
- h) tubos criogênicos de 2,0 ml estéreis

nota: todo o material deve ser esterilizado em forno Pasteur a 170°C / 2 horas.

5.2 Meios de Cultura

- a) ágar BHI
- b) meio de Amies sem carvão (meio de transporte)

5.3 Procedimento

A partir da análise confirmatória de *Enterococcus* das amostras de frango, proceder a manutenção das cepas para o envio ao laboratório de referência.

5.3.1. Manutenção da cepa.

Após obtenção do resultado da análise confirmatória do gênero Enterococos, selecionar 2 colônias isoladas do ágar Enterococcosel sem vancomicina e 2

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA

	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	TÍTULO MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	PÁGINA 3/6

colônias do ágar com vancomicina, para serem encaminhadas para o Laboratório de Referência. A partir do crescimento obtido em ágar bile-esculina, fazer um repique da cepa em tubo de ágar BHI e após o período de incubação a 35-36°C por 18-24hs. Manter a cepa corretamente identificada em geladeira até o encaminhamento para o laboratório de referência. Não exceder 1 mês.

Nota: identificar corretamente as colônias isoladas do ágar Enterococcosel sem e com vancomicina.

5.3.2. Preparo da cepa para encaminhamento ao Laboratório de Referência. A partir do tubo de ágar BHI semear a cepa, com swab, em placa de ágar BHI e incubar a 35-36°C por 18-24hs. Coletar todo o crescimento com auxílio de um swab e introduzi-lo no meio Amies, quebrar ou cortar a haste do swab que fica para fora do tubo, fechar, vedar e identificar adequadamente cada cepa no próprio tubo. Manter o tubo pronto em temperatura ambiente até o envio para o Laboratório de Referência, este período não deve ultrapassar 3 dias. Encaminhar a cepa segundo o PSMIB2-01 – TRANSPORTE DE SUBSTÂNCIAS INFECCIOSAS PARA O LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA.

ANEXO A

ANEXO A

MEIOS DE CULTURA

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA

	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	TÍTULO MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	PÁGINA 4/6

ÁGAR BHI (INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO)

Meio Base:

Infusão de cérebro	200 g
Infusão de coração	250 g
Proteose Peptona	10 g
Bacto dextrose	2 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato di-básico de sódio	2,5 g
Ágar	15 g
Água destilada	1L
pH final 7,4 +/- 0,2 á 25°C	

Preparar a base conforme instrução do fabricante. Autoclavar 15 minutos/121°C.

Dispensar em tubos de 16x160 mm o volume de 10 ml e manter o tubo deitado e inclinado até sua solidificação e preparar placas com aproximadamente 20 ml de meio de cultura.

Fazer controle de esterilidade, incubando por 24 e 48hs a 37°C. Rotular e datar. Estocar a 4°C, devidamente armazenado.

Validade de aproximadamente 15 dias.

/ANEXO A - Cont.

ANEXO A - Cont.

MEIO AMIES SEM CARVÃO PARA TRANSPORTE DE CEPA

Meio base:

Cloreto de sódio 3g

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA

	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	TÍTULO MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	PÁGINA 5/6

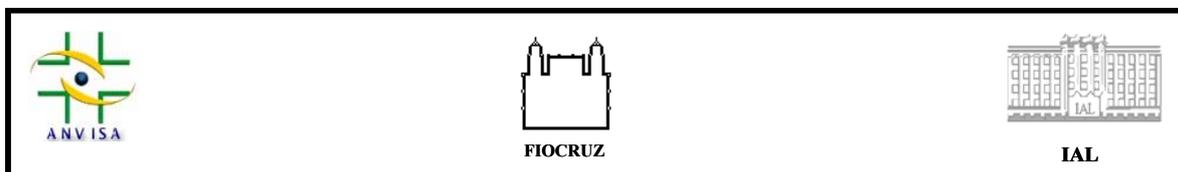
Cloreto de potássio	0,2g
Cloreto de cálcio	0,1g
Cloreto de magnésio	0,1g
Fosfato monobásico de potássio	0,2g
Fosfato di-básico de sódio	1,15g
Tioglicolato de sódio	1g
Bacto ágar	7,5g
Água destilada	1 L
pH final 7,3 +/- 0,1 a 25°C	

Preparar a base conforme instrução do fabricante. Autoclavar 15 minutos/121°C.

Dispensar 1,5 ml do meio nos tubos criogênicos, tampar e manter o tubo em pé até sua solidificação. Fazer controle de esterilidade, incubando por 24 e 48hs a 37°C. Rotular e datar.

Estocar a 4°C, devidamente armazenado por 30 dias.

ANEXO B



ANEXO B

PROGRAMA NACIONAL DE MONITORAMENTO DA PREVALÊNCIA E DA RESISTÊNCIA BACTERIANA EM
FRANGO

Formulário para o envio dos isolados de *Enterococcus* sp

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA



INSTITUTO ADOLFO LUTZ
REGISTRO DA QUALIDADE



NÚMERO

ASMI5-01

TÍTULO

**MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCCO
PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE
REFERÊNCIA**

REVISÃO

01

PÁGINA

6/6

Laboratório:

Estado:

Responsável:

Rubrica:

No da amostra do LACEN	Número do Laudo	Unidade da amostra	Número do isolado do LACEN	Meio de isolamento	Identificação (preenchido pelo Lab. de Referência)	Observações
		A	E Aa	sem Vancomicina		
			E Ab	sem Vancomicina		
			E Ac	com Vancomicina		
			E Ad	com Vancomicina		
		B	E Ba	sem Vancomicina		
			E Bb	sem Vancomicina		
			E Bc	com Vancomicina		
			E Bd	com Vancomicina		
		C	E Ca	sem Vancomicina		
			E Cb	sem Vancomicina		
			E Cc	com Vancomicina		
			E Cd	com Vancomicina		
		D	E Da	sem Vancomicina		
			E Db	sem Vancomicina		
			E Dc	com Vancomicina		
			E Dd	com Vancomicina		
		E	E Ea	sem Vancomicina		
			E Eb	sem Vancomicina		
			E Ec	com Vancomicina		
			E Ed	com Vancomicina		

A ser preenchido pelo Laboratório de Referência

Data:

Assinatura do responsável:

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA

ASMI5-01



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ



TÍTULO:	Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)	Número PSMIB2-01 -
		Revisão 00
PALAVRAS-CHAVE:	Transporte, Material infeccioso	Página 1/5

SUMÁRIO

1. OBJETIVO:	1
2. CAMPO DE APLICAÇÃO	1
3. REFERÊNCIAS	1
3.1 Normativas	1
3.2 Complementares	2
3.3 Cruzadas:	2
4. DEFINIÇÕES E SIGLAS	2
5. PROCEDIMENTO:	2
5.1 Equipamentos	2
5.2 Procedimento:	3
5.3. Formulários e documentos para remessa	4

CONTROLE DAS ALTERAÇÕES:

1. OBJETIVO:

Estabelecer as condições e procedimentos para o transporte de material biológico para o Laboratório de Referência.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se ao Programa Nacional de Monitoramento de *Enterococcus* em carcaças congeladas de frango (IAL/ANVISA) e visa uniformizar as metodologias que serão empregadas pelos laboratórios participantes.

3. REFERÊNCIAS

3.1 Normativas

	DATA	NOME	ASSINATURA
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella	
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle	
APROVAÇÃO			

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA

TÍTULO:	Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)	Número PSMIB2-01 -
		Revisão 00
PALAVRAS - CHAVE:	Transporte, Material infeccioso	Página 2/5

3.2 Complementares

Guia para transporte seguro de substâncias infecciosas e material de diagnóstico da OMS (WHO/EMC/97.3)

Regulamento de cargas perigosas (IATA seção 5, instrução 602 e 650)

Portaria nº 1985, de 25 de outubro de 2001- Regulamento técnico para o transporte de substâncias infecciosas e amostras para o diagnóstico, no MERCOSUL.

Recomendações do Comitê de Especialistas das Nações Unidas para o Transporte de Artigos Perigosos.

Portaria N° 271E/SPL, de 1° de julho de 1998.

3.3 Cruzadas:

PSMIB2-02 – Manutenção de cepa de *Enterococcus* isolada de carcaça de frango para encaminhamento ao Laboratório de Referência.

4. DEFINIÇÕES E SIGLAS

IAL - Instituto Adolfo Lutz

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IATA - International Air Transport Association

OMS – Organização Mundial da Saúde

Substâncias infecciosas: São aquelas que contêm microorganismos viáveis, tais como bactérias, rickettsias, vírus, parasitas, fungos ou um microorganismo recombinante, híbrido ou mutante que sabidamente ou com probabilidade razoável é capaz de provocar doenças no homem e nos animais, segundo WHI/EMC/97.3.

Amostra para diagnóstico: Definida como qualquer material humano ou animal que incluem, porém não se limitam a: excrementos, secreções, sangue e seus derivados, tecidos e líquidos orgânicos, e que são coletados para fins de diagnósticos: se excluem os animais infectados vivos.

Laboratórios de Referência: Os Laboratórios que receberão as amostras biológicas para análises.

5. PROCEDIMENTO:

5.1 Equipamentos.

Caixa para transporte de substâncias infecciosas de acordo com: “Guia para transporte seguro de substâncias infecciosas e material de diagnóstico da OMS”.

TÍTULO:	Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)	Número PSMIB2-01 -
		Revisão 00
PALAVRAS - CHAVE:	Transporte, Material infeccioso	Página 3/5

5.2 Procedimento:

As amostras acondicionadas e identificadas deverão ser embaladas em caixas específicas para transporte de amostras biológicas, segundo: “Guia para transporte seguro de substâncias infecciosas e material de diagnóstico da OMS” (WHO/EMC/97.3) e “Regulamento de cargas perigosas” (IATA seção 5, instrução 602 e 650).

O encaminhamento das amostras deve ser feito de forma segura e eficaz e no menor espaço de tempo para a entrega aos Laboratórios de Referência.

Laboratório de Referência para *Salmonella*:

Dalia dos P. Rodrigues
Laboratório de Enterobactérias
Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ
Av. Brasil, 4365 - Pav. Rocha Lima - 3o. andar
Manguinhos- Rio de Janeiro -RJ
CEP: 21.045-900
Tel # 0 xx 21 2598-4277 R 316
Fax # 0 xx 21 2270-1599 R 331

Laboratório de Referência para *Enterococcus*:

Instituto Adolfo Lutz
Avenida Dr Arnaldo, 355 / 9º andar – Cerqueira Cezar
CEP: 01246-902 – São Paulo – SP
Tel.: (xx11) 3068-2894
Fax: (xx11) 3085-3505
Contato: Dra Rosemeire Zanella
email: cobo@ial.sp.gov.br

5.2.1. Responsabilidades do procedimento:

O transporte de substâncias infecciosas e amostras biológicas para análise em laboratórios habilitados pelos Ministérios da Saúde, estabelece responsabilidades para o remetente e o destinatário.

TÍTULO:	Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)	Número PSMIB2-01 -
		Revisão 00
PALAVRAS - CHAVE:	Transporte, Material infeccioso	Página 4/5

Do Remetente:

- Com antecedência contatar com o destinatário (laboratório) para as providências necessárias para o recebimento e processamento das amostras.
- O envio será acertado através do transporte mais adequado.
- O envio deverá ser feito pela rota mais direta e evitando sua chegada nos finais de semana e feriados no destino.
- Embalar e identificar a substância infecciosa ou a amostra biológica para análise laboratorial, seguindo padrões de biossegurança estabelecidas nas “Recomendações do Comitê de Especialistas das Nações Unidas para o Transporte de Artigos Perigosos”.

Do destinatário:

- Notificar imediatamente ao remetente a chegada do material enviado.

5.2.2. Embalagem e rótulo

Deverá ser realizado de acordo ao prescrito no documento:

“ DANGEROUS GOODS REGULATIONS” 40 th Edition – 1 January 1999.
International Air Transport Association (I.A.T.A.) Section 5 – Packing – Instruction N° 602 y N° 650.

5.3. Formulários e documentos para remessa

As remessas de substâncias infecciosas e/ou biológicas para análise laboratorial entre serviços de saúde, pesquisas e profissionais de saúde, devem ser acompanhada da declaração de transporte de carga perigosa impressa em duas vias e em papel timbrado da instituição remetente, conforme modelo.



INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE			
NÚMERO	TÍTULO	REVISÃO	PÁGINA
	Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)	01	5/5

ANEXO A

EXEMPLO

PAPEL TIMBRADO

São Paulo, 31 de julho de 2000

DECLARAÇÃO

Ao Correio - **Nome da cidade**

Destinatário:

Dra. Rosemeire Cobo Zanella
Bacteriologia
Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo 351
São Paulo, SP CEP: 01246 – 902

Remetente:

Dr. Fulano de Tal
Laboratório Central do Estado XXXX
Endereço Completo

Declaramos que estamos enviando material biológico, **não comerciável**, não explosivo e não volátil para complementação científica necessária no Serviço de Saúde Pública, sendo de uso exclusivo de pesquisa.

Trata-se de bactéria acondicionada em meio de transporte específico e contido em **XX** frascos devidamente fechados e acondicionados.

A embalagem contendo os frascos não deve ser aberta a fim de se evitar que se quebre e ocorra perda do material.

Atenciosamente,

Nome do responsável - No do CRBM/ CRB/ CRF
Encarregada Setor Técnico
Seção de Bacteriologia
Lacen XXXXX

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ



Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima - Manguinhos - RJ - CEP 21.045-900
TEL # 0 XX 21 2598-4277 / 2270-1590 R 316 FAX # 0 XX 21 2270-1599 R 331

Procedimentos Operacionais Padrão Laboratório de Enterobactérias

TITULO DA ATIVIDADE: Encaminhamento das cepas de *Salmonella* spp, para caracterização antigênica e avaliação da suscetibilidade antimicrobiana

1. OBJETIVO

Estabelecer as condições e procedimento para o transporte das cepas de *Salmonella* sp. para o LABENT - IOC - FIOCRUZ – Laboratório de Referência em *Salmonella* sp.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se ao Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência da Resistência Bacteriana em Frango.

3. NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA COM RECOMENDAÇÕES PARA A ATIVIDADE

Nível de Biossegurança 2, na etapa de semeadura das cepas em Agar tamponado.

4. DEFINIÇÕES E SIGLAS

LABENT- Laboratório de Enterobactérias

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IATA – International Air Transport Association

OMS – Organização Mundial de Saúde

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

LABENT

Instituto Oswaldo Cruz
Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima- Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
Tel # 0XX 21 2598-4277/ 1590 R316 FAX # 0XX 21 2270 1599 R331

5. CONDIÇÕES GERAIS

5.1) Material e Equipamentos

- a) tubos de poliestireno com capacidade de 2 mL;
- b) caixas para transporte de material para diagnóstico laboratorial, OMS/IATA;
- c) estufa bacteriológica a 30-35°C.

5.2) Meio de cultura (Anexo A)

- a) Ágar nutriente tamponado.

6. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

Os isolados obtidos através da metodologia descrita no POP (65.3210.044) - “Pesquisa e Contagem de *Salmonella* sp em Carcaças Congeladas de Frango” (INCQS / FIOCRUZ), devem ser encaminhados ao LABENT - IOC - FIOCRUZ – Laboratório de Referência para *Salmonella* sp, através dos procedimentos estabelecidos neste POP.

A cepa identificada presuntivamente como *Salmonella* spp., não deverá ser submetida a sub-cultivos.

Não utilizar meios de cultura que contenham carboidratos.

6.1 - Semeadura no meio de transporte

Semear cada uma das cepas identificadas em um tubo de poliestireno contendo 1,5 mL de ágar nutriente tamponado, efetivando duas a três picadas em profundidade e estriamento em superfície.

Incubar a 37°C por 18-24 horas.

Após este período manter em temperatura ambiente, ao abrigo da luz solar.

Identificar o tubo de acordo com “Formulário para o Envio dos Isolados de *Salmonella* sp”, em anexo.

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

LABENT

Instituto Oswaldo Cruz
Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil,, 4365 – Pav Rocha Lima- Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
Tel # 0XX 21 2598-4277/ 1590 R316 FAX # 0XX 21 2270 1599 R331

6.2 - Controle de qualidade interno (cepas padrão)

Deverá ser efetivado no meio de cultura utilizado, empregando cepa de *Salmonella* spp., visando garantir a qualidade dos resultados presuntivos efetivados

6.3 - Preparo do isolado para encaminhamento ao Laboratório de Referência

O encaminhamento das cepas deverá ser efetivado, com o máximo de intervalo, mensalmente.

Os isolados devidamente acondicionados e identificados deverão ser embalados em caixas específicas para o transporte de cepas para diagnóstico laboratorial, de acordo: “Guia para transporte seguro de substâncias infecciosas e materiais de diagnóstico da OMS” (WHO/EMC/97.3) e “Regulamento de cargas perigosas” (IATA seção 5, instrução 602 e 650) e Espécimes para diagnóstico devem ser assinaladas com o código IATA UN 3373.

6.4 - Detalhes do processamento

Todos os isolados deverão possuir identificação, compatível com o “Formulário para o Envio dos Isolados de *Salmonella* sp”, encaminhado em anexo.

7 – RESPONSABILIDADE DO PROCEDIMENTO

O transporte de substâncias infecciosas em laboratórios habilitados pelo Ministério da Saúde, estabelece responsabilidade para o remetente e o destinatário.

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

LABENT

Instituto Oswaldo Cruz
Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima- Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
Tel # 0XX 21 2598-4277/ 1590 R316 FAX # 0XX 21 2270 1599 R331

Do remetente:

- Com antecedência contactar com o destinatário (laboratório) para as providências necessárias para o recebimento e processamento das amostras.
- O envio deverá ser efetivado mensalmente através do transporte mais adequado, na região.
- O envio deverá ser feito pela a rota mais direta e evitando sua chegada nos finais de semana e feriados no destino.
- Embalar e identificar a substância infecciosa ou amostra biológica para análise laboratorial, seguindo padrões de Biossegurança estabelecidas nas “Recomendações do Comitê de Especialistas das Nações Unidas para o Transporte de Artigos Perigosos”.

Do destinatário:

- Notificar imediatamente ao remetente a chegada do material enviado.

8. SOLUÇÃO DE POSSÍVEIS PROBLEMAS

Caso não ocorra o crescimento no meio a ser empregado para manutenção e envio das cepas, repetir o procedimento de repique a partir do meio original de crescimento.

A empresa de transporte precisa entrar em contato com o remetente e o destinatário, além de informar as autoridades de saúde pública toda vez que uma remessa contendo substâncias infecciosas for danificada durante o transporte.

9. EMBALAGENS E RÓTULO

Deverá ser realizado de acordo ao prescrito no documento: “DANGEROUS GOODS REGULATIONS” 40th Edition – 1 January 1999. International Air Transport Association (IATA); Section5 – Packing - Instruction N° 602 y N° 650, as quais devem apresentar as seguintes informações:

- Especificação da amostra;
- Nível de Biossegurança;
- Rótulo avisando perigo biológico;

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

LABENT

Instituto Oswaldo Cruz
Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil,, 4365 – Pav Rocha Lima- Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
Tel # 0XX 21 2598-4277/ 1590 R316 FAX # 0XX 21 2270 1599 R331

- Rótulo com o endereço do remetente e destinatário, inclusive telefone de contato.

10. FORMULÁRIOS E DOCUMENTOS PARA REMESSA

As remessas de substâncias infecciosas e/ou biológicas para análise laboratorial entre serviços de saúde, pesquisas e profissionais de saúde, devem ser acompanhadas da declaração de transportes de cargas perigosas impressa em duas vias em papel timbrado da Instituição remetente, conforme o modelo.

11. REGISTRO DE PROCESSAMENTO E RESULTADOS

Todas as cepas encaminhadas deverão conter no laboratório de origem o mesmo registro efetivado no encaminhamento.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Costa, G.A. & Hofer, E.. Isolamento e identificação de enterobactérias. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 120 pp., 1972
- Ewing, W. H.. Edward's & Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th Ed., Elsevier Sci.Publ Co. Inc. New York .536 pp.,1986.
- Grist, N.R. Manual de Biossegurança para Laboratórios. 2^a edição, Livraria Ed. Santos, pag. 48-54, 1995.
- PESQUISA e Contagem de *Salmonella* sp em Carcaças Congeladas de Frango. In : MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3210.044)

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

LABENT

Instituto Oswaldo Cruz
Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima- Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
Tel # 0XX 21 2598-4277/ 1590 R316 FAX # 0XX 21 2270 1599 R331

ANEXO A

MEIO DE CULTURA

1) Agar nutriente tamponado

Agar nutriente-----	23 g
Cloreto de sódio-----	5 g
Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)-----	2 g
Água destilada-----	1000 mL

Suspender os componentes na água destilada. Dissolver sob agitação até a total dissolução do Agar. Distribuir alíquotas de 1,5 mL em tubos de poliestireno.

Esterilizar a 121° C por 15 minutos.

Após a esterilização inclinar os tubos para a solidificação do ágar.

pH final 7,0 – 7,2

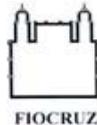
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ

LABENT

Instituto Oswaldo Cruz
Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil,, 4365 – Pav Rocha Lima- Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
Tel # 0XX 21 2598-4277/ 1590 R316 FAX # 0XX 21 2270 1599 R331



**PROGRAMA NACIONAL DE MONITORAMENTO DA PREVALÊNCIA E DA RESISTÊNCIA
BACTERIANA EM FRANGO**

Formulário para o envio de isolados de *Salmonella* sp

Laboratório:

Estado:

Responsável:

Rúbrica:

Destinatário: Laboratório de Enterobactérias – IOC/FIOCRUZ

Nº da amostra do LACEN	Número do laudo	Unidade da amostra	Número do isolado do LACEN	Caracterização Antigênica (a ser preenchido pelo Lab. de Referência)	Observações
		A	S Aa		
			S Aa		
			S Aa		
		B	S Aa		
			S Aa		
			S Aa		
		C	S Aa		
			S Aa		
			S Aa		
		D	S Aa		
			S Aa		
			S Aa		
		E	S Aa		
			S Aa		
			S Aa		

A ser preenchido pelo laboratório de referência

Data:

Assinatura do responsável:

