

Guia ilustrado para isolamento de *Salmonella* spp. de origem avícola



ISSN 0101- 6245
Dezembro, 2016

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Suínos e Aves
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 183

**Guia ilustrado para isolamento
de *Salmonella* spp. de origem
avícola**

*Sabrina Castilho Duarte
Suzana Satomi Kuchiishi
Fernanda dos Santos Almeida
Germana Vizzotto Osowski
Autores*

Embrapa Suínos e Aves
Concórdia, SC
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves

Rodovia BR 153 - KM 110

89.715-899, Concórdia-SC

Fone: (49) 3441 0400

Fax: (49) 3441 0497

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê de Publicações da Embrapa Suínos e Aves

Presidente: Marcelo Miele

Secretária: Tânia M.B. Celant

Membros: Airton Kunz

Ana Paula A. Bastos

Gilberto S. Schmidt

Gustavo J.M.M. de Lima

Monalisa L. Pereira

Suplentes: Alexandre Matthiensen

Sabrina C. Duarte

Coordenação editorial: Tânia M.B. Celant

Revisão técnica: Cátia Silene Klein e Iara Maria Trevisol

Revisão gramatical: Lucas S. Cardoso

Normalização bibliográfica: Claudia A. Arrieche

Editoração eletrônica: Vivian Fracasso

Foto da capa: Lucas S. Cardoso

1^a edição

Versão eletrônica (2016)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Suínos e Aves

Guia ilustrado para isolamento de *Salmonella* spp. de origem avícola /
Sabrina Castilho Duarte... [et al.]. - Concórdia : Embrapa Suínos e
Aves, 2016.

73 p.; 21 cm. (Documentos / Embrapa Suínos e Aves,
ISSN 01016245; 183).

1. Bacteriologia. 2. Avicultura. 3. Sanidade animal. 4. *Salmonella*.
5. Prevenção. 6. Isolamento bacteriológico. 7. Guia. I.Título. II. Série.
III. Duarte, Sabrina Castilho. IV. Kuchiishi, Suzana Satomi. V. Almeida,
Fernanda dos Santos. VI. Osowski, Germana Vizzotto.

CDD. 636.50896927

©Embrapa 2016

Autores

Sabrina Castilho Duarte

Médica-veterinária, doutora em Ciência Animal, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

Suzana Satomi Kuchiishi

Médica-veterinária, mestre em Medicina Veterinária, responsável técnica da bacteriologia do Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal (Cedisa), Concórdia, SC

Fernanda dos Santos Almeida

Médica-veterinária, doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia), auditora fiscal federal agropecuário do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), Campinas, SP

Germana Vizzotto Osowski

Acadêmica de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), bolsista do CNPq/PIBIC, Concórdia, SC

Sumário

Introdução.....	11
Envio de amostras ao laboratório.....	13
Cuidados com o envio de soro.....	14
O que coletar?.....	14
Processamento de meconíon e fezes.....	14
Ovos comerciais e ovos bicados.....	15
Processamento de ovos comerciais e ovos bicados.....	15
Processamento de órgãos.....	17
Observações de coleta.....	17
Caldo BHI.....	17
Princípio.....	17
Utilidade.....	18
Procedimentos de preparação.....	18
Incubação.....	19
Interpretação.....	19
Conservação e validade.....	19
Processamento de material da cama, suave de arrasto, de cloaca e propé.....	19
Observações de coleta.....	20

Etapa 1: Pré-enriquecimento.....	20
Objetivo.....	20
Caldo peptonado.....	20
Princípio.....	20
Procedimentos	21
Incubação.....	21
Interpretação.....	21
Conservação e validade.....	21
Observações gerais.....	21
Meio de transporte Cary e Blair.....	22
Etapa 2: Enriquecimento seletivo.....	22
Objetivo.....	22
Caldo tetratrationato.....	22
Princípio.....	22
Procedimentos.....	23
Solução de iodo.....	23
Solução de verde brilhante (VB).....	23
Incubação.....	24
Interpretação.....	24
Conservação e validade.....	24
Caldo Rappaport.....	24
Princípio.....	24
Procedimentos.....	25
Incubação.....	25
Interpretação.....	25
Conservação e validade.....	25
Etapa 3: Semeadura em placa.....	26
Objetivo.....	26
Procedimento a ser realizado.....	26
Ágar MacConkey.....	30
Princípio.....	30
Procedimentos.....	30
Inoculação.....	30
Interpretação.....	31
Conservação e validade.....	31

Ágar Hektoen.....	31
Princípio.....	31
Procedimentos.....	32
Inoculação.....	32
Interpretação.....	32
Conservação e validade.....	33
Recomendações.....	33
Ágar verde brilhante (VB).....	33
Princípio.....	33
Procedimentos.....	34
Ágar verde brilhante.....	34
Ágar verde brilhante com novobiocina.....	34
Solução de novobiocina à 4% (40 mg/mL).....	34
Inoculação.....	35
Interpretação.....	35
Conservação e validade.....	35
Ágar Rambach.....	35
Princípio.....	35
Procedimentos.....	36
Inoculação.....	36
Interpretação.....	36
Conservação e validade.....	36
Recomendações.....	36
Ágar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS).....	37
Princípio.....	37
Utilidade.....	37
Procedimentos.....	37
Inoculação.....	37
Interpretação.....	38
Conservação e validade.....	38
Recomendações.....	38
XLD.....	38
Princípio.....	38
Procedimentos.....	38
Inoculação.....	39

Interpretação.....	39
Conservação e validade.....	39
Ágar XLT4.....	39
Princípio.....	39
Procedimentos.....	40
Inoculação.....	40
Interpretação.....	40
Conservação e validade.....	40
Etapa 4: Provas bioquímicas preliminares.....	41
Objetivo.....	41
Princípio geral.....	42
Leitura para TSI e LIA.....	42
TSI – triplo açúcar ferro.....	42
Reação típica <i>Salmonella</i>	42
Procedimentos.....	42
Inoculação.....	43
Conservação e validade.....	44
LIA – Lisine Iron.....	44
Reação típica <i>Salmonella</i>	44
Procedimentos.....	44
Inoculação.....	45
Conservação e validade.....	45
SIM-Sulfato, Indol, Motilidade.....	45
Reação típica <i>Salmonella</i>	45
Procedimentos.....	46
Inoculação.....	46
Reativo de Kovacs.....	47
Conservação e validade.....	47
Ureia.....	47
Reação típica <i>Salmonella</i>	47
Procedimentos (meio líquido).....	48
Leitura para SIM e Ureia.....	48
Teste adicional útil - β -galactosidase ONPG.....	48

Etapa 4: Provas bioquímicas complementares.....	49
Teste VP e VM.....	51
Reação típica <i>Salmonella</i>	51
Procedimentos.....	52
Caldo V.M. – V.P.....	52
Solução para teste de VM.....	52
Reativos para o teste de VP.....	53
Inoculação.....	53
Conservação e validade.....	53
Citrato de Simmons.....	53
Reação típica <i>Salmonella</i>	53
Procedimentos.....	54
Citrato.....	54
TSI – Descrito na bioquímica preliminar.....	54
Urease - Descrito na bioquímica preliminar.....	55
Fenilalanina desaminase.....	55
Reação típica <i>Salmonella</i>	55
Procedimentos.....	56
Ágar fenilalanina.....	56
Solução de Cloreto Férrico à 10%.....	56
Conservação e validade.....	56
Lisina, Arginina, Ornitina (descarboxilases).....	56
Procedimento.....	57
Reação típica <i>Salmonella</i>	57
Procedimentos.....	58
Meio Lisina.....	58
Meio Arginina.....	58
Meio Ornitina.....	58
Conservação e validade.....	59
Motilidade.....	59
Malonato.....	59
Reação típica <i>Salmonella</i>	59
Procedimentos.....	60
Malonato.....	60
Conservação e validade.....	60

D- Glicose para ácido e D- Glicose para gás.....	61
Reação típica <i>Salmonella</i>	61
Glicose com Durhan.....	61
Conservação e validade.....	61
Lactose, Sacarose, D-Manitol, Dulcitol, Maltose.....	62
Reação típica <i>Salmonella</i>	62
Procedimentos.....	62
Conservação e validade.....	63
Etapa 5: Sorotipificação.....	63
Procedimento.....	63
Antissoros polivalentes de <i>Salmonella</i> "O" e "H".....	64
Interpretação.....	64
Antissoros monovalente "B" (04).....	65
Inversão de fase.....	65
Antissoros monovalente "D" (09).....	65
Confirmação de eficácia das técnicas utilizadas.....	66
Amostras positivas.....	66
Estoque em BHI ou CPT – manutenção em freezer -20°C e -70°C.....	66
Estoque em Dorset – manutenção em temperatura ambiente.....	67
Preparo do meio dorset.....	67
Procedimento.....	67
Métodos alternativos para detecção de <i>Salmonella</i>	68
Métodos moleculares.....	68
Ribotipagem automatizada.....	68
PCR.....	68
Plaqueamento em ágar semi-sólido MSRV.....	69
Referências.....	70

Guia ilustrado para isolamento de *Salmonella* spp. de origem avícola

Sabrina Castilho Duarte
Suzana Satomi Kuchiishi
Fernanda dos Santos Almeida
Germana Vizzotto Osowski

Introdução

Salmonella é uma bactéria capaz de manifestar doença clínica em animais e seres humanos. O principal nicho dos sorovares de Salmonela é o trato intestinal principalmente de animais de produção e também dos seres humanos. Também podem estar presentes no trato intestinal de pássaros, répteis e ocasionalmente de insetos, como por exemplo, em moscas presentes no sistema produtivo.

Esta bactéria tem uma capacidade notável de infectar diferentes hospedeiros e induzir diferentes quadros sintomáticos nestes hospedeiros. Atualmente esta bactéria, com base nas características genômicas e bioquímicas possui duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. Dentre estas duas espécies a *S. enterica* é a mais estudada e responsável pelos maiores quadros de infecções em animais e seres humanos. Esta espécie divide-se em: *enterica*, *salamae*, *arizonaee*, *diarizonae* e *houtenae*.

Galinhas infectadas com muitos dos sorovares de *Salmonella* podem albergar o agente e não demonstrarem sinais clínicos, ou seja, a infecção não é clinicamente perceptível. Em contrapartida, os sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* causam doença clínica na ave, mas não causam doença clínica em seres humanos. *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são imóveis e determinam Tifo e Pulorose respectivamente nas aves. Uma ave quando adquire *S. Gallinarum* apresenta uma infecção sistêmica única, enquanto ao ser infectada pelos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* apresentam uma infecção subclínica intestinal seguida de uma infecção sistêmica curta e posteriormente tornam-se portadores crônicos. O isolamento desta bactéria identificando aves portadoras é fundamental na prevenção da enfermidade em seres humanos.

Para crescer as bactérias precisam de elementos como: carbono, hidrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo e nitrogênio. Com base nessas necessidades e nos resíduos que estas bactérias geram ao se desenvolver podemos identificar no laboratório por exemplo, que determinado alimento está contaminado. Para esta identificação no caso da Salmonela, comumente utilizamos o isolamento bacteriológico clássico.

No laboratório inocula-se o material contaminado em substratos (carbohidratos e aminoácidos), que visam propiciar o desenvolvimento da bactéria a ser isolada e inibir o crescimento das que não são o foco de interesse.

Para o isolamento de *Salmonella*, geralmente utilizamos algumas etapas fundamentais para obter o isolamento (Figura 1). Este documento irá descrever detalhadamente os processos e discutir pontos chave para o sucesso no isolamento de *Salmonella* spp. com foco principalmente em produtos de origem avícola.



Figura 1. Fases do processo de isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

Envio de amostras ao laboratório

As amostras deverão estar devidamente identificadas, resfriadas (2 a 8°C) e acondicionadas em caixas isotérmicas, além de terem sido coletadas a não mais que 72 horas.

- Nos casos de impossibilidade de processamento imediato do item de ensaio, poderá ser utilizado o meio de transporte Stuart ou Cary-Blair para sua conservação por, no máximo, 72 horas.
- Quando os itens de ensaio destinados ao diagnóstico bacteriológico forem coletados por meio de suabes, os mesmos deverão ser colocados em água peptonada tamponada 1%, garantindo sua umidade até o destino.
- Todos os itens de ensaio deverão estar acompanhados de formulário de coleta devidamente preenchido, conforme modelo estabelecido pela Coordenação de Programa Sanitário Animal – DSA (acessível pelo site do PNSA - <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>).

Cuidados com o envio de soro

Para as análises sorológicas, os soros deverão estar devidamente identificados, lacrados, resfriados (2 a 8°C) e acondicionados em caixas isotérmicas, além de terem sido coletados a não mais que 48 horas. Os soros deverão ser analisados até, no máximo, 96 horas após coleta. Enviar no mínimo 0,5 mL. Não enviar para exame sorológico sangue total, soros com presença de coágulo, com evidências de contaminação ou hemolisado.

LEMBRETE: As amostras destinadas ao diagnóstico bacteriológico devem ser mantidas a temperatura de 2 a 8°C por não mais que 72 horas, até serem processadas.

O que coletar?

- **Aves vivas:** coletar suabes de cloaca, fezes frescas, material de cama ou ninho, poeira de aviário, suabe de arrasto ou propé, ovos bicados, ovos e soro sanguíneo.
- **Aves necropsiadas:** coletar baço, fígado, ovários, vesícula biliar, rins, pulmão, coração, trato gastrointestinal, articulações com lesões, conjuntiva com lesões, ceco e tonsilas cecais.

Processamento de tecido e fezes

Homogeneizar o material e semear nos meios seletivos. Serão adotados sempre três meios seletivos, sendo eles Tetracionato, Rappaport-Vassiliadis e BHI.

1. Caldo Tetracionato ou suas variações (acrescido de novobiocina, solução de iodo e solução de verde brilhante) pesar 2 g ou 2 mL em 20 mL de meio.
2. Caldo Rappaport-Vassiliadis - pesar 0,2 g ou 0,2 mL em 20 mL de meio.
3. Caldo BHI - pesar 2 g ou 2 mL em 20 mL de meio.

Os caldos Tetrathonato e Rappaport-Vassiliadis devem ser incubados a $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. O caldo BHI deverá ser incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Ovos comerciais e ovos bicados

Processamento de ovos comerciais e ovos bicados

Proceder à desinfecção da casca do ovo com álcool etílico a 70% ou álcool iodado antes de abri-lo (Figura 2). Nos casos de importação de ovos férteis, o manipulador deverá abrir as caixas de ovos dentro de cabine de segurança biológica e desinfetar com álcool 70%, se houver situação de risco sanitário submetê-los à luz UV por 15 minutos, virar os ovos, e novamente submetê-los à luz UV por 15 minutos adicionais. Procedimentos relativos a ovos importados são de realização exclusiva do Mapa.

Foto: Autor desconhecido/Acervo Embrapa



Foto: Lucas S. Cardoso/Embrapa

Figura 2. Processamento de ovos comerciais e ovos bicados.

- Em um saco tipo “stomacher” colocar o conteúdo de seis ovos. Homogeneizar (30 segundos por 2 minutos) e pipetar 10 mL do conteúdo. Homogeneizar em frasco ou saco plástico esterilizado e semear 10 mL em 100 mL de caldo BHI. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.

- Os ovos que porventura estiverem com a casca trincada não deverão ser processados.
- Os ovos bicados devem ser desinfetados da mesma forma, após retirar os pintainhos e proceder coleta de baço, fígado e ceco em *pool* (Figura 3).



Figura 3. Processamento de *pool* de órgãos.

Fotos: Lucas S. Cardoso/Embrapa

Processamento de órgãos

Homogeneizar o material e semear nos meios seletivos. Serão adotados sempre três meios seletivos, sendo eles Tetrationato, Rappaport-Vassiliadis e BHI.

1. Caldo Tetrationato ou suas variações (acrescido de novobiocina, solução de iodo e solução de verde brilhante) pesar 2 g ou 2 mL em 20 mL de meio.
2. Caldo Rappaport-Vassiliadis - pesar 0,2 g ou 0,2 mL em 20 mL de meio.
3. Caldo BHI - pesar 2 g ou 2 mL em 20 mL de meio.

Os caldos Tetrationato e Rappaport-Vassiliadis devem ser incubados a 42°C ± 1°C por 18 a 24 horas.

Observações de coleta

- A coleta de órgãos deve ser feita de forma asséptica. Muito cuidado é necessário para evitar contaminações cruzadas. Assim, sempre que coletar adicionar ao tubo de ensaio ou saco tipo "stomacher" previamente identificados de acordo com o tamanho do órgão coletado.

Caldo BHI

Princípio

- É um meio derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose (Figura 4).
- A peptona e a infusão são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas.
- A dextrose é um carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação.

Utilidade

- Meio que oferece cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos.

Procedimentos de preparação

1. Dissolver 37 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 7,4 ± 0,2.
7. Distribuir em tubos estéreis de acordo com a necessidade da técnica a ser desenvolvida, 3 mL por tubo (13 x 100 mm) ou 18 mL em tubos 20 x 150 mm.
8. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.



Foto: Lucas S. Cardoso/Embrapa

Figura 4. Incubação em caldo BHI.

Incubação

- Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas.

Interpretação

- Cor original do meio: amarelo claro, límpido.
- Positivo: presença de turvação = crescimento bacteriano.
- Negativo: ausência de turvação.

Conservação e validade

- Conservar de 2°C a 8°C por 3 meses.

Processamento de material da cama, suabe de arrasto, de cloaca e propé

Após o recebimento da amostra (Figura 5) estas devem ser submetidas a pré-enriquecimento pela adição de Água Peptonada 1% na proporção de 1:10 e incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Homogeneizar o material e semear nos meios seletivos. Serão adotados sempre três meios seletivos, sendo eles Tetrationato, Rappaport-Vassiliadis e BHI ou CPT (o CPT só é utilizado para pré enriquecimento de suabes).

1. Caldo Tetrationato ou suas variações (acrescido de novobiocina, solução de iodo e solução de verde brilhante) pesar 2 g ou 2 mL em 20 mL de meio.
2. Caldo Rappaport-Vassiliadis - pesar 0,2 g ou 0,2 mL em 20 mL de meio.
3. Caldo BHI ou CPT - pesar 2 g ou 2 mL em 20 mL de meio.

Os caldos Tetrationato e Rappaport-Vassiliadis devem ser incubados a $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. O caldo BHI ou CPT deverá ser incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.



Figura 5. Suabes de arrasto e caixas de transporte.

Observações de coleta

- Suabes de arrasto/propé devem ser coletados com luvas limpas e deve-se tomar o cuidado de amostrar de forma homogênea todos os campos da sala ou local a ser investigado. Se o calçado for previamente limpo com álcool 70°GL aguardar que o mesmo seque totalmente antes de utilizar o propé. Se o propé estiver umedecido por álcool no ato da coleta poderá inviabilizar o isolamento no laboratório.
- Caixas de transporte devem ser coletadas imediatamente após a retirada das aves.

Etapa 1: Pré-enriquecimento

Objetivo

Nesta etapa objetiva-se a recuperação das bactérias para sua plena atividade e condição. O pré-enriquecimento será feito com Caldo Peptonado (CPT).

Caldo peptonado

Princípio

- Meio líquido tamponado que mantém a bactéria viável.

Procedimentos

1. Dissolver 20 g de caldo peptonado em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Homogeneizar com auxílio de agitador magnético.
3. Verificar o pH do meio.
4. Distribuir em frascos adequados (frascos de vidro de âmbar).
5. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para $7,2 \pm 0,2$.
6. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
7. Fazer teste de esterilidade à $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.
8. Realizar teste de crescimento: qualquer bactéria.

Inoculação

- Utilizar nove vezes o peso da amostra.
- Incubar a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 12 a 18 horas.

Interpretação

- Cor original do meio: cor de palha clara.
- Positivo: presença de turvação = crescimento bacteriano.
- Negativo: ausência de turvação.

Conservação e validade

- Conservar de 2 a 8°C por até 3 meses.

Observações gerais

- Nos casos de impossibilidade de processamento imediato de qualquer item de ensaio, poderá ser utilizado o meio de transporte Stuart ou Cary Blair para sua conservação por no máximo 72 horas, desde que seja possível a coleta do material com o auxílio de um suabe.
- Deve-se homogeneizar adequadamente o item de ensaio coletado, embeber o algodão do suabe na amostra e introduzi-lo no meio de transporte imediatamente após a realização da coleta. Em seguida, quebrar a sobre da haste do suabe e fechar o tubo. Manter em temperatura ambiente ou refrigerado até o momento de semear nos meios seletivos adequados.

- Caso seja necessário proceder a necropsia, os órgãos necropsiados devem ser macerados/picotados antes de se proceder a introdução do suabe, pois a *Salmonella* spp. é um patógeno intracelular.

Meio de transporte Cary e Blair

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

1. Dissolver 12,6 g em 991 mL de água destilada ou deionizada. Esfriar a 50°C.
2. Acrescentar 9 mL de solução aquosa de cloreto de cálcio a 1%.
3. Ajustar o pH para 8,4.
4. Distribuir em tubos ou frascos estéreis.
5. Esterilizar em vapor fluente por 15 minutos.

Etapa 2: Enriquecimento seletivo

Objetivo

Inibir crescimento bacteriano de outras bactérias e aumentar a possibilidade de crescimento de *Salmonella* spp.

Para o uso do Tetrationato no momento anterior a inoculação adicionar nos tubos iodo-iodeto, verde brilhante e novobiocina.

Caldo tetrationato

Princípio

- Os sais de bile contidos no meio de tenerationato inibem microrganismos Gram positivos e a adição da solução de iodo inibe a flora intestinal normal de espécies fecais.

Procedimentos

1. Dissolver 46 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Aquecer em fogo brando até o início da ebulação.
4. Agitar frequentemente.
5. Observar se dissolveu completamente.
6. Em câmara de fluxo laminar, adicionar 19 mL da solução de iodo, 9,5 mL da solução de VB (verde brilhante) e 1,111 mL de novobiocina.
7. Homogeneizar bem.
8. Distribuir em tubos estéreis 18 mL por tubo (20 x 150 mm com rosca).
9. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.
10. Armazenar de 2-8°C (refrigerador/câmara fria).
11. Validade: 2 meses ou até que haja desidratação (10%).

Solução de iodo

Iodeto de potássio.....	250 g
Iodo.....	200 g
Água destilada.....	1000 mL

1. Macerar com Grall e pistilo o iodo e o iodeto.
2. Acrescentar a água aos poucos, ir lavando o Grall.
3. Deixar agitando em agitador magnético durante 24 horas.
4. Filtrar em papel filtro.
5. Armazenar em frasco âmbar em temperatura ambiente.
6. Validade: 12 meses.

Solução de Verde Brilhante (VB)

Corante verde brilhante.....	1 g
Água destilada.....	1000 mL

1. Macerar com Grall e pistilo o verde brilhante.
2. Acrescentar a água aos poucos, ir lavando o Grall.
3. Deixar agitando em agitador magnético durante alguns minutos.
4. Filtrar em papel filtro.
5. Armazenar em frasco âmbar em temperatura ambiente.
6. Validade: 12 meses.

Incubação

- Incubar a 42°C, 18 a 24 h.

Interpretação

- Cor original do meio: límpido com precipitado branco.
- O crescimento é indicado pela mudança de coloração do meio.

Conservação e validade

O caldo tetratrationato não deve ser armazenado. Preparar no momento do uso. Ou deixar o meio preparado sem a solução de iodo, de VB e novobiocicina e no momento do uso acrescentar as soluções.

Observação importante

**Solução de tetratrationato com iodo e iodeto de potássio
após autoclavação esta solução deverá ser inativada antes do descarte.**

Caldo Rappaport

Princípio

- O verde de malaquita é inibitório para os demais microrganismos e não para *Salmonella* spp. e o cloreto de magnésio aumenta a pressão osmótica do meio. O baixo pH do meio combinado com a presença destes dois componentes aumenta a seletividade por inibir a flora acompanhante.

Procedimentos

1. Dissolver 26,6 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 115°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 5,1 ± 0,2.
7. Distribuir 20 mL por tubo estéril (20 x 150 mm com rosca).
8. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.

Incubação

- Incubar a 42°C, 18 a 24 h.

Interpretação

- O crescimento é indicado pela turbidez do meio.
- Após incubação, semear 3 a 4 alçadas da amostra em uma placa de ágar sólido.

Conservação e validade

- Conservar de 2 a 8°C por até 3 meses.

Etapa 3: Semeadura em placa

Objetivo

Observar a característica da colônia formada no meio. Os meios também contribuem na seleção das bactérias e seu crescimento.

Procedimento a ser realizado

As amostras obtidas dos caldos de enriquecimento seletivo e não seletivo são semeadas por esgotamento nas placas. Semear em pelo menos dois dos seguintes meios seletivos indicadores para *Salmonella* spp. (ágar em placa): MacConkey (MK), Hektoen (HE), Verde Brilhante (VB), Rambach, *Salmonella Shigella* (SS), Xilose-Lisina-Desoxicólico (XLD) e Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4). Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Verificar o aspecto das colônias desenvolvidas nas placas. Características das colônias de *Salmonella*:

- Ágar MacConkey (MK): colônias incolores (Figura 6).

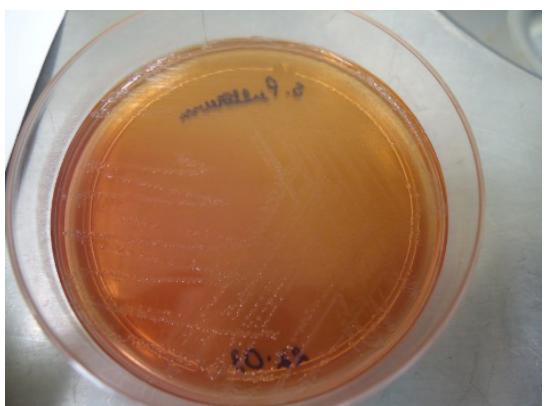


Foto: Suzana S. Kuchiishi/Cedisa

Figura 6. Colônias típicas de *Salmonella* spp. em ágar MacConkey.

- **Ágar Hektoen (HE):** Colônias verde-azuladas, com ou sem centro-negro (Figura 7). O centro escuro revela a produção de ácido sulfídrico (H^2S). *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* podem apresentar colônias sem H^2S , principalmente a *S. Pullorum*.



Foto: Germana V. Osowsky

Figura 7. Colônias típicas de *Salmonella* spp. em ágar Hecktoen.

- **Ágar Verde Brilhante (VB):** Colônias rosadas (Figura 8).



Foto:Germana V. Osowsky

Figura 8. Colônias típicas de *Salmonella* spp. em ágar Verde Brilhante.

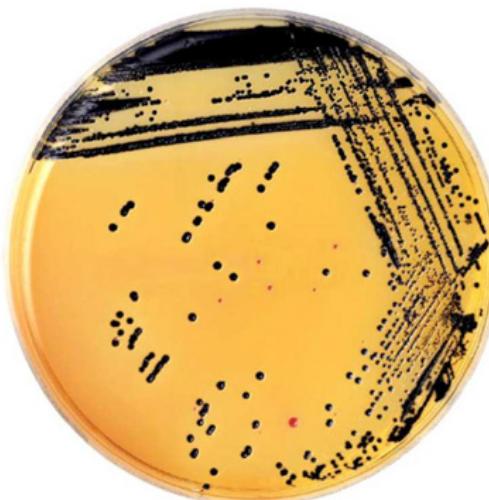
- **Ágar Rambach:** Colônias vermelho brilhantes ou tonalidade carmesin (Figura 9). *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* formam colônias incolores.



Foto: Fernanda S. Almeida/Lanagro

Figura 9. Colônias típicas de *Salmonella* spp. em ágar Rambach.

- ***Salmonella Shigella* (SS):** colônias incolores, o centro negro indica produção de H₂S) (Figura 10).



Fonte: <http://www.hyserve.com/produktgruppe.php?lang=pt&gr=33>

Figura 10. Colônias típicas de *Salmonella* spp. em ágar *Salmonella Shigella*.

- **Xilose-Lisina-Desoxicólico (XLD):** Colônias vermelhas com centro negro (Figura 11).

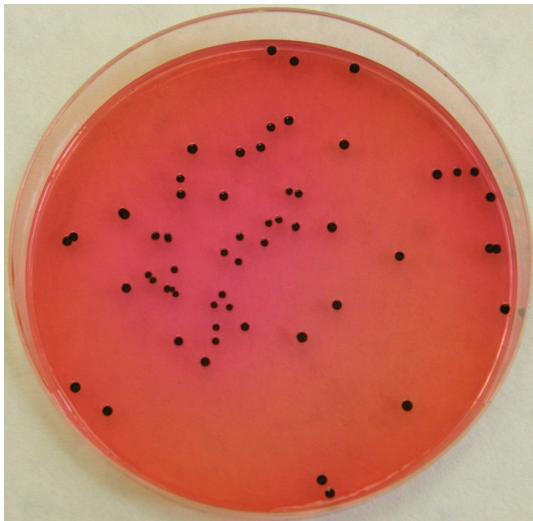


Foto: Fernanda S. Almeida/Lanagro

Figura 11. Colônias típicas de *Salmonella* spp. em ágar XLD.

- **Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4):** Colônias negras (Figura 12).



Foto: Germana V. Osowsky

Figura 12. Colônias típicas de *Salmonella* spp. em ágar XLT4.

A seguir, algumas especificações detalhadas relativas à produção dos meios sólidos para isolamento de *Salmonella*.

Ágar MacConkey

Princípio

- O cristal violeta inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos especialmente *enterococos* e *estafilococos*.
- A concentração de sais de bile é relativamente baixa em comparação com outros meios, por isso não é tão seletivo para Gram negativos como, por exemplo, o ágar SS.

Procedimentos

1. Dissolver 50 g do ágar em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 7,1 ± 0,2.
7. Deixar em banho-maria até atingir a temperatura de 50°C.
8. Homogeneizar bem.
9. Em capela de fluxo laminar distribuir em placas de Petri 90 x 150 mm.
10. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.

Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas.
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

Interpretação

- Cor original do meio: rosa avermelhado.
- Crescimento de bacilos Gram negativos.
- Colônias cor de rosa: fermentadoras de lactose (*E. coli*)
- Colônias incoloras: não fermentadoras de lactose (*Salmonella*, *Shigella* e *Proteus*)
- Não há crescimento de cocos Gram positivos (Figura 13).

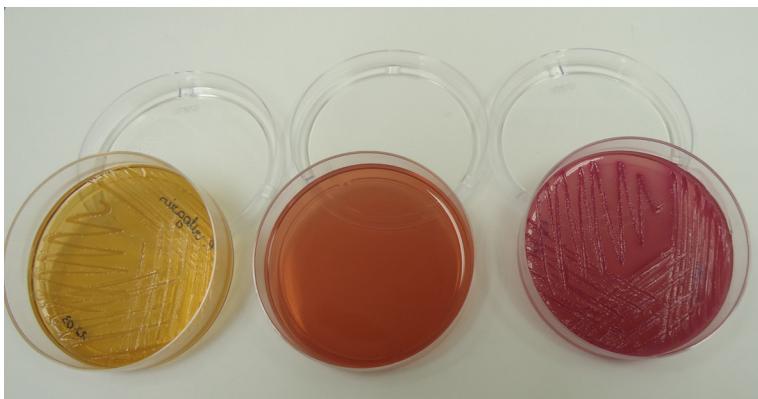


Foto: Suzana S. Kuchiishi/Cedisa

Figura 13. Demonstração de lactose não fermentada (colônias incoloras, a esquerda) e colônias oriundas da fermentação de lactose (foto a direita, colônia rosadas).

Conservação e validade

- Conservar as placas embaladas de 2°C a 8°C por até 2 meses.

Ágar Hektoen

Princípio

- Os sais biliares tornam o meio seletivo, inibindo os organismos gram-positivos e reduzindo o crescimento de alguns organismos gram-negativos além das espécies de *Salmonella* e *Shigella*.
- A lactose, sacarose e salicina acarretam uma diferenciação entre a cor das colônias e a do meio adjacente às colônias.

- As espécies de *Salmonella* e *Shigella* não fermentam estes compostos de carbono e, por conseguinte, não provocam uma alteração da cor do sistema de indicação do pH. Por outro lado, os organismos que fermentam um ou vários compostos deste tipo em ácidos, por exemplo a *E. coli*, fazem com que a cor mude de amarelo para cor-de-laranja.

Procedimentos

1. Dissolver 76 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Fechar com tampão de gaze e algodão e papel laminado.
5. Aquecer (ferver) até dissolver completamente (até ficar translúscido).
NÃO AUTOCLAVAR!
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 7,5 ± 0,2.
7. Deixar em banho-maria até atingir a temperatura de 50°C.
8. Homogeneizar bem.
9. Em capela de fluxo laminar distribuir em placas de Petri 90 x 150 mm ou tubos estéreis (de acordo com a necessidade da técnica a ser desenvolvida).
10. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.

Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas.
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

Interpretação

- *E. coli*: de grande dimensão, cor amarela a salmão; possibilidade de inibição de algumas estirpes.
- *Enterobacter/Klebsiella*: de grande dimensão, cor amarela a salmão.
- *Proteus*: variável, cor verde-azulado a azul ou salmão, a maioria das estirpes têm um centro preto ou são completamente pretas.
- *Salmonella*: cor verde-azulado a azul, a maioria das estirpes tem um cen-

tro preto ou são completamente pretas.

- *Shigella*: aspecto verde e úmido, saliente.
- *Pseudomonas*: irregulares, verdes a acastanhadas.
- Bactérias gram positivas: nenhum indício de crescimento a crescimento ligeiro.

Observação

As colônias de *Proteus mirabilis* podem assemelhar-se
à *Salmonella* neste meio.

Conservação e validade

- Conservar no escuro e embalado de 2 a 8°C por 2 meses.
- Evitar congelar e aquecer excessivamente.

Recomendações

- Ausência de crescimento ou crescimento escasso, reincubar a placa mais 24 horas.
- Não autoclavar, pois a alta temperatura degrada o açúcar contido no meio.

Ágar verde brilhante (VB)

Princípio

- Meio altamente seletivo, usado para o isolamento de salmonelas permite o isolamento destes organismos mesmo em materiais fortemente contaminados, incluindo as fezes.
- O extrato de levedura e duas peptonas fornecem os nutrientes; a lactose e a sacarose, juntamente com o vermelho de fenol, fornecem um sistema de diferenciação que exclui os fermentadores da lactose e/ou sacarose (ex: *E. coli*), enquanto que as salmonelas não produzem ácido a partir destes açúcares.
- O ágar VB é o agente seletivo e inibe a flora de acompanhamento.

Procedimentos

Ágar verde brilhante

1. Dissolver 20,7 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 6,9 ± 0,2.
7. Deixar em banho-maria até atingir a temperatura de 50°C.
8. Em capela de fluxo laminar distribuir em placas de Petri 90 x 150 mm.
9. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.

Ágar verde brilhante com novobiocina

1. Dissolver 20,7 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 6,9 ± 0,2.
7. Deixar em banho-maria até atingir a temperatura de 50°C.
8. Em capela de fluxo laminar acrescentar 1mL da solução de novobiocina (40Mg/mL).
9. Homogeneizar bem.
10. Distribuir em placas de Petri 90 x 150 mm.
11. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.

Solução de novobiocina à 4% (40 mg/mL)

1. Dissolver 4 g de novobiocina em 100 mL de água destilada.
2. Agitar até diluir completamente.
3. Em capela de fluxo laminar esterilizar por filtração, utilizando filtro Millipore 0,22 µm.

4. Dividir em alíquotas de 5 mL em frascos de penicilina.
5. Armazenar em -4°C (congelador).
6. Validade: 90 dias.

Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas.
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

Interpretação

- *Salmonella* (além da *S. Typhi* e da *S. Paratyphi*), colônias brancas a vermelhas rodeadas por zonas vermelhas.
- *S. Typhi* e *S. Paratyphi*: nenhum indício de crescimento.
- *Shigella* spp.: Nenhum indício de crescimento
- *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter*: colônias amarelas a esverdeadas, rodeadas por zonas amarelo-esverdeadas.
- *Pseudomonas*: nenhum indício de crescimento.
- Bactérias gram-positivas: nenhum indício de crescimento.

Conservação e validade

- Conservar as placas embaladas de 2 a 8°C por até 2 meses.

Ágar Rambach

Princípio

- O desoxicíclato de sódio inibe a flora acompanhante de Gram-positivas. Rambach Ágar permitindo que as espécies de *Salmonella* possam ser diferenciadas.
- O indicador de pH propicia a formação de colônias com cor vermelha característica.

Procedimentos

1. Dissolver o Vial (mistura cromogênica) em 250 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Homogeneizar bem.
3. Adicionar o pó nutriente.
4. Deixar em repouso durante 20 minutos.
5. Homogeneizar novamente.
6. Verificar o pH.
7. Dissolver em banho-maria ou vapor fluente por 10 minutos à ± 100°C.
NÃO AUTOCLAVAR!
8. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 7,3 ± 0,2.
9. Deixar em banho-maria até atingir a temperatura de 50°C.
10. Em capela de fluxo laminar distribuir em placas de Petri 90 x 150 mm.
11. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.

Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas.
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

Interpretação

- Cor original arroxeadas: suspeita de *Salmonella*.
- Colônias azuis: suspeita de coliformes.
- Colônias amareladas ou incolores: outras enterobactérias.

Conservação e validade

- Conservar as placas embaladas de 2 a 8°C por até 2 meses.

Recomendações

- Ausência de crescimento ou crescimento escasso, reincubar a placa mais 24 horas.
- Não autoclavar, pois a alta temperatura degrada o açúcar contido no meio.

Ágar *Salmonella-Shigella* (SS)

Princípio

- Ágar SS possui componentes (saís de bile, verde brilhante e citrato de sódio) que inibem microrganismos Gram positivos.
- A incorporação de lactose ao meio permite diferenciar se o microrganismo é lactose positiva (bactérias que fermentam a lactose produzem ácido que na presença do indicador vermelho neutro resultando na formação de colônias de cor rosa), e bactérias que não fermentam a lactose formam colônias transparentes.
- Tissulfato de sódio e o citrato férrico permitem a detecção de H²S evidenciado por formação de colônias de cor negra no centro.

Utilidade

- Selecionar e isolar espécies de *Salmonella* e *Shigella*, em amostras de fezes, alimentos e água.

Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer o meio até fundir o ágar.
- Não autoclavar.
- Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25 mL em placas de Petri 90 mm estéreis.
- Deixar em temperatura ambiente até resfriar.
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.

Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas.
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

Interpretação

- Cor original do meio: vermelho alaranjado.
- Colônias com centro negro (H^2S) ou colônias incolores: suspeita de *Salmonella*.
- Colônias incolores: suspeita de *Shigella* spp.
- Colônias cor de rosa ou vermelho: suspeita de *Escherichia coli* ou *Klebsiella* spp.
- As bactérias não fermentadoras de lactose são incolores.
- As bactérias fermentadoras de lactose aparecem na cor rosa.

Conservação e validade

- Conservar embalado de 2 a 8°C por 2 meses.

Recomendações

- Ausência de crescimento ou crescimento escasso, reincubar a placa mais 24 horas.
- Não autoclavar, pois a alta temperatura degrada o açúcar contido no meio.

XLD

Princípio

- O Ágar *Salmonella Shigella* tem finalidade de isolar os principais micro-organismos gam negativos enteropatogênicos, especialmente *Shigella*. Nesse meio a degradação de xilose, lactose e sacarose, com produção de ácido, irá manifestar mudança de cor de vermelha para amarela.
- O indicador vermelho neutro resulta na formação de colônias vermelhas. Os organismos não fermentadores da lactose formam colônias incolores.

Procedimentos

- Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante.
- Aquecer sob agitação até fundir o ágar completamente.

- Esterilizar em autoclave.
- Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25 mL em placas de Petri 90 mm estéreis.
- Deixar em temperatura ambiente até resfriar.
- Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.

Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas.
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

Interpretação

- Os organismos que fermentam a lactose produzem ácido que, na presença do indicador vermelho neutro, resulta na formação de colônias vermelhas.
- Os organismos não fermentadores da lactose formam colônias incolores (Ex: *Salmonella*).
- *Escherichia coli*: colônias cor-de-rosa a vermelhas com precipitado.
- *Shigella flexneri*: colônias cor-de-rosa claro a incolores

Conservação e validade

- Conservar as placas embaladas de 2 a 8°C por até 2 meses.

Ágar XLT4

Princípio

- O extrato peptonas e leveduras nesta formulação fornecem uma fonte de aminoácidos e nutrientes essenciais juntamente com as vitaminas; garantindo um ótimo crescimento para *Salmonella*.
- O agente seletivo é o Tergitol que é um agente tensoativo aniônico, a sua presença inibe a maioria das bactérias de crescimento indesejado.
- A cor de fundo da placa é vermelha, devido à inclusão do fenol vermelho, que muda de cor devido a alterações de pH a partir de reações de

fermentação e descarboxilação.

- Salmonelas reduzem tiossulfato em sulfureto de hidrogênio, acarretando a formação de colônias negras devido a presença de íons férricos.
- *Escherichia coli* crescem como colônias amarelas pela mudança do pH que altera a cor do indicador vermelho de fenol.

Procedimentos

1. Dissolver 59 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Fechar com tampão de gaze e algodão e papel laminado.
5. Aquecer (ferver) até dissolver completamente (até ficar translúcido).
NÃO AUTOCLAVAR!
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para $7,4 \pm 0,2$.
7. Deixar em banho-maria até atingir a temperatura de 50°C.
8. Em câmera de fluxo laminar acrescentar 4,6 mL de XLT4 suplemento.
9. Homogeneizar bem.
10. Distribuir em placas de Petri 90 x 150 mm.
11. Fazer teste de esterilidade à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Inoculação

- Inocular as placas e incubar por 18 a 24 horas.
- Se negativo após 24 horas, reincubar por mais 24 horas.

Interpretação

- Colônias negras, bom crescimento: *Salmonella*.
- Colônias amarelas, baixo crescimento: *Escherichia coli*.

Conservação e validade

- Conservar as placas embaladas de 2 a 8°C por até 2 meses.

Etapa 4: Provas bioquímicas preliminares

A partir do isolamento em ágar, selecionar de cada uma das placas, duas a três colônias com características típicas para *Salmonella* spp. e semelhantes nos meios presuntivos: Ágar TSI, Ágar LIA, Meio SIM e Caldo Ureia. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas (Tabela 1 e Figura 14).

Se existirem colônias com características morfológicas diferentes, deve-se atentar para o fato de que poderão surgir, em um mesmo item de ensaio, mais de um sorovar de *Salmonella*. Nesse caso, deve-se dar continuidade aos testes para todas as suspeitas encontradas.



Foto: Germana V. Osowsky

Figura 14. Provas de bioquímica.

Objetivo

Avaliar as reações metabólicas que devem ser características da *Salmonella* spp.

Princípio geral

Ao realizar a fermentação, que é um processo de oxi redução, as bactérias geram ácidos. A base dos testes é a incorporação de um indicador de pH que muda a coloração na presença dos ácidos formados.

Leitura para TSI e LIA

Tabela 1. Identificação bioquímica presuntiva de *Salmonella*.

Comportamento bioquímico		<i>Salmonella</i> Pullorum	<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>Salmonella</i> sp. sub-espécie I	<i>Salmonella</i> sp. sub-espécies III a e IIIB
TSI 24 horas	Base	A gás d	A gás -	A gás +	A gás +
	Bisel	K	K	K	K ou A
	H ₂ S	d	+	+	+
LIA 24 horas	Base	K	K	K	K
	H ₂ S	d	+	+	+

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

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

A – amarelo (ácido)

K – vermelho no TSI ou púrpura no LIA (alcalino)

d - variável

TSI – triplo açúcar ferro

Reação típica *Salmonella*

A reação típica de *Salmonella* sp. caracteriza-se pela coloração amarela na base devido a fermentação da glicose, e vermelha no bisel por não fermentar a lactose nem a sacarose (Figura 15).

Procedimentos

1. Dissolver 65 g de TSI em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar, dissolver bem.
3. Verificar o pH.

4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 7,4 ± 0,2.
7. Esfriar a 50°C em banho-maria.
8. Em capela de fluxo laminar distribuir em tubos estéreis de acordo com a necessidade da técnica, usualmente distribui-se 4 mL por tubo (13 x 100 mm com rosca) e deixá-los levemente inclinados.
9. Após solidificar efetuar controle de esterilidade por 24 horas a 37°C ± 1°C.

Inoculação

- Inocular colônia pura de 18 a 24 horas.
- Semear por picada até o fundo e na superfície do meio.
- Incubar 24 hs a 37°C ± 1°C , com a tampa semi aberta.

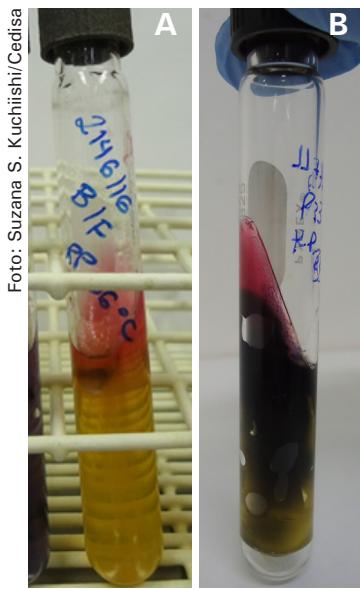


Figura 15. Teste TSI - A: reação típica de *Salmonella* Gallinarum e B: Reação típica de *Salmonella* spp.

Conservação e validade

- Conservar os tubos de 2 a 8°C por até 3 meses ou até que haja desidratação (10%).

LIA – Lisine Iron

Reação típica *Salmonella*

Coloração púrpura na base e na rampa com produção de H₂S (base escura) (Figura 16).



Foto: Lucas S. Cardoso/Embrapa

Figura 16. Teste LIA - coloração púrpura compatível com a reação observada na presença de *Salmonella* spp.

Procedimentos

1. Dissolver 34,56 g de fenilalanina em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar, dissolver bem.
3. Verificar o pH.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 6,7 ± 0,2.

7. Homogeneizar bem.
8. Em capela de fluxo laminar distribuir em tubos estéreis de acordo com a necessidade da técnica, usualmente distribui-se 4 mL por tubo (13 x 100 mm com rosca) e deixá-los levemente inclinados.
9. Fazer teste de esterilidade por 24 horas a 37°C ± 1°C.

Inoculação

- Inocular colônia pura de 18 a 24 horas.
- Semear por picada até o fundo e na superfície do meio.
- Incubar 24 hs a 37°C ± 1°C.

Conservação e validade

- Conservar os tubos de 2 a 8°C por até 3 meses ou até que o meio desidrate (10%).

SIM - Sulfato, Indol, Motilidade

Este teste verifica a motilidade da bactéria e a capacidade do microrganismo de degradar o amino- ácido triptofano. Este aminoácido está presente no meio de cultura (Ex: CPT), bactérias que hidrolisam o triptofano produzem indol no meio como resultado da metabolização. Assim, com a adição do reagente de Kovac's (cor amarela) na presença do Indol, resultará em uma coloração rosada. Podem ser utilizadas fitas com o reagente impregnado.

Reação típica da *Salmonella*

A *Salmonella* é em sua maioria móvel (meio turvo), com exceção dos sorovares *Gallinarum* e *Pullorum* que são imóveis (crescimento acentuado ao longo da linha de inóculo). A *Salmonella* é Indol negativa (Figura 17).

Fotos: Lucas S. Cardoso/Embrapa

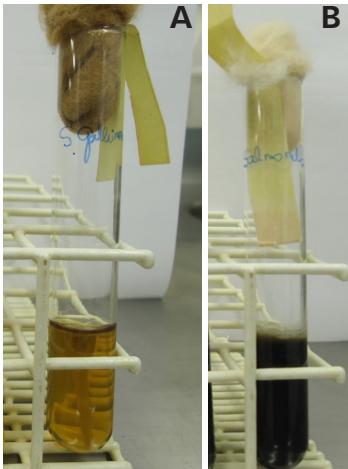


Figura 17. Prova de motilidade SIM -
A: observa-se reação de presença de *Salmonella* imóvel, crescendo só no ponto da inoculação e B: o crescimento ocorreu em todo o meio, típico das salmonelas móveis.

Procedimentos

1. Dissolver 36,23 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para $7,3 \pm 0,2$.
7. Distribuir em tubos estéreis 5 mL por tubo (15 x 100 mm com bucha).
8. Fazer teste de esterilidade à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Inoculação

- Com o auxílio de um fio bacteriológico injetar uma colônia pura de 18 – 24 horas, no meio na posição vertical, lentamente até a base.
- Afastar a agulha seguindo a linha inicial da incubação.
- Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas.

A pesquisa de indol será feita pela adição de algumas gotas do reativo de Kovacs: anel vermelho + , anel amarelo-.

Reativo de Kovacs

Para-dimetil-aminobenzaldeido (PDAB)	5,0 g
Álcool amílico ou iso-amílico.....	75,0 mL
Ácido clorídrico concentrado	25,0 mL

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

Conservação e validade

- Conservar de 2 a 8°C por até três meses ou até que haja desidratação (10%).

Ureia

Reação típica da *Salmonella*

Salmonella não possui urease, assim o resultado será negativo; devido a não alteração do pH. Positivo: alteração do meio para cor de rosa, pink. Negativo: nenhuma alteração (Figura 18 e Tabela 2).

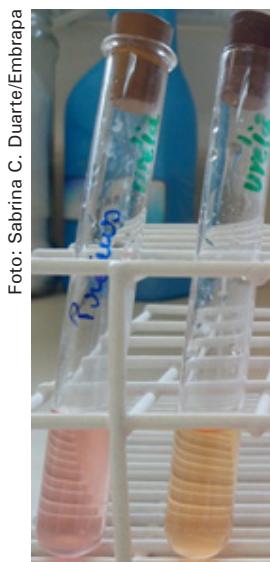


Figura 18. Tubo a esquerda, reação positiva (meio rosa) e a direita alteração típica de *Salmonella* spp. sem causar alteração do meio.

Procedimentos (meio líquido)

- Pesar e hidratar o meio de Ureia conforme instruções do fabricante.
- Esterilizar em autoclave.
- Resfriar até 50°C e adicionar assepticamente 5 mL da solução de Ureia estéril a 40% em 95 mL do meio base.
- Homogeneizar e distribuir 3 mL do meio assepticamente em tubos estéreis com tampa de rosca.

Leitura para SIM e Ureia

Tabela 2. Identificação bioquímica presuntiva de *Salmonella*.

Comportamento bioquímico	<i>Salmonella</i> Pullorum	<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>Salmonella</i> sp. sub-espécie I	<i>Salmonella</i> sp. sub-espécies III a e IIIB
SIM	-	-	+	+
Urease	-	-	-	-

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

Salmonella sp sub espécie III a e III b: antigo grupo Arizona

A: amarelo (ácido)

d: variável

Teste adicional útil - β -galactosidade ONPG

Permite a verificação da presença ou ausência da enzima β -galactosidase verificando se houve utilização do composto orgânico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo presente no meio. O caldo é semeado com alça de platina e a reação positiva é visualizada pela coloração amarela. Para *Salmonella* sp. a reação é negativa (exceção a espécie *bongori*) (Figura 19).

Foto: Sabrina C. Duarte/Embrapa

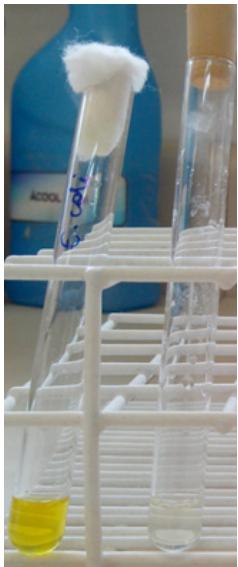


Figura 19. Tubo a esquerda, reação positiva (meio amarelo) e a direita reação negativa típica de *Salmonella* spp. sem causar alteração do meio.

Etapa 4: Provas bioquímicas complementares

As cepas que apresentarem resultado negativo para a presença de urease e reações características de *Salmonella* no Ágar TSI e LIA, móveis ou imóveis no SIM, devem ser submetidas a testes bioquímicos complementares, de acordo com o quadro de diferenciação (Tabela 3).

Tabela 3. Diferenciação bioquímica de *Salmonella*.

Comportamento bioquímico	<i>Salmonella</i> sp. sub-espécie I	<i>Salmonella</i> Pullorum	<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>Salmonella</i> sp. sub-espécies III a e IIIB
Indol	-	-	-	-
VM	+	+	+	+
VP	-	-	-	-
Cit. Simmons	+	-	-	+
H2S no TSI	+	d	+	+
Urease	-	-	-	-
Fenilalanina desaminase	-	-	-	-
Lisina descarboxilase	+	+	+	+
Arginina desidrolase	d	d	-	d
Ornitina descarboxilase	+	+	-	+
Motilidade	+	-	-	+
Malonato	-	-	-	+
D-Glicose produção de ácido	+	+	+	+
D-Glicose produção de gás	+	d	-	+
Lactose	-	-	-	d
Sacarose	-	-	-	-
D – Manitol	+	+	+	+
Dulcitol	+	-	+ (*)	-
Maltose	+	-(**)	+	+

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

Salmonella sp sub espécie III a e III b: antigo grupo Arizona

+ - 90-100% de cepas são positivas

- - 90-100% de cepas são negativas

d – Diferentes tipos

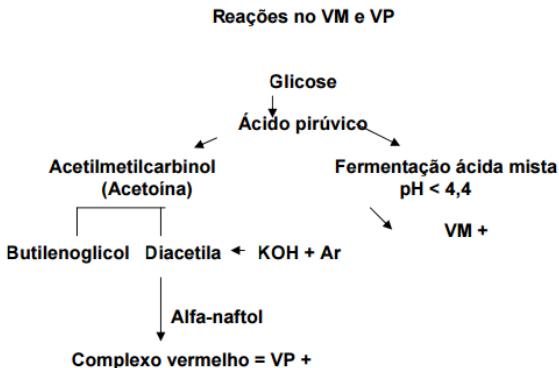
(*) – Ocasionalmente negativa

(**) – ou tardiamente positiva

A maioria das Salmonelas são: Indol, VM, VP, negativos. Utilizam citrato como única fonte de carbono, não fermentam a lactose nem a sacarose, não possuem urease e são negativas para fenilalanina desamina-se.

Teste VP e VM

Estes testes avaliam o produto final gerado pelo microrganismo na degradação da glicose. A formação de acetona acarreta uma reação VP positiva e a fermentação ácida mista gera uma reação VM positiva (Figura 20).



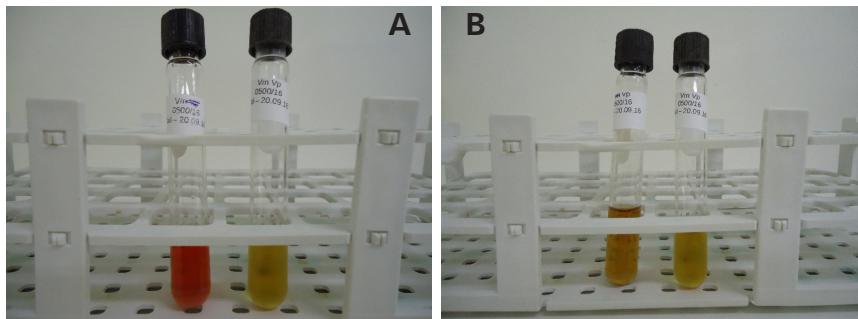
Fonte: FIOCRUZ. Gênero *Salmonella*, características Epidemiológicas e Laboratoriais. Manual. Disponível em bvs.panalimentos.org.

Figura 20. Degradação da glicose pela via fermentativa gerando acetona.

Reação típica da *Salmonella*

Salmonella é VM positiva e VP negativa (Figura 21).

- VM Positivo = cor vermelha.
- VM Negativo = cor amarela.
- VP Positivo = cor vermelha.
- VP Negativa = cor amarela.



Fotos: Suzana S. Kuchiishi/Cedisa

Figura 21. A: Reação típica de *Salmonella* VM positiva ao lado do tubo VM negativo. B: reação de VP positiva à esquerda e negativa à direita.

Procedimentos

Caldo V.M. – V.P.

1. Dissolver 17 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para $6,9 \pm 0,2$.
7. Distribuir em tubos estéreis de acordo com a necessidade da técnica, usualmente distribui-se 2 mL por tubo (13 x 100 mm com rosca).
8. Fazer teste de esterilidade por 24 horas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Solução para teste de VM

Vermelho de metila.....	0,1 g
Álcool etílico 95%.....	300 mL
Água destilada q.s.p.....	500 mL

Macerar em Grall o vermelho de metila e ir acrescentando aos poucos o álcool. Por último acrescentar a água para diluir.

Reativos para o teste de VP

- Solução 1: 5% de alfa naftol em álcool etílico absoluto.
- Solução 2: 40% de hidróxido de potássio.

Inoculação

- Inocular colônia pura de 18 a 24 horas.
- Semear no meio.
- Incubar 24 hs a 37°C ± 1°C.

Conservação e validade

- Conservar de 2 a 8° C por até 3 meses ou até que haja desidratação de até 10%.

Citrato de Simmons

Indica se a bactéria utiliza citrato como única fonte de carbono. A prova é feita semeando-se a bactéria no meio sólido inclinado de citrato de Simmons, (contém azul de bromotimol como indicador), o qual em pH 6,8 a 7,0 apresenta-se verde (negativa). O consumo do citrato alcaliniza o meio e a cor do indicador altera para azul (positiva)(Figura 22).

Reação típica da *Salmonella*

Salmonella é em maioria citrato positiva, mas *Salmonella* Gallinarum e *S. Pullorum* geralmente são citrato negativas.

Observação

Temos visto em nosso laboratório, o aparecimento de cepas de *S. Gallinarum* citrato-positivas, devido ao fato de precisarem ativar o gene para utilização do citrato, como forma de sobrevivência em condições inóspitas, fora dos seus sítios de eleição (intestino ou tonsilas cecais, por ex).

Foto: Lucas S. Cardoso/Embrapa



Fotos: Suzana S. Kuchiishi/Cedisa

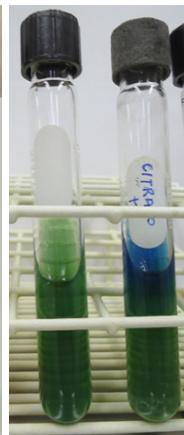


Figura 22. Meio de coloração verde, o resultado positivo acarreta a mudança do meio para cor azul.

Procedimento

Citrato

1. Dissolver 24,28 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para $6,8 \pm 0,2$.
7. Distribuir em tubos estéreis 4 mL por tubo (13 x 100 mm com rosca).
8. Inclinar os tubos para obter a forma de bisel.
9. Fazer teste de esterilidade à $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.
10. Conservação e Validade: Conservar de 2°C a 8°C por até três meses ou até que haja desidratação de até 10%.

TSI – Descrito na bioquímica preliminar

Vide acima.

Urease - Descrito na bioquímica preliminar

Vide acima.

Fenilalanina desaminase

Verifica a capacidade do microrganismo em desaminar a fenilalanina originando ácido fenilopiruvico. A presença do ácido fenilopiruvico é determinada pela reação com cloreto férreo a 10%, resultando numa coloração verde. Interpretação: Quando o microrganismo degrada o meio este fica verde (positivo). Quando não há degradação a coloração continua amarela (negativo).

Reação típica da *Salmonella*

Salmonella é negativa para este teste (Figura 23).

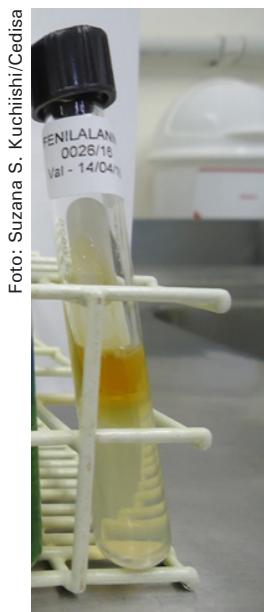


Figura 23. Reação típica de *Salmonella* que não degrada o meio e mantém a coloração amarela.

Procedimento

Ágar fenilalanina

1. Dissolver 26 g de fenilalanina em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar, dissolver bem.
3. Verificar o pH.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 7,3 ± 0,2.
7. Homogeneizar bem.
8. Em capela de fluxo laminar distribuir em tubos estéreis de acordo com a necessidade da técnica, usualmente distribui-se 4 mL por tubo (13 x 100 mm com tampa de rosca) e deixá-los levemente inclinados.
9. Fazer teste de esterilidade por 24 horas a 37°C ± 1°C.

Solução de Cloreto Férrico à 10%

Cloreto férrico.....	10 g
Água destilada.....	100 mL

1. Dissolver o cloreto em 100 mL de água destilada.
2. Homogeneizar bem.
3. Armazenar em frasco de vidro âmbar em temperatura ambiente.
4. Validade de seis meses.

Conservação e validade

- Conservar de 2 a 8° C por até três meses ou até que haja desidratação de até 10%.

Lisina, Arginina, Ornitina (descarboxilases)

As descarboxilases são um grupo de enzimas com substrato específico, capazes de reagir com o grupo carboxila dos aminoácidos para formarem aminas alcalinas. Essa reação, conhecida como descarboxilação,

origina dióxido de carbono como produto secundário. A incubação deve ser em anaerobiose, por isso utiliza-se a adição de óleo mineral. Tubo controle (sem aminoácido): amarelo e turvo – indica que o micro-organismo é viável e o pH do meio abaixou o suficiente para ativar as enzimas descarboxilase.

Procedimento

A partir de crescimento recente, inocular a colônia em estudo no tubo contendo o aminoácido e no tubo controle. Colocar peso 1 mL de óleo mineral estéril em cada tubo. Incubar à 35 +/ - 1°C em aerobiose.

Reação típica da *Salmonella*

Salmonella é Lisina positiva, Arginina com reações variáveis, e Orinitina em sua maioria positiva com exceção da *S. Gallinarum* que é negativa (Figura 24).



Fotos: Suzana S. Kuchiishi/Cedisa

Figura 24. Tubo de aminoácidos: os tubos com coloração arroxeadas correspondem a reações positivas, os tubos com coloração amarelada é negativo e os tubos à direita são meios sem inoculação.

Procedimentos

Meio Lisina

1. Dissolver 20,52 g de lisina em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 6,8 ± 0,2.
7. Distribuir em tubos estéreis 3 mL por tubo (13 x 100 mm com rosca).
8. Acrescentar 0,5 mL de óleo mineral estéril em cada tubo.
9. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.

Meio Arginina

1. Dissolver 20,52 g de arginina em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 6,8 ± 0,2.
7. Em capela de fluxo laminar distribuir em tubos estéreis de acordo com a necessidade da técnica a ser desenvolvida, 3 mL por tubo (13 x 100 mm com rosca).
8. Acrescentar 0,5 mL de óleo mineral estéril em cada tubo.
9. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.

Meio Ornitina

1. Dissolver 20,52 g de ornitina em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.

5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 6,8 ± 0,2;
7. Distribuir em tubos estéreis 3 mL por tubo (13 x 100 mm com rosca).
8. Acrescentar 0,5 mL de óleo mineral estéril em cada tubo.
9. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.

Na realização dos testes com aminoácidos deve-se colocar um tubo de controle negativo (base Moeller) indicando o ponto de viragem.

Conservação e validade

- Conservar de 2 a 8° C por até 3 meses ou até que haja desidratação de até 10%.

Motilidade

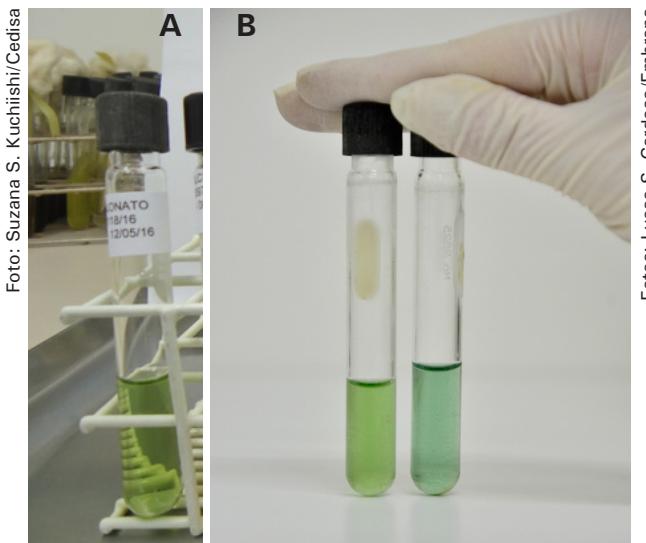
Teste SIM (vide acima, na bioquímica preliminar).

Malonato

Determina a habilidade do micro-organismo de utilizar malonato de sódio como única fonte de carbono, resultando em alcalinização do meio. O meio apresenta cor verde (negativo) e o resultado positivo é indicado pela cor azul.

Reação típica da *Salmonella*

A maioria das *Salmonelas* são malonato negativo (Figura 25).



Fotos: Lucas S. Cardoso/Embrapa

Figura 25. A: reação Malonato negativa e B: tubo a esquerda malonato negativo e tubo a direita malonato positivo

Procedimento

Malonato

1. Dissolver 8 g do meio em 1.000 mL de água destilada (observar a quantidade especificada pelo fabricante).
2. Deixar hidratar durante 10 minutos.
3. Verificar o pH do meio.
4. Aquecer (ferver) até dissolver completamente.
5. Autoclavar durante 15 minutos a 121°C.
6. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para $6,7 \pm 0,2$.
7. Distribuir em tubos estéreis 3 mL por tubo (13 x 100 mm com rosca).
8. Fazer teste de esterilidade à $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Conservação e validade

- Conservar de 2 a 8°C por até 3 meses ou até que haja desidratação de até 10%.

D- Glicose para ácido e D- Glicose para gás

A partir da glicose podemos observar também a produção ou não de gás (CO_2 , H_2) no interior do tubo de Durhan. Incubar por 24 horas a 37°C. Evidencia a formação de bolhas de gás.

Reação típica da *Salmonella*

A *S. Typhimurium* forma bolhas e a *S. Gallinarum* não apresenta esta característica (Figura 26).

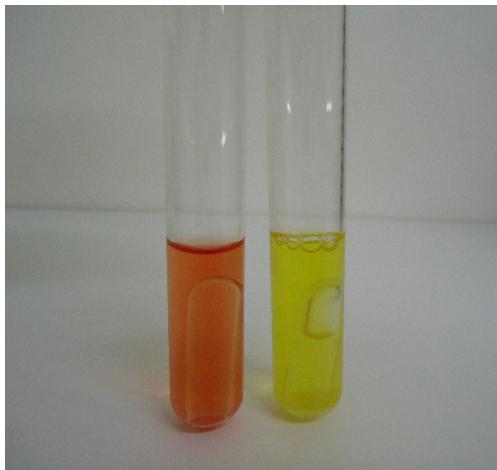


Foto: Suzana S. Kuchiishi/Cedisa

Figura 26. Formação de bolhas de gás, reação comumente observada na *Salmonella* spp. Tubo a esquerda não inoculado e tubo a direita inoculado com *Salmonella*.

Glicose com Durhan

Neste caso distribuir 5 mL da glicose em tubos 16 x 150 mm. Colocar os tubos de Durhan com a boca para baixo.

Conservação e validade

- Conservar de 2 a 8° C por até três meses ou até que haja desidratação de até 10%.

Lactose, Sacarose, D-Manitol, Dulcitol, Maltose

Verifica a capacidade da bactéria em fermentar estes carboidratos.

Reação típica da *Salmonella*

A Maioria das *Salmonellas* não fermenta Lactose e Sacarose, mas podem adquirir esta característica através de transferência plasmidial. *S. Pullorum* não fermenta Dulcitol (Figura 27).



Foto: Suzana S. Kuchiishi/Cedisa

Figura 27. Bioquímica complementar.

Procedimentos

Os carboidratos devem ser preparados utilizando-se 1 g de carboidrato em 100 mL de caldo vermelho de fenol (concentração 1%).

1. * Dissolver 1 g do carboidrato em 100 mL de caldo vermelho de fenol;
2. Homogeneizar bem.
3. Ajustar o pH do meio com NaOH 0,1M ou HCl 0,1M estéril para 7,4.
4. Esterilizar por filtração, utilizando filtro Millipore 0,22 µm.
5. Distribuir em tubos estéreis 2 mL por tubo (13 x 100 mm com tampa de rosca)*.
6. Fazer teste de esterilidade à 37°C ± 1°C por 24 horas.

Conservação e validade

- Conservar de 2 a 8° C por até 3 meses ou até que haja desidratação de até 10%.

Nos casos de cepas imóveis evidenciadas pelo teste de motilidade do bioquímismo preliminar com reações compatíveis com o gênero *Salmonella* nos testes bioquímicos complementares, as mesmas deverão ser diferenciadas com o auxílio de dois ou mais testes descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Reações bioquímicas para diferenciação dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*.

Provas bioquímicas	<i>Salmonella Pullorum</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>
Mucato	-	+
L-Rhamnose	+	-
Salicina	-	+
Tartarato de Jordans	-	+
Cellobiose	-	+
D-tartarato	-	+
Gelatina	-	+

Fonte: Ribeiro et al., 2009.

Etapa 5: Sorotipificação

Caracterização antigênica pela técnica de aglutinação rápida.

Procedimento

- Repicar as colônias suspeitas em ágar nutritivo inclinado e incubar a 37 °C ± 1 °C por 18 a 24 horas.
- Adicionar 0,5 a 1,0 mL de solução salina 0,85% estéril ao crescimento bacteriano e homogeneizar.

Antissoros polivalentes de *Salmonella* "O" e "H"

- Depositar, separadamente, sobre a superfície da lâmina ou placa de vidro quadriculada, uma gota da solução salina 2%, uma de antissoro "O" e outra de antissoro "H". Acrescentar uma gota de suspensão bacteriana sobre cada uma delas e homogeneizar. Realizar a leitura em até dois minutos, com iluminação sobre fundo escuro.

Interpretação

- Positiva: presença de aglutinação na mistura cultura + antissoro (Figura 28).
- Negativa: ausência de aglutinação na mistura cultura + antissoro.

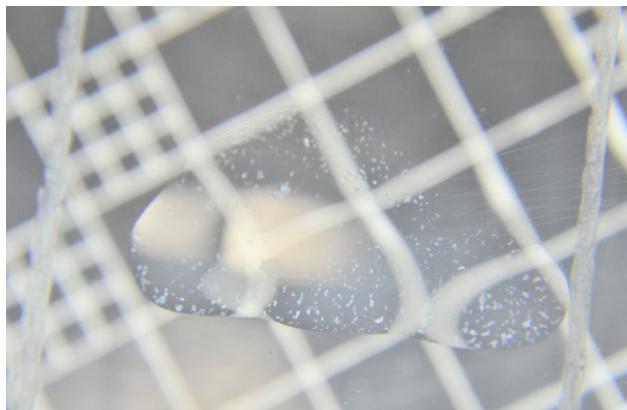


Foto: Suzana S. Kuchiishi/Cedisa

Figura 28. Reação de aglutinação.

Caso ocorra aglutinação na mistura com solução salina, a caracterização antigenica estará inviabilizada para por tratar-se de cepa rugosa autoaglutinante.

As cepas que apresentarem aglutinação ao antissoro "O" deverão ser caracterizadas antigenicamente com os antissoros monovalentes "B" (04) e "D" (09) de *Salmonella*.

Antissoro monovalente “B” (04)

Caso ocorra aglutinação ao antissoro “B”, deve-se prosseguir na caracterização antigênica frente aos antissoros flagelares Hi e H2 de *Salmonella*, no sentido de identificar *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Typhimurium (1, 4, [5], 12:i:1, 2). Portanto a aglutinação 4:i:2 confirma o sorovar acima.

Inversão de fase

Caso ocorra a aglutinação frente apenas a um dos antissoros (Hi ou H2) será necessário inativar o antígeno que está se expressando, para possibilitar a expressão do outro.

Deve-se atentar para o aparecimento de cepas monofásicas de *Salmonella enterica* sorovar 4,5,12:i: - _ devido à perda da expressão do segundo antígeno flagelar H2, ou 4,5,12:-:1,2 devido à perda da expressão do segundo antígeno flagelar Hi. Tais cepas não poderão ser classificadas como *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Typhimurium, mas, devido ao seu potencial patogênico, são de notificação obrigatória. Sua fórmula antigênica deve ser evidenciada no relatório final de análise.

Antissoro monovalente “D” (09)

As cepas que não apresentarem resultado positivo frente ao antissoro “B” deverão ser submetidas ao teste de aglutinação frente ao antissoro “D”.

Caso ocorra aglutinação ao antissoro “D”, deve-se prosseguir na caracterização antigênica frente aos antissoros flagelares Hg; Hm e Hp, no sentido de identificar *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Enteritidis (1,9,12:g,m:-). A inclusão do soro anti-flagelar Hp visa afastar a possibilidade de identificação errônea de outros sorovares com fórmula antigênica semelhante. Portanto, a aglutinação 9:g,m confirma o sorovar acima.

As cepas imóveis que apresentarem resultado positivo frente ao antisoro “O”, deverão ser caracterizados antigenicamente com o antissoro “D”. As cepas que apresentarem resultado positivo deverão ser diferenciadas bioquimicamente.

Confirmação de eficácia das técnicas utilizadas

É obrigatória a inclusão de controle positivo para todas as técnicas/métodos bacteriológicos e sorológicos e para cada etapa durante o andamento das análises.

O diagnóstico definitivo dos sorovares de *Salmonella* poderá ser realizado por caracterização antigênica ou ainda, pela utilização de técnicas moleculares desde que devidamente validadas e aprovadas pela CGAL.

Amostras positivas

As amostras poderão ser estocadas das seguintes formas: acondicionada em frascos contendo Dorset, devidamente identificados, ou em estoque no Freezer (-20° C) ou -70 °C. preparado em tubo Criogênico contendo BHI ou CPT adicionado de 20% de glicerol ou mantida em ágar nutritivo.

Estoque em BHI ou CPT – manutenção em freezer -20°C e -70°C

Preparar um cultivo da amostra em BHI OU CPT (caldo infusão cérebro coração) e transferir 800 ul para um tubo criogênico, contendo 200 ul de glicerol estéril e estocar a -20°C por 2 horas e seguida a -70°C.

Estoque em Dorset – manutenção em temperatura ambiente

Repicar com uma agulha o crescimento da placa de TSA para o tubo de Dorset. Fechar como lacre de metal e incubar a 37°C/24H. Estocar a temperatura ambiente.

Preparo do meio Dorset

Procedimento

1. Lavar os ovos SPF em água corrente e após desinfetar com álcool 70%. Quebrar os ovos dentro de um becker de plástico (capacidade 2.000 mL perfazendo um total de 375 mL. Agitar com bastão de vidro até obter uma solução bem homogênea.
2. Filtrar em gaze dobrada quatro vezes para retirar a parte coloidal.
3. Preparar 125 mL de uma solução de caldo nutritivo (conforme orientação do fabricante) e adicionar a 375 mL de ovos filtrados.
4. Distribuir 5 mL da mistura em vidros de penicilina (capacidade 8,0 mL). Tampar com tampa de borracha e vedar com tampa de metal.
5. Colocar os virdros em uma panela de alumínio inclinados (-/+ 45°C) e tindalizar em autoclave semi-aberta tres dias consecutivos por 30 minutos.
6. Estocar em geladeira.

Nota

Contar o tempo de meia hora somente quando a água da autoclave estiver quente (fervendo). Após cada tindalizada o meio deverá ser colocado imediatamente sob refrigeração a 4°C, para evitar mudanças na coloração (tom escuro).

Métodos alternativos para detecção de *Salmonella*

Métodos moleculares

Ribotipagem automatizada

Na identificação de sorovares de *Salmonella*, o método da ribotipagem é utilizado nos laboratórios de referência mundiais. Esse método constitui boa alternativa para monitoramento da cadeia epidemiológica das salmoneloses aviárias.

A técnica consiste na extração e purificação do DNA total da bactéria, digestão deste material com uma enzima de restrição, corrida eletroforetífica, transferência de fragmentos desnaturados para um filtro, hibridação com a sonda marcada e revelação do padrão de bandas. As demais informações estão contidas no manual do fabricante do equipamento.

PCR

Esta técnica poderá ser utilizada como teste inicial de triagem bacteriana, identificando a presença ou ausência de cepas de *Salmonella* spp. em amostras de campo ou para identificação final de sorovares.

A técnica de PCR baseia-se na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA de uma única célula. Existem três fases: desnaturação do DNA molde, ligação (“annealing”) dos primers e polimerização do DNA.

Outra técnica molecular é a PCR em Tempo Real, uma variação da PCR que permite amplificação e detecção simultânea. O produto é obtido a cada ciclo através da fluorescência emitida e detectada pelo equipamento. Existem diferentes equipamentos comercializados para este objetivo.

Nota

Outras técnicas moleculares poderão ser utilizadas com a finalidade de montagem de banco de dados epidemiológico, triagem ou identificação de sorovares de *Salmonella*.

Plaqueamento em ágar semi-sólido MSRV

Este método pode ser utilizado como teste de triagem para bactérias do gênero *Salmonella*. O ágar semi-sólido MSRV promove o crescimento seletivo e diferencial para *Salmonella* spp. e os resultados são obtidos em até 48 horas após cultivo. Deve-se realizar as etapas de pré-enriquecimento/enriquecimento.

Pipetar sobre o meio MSRV três gotas do cultivo enriquecido, totalizando 100 μ L, e distribuí-las de forma que fiquem equidistantes umas das outras na placa. As gotas não poderão se espalhar pela placa. Aguardar a secagem das gotas inoculadas e incubar as placas a 42°C \pm 1°C por 24 horas. Se não houver a formação de halos, incubá-las novamente, a mesma temperatura, por mais 24 horas. A formação de halo no ágar MSRV é indicativa de resultado positivo.

Proceder a semeadura em placa. Deve-se coletar uma alçada do crescimento bacteriano da borda do halo e semeá-la para isolamento das colônias. Colônias com características morfológicas suspeitas para *Salmonella* devem ser selecionadas.

Após a leitura das placas, existe a necessidade de se proceder à caracterização bioquímica e antigênica para finalizar o diagnóstico do sorovar de *Salmonella*. Maiores detalhes do método estão descritos na ISO 6579:2002/amd.

A apresentação de relatório de validação das técnicas a serem utilizadas é obrigatória para qualquer situação e precisará ser aprovada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária na Coordenação Geral de Laboratórios Agropecuários (CGAL) antes de serem colocadas em prática.

Referências

ABNT. **NBR ISO/IEC 17025:** requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 21 p.

ANVISA: http://www.anvisa.gov.br/servicosaud/microbiologia/mod_4_2004.pdf.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos.** Brasília, DF: [2004?]. Módulo IV. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/servicosaud/microbiologia/mod_4_2004.pdf >. Acesso em: 13 dez. 2016.

AKIBA, M.; KUSUMOTO, M.; IWATA, T. Rapid identification of *salmonella* enterica serovars, typhimurium, choleraesuis, infantis, hadar, enteritidis, dublin and gallinarum, by multiplex PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 1, p. 9-15, 2011.

BALE, J.A.; PINNA, E.M; THRELFALL, E. J.; WARD, L. R. **Salmonella identification:** serotypes and antigenic formulae: Kauffmann-White scheme- 2007. London: Centre for Infections Health Protection Agency, 2007. 168 p.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves.** Campinas: FACTA, 2000. 490 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, de 16 de janeiro de 2007. Estabelece os critérios para credenciamento, reconhecimento, extensão de escopo e monitoramento de laboratórios no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de forma a integrarem a Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, constantes do Anexo à presente Instrução Normativa. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, ano 144, n. 12, 17 jan. 2007. Seção 1, p. 1-3.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Instrução Normativa nº 7, de 6 de junho de 1997. Dispõe sobre as normas para o trabalho em contenção com organismos geneticamente modificados - OGMs. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 107, 9 jun. 1997. Seção 1, p. 11827-11833.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. Aprova as normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella gallinarum* e de *Salmonella pullorum* e livres ou controlados para *Salmonella enteritidis* e para *Salmonella typhimurium*.). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 215, 5 nov. 2003. Seção 1, p. 3-5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 126, de 03 de Novembro de 1995. Normas para o credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das salmonelas aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 212, 6 nov. 1995. Seção 1, p. 17694-17698.

BOUCHET, V.; HUOT, H.; GOLDSTEIN, R. Molecular Genetic Basis of Ribotyping. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 21, n. 2, p. 262-273, 2008.

BURTON, G. R.; ENGELKIRK, P. G. **Microbiologia para Ciência da Saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.

CAFFER, M. I.; TERRAGNO, R. **Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella***. Buenos Aires: Ministerio de Salud, 2001.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: Microbiologia. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F (Ed.). São Paulo: Atheneu, 2004. p. 319-328.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

ISO 6579. Anexo D - Fourth edition, 2015. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Annex D: **Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage**.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 6579: microbiology of food and animal feeding stuffs — **Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. 4th ed. Geneve, 2002. 27 p.

KING, S.; METZGER, W. I. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. Hektoen enteric agar. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 577-578, 1968b.

KING, S.; METZGER, W. I. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. II. Comparison of Hektoen enteric agar with SS and EMB agar. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 579-581, 1968b.

RIBEIRO, S. A. M. et al. Diferenciação molecular entre *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum e *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**. [online]. 2009, vol.40, n.1, pp. 184-188.



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

