

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Manual Técnico de
Diagnóstico Laboratorial da
Salmonella spp.

Brasília – DF
2011

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Apoio à Gestão de Vigilância em Saúde

Manual Técnico de
Diagnóstico Laboratorial da
Salmonella spp.

Diagnóstico Laboratorial do
Gênero *Salmonella*

Série A. Normas e Manuais Técnicos

Brasília – DF
2011

© 2011 Ministério da Saúde.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica. A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <http://www.saude.gov.br/bvs>

Série A. Normas e Manuais Técnicos

Tiragem: 1ª edição – 2011 – 1.000 exemplares

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Vigilância em Saúde

Departamento de Apoio à Gestão de Vigilância em Saúde

Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública

Setor Comercial Sul, Quadra 4, Bloco A, Edifício Principal,
3º andar

CEP: 70304-000, Brasília – DF

E-mail: svs@saude.gov.br

Home page: www.saude.gov.br/svs

Coordenação

Lúcia Helena Berto – CGLAB/DEVEP/SVS/MS

Equipe de elaboração

Esta publicação foi elaborada por um grupo de profissionais pesquisadores, técnicos de bancada do Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ e do Instituto Adolfo Lutz – IAL/SP.

Equipe de Revisão Técnica:

Dalia dos Prazeres Rodrigues

Miyoko Jakabi

Equipe de Elaboração:

Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas/IOC/Fiocruz

Dalia dos Prazeres Rodrigues

Eliane Moura Falavina dos Reis

Norma dos Santos Lázaro

Renata Garcia Costa

Instituto Adolfo Lutz

Miyoko Jakabi

Harumi Sakuma

Produção Editorial:

Capa: NJOBS Comunicação (Eduardo Grisoni)

Projeto gráfico: NJOBS Comunicação (Eduardo Grisoni)

Diagramação: NJOBS Comunicação (Marília Assis)

Normalização: NJOBS Comunicação (Ana Cristina

Vilela e Fernanda Gomes) e Editora MS (Márcia Cristina Tomaz de Aquino)

Revisão: NJOBS Comunicação (Ana Cristina Vilela e Fernanda Gomes)

Impresso no Brasil / *Printed in Brazil*

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.

Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella* / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

60 p. : il. – (Série A. Normas e manuais técnicos)

ISBN

1. Análise bacteriológica. 2. Diagnóstico. 3. Intoxicação alimentar. I. Fundação Oswaldo Cruz. II. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (Brasil). III. Instituto Adolfo Lutz. IV. Título. V. Série.

CDU 616-074:613.2.099

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2011/0096

Títulos para indexação:

Em inglês: Technical manual of laboratorial diagnostic from *Salmonella* spp.: laboratorial diagnosis of *Salmonella* genre.

Em espanhol: Manual técnico de diagnóstico de laboratorio de *Salmonella* spp.: diagnóstico de laboratorio del género *Salmonella*.

QUADROS

Quadro 1 – Distribuição do número de sorovares de acordo com espécie e subespécie de *Salmonella*

Quadro 2 – Caracterização fenotípica das espécies e subespécies de *Salmonella* spp.

Quadro 3 – Diferenciação bioquímica entre *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* e sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* mais frequentes

Quadro 4 – Procedimentos de isolamento de *Salmonella* spp. aprovados por diferentes órgãos reguladores

Quadro 5 – Confirmação de *Salmonella* spp. em alimentos – ISO 6579:2007

Quadro 6 – Avaliação de *Salmonella* spp. em alimentos – MLG/FSIS, 2004

Quadro 7 – Características dos meios de enriquecimento seletivos

Quadro 8 – Características dos meios seletivos – indicadores

Quadro 9 – Características diferenciais dos meios TSI, KIA, MIO, MILi e LIA

Quadro 10 – Reações nos meios de triagem TSI e KIA

Quadro 11 – Reações no Ágar Lisina-Ferro – LIA

Quadro 12 – Reações observadas no meio de Costa e Vernin – CV

Quadro 13 – Interpretação do meio EPM

Quadro 14 – Características bioquímicas de *Salmonella* spp.

Quadro 15 – Percentuais de positividade de *Salmonella* spp. nas provas bioquímicas

Quadro 16 – Características bioquímicas diferenciais de *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. e *Edwardsiella tarda*

Quadro 17 – Diferenciação bioquímica entre *S. enterica* subespécie *enterica*, *Citrobacter* spp. e *Edwardsiella tarda*

Quadro 18 – Diferenciação entre *Citrobacter freundii* e *Salmonella arizonae* e *S. diarizonae*

Quadro 19 – Diferenciação entre *Salmonella* -Paratyphi C e *S. Choleraesuis*

Quadro 20 – Duração máxima de meios de cultura: envase em placas de Petri

Quadro 21 – Duração máxima de meios de cultura: envase em tubos

Quadro 22 – Duração máxima de meios de cultura: meio líquido em tubos

SUMÁRIO

1	Taxonomia	5
2	Características Gerais	7
3	Habitat	9
4	Ecologia	10
5	Características Clínicas e Patogenia	11
6	Epidemiologia	14
7	Diagnóstico Laboratorial	16
8	Aspectos Gerais – Antígenos das Enterobactérias	40
9	Caracterização Antigênica de <i>Salmonella</i> spp.	42
10	Meios de Cultura	45
11	Figuras	47
	Referências	52
	Anexo	55

1 Taxonomia

A designação do gênero *Salmonella* foi adotada em 1900, por Lignières, em homenagem a Daniel Salmon, o qual isolou o microrganismo conhecido como *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis de suínos. Sua nomenclatura teve como orientação inicial informações relacionadas às condições clínicas ou ao hospedeiro do qual o microrganismo era isolado.

Entretanto, a diversidade inicial de sorovares que apresentavam etiologia não específica de um determinado hospedeiro levou, inicialmente, à designação do mesmo sorovar em hospedeiros distintos, em locais diferentes. A partir de 1920, um grupo de microbiologistas, liderados por Fritz Kauffmann, em Copenhague, e por Philip Bruce White, em Londres, unificou a taxonomia, tendo seu trabalho reconhecido pelo subcomitê de *Salmonella* da Sociedade Internacional de Microbiologia, em 1933, como esquema de Kauffmann-White. A partir de então, sua nomenclatura passou por algumas modificações, tendo por base a utilização de métodos clássicos e de métodos moleculares, como AFLP e sequenciamento 16S rRNA, MLEE e AFLP.

Na atualidade, o gênero está constituído de duas espécies geneticamente distintas: *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a primeira está dividida em seis subespécies, que receberam as seguintes denominações: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*.

Na forma da redação da nomenclatura atual, de acordo com as modificações taxonômicas estabelecidas, os sorotipos ou sorovares não são mais considerados espécies, razão pela qual os sorovares da subespécie *enterica* devem ser designados da seguinte maneira: *Salmonella typhimurium*: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ou, de maneira mais simples e objetiva, *Salmonella* sorovar Typhimurium ou ainda *Salmonella* Typhimurium. Portanto, na nomenclatura atual, os sorovares Typhimurium, Agona, Enteritidis, entre outros, não indicam uma espécie, motivo pelo qual o sorovar não deve ser escrito em itálico ou sublinhado.

Salmonella é o gênero de maior relevância na família *Enterobacteriaceae*, embora sua relação filogenética seja, de certo modo, conjuntural. Dependendo do método empregado, *S. enterica* é mais relacionada com *Citrobacter* spp. do que com *Escherichia coli* (homologia de DNA) ou em sentido inverso, quando empregado método de avaliação de grandes fragmentos (23S rRNA).

Em geral, acredita-se que *Salmonella* e *E. coli* descenderam de um ancestral comum há 160-180 milhões de anos, durante o período terciário, em paralelo com os invertebrados. Ao longo da avaliação, *E. coli* e a maioria das cepas de *Salmonella* difásica se adaptaram aos mamíferos e, de modo semelhante, os sorovares monofásicos permaneceram adaptados aos répteis.

Em cada subespécie são reconhecidos diferentes números de sorovares tendo por base a caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Entre as espécies, a subespécie *S. enterica* apresenta maior número de sorovares, sendo responsável por 99% dos isolamentos, usualmente de animais de sangue quente. Em 2002, foram incluídos 18 novos sorovares, sendo 12 pertencentes a *S. enterica* subespécie *enterica*, 2 subespécie *salamae*, 2 *diarizonae*, 1 *houtenae* e 1 *S. bongori*. Atualmente são reconhecidos cerca de 2500 sorovares incluídos em duas espécies *S. enterica* e *S. bongori*, cuja distribuição editada por Grimont e Weill (2007) é apresentada no Quadro 1.

Quadro 1 - Distribuição do numero de sorovares de acordo com espécie e subespécie de *Salmonella*

Espécies/Subespécies	Sorovares
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1.490
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	500
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	94
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	320
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	72
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>indica</i>	12
<i>Salmonella bongori</i>	22

Em 2004, uma nova espécie foi proposta, *Salmonella subterranea*, isolada em sedimento subterrâneo de solo com baixo pH na Oak Ridge, Tennessee. Essa amostra apresentou forte inter-relação com *S. bongori*, por meio de sequenciamento 16S rRNA, além de algumas características metabólicas, como indol positivo, H₂S e lisina descarboxilase negativa, pigmento amarelo e um flagelo lateral. A amostra-tipo proposta é ATCC BAA-86.

2 Características Gerais

As salmonelas pertencem à família Enterobacteriaceae, sendo que, morfológicamente, são bastonetes Gram negativos, geralmente móveis, capazes de formar ácido e, na maioria das vezes, gás a partir da glicose, com exceção de *S. Typhi*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* ($\leq 5\%$ produzem gás). Também fermentam arabinose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose, xilose e dulcitol. A maioria das salmonelas de interesse clínico não fermenta lactose, contudo, muitas cepas podem adquirir essa característica por meio de transferência plasmidial. São oxidase negativa, catalase positivo, indol, Voges-Proskauer – VP, Vermelho de Metila – VM, malonato e ureia negativa. Produzem gás sulfídrico a partir da redução do enxofre por ação da enzima cisteína desulfidrase. Apresentam ainda como características metabólicas a capacidade de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, redução de nitrato a nitrito e utilização do citrato como única fonte de carbono, podendo ocorrer variações em função do sorovar e/ou da subespécie. Por exemplo, *S. Arizonae* não fermenta o dulcitol, mas frequentemente é malonato positivo. *S. Pullorum* não fermenta o dulcitol e *S. Gallinarum* não descarboxila ornitina, sendo ambas imóveis. *S. Typhi*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* não produzem gás a partir da fermentação da glicose.

A diferenciação fenotípica das espécies e subespécies de *Salmonella* está apresentada no quadro 2 e a caracterização bioquímica entre *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (predominantes em isolamentos de fontes humanas e animais) estão descritas no quadro 3.

Quadro 2 - Caracterização fenotípica das espécies e subespécies de *Salmonella* spp.

Espécies	<i>S. enterica</i> subsp.						<i>S. bongori</i>	<i>S. subterranea</i>
	enterica	salamae	arizonae	diarizonae	houtenae	indica		
Subespécies								
Características								
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+	+
ONPG (2h)	-	-	+	+	-	d	+	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	-	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+	-
Crescimento KCN	-	-	-	-	+	-	+	+
L(+) Tartarato ^(a)	+	-	-	-	-	-	-	+ ^(e)
Galacturonato	-	+	-	+	+	+	+	ND
g-glutamyl transferase	+ ^(b)	-	+	+	+	+	+	ND
b-glucuronidase	D	D	-	+	-	d	-	ND
Mucato	+	+	+	-(70%)	-	+	+	ND
Salicina	-	-	-	-	+	-	-	ND
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-	-
Lise-fago O ₁	+	+	-	+	-	+	D	ND
Habitat normal animais	Sangue quente		Sangue frio e meio ambiente					?

Notas: (a): d-tartarato; (b): *S. Typhimurium* (d), *S. Dublin* (-); +: ≥ 90% reações positivas; ≥ 90% reações negativas; d: diferentes reações (sorovares); (e): crescimento sem produção de ácido.

Quadro 3 - Diferenciação bioquímica entre *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* e sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* mais frequentes

	<i>S. Typhi</i>	<i>S. Paratyphi A</i>	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>
Glicose (gás)	-	+	+
Ácido:			
Dulcitol	+/-	+	+
Arabinose	-/+	+	+
Descarboxilação:			
Lisina	+	-	+
Ornitina	-	+	+
Dehidrolação da Arginina	+/-	+	+
Produção de H ₂ S	+*	- / (+)	+
Citrato de Simmons	-	-	+

Notas: +: positivo; -: negativo; (+) 75% positivo após 48 horas; *: fraco

3 Habitat

O *habitat* natural das salmonelas pode ser dividido em três categorias, com base na especificidade do hospedeiro e padrão clínico por ele determinado: *altamente adaptadas ao homem*, incluindo *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C, agentes da febre entérica (febres tifoide e paratifoide); *altamente adaptadas aos animais*, representadas por *S. Dublin* (bovinos), *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* (suínos), *S. Abortusequi* (equinos), *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (aves), responsáveis pelo paratifo dos animais. Entretanto, em determinadas situações (idade jovem, pacientes com doenças crônicas, idosos, imunocomprometidos), os sorovares *S. Dublin* e *S. Choleraesuis* podem determinar no homem um quadro septicêmico, isto é, mais grave do que o causado por *S. Typhi*.

A terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atingem indiferentemente o homem e os animais, designadas *salmonelas zoonóticas*, as quais são responsáveis por quadro de gastroenterite (enterocolite) ou por doenças de transmissão alimentar. Sua distribuição é mundial, sendo os alimentos os principais veículos de sua transmissão. São responsáveis por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto nos países emergentes quanto nos desenvolvidos, determinando pequenos e grandes surtos, envolvendo, principalmente, o consumo de alimentos de origem animal, como ovos, aves, carnes e produtos lácteos.

4 Ecologia

A *Salmonella* spp. é eliminada em grande número nas fezes, contaminando o solo e a água. A sobrevivência no meio ambiente pode ser muito longa, em particular na matéria orgânica. Pode permanecer viável no material fecal por longo período (anos), particularmente em fezes secas, podendo resistir mais de 28 meses nas fezes de aves, 30 meses no estrume bovino, 280 dias no solo cultivado e 120 dias na pastagem, sendo ainda encontrada em efluentes de água de esgoto, como resultado de contaminação fecal.

Os produtos agrícolas não processados, como hortaliças e frutas, e os alimentos de origem animal, como as carnes cruas, o leite e os ovos são veículos frequentes de salmonelas. A contaminação de origem fecal é geralmente a fonte para os produtos agrícolas, pela exposição à água contaminada; para o leite e os ovos, por meio da exposição direta; e para a carne, usualmente durante as operações de abate.

Em comparação com outros bastonetes Gram negativos, as salmonelas são relativamente resistentes a vários fatores ambientais. A adaptabilidade fisiológica de *Salmonella* é demonstrada por sua habilidade para proliferar em valores de pH entre 7.0 e 7.5 (extremos 3.8 e 9.5), temperatura de 35°C a 43°C (extremos 5°C a 46°C) e uma atividade hídrica ($\geq 0,94$), ocorrendo variações entre sorovares e/ou cepas. Nos produtos secos, como o chocolate, o cacau em pó, as especiarias ou o leite em pó, e em produtos congelados, como os sorvetes, o normal é a sobrevivência por períodos de tempo prolongados. A bactéria é sensível ao calor, não sobrevivendo à temperatura superior a 70°C. No entanto, a termorresistência pode incrementar-se com menor coeficiente de atividade de água.

A inativação ocorre rapidamente em temperatura de pasteurização em alimentos com atividade de água $\geq 0,95$ a qual, quando inferior, aumenta a termorresistência. Essa associação entre tolerância ao sal e ácido resistência são interdependentes. Certos processos como salmoura ($\geq 9,0\%$) e defumação têm efeito limitado na sobrevivência das salmonelas, pois elas podem sobreviver por vários meses na salmoura com cerca de 20% de sal e em produtos de elevados teores proteicos ou de gordura. Como exemplos, podem ser citados a carne seca defumada e o pescado, nos quais as salmonelas apresentam capacidade de sobrevivência de várias semanas a meses. A relativa resistência que esses microrganismos apresentam à dessecação, congelamento, salmoura e defumação explica por que sobrevivem em muitas classes de alimentos. O efeito bactericida das condições ácidas varia de acordo com a natureza do ácido utilizado no processo, sendo que os ácidos acético e propiônico são mais inibitórios que os ácidos láctico e cítrico.

5 Características Clínicas e Patogenia

A dose infectante varia de 10^5 a 10^8 células, porém, em pacientes imunocomprometidos, têm sido observadas doses $\leq 10^3$ para alguns sorovares envolvidos em surtos de doenças de transmissão alimentar – DTA. A manifestação clínica inclui quadros entéricos agudos ou crônicos, além de localização extraintestinal, como infecções septicêmicas, osteomielite, artrite, hepatite etc.

Os microrganismos penetram por via oral, invadindo a mucosa intestinal, com disseminação para a submucosa, resultando em enterocolite aguda. Normalmente, o quadro diarreico é moderado, sem a presença de sangue, entretanto, em alguns quadros clínicos, pode ocorrer perda de pequeno volume de fezes associado a tenesmo e sangue.

Seu transporte, através do sistema retículo endotelial, aliado à capacidade de multiplicação no interior dos macrófagos, possibilita sua manutenção e disseminação no organismo. Indivíduos subnutridos ou com deficiências do sistema imune podem apresentar infecções de extrema gravidade, como a incidência de bacteremia em pacientes aidéticos, dos quais 20% a 60% relatam infecção gastrointestinal prévia.

Sua virulência é multifatorial, incluindo mobilidade, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência à ação do complemento, produção de entero, cito e endotoxina, sendo desconhecido o exato papel de cada um, para a manifestação da doença. Em alguns sorovares, a virulência é mediada por um plasmídeo, em uma região do operon de 8Kb que contém os genes *spvR ABCD*, cuja origem é ainda desconhecida. A relação entre a presença desse plasmídeo de virulência e sorovar já se encontra bem estabelecida em *S. Dublin*, *S. Gallinarum* e *S. Choleraesuis*.

Em pacientes imunodeprimidos, a salmonelose pode ser assintomática ou ainda determinar diarreia autolimitada em 95% dos casos. As infecções clínicas humanas determinadas por *Salmonella* spp. apresentam quatro síndromes clínicas distintas: gastroenterite, febre entérica, septicemia com ou sem infecções localizadas e determinam o estado de portador assintomático. Entre a totalidade de sorovares, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são os sorovares de maior prevalência em casos de septicemia e infecções localizadas.

Infecções gastrintestinais

O quadro clínico humano pode variar com fezes diarreicas de características aquosas, semelhante à diarreia colérica, a fezes consistentes com sangue oculto, ou visível, e muco. O quadro diarreico regride, usualmente, de três a quatro dias. Pode ocorrer febre (39°C) em cerca de 50% dos casos, normalmente de curta duração (dois dias), cólicas abdominais leves a intensas quando houver invasão dos linfonodos (linfadenite mesentérica), que podem mimetizar apendicite. Desenvolvimento de síndrome de cólon irritado – SCI, que se caracteriza por diarreia branda persistente seguida de quadro agudo de gastroenterite.

Em pacientes portadores de SCI, há persistência como portador assintomático em 31% após cinco anos. Em pacientes hospitalizados, portadores de câncer, o quadro reincide, ocasionando pneumonia semelhante àquela ocasionada por *Pneumocystis*, e *Salmonella*. permanecendo presente nas fezes após cessarem os sintomas, com uma média de excreção durante o período de cinco semanas. O estágio de portador persiste por até nove semanas em 90% dos adultos, sendo, em crianças < 5 anos, inferior a sete semanas. A frequência desse estágio entre manipuladores de alimentos usualmente é reduzida (0,5%). Entre esses profissionais, normas de educação e higiene no manuseio de alimentos representam os principais aspectos para minimizar o risco de transmissão alimentar.

Bacteremia

A febre entérica é usualmente determinada por *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* e *C* e *S. Sendai*, entretanto pode ser determinada por outros sorovares. Sua frequência é mais elevada entre pacientes do sexo masculino, acometendo de 1% a 4% dos pacientes imunodeprimidos (especialmente doenças do sistema reticuloendotelial, linfoma, leucemia, câncer, lúpus sistêmico e outras doenças vasculares). O risco de desenvolvimento de bacteremia entre pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida – HIV é de 20 a 100 vezes maior do que na população normal. Entre esses, somente 20% dos pacientes apresentam quadro posterior diarreico.

Usualmente, a bacteremia apresenta elevada prevalência em adultos, os quais têm como histórico o uso prévio de drogas imunossupressoras. Entre esses pacientes, a complicação subsequente usualmente é a pneumonia, sendo responsável por elevados índices de letalidade entre idosos.

Infecções do Sistema Nervoso Central

As infecções incluem meningites, abscessos, empiema subdural. A presença de diarreia e de outros sintomas gastrentéricos são apontados em 50% dos casos. Embora a bacteremia seja comum em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida, complicações do sistema nervoso central raramente são apontadas. A maior prevalência dessas infecções ocorre entre pacientes de longo período de hospitalização, drenagem cirúrgica e terapia antimicrobiana prolongada.

Os sorovares de maior prevalência em bacteremia e nas infecções do sistema nervoso central são *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*.

Infecções em outros sítios

As infecções variam de bacteriúria ao comprometimento de juntas (mais comuns), ossos e tecidos e endocardites (< 1% a 0.1%). Podem ocorrer no baço e no trato genital, assim como em complicações pulmonares. No trato urinário, há maior prevalência em mulheres, das quais 50% apresentam quadro diarreico. Os principais fatores de risco são imunossupressão, cistite, pielonefrite e abscesso renal, entretanto a maioria dos casos ocorre em pacientes sem fatores de risco conhecidos.

A *Salmonella* também é reconhecida por ocasionar lesões endovasculares e osteomielite, acometendo 7% a 10% dos pacientes > 50 anos.

Em pacientes que apresentam como fatores de risco diabetes, infecção por HIV (vírus da imunodeficiência adquirida) e aterosclerose (composta especialmente por lipídios e tecido fibroso que se formam nas paredes dos vasos), a presença de *Salmonella* é observada nas placas ateroscleróticas, tendo em vista a propriedade de se multiplicar nos fagócitos dessas placas.

Entre as complicações da gastroenterite, podem ser citadas a rabdomiólise (lesão do músculo esquelético, usualmente acompanhado de falha renal), a osteomielite, que pode levar ao aparecimento de aneurisma abdominal aórtico, com elevado índice de mortalidade, a linfadenite mesentérica, a apendicite, a peritonite, a colecistite, a pericardite, a pleuropneumonia e a insuficiência renal, que têm sido amplamente apontadas como infecções extraintestinais determinadas por *Salmonella* spp.

Artrite reativa, artrite inflamatória e a síndrome de Reiter (ocorrência simultânea de uretrite e/ou cervicite, conjuntivite e artrite) têm sido reportadas por uma ampla variedade de enteropatógenos, incluindo *Salmonella* spp. A incidência de artrite reativa e de síndrome de Reiter em surtos varia de 6% a 29% e 3%, respectivamente. Estudos recentes apontam que pacientes com o marcador imunogenético HLA-B27 apresentam elevada probabilidade de desenvolver a síndrome de Reiter. A antibioticoterapia não é efetiva para o tratamento de artrite reativa.

6 Epidemiologia

A salmonelose é considerada a zoonose mais difundida do mundo. Como o ciclo de transmissão de salmonela envolve praticamente todos os vertebrados e sua veiculação está associada à ingestão de alimentos, seu controle representa um desafio para a saúde pública, tendo em vista a emergência de novos sorovares e a reemergência de outros em determinadas áreas, tanto nos países emergentes quanto nos industrializados.

O fator epidemiológico mais destacado nos animais é o estado de portador, no qual a falta de sintomas e as dificuldades técnicas para sua detecção antes ou durante a inspeção dos produtos de origem animal os convertem em fonte contínua de contaminação do meio ambiente e, portanto, dos alimentos.

Considerando que a principal via de transmissão de *Salmonella* spp. está na cadeia alimentar, sua presença em animais, criados com objetivo comercial, aponta esse microrganismo como o mais incidente e relevante agente etiológico de enteroinfecções. Isso ocasiona perdas de milhões de dólares para a indústria, particularmente de bovinos, suínos e aves, tanto para o mercado interno quanto para exportação, sendo que, em alguns países, a rigidez na inspeção representa necessidade constante de qualidade.

Particularmente nas aves, a transmissão de *Salmonella* spp. pode ser do tipo vertical ou horizontal. Por séculos, o consumo de ovos sem cocção era uma prática comum do homem, porém, na atualidade, diferentes surtos, determinados pelo sorovar *S. Enteritidis* e, mais recentemente, por outros sorovares (*S. Heidelberg*, *S. Agona* e *S. Virchow*), levaram ao reconhecimento de sua capacidade de transmissão transovariana, levando à disseminação, para o homem, por meio de alimentos que são utilizados sem a devida cocção, como tortas, maioneses, omeletes etc. (WHITE; FEDORKA-CRAY; CHILLER, 2006).

A transmissão horizontal envolve todos os sorovares, os quais apresentam características ubíquas. Pode ocorrer pelo meio ambiente, em que roedores assumem o papel de portadores assintomáticos, por longos períodos (> 10 meses), disseminando tais microrganismos entre diferentes áreas. Outra via, a qual ainda é objeto de especulação, está representada pelas rações. Embora, na literatura nacional, entre as décadas de 1980 e 1990, seja apontada ausência dos sorovares adaptados às aves em matérias-primas de origem animal, algumas medidas têm sido adotadas pelos criadores, no sentido de minimizar possíveis contaminações, tendo em vista a impossibilidade de sua eliminação total (BACK et al. 2006).

Os produtos agrícolas não processados, como hortaliças e frutas, e os alimentos de origem animal, como carnes cruas, leite e ovos, são veículos frequentes de salmonelas. A contaminação de origem fecal é geralmente a fonte para os produtos agrícolas, pela exposição à água contaminada;

para leite e ovos, a contaminação se dá por meio da exposição direta e para a carne, usualmente ocorre durante as operações de abate (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1988).

Os animais ocupam o ponto central na epidemiologia das salmonelas entéricas, representando uma fonte de infecção de grande importância sanitária, porém de difícil controle. Com exceção dos poucos sorovares adaptados à espécie humana, não há dúvida de que o homem contrai a infecção, cuja manifestação clínica é gastrintérica, usualmente resultante do consumo de alimentos de origem animal.

Soma-se, nesse contexto, o aumento da resistência de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos, com o percentual elevando-se de 17% na década de 1970 para 31% ao final dos anos 1980, incluindo-se a resistência às fluoroquinolonas. Tal fato vem culminando, neste século, com o aparecimento, em diferentes países, de cepas produtoras de diferentes tipos de beta-lactamases.

A incidência de resistência bacteriana a antimicrobianos representa risco à saúde humana e animal. Esse tema de extrema importância tem sido objeto de atenção de instituições como a Organização Mundial da Saúde – OMS, o Escritório Internacional de Epizootias – OIE e o Codex Alimentarius, que vêm discutindo soluções globais para o problema. Tal fato tem por base sua distribuição mundial, sendo detectada na maioria das espécies animais utilizada para consumo humano, além de animais silvestres e domésticos.

Embora a terapia antimicrobiana não seja recomendada na maioria das infecções diarreicas, esse procedimento é indicado nas infecções invasivas e ocorre, na prática, muitas vezes de modo indiscriminado, resultando no aumento de amostras resistentes aos antimicrobianos, podendo representar grave problema, especialmente nos países emergentes.

Como resultados, podem ser citadas diferentes situações, como a resistência, no sudeste da Ásia, de 50% de *Salmonella* Typhi ao cloranfenicol, à tetraciclina e à ampicilina, com o uso de fluoroquinolonas, excetuando-se crianças, para as quais esta é substituída pela ceftriaxone.

O uso de antimicrobianos na terapêutica também requer o conhecimento ou suspeita quanto ao agente infeccioso e seu perfil de sensibilidade. Contempla um regime posológico, cuja dosagem e duração possibilitam o controle do processo infeccioso, reduzindo-se riscos de desenvolvimento de resistência bacteriana.

7 Diagnóstico Laboratorial

Espécimes clínicos

Sangue

O hemocultivo reveste um interesse especial no caso de febre tifoide e paratifoide, porém não é constantemente positivo. Os percentuais de positividade, na ausência de tratamento prévio com antibióticos, são de 90% durante a primeira semana de evolução, de 75% na segunda, de 40% na terceira e de 10% na quarta semana.

Os hemocultivos são negativos nas infecções transmitidas por meio dos alimentos (infecções gastrintestinais), determinadas pela maioria dos sorovares, podendo causar septicemia em indivíduos imunocomprometidos.

1. Principais cuidados para coleta

A coleta deve ser realizada antes da utilização de antimicrobianos devendo-se efetuar a desinfecção da superfície dos frascos de cultivo (álcool 70°GL) e assepsia do sítio de punção (álcool 70°GL ou solução iodada) em movimentos concêntricos do centro para a extremidade.

2. Volume para cultura

Nos adultos, o volume deverá ser de duas coletas de 10mL com intervalo de uma hora, os quais são inoculados em dois frascos de meio de cultura (inocular 10mL/100mL de meio enriquecido, acrescido de anticoagulante SPS – Polianetolsulfonato sódico). Para crianças, mantendo a proporção (1mL/10mL de meio enriquecido, acrescido de SPS), devem ser tomados volumes variáveis de acordo com o peso (< 1,5kg a < 4kg – 1mL; 4kg a 13kg – 3mL; 13kg a 25kg – 10mL; > 25kg – 20mL).

No processamento das amostras de sangue por hemocultura tradicional, os frascos devem ser incubados a 35°C e avaliados por sete dias e deve ser empregada, paralelamente, semeadura direta em meio seletivo-indicador. A partir do crescimento de colônias com morfologia típica, deverá ser efetuado o isolamento e subsequente identificação bioquímica e antigênica. No caso de recebimento de sangue coagulado, dilacerar o coágulo, por meio de uma pipeta e, em sequência, semear em meio de enriquecimento e, paralelamente, em meio seletivo-indicador.

Fezes

A procura de uma metodologia ideal para o isolamento de *Salmonella* spp. tem sido constante entre os pesquisadores, o que tem trazido melhorias na especificidade e na sensibilidade, bem como simplicidade e rapidez na execução dos exames bacteriológicos.

Numerosos métodos e técnicas clássicas e moleculares vêm sendo descritos, visando ao isolamento de diferentes sorovares de *Salmonella spp.* procedentes de distintas fontes de infecção.

Nas amostras clínicas, se um espécime é apropriadamente obtido na fase aguda da doença, não é necessária a utilização de meios de enriquecimento, tendo em vista a presença de grande número de células. Contudo, na forma crônica ou mesmo na identificação de portadores, é indicada a utilização de meios de enriquecimento e de meios seletivos para facilitar seu isolamento.

1. Aspectos relevantes para a coleta

As fezes devem ser coletadas durante a fase aguda, antes de iniciar o tratamento com antibióticos. Em pacientes com infecção ativa, do mesmo modo que para crianças ou indivíduos com dificuldade de obtenção de amostras, deve ser priorizada a utilização de *swabs* retais. Em pacientes com suspeita de febre tifoide, a pesquisa de *Salmonella Typhi* nas fezes é indicada a partir da segunda semana da doença, assim como na fase de convalescença e na detecção de portadores.

2. Fezes de emissão espontânea

Essas amostras devem ser coletadas em pequenos recipientes, de vidro ou polietileno, de boca larga, limpos e/ou esterilizados. O material deverá ser analisado até duas horas após a coleta, quando mantido à temperatura ambiente. Deve ser colhida de 0,5g a 2g de fezes e, quando da presença de sangue ou de muco, essa deve ser a porção selecionada para a avaliação laboratorial. Evitar a coleta de espécimes fecais a partir das roupas do paciente, da superfície de camas e/ou chão.

3. Espécimes retais

Umedecer o *swab* em solução fisiológica ou em água destilada esterilizada e introduzir na ampola retal do paciente ou comunicante, comprimindo-o em movimentos rotatórios suaves por toda a extensão dessa região. O processamento laboratorial deve ser efetuado até duas horas após a coleta e, caso não seja possível, introduzir o *swab* retal ou fecal impregnado de fezes no meio de conservação Cary e Blair. Nessa condição, as salmonelas sobrevivem por uma a duas semanas em temperatura de refrigeração.

4. Coleta de fezes em papel-filtro:

Podem ser utilizadas tiras de papel-filtro, tipo xarope ou mata-borrão, com dimensões de 2,5cm de largura por 6,0cm de comprimento. As fezes diarreicas ou suspensas em água devem ser espalhadas em dois terços de uma das superfícies do papel, com auxílio de um fragmento de madeira (palito individual) ou de qualquer outro material semelhante, disponível no momento. Em sequência, devem ser acondicionadas em invólucros plásticos após dessecar naturalmente. Sob essas condições, a *Salmonella* se mantém viável por um período aproximado de 30 dias.

5. Transporte:

São utilizados contêineres plásticos ou isopor para transporte das amostras e manutenção por curto período de tempo (> 2h < 4h). Estas são acondicionadas em embalagens de plástico ou de papel e colocadas no interior da caixa de transporte, sendo que as fichas contendo as informações clínicas e/ou epidemiológicas são mantidas à parte dos espécimes clínicos. Para reutilização dos contêineres para transporte, deverá ser efetuada a desinfecção, utilizando-se solução de hipoclorito de sódio (100ppm).

Exame direto de fezes – avaliação presuntiva

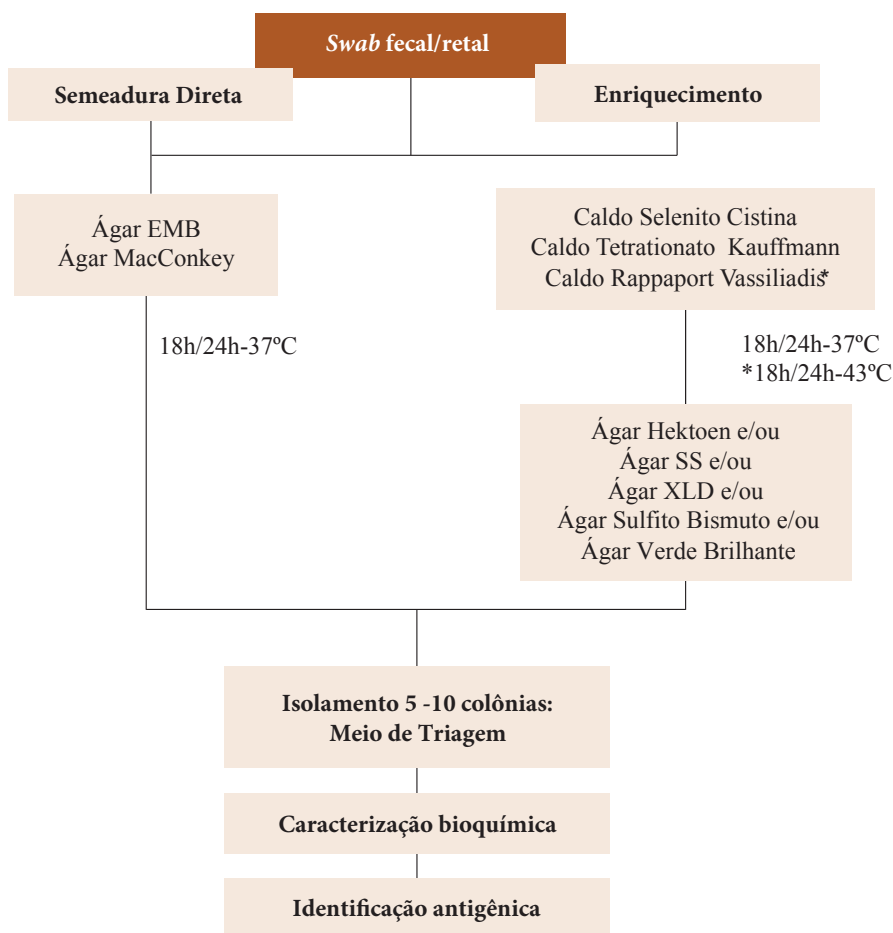
É uma ferramenta para orientar o profissional de laboratório na metodologia a ser adotada. Os resultados podem ser individualizados da seguinte forma: a presença de piócitos e células mononucleares indicam processo inflamatório; a presença de polimorfonucleares é indicativa de síndrome disenteriforme ou colite determinada por patógenos invasivos; e a presença de células mononucleares predomina em pacientes com febre tifoide.

1. Metodologia

Utilizar solução de azul de metileno de Loeffler, misturada em igual quantidade com as fezes; essa mistura deve ser colocada sobre lâmina, coberta por lamínula e examinada com microscópio ótico (objetiva de 10x e 40x).

FLUXOGRAMA

Isolamento de *Salmonella spp.* em espécimes fecais
Fezes (suspensão)



Espécimes oriundos de outros sítios orgânicos

Os procedimentos de rotina empregados na análise microbiológica dos diferentes espécimes clínicos também podem ser utilizados no isolamento de *Salmonella* spp. A morfologia colonial fornece as primeiras informações para a sua identificação.

É importante conhecer o potencial de crescimento de cada meio de cultura e observar as características das colônias. Por exemplo, semeadura em Ágar Sangue e em Ágar MacConkey pode apontar morfologia semelhante ou, ainda, tamanhos distintos.

Um dos aspectos mais importantes na análise de amostras oriundas de diferentes sítios orgânicos é a coleta e o transporte até o laboratório.

- *Fluidos orgânicos e secreções*: em sua maioria, os líquidos (pleural, ascítico, biliar, de articulações e outros) são coletados por procedimento médico, devendo ser transportados imediatamente ao laboratório e processados dentro da rotina de diagnóstico de diferentes grupos microbianos.
- *Espécimes oriundos de infecções sistêmicas e localizadas*: em pacientes com *sépsis* aguda, meningite, osteomielite, artrite ou pneumonia devem ser coletadas duas amostras (10mL a 20mL por amostra) de punções venosas distintas, antes da antibioticoterapia, com intervalos de cinco a 15 minutos entre as punções.
- *Urina*: a coleta deve ser feita pela manhã, preferencialmente da primeira micção do dia, ou então após retenção vesical de duas a três horas. A coleta deve seguir normas de assepsia rigorosa prévia dos genitais com água e sabão neutro, posterior secagem e coleta do jato intermediário espontâneo.
- *Líquor*: a coleta deve ser realizada por equipe médica especializada, sendo recomendado que o paciente esteja em jejum. O transporte da amostra para o laboratório deve ser feito imediatamente e, quando tiverem sido coletados dois ou mais tubos, o laboratório deverá utilizar o tubo que contiver menos sangue, o que facilita o isolamento bacteriano.

Salmonella spp. em alimentos

A salmonelose é uma das zoonoses mais complexas em sua epidemiologia e controle, cujos padrões diferem de uma região para outra. Isso se deve a diferenças nos hábitos alimentares, práticas de elaboração de alimentos, criação de animais e padrões de higiene e saneamento. Seu controle é um trabalho árduo, tendo em vista a emergência de novos sorovares e a reemergência de outros em determinadas áreas, tanto nos países emergentes quanto naqueles industrializados (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1988).

Qualquer alimento que contenha *Salmonella* spp. é um risco potencial para o consumidor, cuja veiculação é facilitada, na atualidade, pela mudança nos hábitos alimentares da população. A necessidade, cada vez maior, de elevar a produção/oferta de alimentos leva ao aumento dos fatores de risco, resultantes de falhas quanto ao manuseio, transporte muitas vezes em condições inadequadas, aliados à ausência de critérios básicos de higiene e saneamento, os quais favorecem a disseminação.

Nos produtos secos, como chocolate, cacau em pó, especiarias ou leite em pó, e em produtos congelados como os sorvetes, o normal é a sobrevivência por períodos de tempo prolongados. Esse microrganismo é

sensível ao calor e não sobrevive à temperatura $> 70^{\circ}\text{C}$, no entanto, a termorresistência pode ser suplementada com menor coeficiente de atividade de água, como inativação que ocorre rapidamente em temperatura de pasteurização em alimentos com atividade de água $\geq 0,95$.

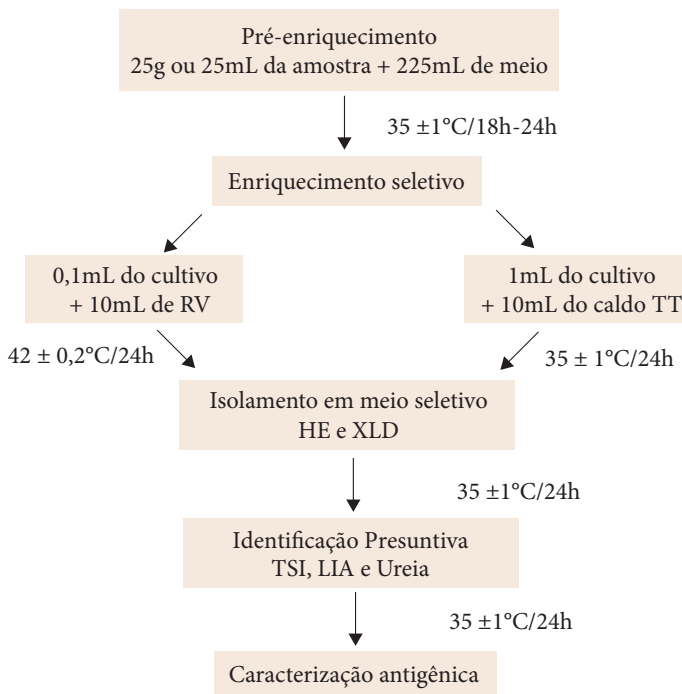
A associação entre tolerância ao sal e ácido resistência são interdependentes. Certos processos como salmoura ($\geq 9,0\%$) e defumação têm efeito limitado na sobrevivência das salmonelas, podendo resistir por vários meses na salmoura com cerca de 20% de sal, em produtos de elevado teor proteico ou de gordura. São exemplos a carne seca defumada e o pescado, em que têm capacidade de manter-se vivos por várias semanas a meses. A relativa resistência que esses microrganismos apresentam à dessecação, ao congelamento, à salmoura e à defumação explica por que permanecem em muitas classes de alimentos. O efeito bactericida das condições ácidas varia de acordo com a natureza do ácido utilizado no processo, sendo que os ácidos acético e propiônico são mais inibitórios que os ácidos láctico e cítrico.

Deve ser salientado que, em alimentos com elevado teor lipídico, como ovos e chocolate, as salmonelas ficam dentro dos glóbulos de gordura, protegidas, não sendo afetadas pelas enzimas digestivas ou pela acidez gástrica, fato que reduz a dose infectante (FORSYTHE, 2002).

Nos alimentos, o isolamento de *Salmonella* spp. representa um problema para os bacteriologistas em função do reduzido número de microrganismos presentes, associados a uma microbiota mista e numerosa, aliada ainda à complexa composição de alguns tipos de alimentos.

Desse modo, a análise de alimentos para detecção de *Salmonella* spp. requer métodos diferentes daqueles utilizados em laboratórios clínicos. A metodologia convencional recomendada por diferentes órgãos regulamentadores segue basicamente quatro etapas, que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento, embora apresentem algumas variações na seleção de meios de cultura e na forma de preparação das amostras.

FLUXOGRAMA PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO EM ALIMENTOS



Características dos meios de cultura usualmente empregados

Pré-enriquecimento

As salmonelas podem estar presentes nos alimentos em pequenas quantidades e, geralmente, sofrem os efeitos resultantes do processamento e do armazenamento. Necessitam, portanto, de pré-enriquecimento em meios não seletivos para sua recuperação. Os danos às salmonelas resultam na perda ou na alteração das funções celulares, o que as tornam suscetíveis a agentes seletivos, que refletem na incapacidade de formar colônias em meios mínimos salinos, entretanto, são visualizadas em meios complexos.

Microrganismos que sofreram danos estruturais não são capazes de proliferar ou sobreviver em meios contendo agentes seletivos (concentrações crescentes de sal, lauril sulfato, desoxicolato, sais biliares, detergentes e antibióticos). O dano só é reversível se as células forem expostas às condições favoráveis de desenvolvimento em um meio não seletivo e rico em nutrientes. Essa recuperação pode ser conseguida utilizando-se vários meios, como água peptonada tamponada, caldo lactosado, água destilada verde brilhante, caldo tripticase de soja, entre outros (Quadro 4).

A água peptonada a 1,0% tamponada e o caldo lactosado são comumente usados, mas outros meios, tais como triptona de soja e caldo nutriente, podem ser empregados. O caldo lactosado pode, eventualmente, ser inconveniente como pré-enriquecimento quando utilizado em amostras que contêm população elevada de microrganismos fermentadores da lactose, pois a subsequente redução do pH do meio pode limitar a multiplicação das salmonelas, em particular das células com danos estruturais, embora a literatura aponte que a *Salmonella* spp. se multiplica em uma faixa ampla de pH (pH 3.8 a 9.5).

Quadro 4 - Procedimentos de isolamento de *Salmonella* aprovados por diferentes órgãos reguladores

Método ^(a)	Meios de Pré-enriquecimento ^(a)	Meios de Enriquecimento ^(a)	Meios Seletivo-Indicadores
ISO 6579 (2007)	APT ^(b) 37°C ±1 / 18±2h ^(c)	RVS 41,5 ±1°C / 24h ±3h MKTT 37°C±1°C / 24h± 3°C	XLD - 37°C ±1 / 24±3h 2°C opcional ^(e)
BAM/FDA ^(f) (2006)	CL 35°C ±2 / 24±2h ^(c)	RV 42°C ±0,2 / 24±2h TT 35°C ±2 / 24±2h ou 42°C ±0,2 / 24±2h ^(d)	HE 35°C ±0,2 / 24±2h SB 35°C ±2 / 24±2h XLD 35°C ±2 / 24±2h
MLG/FSIS (2004)	APA 35°C ±2 / 18±24h	RV ou RVS 42°C±0,5 / 22±2h TTH 42°C ±0,5 / 22±2h	VB 35°C ±0,2/18-24h XLT4 ou DM-LIA 35°C±2 / 18-24h
APHA ^(f) (2001)	CL 35°C ±2 / 24±2h ^(c)	SC 37°C±1°C / 24h±3°C TT 37°C±1°C / 24h±3°C	SS 35°C ±2 / 24±2h BS 35°C ±2 / 24±2h HE 35°C ±2 / 24±2h

Notas: ^(a) ISO – International Standartization Organization; **BAM/FDA** – Bacteriological Analytical Manual da Food and Drug Admistration – *on-line*; e **MLG/FSIS** – Microbiological Laboratory Guidebook *on-line* da Food Safety And Inspection Service, United States Department of Agriculture.

^(b) **APT** – Água Peptonada Tamponada; **CL** – Caldo lactosado; **SC** – Caldo Selenito Cistina; **RVS** – Caldo Rappaport Vassiliadis Soja; **MKTT** – Caldo Tetrionato de Kauffmann com novobiocina; **RV** – Caldo Rappaport Vassiliadis modificado; **TT** – Caldo Tetrionato; **TTH** – Caldo Tetrionato de Hajna; **XLD** – Ágar Xilose Lisina Desoxicolato; **HE** – Ágar Entérico Hektoen; **SS** – Ágar *Salmonella-Shigella*; **SB** – Ágar Sulfito de Bismuto; **DM-LIA** – Ágar Lisina Ferro duplamente modificado; **VBS** – Ágar Verde Brilhante Sulfa; e **XLT4** – Ágar Xilose Lisina Tergitol 4.

^(c) Existem algumas variações apontadas na descrição do procedimento técnico.

^(d) Alimentos com carga microbiana reduzida, incubar a 35°C, e com carga microbiana elevada a incubação deverá ser a 43°C.

^(e) Selecionar meio seletivo indicador adequado para o isolamento de cepas lactose positiva e dos sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi*. Podem ser empregados o Ágar Verde Brilhante – VB e o Ágar Sulfito de Bismuto – SB.

^(f) FDA e APHA, além do caldo lactosado, para uso geral, recomendam a utilização de: água destilada verde brilhante, para leite em pó e misturas lácteas; leite em pó desnatado verde brilhante, para chocolates, balas e confeitarias; caldo triptcase de soja para condimentos; caldo nutriente, para glacês e coberturas similares.

Quadro 5 - Confirmação de *Salmonella* spp. em alimentos – ISO 6579:2007

Testes bioquímicos	Autoaglutinação	Testes antigênicos	Interpretação
Típicos ¹	Não	Poli "O", "H" ou "Vi" positivos	Confirmado como <i>Salmonella</i> spp.
Típicos ¹	Não	Todos negativos	Pode ser <i>Salmonella</i> spp. ²
Típicos ¹	Sim	Não se aplica	
Atípicos	Não/Sim	Poli "O", "H" ou "Vi" positivos	Não confirmado como <i>Salmonella</i> spp.
Atípicos	Não/Sim	Todos negativos	

Notas: ¹Resultados típicos: TSI com bisel alcalino; acidez na profundidade; H₂S; lisina descarboxilase positiva; urease, β-galactosidade, VP e indol negativos.

² As cepas devem ser enviadas ao Laboratório de Referência Nacional para a confirmação definitiva.

Quadro 6 - Avaliação de *Salmonella* spp. em alimentos

Ágar TSI	Ágar LIA	Aglutinação		Ação
		Poli "O"	Poli "H"	
Base ácida/ápice alcalino com H ₂ S	Base e ápice alcalino com H ₂ S	+	+	Continuar
Base ácida/ápice alcalino com H ₂ S	Base e ápice alcalino com H ₂ S	+	-	Continuar
Base ácida/ápice alcalino sem H ₂ S	Base e ápice alcalino sem H ₂ S	+(?)	-	Continuar
Base ácida/ápice alcalino sem H ₂ S	Base e ápice alcalino sem H ₂ S	+	+	Continuar*
Base ácida/ápice alcalino sem H ₂ S	Base e ápice alcalino sem H ₂ S			Descartar
Base ácida/ápice alcalino com H ₂ S	Base ácida e ápice alcalino com/sem H ₂ S	+(?)		Continuar
Base e ápice ácidos sem H ₂ S	Base alcalina ou ácida e ápice sem H ₂ S			Descartar
Base e ápice ácidos com H ₂ S	Base e ápice alcalinos com H ₂ S	+(?)		Continuar**
Sem alteração de cor nos meios de cultura				Descartar

Fonte: (USDA, 2004)

Nota: **S. Typhisuis* – pode ser encontrada em suínos.

***S. enterica* subesp. *arizonae* ou *diarizonae*.

Enriquecimento Seletivo

O enriquecimento seletivo determina aumento contínuo de *Salmonella*, restringindo a proliferação da microbiota acompanhante. Devido à utilização dos diferentes agentes inibitórios adicionados aos meios, estes também diferem em sua seletividade e aplicação específica.

Diferentes tipos de inibidores têm sido propostos para enriquecimento seletivo de salmonelas, sendo a bile, o tetracionato, o selenito e corantes, como o verde brilhante e o verde malaquita, os mais usados. Esses inibidores são incorporados aos meios, isolados ou em combinação. Particularmente para produtos gordurosos como leite de coco e coco ralado, utilizar Tween-80, Triton X ou Tergitol 7.

A seletividade é melhorada pela incubação a 41°C-43°C. Nessa etapa, recomenda-se a utilização de dois diferentes meios, devido à variação de resistência da *Salmonella* spp. aos agentes seletivos. Os meios comumente usados são: caldo Rappaport Vassiliadis modificado – RV ou Rappaport Vassiliadis Soja – RVS e diversas formulações do caldo tetracionato – TT. Entretanto, o primeiro não deve ser utilizado, caso haja suspeita de *S. Typhi*.

Para amostras clínicas, podem ser utilizados diferentes meios de enriquecimento, destacando-se o Caldo Tetracionato, o Caldo Tetracionato Verde Brilhante, o Caldo Selenito, o Caldo Gram Negativo, o Caldo Cloreto de Magnésio Verde Malaquita, o Caldo Rappaport Vassiliadis e variações desses.

As principais características dos meios de enriquecimento seletivos mais empregados estão descritas na Quadro 7.

1. Caldo Tetracionato

A seletividade do caldo tetracionato depende de sua capacidade de restringir a multiplicação de coliformes. Sorovares de *Salmonella* (exceto *S. Choleraesuis*, *S. Typhisuis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*) possuem a enzima tetracionato-redutase e, conseqüentemente, são capazes de multiplicar-se no meio. Porém, o desenvolvimento excessivo de *Proteus* spp., que também produz essa enzima, pode interferir na detecção de *Salmonella* spp. Nesse caso, o caldo tetracionato verde brilhante, segundo Muller-Kauffmann, contendo verde brilhante e bile, inibe a multiplicação de espécies de *Proteus*

2. Caldo Rappaport

O Caldo Cloreto De Magnésio Verde Malaquita (Caldo Rappaport) vem demonstrando eficácia na detecção de *Salmonella* spp. A associação do cloreto de magnésio com um corante bacteriostático (verde malaquita) constituiu-se no meio de enriquecimento para a maioria dos sorovares de *Salmonella* spp., com exceção de *S. Typhi*. Posteriormente, uma modificação desse meio, resultante da diminuição da concentração de verde malaquita, com temperatura de 43°C para incubação, o qual foi denominado meio de Rappaport Vassiliadis, vem evidenciando maior eficiência quando da utilização de pequenas quantidades de inóculo, bem como por ter maior capacidade de inibição dos microrganismos competitivos.

3. Caldo Selenito

Esse meio vem sendo recomendado para o enriquecimento de *Salmonella* spp. em espécimes fecais, especialmente para o isolamento de *S. Typhi* e *S. Paratyphi B*, sendo também útil para a detecção de outros sorovares de *Salmonella* spp., mesmo quando os microrganismos estão presentes em pequeno número. A adição de cistina melhora a qualidade do meio de cultura.

4. Caldo Gram negativo – Caldo GN

Esse meio é utilizado para o enriquecimento seletivo de bactérias Gram negativas, particularmente *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., a partir de todo tipo de espécimes clínicos. Devido à concentração relativamente baixa de desoxicolato, é menos inibidor de *Escherichia coli* e de outros coliformes, enquanto a maior concentração de manitol em relação à glicose limita o crescimento de espécies de *Proteus* e favorece o de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., que são fermentadores do manitol.

Quadro 7 - Características dos meios de enriquecimento seletivos

Meios	Indicação	Substâncias inibidoras	Bactérias inibidas	Bactérias favorecidas
Caldo Selenito	Espécimes clínicos	Selenito de sódio	Coliformes <i>S. Typhisuis</i> , <i>S. Choleraesuis</i> , <i>S. Gallinarum</i> , <i>S. Pullorum</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Caldo GN	Espécimes clínicos	Citrato desoxicolato de sódio	Gram positivos, coliformes, <i>Proteus</i> spp.	Maioria das enterobactérias
Caldo Rappaport	Espécimes clínicos Alimentos	Cloreto de magnésio verde malaquita	Gram positivos, coliformes <i>S. Typhi</i> <i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Caldo Tetrionato	Espécimes clínicos Alimentos	Sais biliares lodo	Gram positivos, coliformes, <i>S. Typhi</i> , <i>S. Paratyphi</i> , <i>S. Pullorum</i> , <i>S. Gallinarum</i> , <i>S. Typhisuis</i> , <i>S. Choleraesuis</i> ,	<i>Salmonella</i> spp.

Meios seletivos-indicadores

No esquema de diagnóstico das enterobactérias, os meios seletivos indicadores, de natureza sólida, desempenham função primordial para o isolamento de diferentes membros dessa família.

Todos esses meios objetivam a diferenciação de *Salmonella* spp. de outras bactérias, em função de suas propriedades inibitórias e do aspecto macroscópico das colônias (Quadro 8).

Esses meios são comumente baseados na incapacidade da maioria das salmonelas em fermentar a lactose e, em alguns casos, outros substratos, tais como a sacarose e a salicina, bem como a capacidade de produção de sulfeto de hidrogênio.

Vários meios, tais como o Ágar Verde Brilhante, o Ágar Entérico de Hektoen, o Ágar Xilose Lisina Desoxicolato, o Ágar *Salmonella-Shigella* e o Ágar Sulfito de Bismuto, são indicados nos procedimentos aprovados por diferentes órgãos reguladores para o isolamento de salmonela a partir de alimentos.

Como algumas cepas de salmonela podem produzir reduzida quantidade de gás sulfídrico – H₂S, muitas vezes não detectado nos meios seletivos, ou ainda perder a capacidade de produzir esse gás, particularmente na análise de alimentos, é importante que o segundo ou terceiro meio de isolamento não seja baseado nessas duas características. Uma dessas opções é o Ágar Verde Brilhante – BG Ágar, que se baseia na fermentação da lactose, mas não na produção de H₂S, e o Ágar Bismuto Sulfito – BS Ágar, que se baseia na produção de H₂S, mas não fermenta a lactose.

O Ágar Sulfito de Bismuto é particularmente recomendado para o isolamento de *S. Typhi*, entretanto não deve ser utilizado se foi preparado em período superior a 24-36 horas.

Por outro lado, esse meio inibe o crescimento de outros sorovares de *Salmonella* spp., a menos que seja refrigerado a 4°C por, no mínimo, 24 horas antes de sua utilização.

Mais recentemente, novos meios de cultura que incorporam substâncias cromogênicas em sua fórmula estão disponíveis no mercado, os quais, por serem seletivos e indicadores, permitem a diferenciação de *Salmonella* spp. de outras bactérias, pelo desenvolvimento de cores características para cada gênero/grupo bacteriano. Dentre os meios cromogênicos, podem ser citados: Ágar Rambach, Cromocen SC, CHROMagar *Salmonella*, Colorex *Salmonella*.

O Ágar Rambach vem sendo utilizado para identificar *Salmonella* spp. em gêneros alimentícios e amostras clínicas, permitindo a diferenciação com membros do gênero *Proteus* e outras bactérias entéricas. Além de um composto cromogênico que indica a presença de b-galactosidase, própria dos coliformes, possibilita a identificação de *Salmonella* spp. por formar ácido a partir do propilenoglicol que, em combinação com um indicador de pH, resulta em uma coloração vermelho carmim, característica de suas colônias.

A presença de fragmentos de β-galactosidase, característica dos coliformes, é evidenciada pelo desenvolvimento de colônias azul-esverdeadas ou violeta-azuladas. Outras enterobactérias ou bactérias Gram negativas, como *Proteus*., *Pseudomonas*, *Shigella*. *S. Typhi* e *S. Paratyphi A* apresentam colônias incolores.

Cromocen SC é um meio para a detecção, isolamento, diferenciação e/ou contagem de *Salmonella* (exceto *S. Typhi*), coliformes totais e de outras bactérias Gram negativas. O meio se baseia na combinação de uma reação cromogênica para detectar a atividade β-galactosidase e uma reação bioquímica de degradação de fontes de carbono que produzem diminuição do pH, com a consequente alteração de cor do indicador incluído na formulação. A *Salmonella* (exceto *S. Typhi*) apresenta colônias com centro vermelho e bordas mais claras; coliformes (exceto *Klebsiella* spp. e *Citrobacter* spp.), colônias verde-azuladas; e *Klebsiella* spp. e *Citrobacter* spp. colônias violeta. As colônias incolores ou com pigmentação própria correspondem a outras bactérias Gram negativas.

CHROMagar *Salmonella* é um meio seletivo e diferencial para o isolamento e a identificação presuntiva de *Salmonella* spp. de outras bactérias coliformes e não coliformes em amostras fecais e de alimento. Colônias de *Salmonella*, incluindo *S. Typhi* caracterizam-se pela cor púrpura, e outras espécies bacterianas são inibidas, incolores ou azuis.

Colorex *Salmonella* é um meio cromogênico para isolamento e diferenciação de *Salmonella* spp., incluindo *S. Typhi*, diretamente de espécimes clínicos e de alimento. Apresenta, em sua composição, mistura cromogênica especial que permite diferenciar *Salmonella* spp. de outras bactérias, com base na cor e na morfologia das colônias, além de inibir bactérias Gram positivas. Colônias de *Salmonella* spp. se apresentam na cor púrpura; *E.coli* e outros coliformes, na cor azul-esverdeada, enquanto os microrganismos incapazes de hidrolisar o composto cromogênico são incolores.

Nos espécimes clínicos, a recuperação de múltiplos sorovares de *Salmonella* spp. requer dois ou mais meios seletivos indicadores e a escolha de um deles, ou do esquema a ser utilizado para o isolamento e identificação desse microrganismo, é, em grande parte, questão de preferência pessoal. Portanto, na escolha do meio de cultura, deve ser levado em consideração o espécime a ser analisado e os sorovares usualmente detectados.

É importante lembrar que a interação dos meios de enriquecimento e seletivos com a temperatura e tempo de incubação são fundamentais para melhor isolamento dessa bactéria.

A prevalência de *Salmonella* spp. no ambiente e em alimentos e a necessidade de redução do intervalo de tempo das análises laboratoriais têm levado à busca e ao consequente uso de procedimentos analíticos mais rápidos. Entretanto, esses devem ser equivalentes, em sensibilidade e em especificidade, aos métodos clássicos, podendo ser citados: testes bioquímicos miniaturizados, métodos baseados em anticorpos, hibridização de DNA e variações do método de PCR.

Apesar de vários desses métodos serem considerados rápidos, a maioria dos sistemas de detecção de *Salmonella* spp. ainda recorre ao cultivo para recuperar células que sofreram danos estruturais e ampliar a população de *Salmonella* spp. em meios líquidos. Dessa forma, os procedimentos de pré-enriquecimento e/ou enriquecimento seletivo, devem ser empregados em conjunto com os métodos rápidos.

Quadro 8 - Características dos meios seletivos – indicadores

	Ágar EMB.	Mac Conkey	Ágar SS	Ágar Hektoen	Ágar XLD	Ágar Verde Brillante	Ágar Sulfito de Bismuto
Fontes de aminoácido	Proteose peptona	Peptona Proteose peptona	Proteose peptona	Proteose peptona Extrato de levedura	Extrato de levedura	Proteose peptona Extrato de levedura	Proteose peptona Extrato de levedura
Carboidratos	Lactose Sacarose	Lactose	Lactose	Lactose	Xilose Lactose Sacarose	Lactose Sacarose	Glicose
Indicadores	Eosina Azul de metileno	Vermelho neutro	Vermelho neutro Citrato férrico	Azul bromotimol Fucsina ácida Citrato férrico	Vermelho de fenol Citrato férrico	Vermelho de fenol	Sulfito de bismuto Sulfato de ferro
Detectado	Fermentação da lactose Sacarose	Fermentação da lactose	Fermentação Lactose Produção de H ₂ S	Fermentação Lactose Sacarose Salicina H ₂ S	Xilose Lactose Sacarose Produção de H ₂ S Descarboxilação da lisina	Fermentação Lactose Sacarose	Produção de H ₂ S Redução do bismuto
Inibidores	Eosina Azul de metileno	Sais biliares Cristal violeta	Sais biliares Citrato de sódio	Sais biliares	Desoxicolato de sódio	Verde brilhante	Verde brilhante Sulfito de bismuto
Bactérias Favorecidas	Enterobactérias	Enterobactérias	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> particularmente <i>S. Typhi</i>
Aspecto das Colônias	Fermentadoras: púrpura/verde metálico Não fermentadoras: transparentes	Fermentadoras: vermelhas Não fermentadoras: incolores/discretamente amarelas	Fermentadoras: núcleo rosado, periferia clara Não fermentadoras: incolores Produção H ₂ S: ponto negro no centro	Fermentadoras: salmão Não fermentadoras: verde-azuladas Produção H ₂ S: ponto negro no centro	Fermentadoras: amarelas Não fermentadoras: cor do meio Descarboxilação da lisina vermelho-púrpura ao redor das colônias Produção de H ₂ S ponto negro no centro	Fermentadoras: amarelo-esverdeadas Não fermentadoras: vermelhas	<i>S. Typhi</i> – colônias negras circundadas por halo de brilho metálico Outros sorovares: colônias negras ou verdes

Identificação Bioquímica Presuntiva (Meios de Triagem)

Uma vez selecionadas colônias sugestivas nos meios indicadores seletivos, estas serão transferidas para meios de triagem, tais como Ágar ferro triplo açúcar – Ágar TSI, Ágar dois açúcares ferro (Kligler – KIA), Ágar Lisina Ferro – LIA, meio de Costa e Vernin – CV, meio IAL (modificação do meio de Rugai e Araújo), Ágar Motilidade-Indol-Lisina – MILi, Ágar Motilidade-Indol-Ornitina – MIO e meio EPM – Escola Paulista de Medicina.

As características diferenciais dos meios de triagem mais utilizados estão descritas nos quadros 9, 10, 11, 12 e 13. Esses meios podem ser empregados de forma isolada ou em associação e possibilitam caracterização bioquímica presuntiva, indicando os testes bioquímicos complementares necessários para sua identificação.

1. Ágar ferro-açúcar triplo (Ágar TSI)

Esse meio é utilizado para diferenciação de bastonetes Gram negativos com base na fermentação e produção de gás dos carboidratos: glicose, lactose e sacarose e produção de sulfeto de hidrogênio. Permite verificar a fermentação da glicose por meio do aparecimento de coloração amarela na base e a produção de gás, indicada pela formação de bolhas ou rachaduras no meio. A mesma coloração também é observada na porção superior do tubo quando ocorre fermentação da lactose e/ou sacarose. Quando esses dois açúcares não são fermentados, o ápice permanece com a cor original (âmbar). A produção de H₂S é indicada pela cor negra na base da porção central do tubo. Microrganismos como *Proteus mirabilis*, *Edwardsiella tarda*, *Citrobacter freundii* e *Salmonella* spp. podem apresentar perfil de comportamento semelhante.

Ágar ferro - dois açúcares (Kligler Iron Ágar – KIA)

Esse meio apresenta as mesmas indicações, leitura e interpretação do Ágar TSI, porém com diferença na sua formulação por não conter sacarose.

Ágar Lisina-Ferro – LIA

Esse meio de cultura usualmente é empregado em associação com outro meio de triagem para identificação presuntiva de enterobactérias, visando ofertar maior número de informações para a identificação presuntiva. A descarboxilação da lisina é evidenciada pela coloração púrpura (alcalina) da base e, quando esta não ocorre, a cor amarela aponta somente a fermentação da glicose. A desaminação da lisina é visualizada no ápice (vermelho-cobreado) e a produção de H₂S (negro), usualmente, da base até a porção central do tubo.

Meio de Costa e Vernin – CV

Esse meio é uma modificação do meio de Monteverde, apresentando camada inferior semissólida e outra sólida, permitindo avaliar as seguintes reações: indol (tampão de algodão ou tira

de papel de filtro embebida no reativo), fermentação da lactose e sacarose, produção de gás, hidrólise da ureia, produção de H₂S, formado na interface do meio semissólido e sólido, e mobilidade.

O ataque à lactose ou à sacarose, ou a ambas, com a produção de ácido, torna o meio vermelho. A presença de um anel negro na base da camada sólida indica produção de H₂S; a turvação difusa ou não da parte semissólida revela a mobilidade; a coloração azul, distribuída por todo o meio, identifica as bactérias produtoras de urease. Além desses testes, o aparecimento de uma coloração rósea ou vermelha na tira de papel de filtro ou no algodão caracteriza as bactérias produtoras de indol.

Meio IAL (PESSOA; SILVA, 1972)

Elaborado para triagem de enterobactérias, permite a leitura das seguintes provas bioquímicas: indol (tampão de algodão ou tira de papel de filtro embebida no reativo), fermentação da sacarose e da glicose, produção de gás, desaminação da fenilalanina, hidrólise da ureia, produção de H₂S, descarboxilação da lisina e mobilidade.

Meios MIO – Motilidade-Indol-Ornitina e Meio MILi – Motilidade-Indol-Lisina

Esses meios evidenciam a descarboxilação dos aminoácidos ornitina ou lisina, a mobilidade e a produção de indol. A mobilidade é interpretada pela difusão do microrganismo na zona da inoculação; a descarboxilação da ornitina ou lisina é evidenciada pela coloração púrpura (alcalina) da base, que neutraliza o ácido (amarelo), formado pela fermentação da glicose. A produção de indol é observada pela formação de um anel vermelho após acrescentar 2 a 4 gotas do reativo de Kovacs à superfície do meio.

Meio EPM

O meio EPM é uma modificação do meio de Rugai e Araújo, evidenciando a produção de gás por fermentação da glicose, produção de H₂S, hidrólise da ureia e desaminação do triptofano.

Quadro 9 - Características diferenciais dos meios TSI , KIA, MIO, MILi e LIA

	TSI e KIA	MIO/MILi	LIA
Fontes de aminoácidos (desaminação)	Peptona Extrato de carne Extrato de levedura	Peptona Extrato de levedura ornitina ou lisina	Peptona Extrato de levedura lisina
Aminoácidos (descarboxilação)	Não	Ornitina ou lisina	Lisina
Fermentação de carboidratos	lac+sac+glic = TSI lac+ glic = KIA	Glicose (0,1%)	Glicose (0.1%)
Indicador de pH	Vermelho de fenol: ácido = amarelo alcalino = vermelho	Bromocresol púrpura: ácido = amarelo alcalino = púrpura	Bromocresol púrpura: ácido = amarelo alcalino = púrpura

(continua)

(continuação)

	TSI e KIA	MIO/MILi	LIA
Fonte para produção de H ₂ S	Tiosulfato de sódio	Não	Tiosulfato de sódio
Indicador da produção de H ₂ S	Sulfato ferroso	Não	Citrato férrico amoniacal

Quadro 10 - Reações nos meios de triagem TSI e KIA*

Leitura	Interpretação	Diagnóstico presuntivo
Reação ácida (amarelo) e gás na profundidade Reação ácida na superfície Ausência de H ₂ S	Fermentação da glicose Fermentação da lactose e/ou sacarose, com produção de gás	<i>Escherichia, Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Providencia, Serratia</i>
Reação ácida e gás na profundidade Superfície alcalina (vermelha) Presença de H ₂ S	Fermentação da glicose sem ataque à lactose e/ou à sacarose	<i>Salmonella,</i> <i>Edwardsiella</i> <i>Citrobacter, Proteus</i>
Reação ácida sem gás na profundidade, superfície alcalina Ausência de H ₂ S	Fermentação da glicose Nenhuma ação sobre a lactose e a sacarose	<i>Shigella, Salmonella</i> <i>Proteus, Providencia, Serratia, Yersinia</i>
Meio inteiramente ácido com gás Presença de H ₂ S	Fermentação da glicose com gás Fermentação da glicose e/ou da sacarose	<i>Citrobacter, Proteus</i>
Meio inteiramente ácido, sem gás Ausência de H ₂ S	Fermentação da glicose com formação de ácido Fermentação da lactose e/ou sacarose	<i>Escherichia coli,</i> <i>Serratia</i>

Nota: *Para a interpretação do Ágar Kligler (KIA) não considerar a fermentação sobre a sacarose.

Quadro 11 - Reações no Ágar Lisina Ferro – LIA

Microrganismos	Base	Ápice	H ₂ S
<i>Salmonella</i>	Púrpura	Púrpura	+
<i>Proteus, Morganella</i>	Amarelo	Púrpura avermelhado	+/-
<i>Providencia</i>	Amarelo	Púrpura avermelhado	-
<i>Citrobacter</i>	Amarelo	Púrpura	+
<i>Escherichia</i>	Amarelo/ Púrpura	Púrpura	-
<i>Shigella</i>	Amarelo	Púrpura	-
<i>Klebsiella</i>	Púrpura	Púrpura	-
Exceção: <i>S. Paratyphi A</i> = base amarela/ ápice púrpura			

Quadro 12 - Reações observadas no meio de Costa e Vernin – CV

Leitura	Microrganismos
Meio inalterado, com certa alcalinidade no ápice (esverdeado ou azulado). Presença de H ₂ S; ausência de gás; móvel ou imóvel	<i>Salmonella</i> spp. <i>Edwardsiella tarda</i> <i>Citrobacter freundii</i>
Reações idênticas às acima citadas, sem H ₂ S	Certos sorovares de <i>Salmonella</i>
Meio inalterado no prazo de 24h, podendo se acidificar em períodos mais longos (fermentação lenta); ausência de H ₂ S; móvel ou imóvel	<i>Shigella</i> spp. <i>Providencia</i> sp.
Meio inteiramente azul, com produção ou não de H ₂ S; dificuldade na leitura da mobilidade	<i>Proteus</i> sp.
Camada sólida azul (superfície) e amarelo-azulado na porção semissólida (base), indicando ação sobre a sacarose. Presença de H ₂ S	<i>Proteus vulgaris</i>
Meio totalmente vermelho, por vezes podendo apresentar áreas amareladas (redução); grande produção de gás. Ausência de H ₂ S. Mobilidade presente ou não. Ápice do meio sólido com discreta alcalinidade na Tribo Klebsiellae	<i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> e <i>Serratia</i> (sem gás)
Meio com discreta acidez na profundidade, ligeira alcalinização na superfície. Presença de H ₂ S, móvel	<i>Citrobacter freundii</i>
Meio inalterado com 24h; pequena alcalinização na superfície, acentuando-se após 48h. Forte tonalidade azul-esverdeada na superfície. Ausência ou discreto crescimento no meio semissólido	<i>Pseudomonas</i>

Quadro 13 - Interpretação do meio EPM

Base	Produção de gás	Formação de bolhas ou rachaduras no meio
	Produção de H ₂ S	Presença de pigmento negro de qualquer intensidade
	Hidrólise da ureia	Coloração azul-esverdeada (fraca) na base indica prova positiva
Superfície	Desaminação do triptofano	Reação positiva: verde-escuro ou acastanhado Reação negativa: superfície inalterada

Caracterização bioquímica complementar

Embora seja possível uma identificação preliminar, com base na morfologia colonial e nas reações bioquímicas, nos diferentes meios indicadores seletivos e de triagem, a identificação de membros da família Enterobacteriaceae requer a utilização de provas bioquímicas complementares. Entre as provas preliminares, destacam-se a detecção da enzima citocromo-oxidase e a redução do nitrato a nitrito, características intrínsecas da família. Além dessas, dispõe-se de uma variedade de provas diferenciais complementares, as quais permitem avaliar as características metabólicas, contribuindo para a identificação posterior dos gêneros/espécies.

Essas características são: fermentação de carboidratos, reação de vermelho de metila –VM, utilização de citrato, produção de acetoina – VP, indol, urease, sulfeto de hidrogênio – H₂S, descarboxilação de aminoácidos e mobilidade.

As principais características bioquímicas e diferenciais de *Salmonella* spp. estão descritas nos quadros 14, 15, 16, 17, 18 e 19.

1. Citocromo-Oxidase

Os citocromos são hemoproteínas que contêm ferro e funcionam como a última ligação da cadeia respiratória aeróbica, transferindo elétrons (hidrogênio) ao oxigênio com a formação de água. O sistema citocromo é encontrado nos organismos aeróbios ou microaeróbios e anaeróbios facultativos. Portanto, o teste da oxidase é importante na identificação de microrganismos que não possuem a enzima ou são anaeróbios obrigatórios. O teste é muito útil em estudos preliminares para diferenciação de Enterobacteriaceae (negativas, exceto *Plesiomonas shigelloides*) de outras famílias como Aeromonadaceae, Pseudomonadaceae e Vibrionaceae, positivas nesse teste.

A prova de citocromo-oxidase utiliza certos reativos corantes, como o dicloridrato de p-fenilenodiamina ou oxalato de p-amino-dimetil-anilina, que atuam como aceptores artificiais de elétrons, substituindo o oxigênio. Esses são incolores no estado reduzido, mas na presença da enzima e do oxigênio atmosférico se oxidam, formando produto de tonalidade azul ou rosa, respectivamente.

2. Redução de Nitratos

A capacidade de um microrganismo reduzir nitrato a nitrito é uma característica importante utilizada na identificação e na diferenciação de espécies de muitos grupos de microrganismos. Todas as enterobactérias, exceto certos biotipos de *Panthoea agglomerans* e *Erwinia*, reduzem nitratos. Os microrganismos que reduzem nitratos têm a capacidade de retirar oxigênio destes para formar nitritos e outros produtos de redução.

A presença de nitritos no meio teste é evidenciada pela cor vermelha após adição do reativo de Griess-Ilosvay, composto de duas soluções: solução A (ácido sulfanílico – 0,8g, ácido acético – 30mL, água destilada – 75mL) e solução B (alfa-naftilamina – 0,5g, ácido acético – 30mL, água destilada – 75mL).

3. Pesquisa da produção de indol

O indol é um dos produtos metabólicos de degradação do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de hidrolisar e desaminar o triptofano com produção de indol, ácido pirúvico e amônia. A prova está baseada na formação de um complexo de cor vermelha quando o indol reage com o grupo aldeído do p-dimetilaminobenzaldeído (reativos de Kovacs ou Ehrlich).

4. Prova do Vermelho de Metila – VM

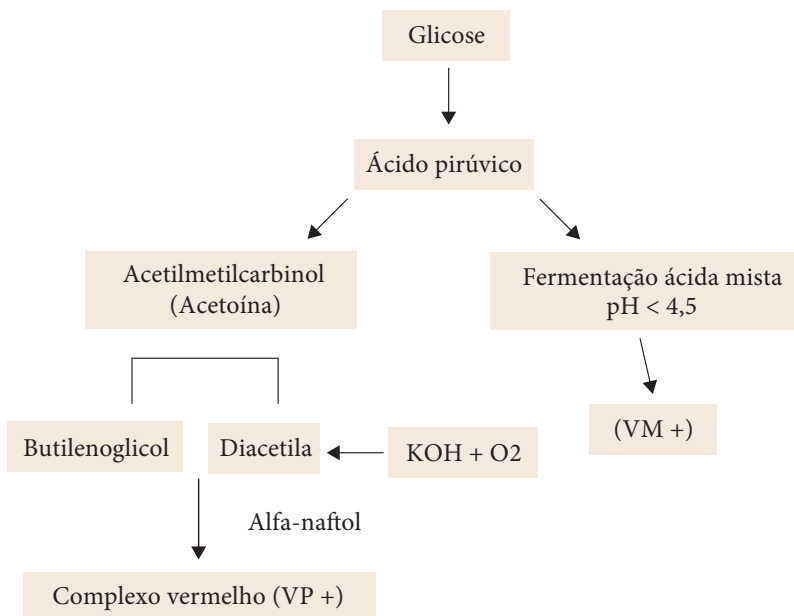
É uma análise quantitativa de produção de ácidos fortes (lático, acético, fórmico), a partir da glicose, por meio da via da fermentação ácida mista. Como muitas espécies de enterobactérias podem

produzir quantidades suficientes de ácidos fortes detectáveis pelo indicador vermelho de metila, durante as fases iniciais da incubação, somente os organismos que podem manter esse pH baixo após incubação prolongada (48h a 72h), superando o sistema estabilizador de pH do meio, é que podem ser chamados de vermelho de metila positivos. Para reduzir o tempo de incubação e leitura do teste, pode ser empregada, como alternativa, a semeadura da cepa em 1mL do meio básico, envasado em tubos 18x180, e após o período de 24 horas, efetivada a adição do reativo conforme a metodologia original e leitura conclusiva.

5. Prova de Voges-Proskauer –VP

O ácido pirúvico, composto principal formado pela degradação fermentativa da glicose, é metabolizado por meio de várias vias, de acordo com os sistemas enzimáticos que possuem as diferentes bactérias. Uma dessas vias leva à produção de acetoína (acetil-metil-carbinol), um subproduto inativo. Os microrganismos do grupo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* produzem acetoína como principal subproduto do metabolismo da glicose e formam quantidades menores de ácidos mistos. Na presença de oxigênio atmosférico e de hidróxido de potássio a 40%, a acetoína é convertida em diacetila e o alfa-naftol atua como catalisador para revelar um complexo de cor vermelha. Esse teste pode ser agilizado quanto à execução e leitura, efetuando semeadura da cepa em 1mL do meio básico envasado em tubos 18x180 e, após o período de 24 horas, efetivada a adição dos reativos (0,2mL de KOH 40% e 0,6mL de α -naftol 5%), repouso por 30 minutos e leitura conclusiva.

Mecanismo bioquímico dos testes de VM e VP



6. Utilização do citrato

O citrato de sódio é um sal de ácido cítrico, composto orgânico simples, que constitui um dos metabólitos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs). Algumas bactérias podem obter energia

por via diferente da fermentação de carboidratos, utilizando citrato como única fonte de carbono. A avaliação dessa característica é importante para identificação de certos gêneros e espécies da família Enterobacteriaceae. Os meios de cultura empregados para detectar a utilização de citrato são isentos de proteínas e carboidratos como fontes de carbono.

O meio de cultura tem como única fonte de carbono o citrato de sódio, um ânion, apresentando ainda fosfato de amônia como única fonte de nitrogênio. As bactérias capazes de utilizar o citrato também são capazes de extrair nitrogênio do sal de amônio, levando à alcalinização do meio a partir da conversão do NH_3 em hidróxido de amônia (NH_4OH). Como indicador, é utilizado o azul de bromotimol, que nas reações positivas ($\text{pH} > 7.6$) torna o meio de tonalidade azul.

7. Hidrólise da Ureia

A urease é uma enzima presente em muitas espécies de microrganismos que podem hidrolisar a ureia. A ureia é uma diamina do ácido carbônico; todas as aminas são facilmente hidrolisadas com liberação de amônia e de dióxido de carbono. A amônia reage em solução para formar carbonato de amônio, resultando na alcalinização e aumento do pH do meio.

Podem ser utilizados dois meios para a detecção de urease, o caldo ureia de Stuart e o Ágar Ureia de Christensen. O primeiro é tamponado com sais de fosfato a um pH 6,8, sendo indicado para identificação de microrganismos produtores de grandes quantidades de amônia para superar o sistema e elevar o pH do meio para produzir uma viragem do indicador (> 8.0), sendo seletivo para espécies de *Proteus*. O Ágar Ureia de Christensen possui um sistema tampão muito mais fraco, permitindo detectar produções menores de amônia, sendo, portanto, apropriado para a análise de bactérias que apresentam formação reduzida de urease ativa.

8. Produção de sulfeto de hidrogênio H_2S

Capacidade de certas espécies bacterianas para liberar enxofre na forma de H_2S a partir de aminoácidos ou de outros compostos. A produção de H_2S pode ser detectada em um sistema analítico se as seguintes condições estiverem presentes: liberação de sulfeto a partir da cisteína ou do tiosulfato por ação enzimática bacteriana; acoplamento do sulfeto com o íon hidrogênio para formar H_2S ; detecção do H_2S pelos sais de metais pesados, tais como ferro, bismuto ou chumbo, na forma de sulfeto de metal pesado, um precipitado negro.



9. Descarboxilases

As descarboxilases representam um grupo de enzimas substrato específicas, capazes de atuar sobre a porção carboxila dos aminoácidos, formando aminas de reação alcalina. Lisina, arginina e ornitina são os três aminoácidos habitualmente avaliados na identificação das enterobactérias cuja descarboxilação resulta na liberação das seguintes aminas específicas:

Lisina	cadaverina
Ornitina	putrescina
Arginina	citrulina

Na conversão de arginina para citrulina intervém uma dehidrolase, ao invés de uma descarboxilase, visto que, na primeira etapa, o NH_2 é retirado da arginina. Em sequência, a citrulina é transformada em ornitina que, em seguida, sofre descarboxilação para formar putrescina.

Durante os períodos iniciais da incubação, o meio torna-se amarelo devido à fermentação da glicose presente. Se o aminoácido for descarboxilado, formam-se aminas alcalinas e o meio volta à cor púrpura original.

10. Fenilalanina desaminase

A fenilalanina é um aminoácido que, por desaminação, forma um cetoácido, o ácido fenilpirúvico. Entre os membros da família Enterobacteriaceae, somente espécies dos gêneros *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* possuem a enzima desaminase, necessária para essa conversão.

O teste da fenilalanina é baseado na detecção de ácido fenilpirúvico, o qual é liberado no meio, após o crescimento do organismo teste. Sua presença é visualizada pela adição de uma solução de cloreto férrico a 10%, quando aparece uma cor verde.

Fenilalanina desaminação ___ ácido fenil pirúvico _____ precipitado verde (piruvato)
Cloreto férrico 10%

11. Fermentação de carboidratos

São extensivamente empregadas nos meios de cultura como fonte de energia para a bactéria e, mais particularmente, para diferenciação de gêneros e identificação de espécies. A fermentação é um processo metabólico de oxidação-redução que tem lugar em um ambiente anaeróbico, no qual um substrato orgânico serve como aceptor final de hidrogênio (elétron) ao invés do oxigênio. Nos sistemas de provas bacteriológicas, esse processo é detectado por observação da mudança de cor dos indicadores de pH quando os produtos ácidos são formados. A fermentação dos carboidratos produz ácido e gás ou somente ácido, sendo que a produção de gás (dióxido de carbono e hidrogênio) se detecta pelo acúmulo de gás em um tubo de vidro (tubo de Durham) invertido no meio. A fermentação de substratos orgânicos, tais como carboidratos, resultam em produtos finais reduzidos e oxidados.

Quadro 14 - Características bioquímicas de *Salmonella* spp.

Meios	Reações
Ureia	Reação negativa
LDC – Lisina descarboxilase	Positivo: Reação alcalina (cor púrpura do meio) e amarelo no meio controle (exceto <i>S. Paratyphi</i>)
ODC – Ornitina descarboxilase	Positivo: Reação alcalina (cor púrpura do meio) e amarelo no meio controle (exceto <i>S. Gallinarum</i> – ODC negativo)
VM – Vermelho de metila	Coloração vermelha do meio após adição do reagente

(continua)

(continuação)

Meios	Reações
VP – Voges-Proskauer	Meio sem alteração após adição dos reagentes
Fenilalanina desaminase	Meio inalterado após colocação do reagente
Utilização do citrato	Positivo: Reação alcalina – cor azul do meio
SIM	
Indol	Negativo – anel amarelo após colocação do reagente – Kovacs
H₂S	Presença de pigmento negro de qualquer intensidade ou somente na picada (cepas imóveis)
Motilidade	Crescimento ao longo da picada (imóvel) ou turvação do meio (móvel)
Fermentação de açúcares	
Glicose	Positivo (reação ácida) com/sem gás no tubo de Durham
Lactose	Negativo/Positivo
Manitol	Positivo
Sacarose	Negativo

Quadro 15 - Percentuais de positividade de *Salmonella* spp. nas provas bioquímicas

Meios de cultura	Reação positiva ou negativa	Percentual de <i>Salmonella</i> que apresenta essa reação ¹
TSI glicose (ácido)	+	100
TSI glicose (gás)	+	91,9 ²
TSI lactose	-	99,2 ³
TSI sacarose	-	99,5
TSI H ₂ S	+	91,6
LIA	+	98
SIM (H ₂ S)	+	97
SIM (indol)	-	98,9
SIM (motilidade)	+	97
Hidrólise da ureia	-	99
Lisina descarboxilase	+	94,6
Ornitina descarboxilase	+	97
Reação de Voges-Proskauer	-	100
Reação do Indol	-	98,9

Notas: ¹ Esses percentuais indicam incidência de cepas com reações marcadas como + ou -.

² *S. Typhi* é anaerogênica.

³ *Salmonella enterica* subespécie *arizonae*: reações +/- para lactose, β-galactosidase positiva; *Salmonella enterica* subespécie *salamae*: reação - para lactose e β-galactosidase.

Quadro 16 - Características bioquímicas diferenciais de *Salmonella* spp., *Proteus* sp., *Citrobacter* sp. e *Edwardsiella tarda*

	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> Typhi
Glicose (gás)	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-
Fermentação								
Manitol	+	+	+	-	-	-	+	+
Lactose	+/-	+/-	-/+	-	-	-	-	-
Sacarose	+/-	-/+	-/+	-	-/+	+	-	-
Dulcitol	-/+	-/+	-	-	-	-	+	-
ONPG	+/-	+	+	-	-	-	-	-
Vermelho metila	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	+/-	-	-	-
Indol	-/+	+	+	+	-	+	-	-
Citrato Simmons	+/-	+	+	-	+/-	-/+	+	-
Acetato	-/+	+/-	+/-	-	-/+	-/+	+	-
Malonato	-/+	+	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	+/-	-	-/+	+	+	+	+	+
Mobilidade	+/-	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólise ureia	-/+	+/-	+/-	-	+	+	-	-
Fenilalanina desaminase	-	-	-	-	+	+	-	-
Lisina descarboxilase	-	-	-	+	-	-	+	+
Arginina desidrolase	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+/-	-
Ornitina descarboxilase	-	+	+	+	+	-	+	-
KCN	+/-	-	+	-	+	+	-	-

Nota: + : positivo; - : negativo.

Quadro 17 - Diferenciação bioquímica entre *S. enterica* subespécie *enterica*, *Citrobacter sp.* e *Edwardsiella tarda*

	<i>S. enterica</i> <i>sub. enterica</i>	<i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	<i>Citrobacter</i> <i>diversus</i>	<i>Edwardsiella</i> <i>tarda</i>
Descarboxilação:				
Lisina	+	-	-	+
Ornitina	+	[-]	+	[+]
Indol	-	-	+	+
Citrato Simmons	+	+	+	-
H ₂ S	+/-	[+]	-	+
Urease	-	+/-	+/-	
KCN	-	+	+	-
ONPG	-	+	-	-

Notas: + : positivo; - : negativo; [+]: 76 a 89% positivo; [-]: 11 a 25% negativo.

Quadro 18 - Diferenciação entre *Citrobacter freundii* e *Salmonella arizonae* e *S. diarizonae*

	LDC ¹	Glicerol	Malonato	ODC ²	Gelatinase
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	-	-
<i>Salmonella arizonae</i>	+	-	+	+	+ (lenta)
<i>Salmonella diarizonae</i>	+	-	+	+	+ (lenta)

Notas: ¹Lisina descarboxilase.

²Ornitina descarboxilase.

Quadro 19 - Diferenciação entre *Salmonella Paratyphi C* e *S. Choleraesuis*

	Dulcitol	H ₂ S	Mucato
<i>S. Paratyphi C (Vi⁺ ou Vi⁻)</i>	+	+	-
<i>S. Choleraesuis</i>	-	-	-
<i>S. Choleraesuis var. Kunzendorf</i>	-	+	-

Nota: *S. Paratyphi C* é adaptada ao homem e *S. Choleraesuis* possui característica ubiqüitária.

8 Aspectos Gerais – Antígenos das Enterobactérias

Antígenos comuns: todas as espécies da família Enterobacteriaceae apresentam um antígeno comum, também designado de antígeno de “Kunin”. Sua presença usualmente não é avaliada, tendo em vista que não representa um critério relevante para a diferenciação entre gêneros ou espécies.

Antígeno de parede ou antígeno “O” – Ohne: composição lipopolissacarídica (hexosamina – 3.5% a 4.5%; complexo fosfolipídico – 20% a 30%; polissacarídeos – 60%). É termoestável (1hora/100°C), não sendo destruído pelo álcool etílico a 50°GL. Esse antígeno é composto de três partes:

- porção lipídica, responsável pela toxicidade e características pirogênicas;
- porção basal ou “core”;
- polissacarídeo, característico da especificidade somática das formas lisas (S). É constituído de cadeias repetitivas, cujo arranjo espacial confere natureza definida. Esta, aliada ao tipo de ligação, determina a especificidade dos antígenos “O”.

Cepas em fase lisa (“S” – *Smooth*) apresentam colônias com superfícies homogêneas, brilhantes e bordos regulares indicativos de antígeno “O” completo. A ocorrência de mutação que afete sua porção basal, ou na síntese de sua cadeia, resulta na perda da especificidade do antígeno. São designadas rugosas “R” (*Rough*) de superfície e bordos irregulares. São autoaglutináveis em solução salina, facilmente fagocitáveis e sensíveis à ação do complemento e, como consequência, perdem sua capacidade patogênica.

No procedimento laboratorial para a confirmação antigênica, a aglutinação das células bacterianas (somática ou antígeno “O”) pelo antissoro específico apresenta como característica a formação de grânulos finos não dissociáveis pela agitação, tendo em vista que a reação ocorre pela inter-relação das paredes das células bacterianas.

Antígeno flagelar ou antígeno “H” (Hauch): está presente nas enterobactérias móveis e sua composição é proteica, designada flagelina. As diferenças antigênicas surgem devido a variações na estrutura primária (contendo aminoácidos) das diferentes moléculas de flagelina.

A estrutura flagelar possui como característica importante a termolabilidade, podendo ser destruído a 100°C por uma hora, bem como após ação lenta do álcool 50°GL, sendo resistente à solução de formol a 0,5%.

A aglutinação flagelar apresenta como característica a formação de grumos espessos que se dissociam rapidamente por meio de agitação. Esta ocorre em tempo mais rápido do que aglutinação somática, devido ao elevado número existente na célula, quando comparado à aglutinação somática (entre as células bacterianas).

O arranjo espacial e as características intrínsecas ao gênero possibilitam a produção de dois tipos de flagelos distintos. Em uma população bacteriana de uma cepa de *Salmonella* spp., que produza dois tipos distintos de flagelo, a frequência de variação de células que apresentam um dos tipos ou fases é na ordem de 10^4 .

Antígeno de superfície ou envoltório “Vi” (Félix e Pitt): apresenta sua localização espacial externa, a qual impede a detecção do antígeno somático. Usualmente, encontra-se presente em cepas de *S. Typhi* isoladas de pacientes, podendo também ser detectados em *S. Paratyphi C* e *S. Dublin*. São termolábeis, podendo ser destruídos pelo aquecimento da suspensão a $100^{\circ}\text{C}/10$ a 15 minutos. Apresenta como relevância a possibilidade de uso como ferramenta epidemiológica por meio de um conjunto de preparados fágicos.

9 Caracterização Antigênica de *Salmonella* spp.

A sorotipificação constitui importante ferramenta epidemiológica complementar na identificação de *Salmonella* spp., permitindo determinar a prevalência/emergência ou apontar tendências de um sorovar em distintas zonas geográficas, bem como identificar surtos, conhecer as fontes de infecção e vias de transmissão. A distribuição dos sorovares estão catalogadas no esquema de Kauffmann e White (POPPOF; MINOR, 2001) e envolve a identificação dos antígenos somáticos e flagelares.

Esquema de Kauffmann-White

Baseado nos componentes antigênicos somáticos O e flagelares H, foi estabelecido o esquema denominado Kauffmann-White, que contém informações quanto às espécies, subespécies e apresenta listadas as fórmulas antigênicas de todos os sorovares. Sua editoração é efetuada pelo Centro Colaborador para Referência e Pesquisa em *Salmonella* da Organização Mundial de Saúde (Instituto Pasteur-Paris), sendo revisado anualmente quanto à caracterização de novos sorovares. A editoração completa dessa listagem é efetivada a cada cinco anos.

Apresenta-se sob a forma de tabela, contendo o conjunto das características antigênicas. Compreende na primeira coluna a estrutura somática, cujos sorovares que possuem tais características são identificados por letras maiúsculas. Ex.: grupo A (O:2), grupo B (O:4), grupo C₁ (O:6,7), grupo C₂ (O:6,8,20), grupo D₁ (O:9), grupo E₁ (O:3,10), grupo E₂ (O:3,15), grupo E₄ (O:1,3,19) etc.

A segunda e a terceira colunas apresentam suas estruturas flagelares, indicadas por letras minúsculas e números, fase 1, e a fase 2, representada por números arábicos, além de letras minúsculas.

Em relação aos antígenos O e H, alguns aspectos devem ser considerados:

1. Antígeno O de *Salmonella* spp.:

O grupo antigênico é identificado por alguns fatores, como: O:4, O:9. Outros têm pouco ou nenhum valor discriminatório e se apresentam normalmente associados, por exemplo: O:12, com O:2, O:4 e O:9; *S. Paratyphi* A (O:1,2,12), *S. Typhimurium* (O:1,4,5,12) e *S. Enteritidis* (O:1,9,12).

Determinados antígenos surgem como consequência de uma modificação da estrutura, por exemplo: O:1 resulta da inserção de uma cadeia de galactose no polissacarídeo e O:5, de uma reação de acetilação, presente nas unidades repetidas do polissacarídeo, responsável pela especificidade, por exemplo: O:4,12 como é o caso do sorovar *S. Typhimurium* O:1,4,5,12.

2. Antígenos H de *Salmonella* spp.:

Os fatores antigênicos H de *Salmonella* são representados por letras minúsculas nas fases específicas (H1), como “i” em *S. Typhimurium* e “z₁₀” em *S. Hadar*, ou associadas, q, m, f, g, h etc. A outra fase, definida como não específica ou H2, é representada por números arábicos, como 1,2; 1,5; 1,6; 1,7, além de letras minúsculas e.n, x, z₄, z₆ etc.

Identificação antigênica

Determinadas características bioquímicas específicas podem ser observadas em alguns sorovares, como *S. Typhi*: ausência de gás em glicose, produção reduzida de H₂S, lisina descarboxilase positiva, ornitina descarboxilase e utilização do citrato de Simmons negativas; *S. Paratyphi A*: produção de gás em glicose, ornitina descarboxilase positiva, produção de H₂S, lisina descarboxilase e citrato de Simmons negativas. Entretanto, a confirmação do sorovar somente poderá ser dada por meio da identificação antigênica conclusiva.

Principais cuidados para a execução do teste

- Nunca utilizar crescimento a partir de meios de cultura que contenham carboidratos.
- Semear, preferentemente, a cepa em tubo 13x100, contendo Ágar nutriente inclinado, envasado com bisel longo (4cm a 5cm).
- Preparar suspensão utilizando solução salina (0,85% NaCl).
- A suspensão deverá apresentar turbidez semelhante ao tubo 3 da escala de MacFarland. Usualmente, o volume de solução salina adicionada é de aproximadamente 1,5mL.
- Realizar o teste somente a partir de cultivos recentes (máximo de 18 a 24 horas de crescimento a 37°C).
- Em amostras com antígeno de envoltório, efetuar a retirada, por meio do aquecimento da suspensão em (100°C por 15 minutos).
- Observar se a suspensão apresenta-se homogênea antes de realizar o teste, certificando-se de que esteja em sua forma lisa.
- Cepas que apresentarem grumos que se depositam após um período em repouso são consideradas autoaglutináveis e devem ser submetidas a um reisolamento para tentativa de isolamento de cepas lisas. Estas deverão ser reavaliadas e, caso persista o perfil de autoaglutinação, encaminhadas ao laboratório de referência.

Execução do teste de soroaglutinação rápida

- Semear a cepa isolada em Ágar nutriente inclinado e incubar 37°C/18h-24h.
- Preparar suspensão, adicionando solução salina (0,85g% NaCl).
- Homogeneizar a suspensão.
- Observar a homogeneidade da suspensão e, no caso de dúvidas, observar ausência de aglutinação em lâmina e dar prosseguimento para a confirmação do gênero *Salmonella*.
- Em uma lâmina de vidro, adicionar uma gota (10µl) de antissoro polivalente OH ou antissoro polivalente somático e uma gota da suspensão bacteriana, homogeneizando com o auxílio de uma alça de platina ou com um palito de madeira.

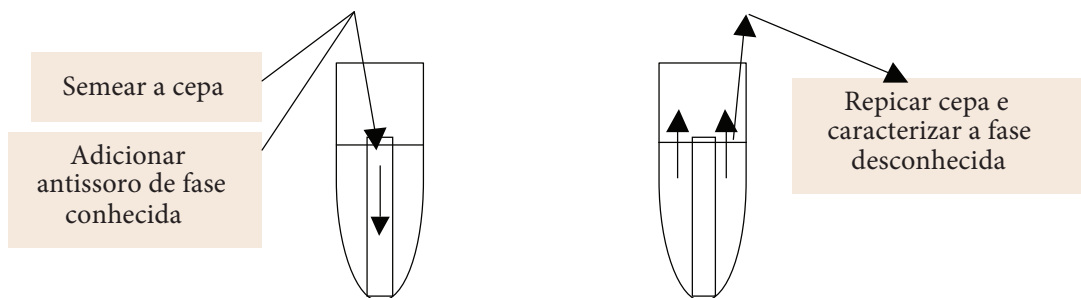
- Impelir movimentos rotatórios e observar, até o período de um minuto, em caixa de Huddleson, a presença de aglutinação (grumos).
- Repetir o procedimento, empregando antissoros polivalentes flagelares.
- No diagnóstico de *S. Typhi*, empregar inicialmente o antissoro Vi para caracterização do antígeno de envoltório. Caso a reação seja positiva, aquecer a suspensão em (100°C/15 minutos) reavaliar com antissoro Vi e, caso não seja observada aglutinação, confirmar a estrutura somática por meio do antissoro “OD”. Para identificação conclusiva de *S. Typhi*, efetivar a caracterização do antígeno flagelar Hd.

Todas as cepas de *Salmonella* spp. devem ser encaminhadas para o Laboratório de Referência Nacional (IOC/Fiocruz) para identificação antigênica conclusiva e realização de ensaios complementares.

Variações que afetam a Tipagem Antigênica em *Salmonella* spp.

1. Variação Capsular – V-W: fenotípica
 - Impede aglutinação somática.
 - Utilizada em avaliação epidemiológica (lisotipia em *S. Typhi*).
2. Variação da Estrutura Somática – S-R: genotípica
 - É de natureza genotípica.
 - Determina alterações quanto à morfologia colonial.
 - Usualmente, apresenta ausência de estabilidade em solução salina.
3. Variação Flagelar – OH-O: fenotípica
 - Permite a formação de grandes flocos que se dissolvem com agitação.
 - Importante na caracterização conclusiva dos sorovares de *Salmonella* spp.
 - Quando da perda de uma de suas fases, podem ser, na maioria das vezes, recuperados, utilizando o meio de Craigie (Ágar semissólido – 0,5%):

Ilustração 1 -



4. Variações Mediadas por Fagos
 - Presença de fagos temperados: grupos A, B, D de *Salmonella* spp.
 - Conversão lisogênica: fração 12 (*Salmonella* spp.)

10 Meios de Cultura

1. Principais aspectos quanto à manutenção e à estocagem:
 - Somente devem ser recebidos meios de cultura, adquiridos por meio de compra, cujo prazo de validade seja \geq seis meses da data de recebimento.
 - Apertar todas as tampas dos frascos.
 - Observar prazo máximo de estocagem.
 - Registrar o quantitativo em estoque, recepção e saída.
 - Nenhum meio de cultura pode ser utilizado após a data de vencimento.
 - A revalidação somente pode ser efetuada pelo fabricante.
 - Os meios de cultura preparados devem ser estocados sob proteção da luz solar.
 - A manutenção deve, preferencialmente, ser efetuada sob refrigeração a 4°C.
2. Preparo dos meios de cultura:
 - Na re-hidratação ou preparo devem ser seguidas, obrigatoriamente, as instruções do fabricante.
 - Preparar a quantidade mínima, suficiente para o uso.
 - Observar o tempo de validade de meios preparados, estocados sob condições adequadas.

Quadro 20 - Duração máxima de meios de cultura
Meio sólido – envase em placas de Petri

Meio de cultura	4°C	4°C Embalagem plástica
Ágar sangue	15 dias	50 dias
Ágar EMB	15 dias	60 dias
Ágar MacConkey	15 dias	60 dias
Ágar SS	6 dias	10 dias
Ágar XLD	5 dias	10 dias
Ágar Hektoen	5 dias	10 dias
Ágar Verde Brilhante	2 dias	4 dias
Ágar Sulfito Bismuto	24 horas	24 horas

Quadro 21 - Duração máxima de meios de cultura
Meio sólido – envase em tubos

Meio de cultura	Bucha de algodão 4°C Nº semanas	Bucha de algodão TA Nº semanas	Fechamento hermético plástico 4°C Nº meses
Ágar LIA	1-2	1-2	3-6
Ágar TSI	1-2	2-4	3-6
Ágar KIA	3-4	2-4	2-4
Ágar Müller Hinton	1-2	2-4	3-6
Ágar Nutriente	3-4	1-2	2-4
Ágar Ureia	3-4	1-2	2-4
Ágar Citrato	3-4	1-2	2-4
Ágar Fenilalanina	3-4	1-2	2-4

Quadro 22 - Duração máxima de meios de cultura
Meio líquido - envase em tubos

Meio de cultura	Bucha de algodão 4°C Nº semanas	Bucha de algodão TA Nº semanas	Fechamento hermético Plástico 4°C Nº meses	Lacre de alumínio TA Nº meses
C. Müller Hinton	3-4	1-2	2-4	3-6
C. Infuso Coração	3-4	1-2	2-4	3-6
C. Trypticase Soja	3-4	1-2	2-4	3-6
C. Peptonado	3-4	1-2	2-4	3-6
C. Nitrato	3-4	1-2	2-4	3-6
C. Selenito	3-4	1-2	2-4	3-6
Meio-fermentação carboidratos	3-4	1-2	2-4	3-6

3. Controle de qualidade dos meios de cultura
- Controlar o pH de cada partida de meio.
 - Efetuar teste de esterilidade.
 - Realizar teste de desempenho: inocular uma alça do crescimento da cepa padrão e incubar nas condições de rotina até obter turvação correspondente ao tubo 0.5 da escala de MacFarland.
 - Anotar e registrar resultados em cada lote, como o exemplo a seguir.

Ilustração 2 

Data Controle	Data - Lote Fabricação	Data Vencimento	pH	Desempenho +/-	Esterilidade +/-	Responsável

Meio de cultura: _____

Cepas para controle: Positivo: _____

Negativo: _____

11 Figuras

 **Figura 1 -**



Fonte disponível em:
<<http://www.edgarsnyder.com/foodpoisoning/salmonella.html>>

 **Figura 2 -**

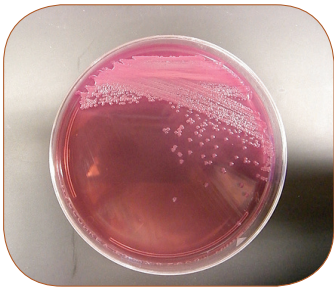


Fonte disponível em:
<<http://www.sdgl.org/index.php?page=medische.informatie.salmonella>>

 **Figura 3 -**



Figura 4 - Ágar Mac Conkey
Colônias fermentadoras da lactose



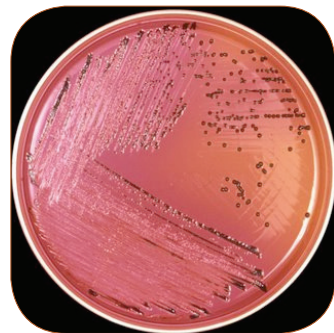
Fonte disponível em: <[flickr.com/photos](https://www.flickr.com/photos/)>

Figura 5 - Ágar Mac Conkey – morfologia colonial de Salmonella spp.



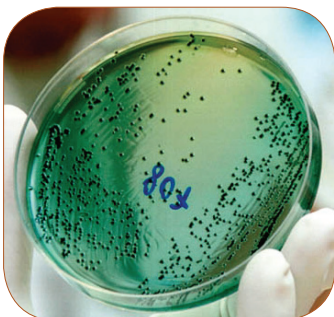
Fonte disponível em: <[flickr.com/photos](https://www.flickr.com/photos/)>

Figura 6 - Ágar XLD – morfologia colonial de Salmonella spp.



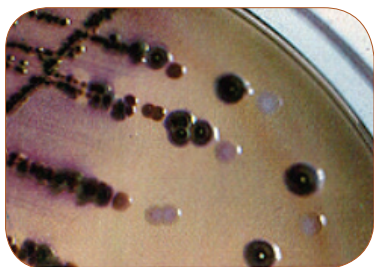
Fonte disponível em: <http://www.bact.wisc.edu>

Figura 7 - Ágar Entérico Hektoen – morfologia colonial de Salmonella spp.



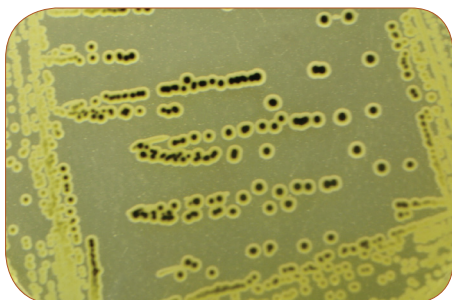
Fonte disponível em: <labent/ioc/fiocruz>

Figura 8 - Ágar Eosina- Azul de Metileno



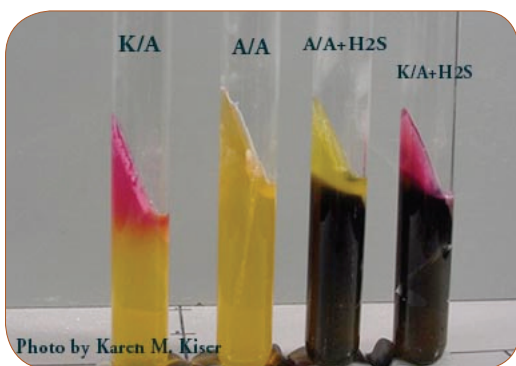
Fonte: (KONEMAN; SOMMERS,1989)

Figura 9 - Ágar Salmonella-Shigella – Ágar SS – colonias de Salmonella spp.



Fonte disponível em: <labent/ioc/fiocruz

Figura 10 - TSI – Ágar ferro três açúcares



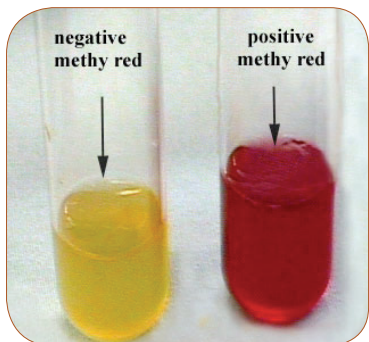
Fonte disponível em:
<users.stlcc.edu/kkiser/biochem.html>

Figura 11 - LIA – Ágar Lisina Ferro



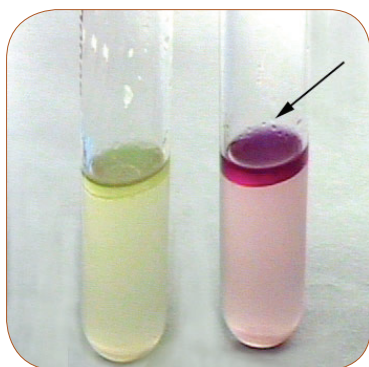
Fonte disponível em:
<users.stlcc.edu/kkiser/biochem.html>

Figura 12 - Reação do Vermelho de Metila – VM



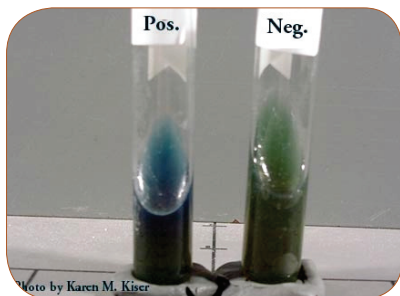
Fonte disponível em:
<people.rit.edu/.../PDFfiles/20081MicroLab4.pdf>

Figura 13 - Positivo: Reação de Voges-Proskauer – VP



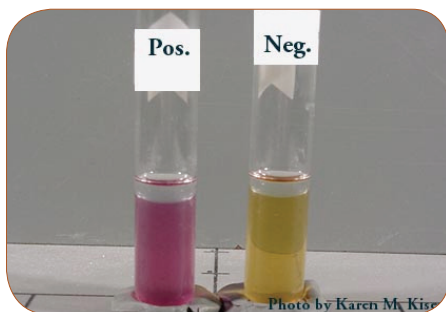
Fonte disponível em:
<people.rit.edu/.../PDFfiles/20081MicroLab4.pdf>

Figura 14 - Utilização do Citrato de Simmons



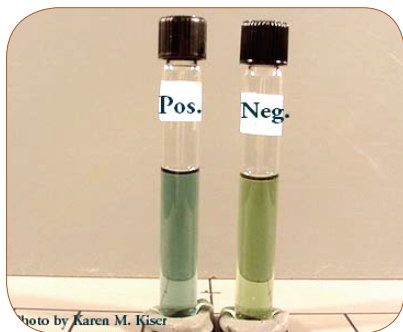
Fonte disponível em:
<people.rit.edu/.../PDFfiles/20081MicroLab4.pdf>

Figura 15 - Descarboxilação de aminoácidos (Moeller)



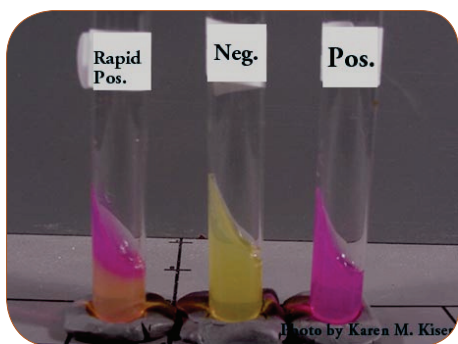
Fonte disponível em:
<users.stlcc.edu/kkiser/biochem.html>

Figura 16 - Utilização do Malonato



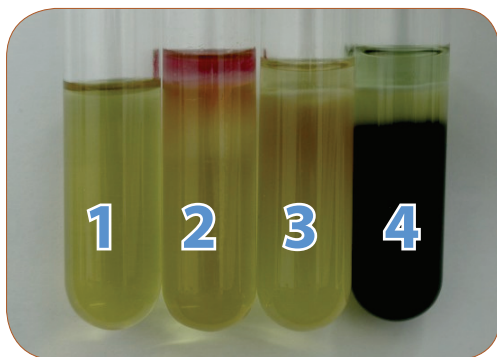
Fonte disponível em:
<users.stlcc.edu/kkiser/biochem.html>

Figura 17 - Utilização da ureia- ;Ágar Ureia de Christensen



Fonte disponível em:
<users.stlcc.edu/kkiser/biochem.html>

Figura 18 - Meio SIM (H2S; Indol; Mobilidade)



Fonte disponível em:
<people.rit.edu/.../PDFfiles/20081MicroLab4.pdf>
Notas: 1: não inoculado; 2: H2S - Indol + Mobilidade+;
3:H2S - Indol - Mobilidade-; 4: H2S + Indol - Mobilidade+.

Referências

ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. Salmonella. In: ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual [on-line]**. [Silver Spring: FDA], 2007. cap. 5. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>>. Acesso em: 10 fev. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Procedimentos laboratoriais**: da requisição do exame à análise microbiológica. Módulo III. 45 p. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/eventos/biosseguranca/publicacoes/ggtes>>. Acesso em: 26 abr. 2009

BACK, A.; BELTRÃO, N.; LEÃO, J. A. Monitoria e controle de salmonela: aspectos práticos. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7., 2006, Chapecó, SC. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários, 2006. , p. 95-103.

BALFOUR, A. E.; LEWIS, R.; AHMED, S. Convalescent excretion of Salmonella Enteritidis in infants. **Journal of Infection**, London, v. 34, p. 133-138, 1999.

CHART, H. J.; CHEESBROUGH, J. S.; WAGHORN, D.J. The serodiagnostic of infection with Salmonella Typhi. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 53, p. 851-853, 2000.

COSTA, G. A.; HOFER, E. **Isolamento e identificação de enterobactérias**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1972. 120 p.

D'AOUST, J. Y. Salmonella species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, DC: ASM Press, 1997.

ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual [on-line]**. [Silver Spring: FDA, 2007]. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>>. Acesso em: 22 maio 2009.

FLOWERS, R. S. et al. Salmonella. In: DOWNES, F. P; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, D.C: American Public Health Association, 2001. cap. 37, p. 357-380.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Codex Alimentarius Commission**. Rome, Italy, 1996.

- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 163.
- GARBUTT, J. Foodborne diseases and food poisoning. In: _____. **Essentials of food microbiology**. London: Arnold, Hodder Headline plc, 1997. p. 135-181.
- GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. **Antigenic formulae of the Salmonella Serovars**. 9th ed. Paris: Institut Pasteur, 2007. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Disponível em: <<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>> Acesso em: 12 jan. 2009.
- HOHMANN, E. L. Nontyphoidal salmonellosis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 32, p. 263-269, 2001.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579**: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of Salmonella spp. 4th ed. Geneva, 2002. Amendment 1: 15 jul. 2007.
- ISENBERG, H. D. **Clinical microbiology procedures handbook**. 2nd . ed. Washington, DC: ASM Press, 2004. v.1.
- KONEMAN, A.; SOMMERS, J.R. **Diagnóstico microbiológico**. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1989. 730 p.
- MOLBAK, K. et al. International Salmonella Typhimurium DT104 Infections, 1992–2001. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 6, p. 859-867, 2005.
- MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 9th ed. Washington, DC: ASM Press, 2007. 1289p. v. 1.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Control de la salmonelosis**: importância de la hygiene veterinaria e de los productos de origen animal. Ginebra, 1988. (Série de informes técnicos, n. 774).
- PEIRANO, G. et al. Ocurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among Salmonella enterica from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 58, p. 305-309, 2006.
- PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 32, p. 97-100, 1972.
- POPOFF, M. Y.; MINOR, L. **Antigenic formulas of the Salmonella sorovars**. 8th ed. Paris: Pasteur Institute, 2001. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella.
- RODRIGUES, D. P.; LAZARO, N. S.; REIS, E. M. F. **Manual de procedimentos para diagnóstico laboratorial de Salmonella spp**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. 48 p.
- THRELFALL, E. J.; FROST, J. A. The identification, typing and fingerprinting of Salmonella: laboratory aspects and epidemiological applications. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 68, p. 5-16, 1990.
- UNITED STATES. Department of Agriculture (USDA). Food Safety and Inspection Service. Office of Public Health Science. MLG 4.04: isolation and identification of Salmonella from meat, poultry and egg products. In: _____. **Microbiology laboratory guidebook**. [Athens], 2004. cap. 4.03, Disponível em: <http://www.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp>. Acesso em: 23 nov. 2008.

WHITE, D. G.; FEDORKA-CRAY, P.; CHILLER, T. C. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). **NMC Annual Meeting Proceedings**, Florida, p. 56-60, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prevention and control of foodborne salmonellosis through the application of the hazard analysis critical control point system**. Copenhagen, 1985. (Document ,VPH/86.65).

_____. **Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world**. [Geneva: WHO, 2003?]. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/WHO_CDS_CSR_RMD_2003_6/en/> . Acesso em: 12 dez. 2008.

Anexo

Meios de cultura e reagentes: para o preparo dos meios de cultura desidratados, reagentes e soluções comercializados e não discriminados a seguir, obedecer às recomendações dos fabricantes.

Meios de Pré-enriquecimento

Água Peptonada 1% Tamponada (pH 7,2)

Peptona	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato de sódio dibásico	3,5g
Fosfato de potássio monobásico	1,5g
Água destilada	1000mL

Suspender e dissolver os componentes em água destilada, esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.

pH final: $7,2 \pm 0,2$ a 2°C

Caldo Tetratonato

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

Suspender os componentes em água destilada e dissolver por aquecimento até a ebulição. Distribuir alíquotas de 10mL em tubos de ensaio de 16mmx160mm previamente esterilizados. Não autoclavar. Estocar por até duas semanas a 5°C-10°C.

pH final $8,4 \pm 0,2$ a 25°C.

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

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

Caldo Rappaport-Vassiliadis*Meio Base*

Triptona	5g
Cloreto de sódio	8g
Fosfato monobásico de potássio	1,6g
Água destilada	1.000mL

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

Solução de Cloreto de Magnésio

Cloreto de magnésio hexa-hidratado	400g
Água destilada	1.000mL

Estocar em frasco escuro, à temperatura ambiente, por até um ano.

Solução de Verde Malaquita Oxalato

Verde malaquita oxalato	0,4 g
Água destilada	1.000 mL

Estocar em frasco escuro, à temperatura ambiente, por até seis meses.

Preparo e distribuição final do meio

Para o preparo do meio completo, acrescentar para cada 1.000mL do meio base: 100mL de solução de cloreto de magnésio e 10mL de solução de verde malaquita oxalato. Dispensar alíquotas de 10mL em tubos de 16mm x 160mm. Autoclavar a 115°C por 15 minutos. Estocar o meio completo em refrigerador e utilizar em até um mês após o preparo.

pH final $5,5 \pm 0,2$ a 25°C

Meios de Triagem*Meio de Triagem de Costa e Vernin – CV**A - Base semissólida*

Peptona	20g
Cloreto de sódio	5g
Solução de Azul de Timol	3mL
Indicador de Andrade	10mL
Ágar-ágar.	5g
Água destilada	1.000mL

Adicionar todos os elementos à água e aquecer até dissolver completamente o ágar. Ajustar o pH a 7,3 ou a 7,4. Distribuir quantidades exatas do meio em balões e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

B - Base Sólida

Peptona (Bacto)	1g
Triptona ou tripticase	5g

Tiosulfato de sódio	0,2g
Sulfato ferroso amoniacal	0,2g
Solução de azul de timol	3mL
Indicador de Andrade	10mL
Ágar	20g
Água destilada	1.000mL

Adicionar os componentes em água destilada e aquecer em banho-maria fervente até a completa dissolução. Ajustar o pH a 7,3 ou a 7,4. Distribuir quantidades exatas do meio em balões e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Preparo e distribuição final do meio

Fundir as bases e resfriar entre 50°C a 60°C, aproximadamente. Adicionar, a cada um deles, na proporção de 5mL por 100mL de meio, a solução de ureia e açúcares. Distribuir, inicialmente, o Ágar semissólido em volume de 2,5mL em tubos esterilizados de 13mm de diâmetro com altura variável. Deixar solidificar, à temperatura ambiente, por cerca de 30 minutos e acrescentar, em seguida, volume idêntico, por tubo, da base sólida. Inclinare os tubos, de modo a deixar uma base de 2cm a 3cm de altura, aproximadamente.

Solução de azul de timol

Azul de timol	1,6g
NaOH 0,1N	34,4mL
Água destilada	65,6mL

Indicador de Andrade

Fucsina ácida	0,5g
Hidróxido de Sódio N	16mL
Água destilada	100mL

Dissolver a fucsina em água destilada e adicionar o hidróxido.

Solução de Ureia e açúcares

Ureia	20g
Lactose	30g
Sacarose	30g
Água destilada	100mL

Dissolver a mistura por aquecimento brando em banho-maria e esterilizar por filtração. Conservar em geladeira.

A semeadura é executada com auxílio de agulha, introduzindo-a até o terço superior da metade da camada semissólida e sob a forma de estrias, na superfície da parte sólida. Neste meio, poderá ser pesquisada a produção de indol, fixando no tampão, após a inoculação, uma tira de papel de filtro, embebida no reativo para pesquisa de indol ou então impregnando o próprio algodão (hidrófilo) na sua base interna, com esse reativo. Incubar a 37°C durante 24 a 48 horas.

Meio de Triagem IAL (PESSOA; SILVA, 1972)

Base (Meio de Rugai)

Triptona (Difco)		10g
Extrato de carne (Difco)		2g
Cloreto de sódio (Merck)		5g
Fosfato dissódico (Synth)		2g
L-triptofano (Nuclear)		1g
Azul de bromotimol (Inlab)	solução alcoólica 1,5%	2mL
Ágar (Difco)		11g
Água destilada		1.000mL

Dissolver todos os ingredientes, com exceção do ágar e do indicador. Ajustar o pH em 7,4±0,2, acrescentar o ágar, fundir, filtrar e adicionar o indicador. Esterilizar 121°C por 15 minutos.

Lisina

Extrato de levedura (Oxoid)		3g
Glicose (Synth)		0,5g
Nitrato de potássio (Merck)		0,5g
L-lisina (Ajinomoto)		5g
Ágar (Difco)		4g
Púrpura de bromocresol(Merck)	solução alcoólica 1,6%	1,25mL
Água destilada		1.000mL

Dissolver todos os ingredientes, acertar o pH em 6,4±0,2, acrescentar o ágar e aquecer até completa fusão.

Vascar

Cera de carnaúba (tipo flor)	10g
Vaselina líquida	90mL

Reativo de indol

p-dimetil aminobenzoaldeído	1g
Ácido arcórbico	2g
Água destilada	1.000mL

Dissolver o p-dimetil aminobenzoaldeído no álcool, adicionar o ácido ortofosfórico e água.

Solução substrato

Citrato de ferro amoniacal	2g
Tiosulfato de sódio	2g
Sacarose	80g
Glicose	10g
Ureia	40g
Água destilada	85mL

Colocar todos os reagentes em um frasco esterilizado de 200mL, fechar e aquecer a 65°C sob agitação frequente até completa dissolução. Deixar o frasco imerso por uma hora a essa temperatura. Fundir 800mL de Rugai, esfriar a aproximadamente 65°C e acrescentar 14mL de substrato.

Adicionar, em tubos de 12mmx120mm, quantidade de vascar (solução 3) suficiente para formar um anel de 1mm de espessura. Distribuir 1,5mL do meio Lisina (solução 2) e esterilizar a 121°C por 15 minutos. Deixar os tubos na posição vertical para formação do menisco vedatório do vascar e adicionar 3mL do meio de Rugai (solução 1) com o substrato (solução 5). Colocar o tampão de algodão no reativo do indol (solução 4). Deixar inclinado de tal maneira que a base seja de aproximadamente um terço da altura do ápice.

Meio Básico para Fermentação de Carboidratos

Peptona	10g
Extrato de carne	3g
Cloreto de sódio	5g
Indicador de Andrade	10mL
Água destilada	1.000mL

Ajustar pH a 7.2. Distribuir em volumes de 3mL a 5mL e esterilizar a 121°C por 15 minutos. Os carboidratos glicose, lactose, sacarose e manitol são incorporados ao meio, na concentração final de 1,0%, os demais carboidratos são geralmente utilizados a 0,5%.

A glicose, manitol, dulcitol, salicina, adonitol e inositol podem ser incluídos ao meio básico e esterilizados a 121°C por 15 minutos, pois resistem a esse processo. No entanto, lactose, sacarose, celobiose, arabinose, ramnose e xilose devem ser esterilizados à parte, principalmente sob a forma de soluções a 10% ou a 20%, recorrendo-se, para tanto, aos processos físicos, como a filtração ou o aquecimento a 121°C por 10 minutos, seguido de resfriamento brusco. A presença de ácido no meio, em decorrência do metabolismo da bactéria, é revelada pela viragem do indicador de Andrade para uma coloração avermelhada.

Caldo Ureia

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

Suspender os componentes em água destilada e homogeneizar até a total dissolução. Esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 3mL em tubos de ensaio de 13X100mm.

pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C.

Meio para Manutenção e Envio de Cepas

*Ágar nutriente fosfatado***

*Extrato de carne	3g
*Peptona	10g
*Cloreto de Sódio (NaCl)	3g
Fosfato dibásico de sódio (12 H ₂ O)	2g
*Ágar-ágar	15 g
Água destilada	1.000mL

Ajustar o pH 7.2-7.4. Distribuir em tubos de hemólise, em volumes de 3mL a 4mL/tubo e esterilizar a 121°C por 15 minutos. Deixar solidificar em posição discretamente inclinada (bisel curto). A semeadura do meio deve ser realizada por duas a três picadas, até a profundidade, e por estrias, na superfície. Substituir o tampão de algodão dos tubos por rolhas de borracha ou por silicone previamente esterilizadas. Empregar as condições normais de tempo e de temperatura de incubação. Para manutenção por longo período, as cepas repicadas devem ser mantidas ao abrigo da luz.

* A formulação citada poderá ser substituída por meio comercializado (*Ágar nutriente*), desde que mantidas as concentrações anteriormente mencionadas, efetuando-se adição somente da(s) droga(s) não existente(s) na formulação básica.

** Essa formulação poderá ser utilizada para manutenção e envio de cepas das famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae. Para o preparo do meio, devem ser adicionados 10g de cloreto de sódio (NaCl), em substituição ao peso indicado na formulação acima.

Soluções e Reagentes

Solução de iodo-iodeto de potássio

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

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

Solução de verde brilhante a 0,1%

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

Dissolver o corante em água esterilizada

Solução salina a 0,85%

Cloreto de sódio	8,5g
Água destilada	1.000mL

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

Disque Saúde
0800.61.1997

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde

www.saude.gov.br/bvs

Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

www.saude.gov.br/svs



Secretaria de
Vigilância em Saúde

Ministério da
Saúde

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA