



NORMA TÉCNICA

L5.218

Nov/1993
42 PÁGINAS

Salmonella - isolamento e identificação: método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	<p style="text-align: center;">SALMONELLA - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO</p> <p style="text-align: center;">Método de ensaio</p>	<p style="text-align: center;">L5.218</p> <p style="text-align: center;">Nov/93</p>
--------	---	---

SUMÁRIO

Introdução

- 1 Objetivo
- 2 Normas complementares
- 3 Definições
- 4 Aparelhagem
- 5 Execução do ensaio
- 6 Resultados

Anexo A - Prescrições gerais

Anexo B - Leitura do meio IAL

Anexo C - Referências bibliográficas

INTRODUÇÃO

O acesso de poluição fecal à água pode introduzir uma variedade de organismos patogênicos de origem intestinal, tornando-a um veículo na transmissão de doenças. Entre os microrganismos patogênicos mais comuns encontram-se as bactérias do gênero *Salmonella*. Amplamente distribuídas na natureza, são responsáveis por um elevado número anual de infecções gastrointestinais, cuja incidência vem se tornando cada vez maior em todo o mundo, constituindo, assim, um importante problema de saúde pública.

Além da veiculação por águas contaminadas por fezes, também atuam na propagação da doença os alimentos crus contaminados por portadores crônicos ou por excretos humanos e animais, eventualmente usados como adubo no cultivo de hortaliças e plantas frutíferas. O gênero *Salmonella* está bem disseminado entre os animais, causando infecções graves e representando perigo para o homem, levando a toxicoinfecções alimentares e quadro de gastroenterite aguda.

Devido à importância do assunto e à prevalência de *Salmonella* em água, o monitoramento desses microrganismos tem demonstrado ser um excelente indicador epidemiológico para a determinação de muitas infecções intestinais.

Vários autores têm proposto o uso de *Salmonella* como indicador de poluição, pois enfatizam que a *Salmonella* pode, em certas circunstâncias, sobreviver durante mais tempo do que os coliformes, tendo sido detectada em águas com baixa densidade de coliformes. O principal argumento contra a utilização de *Salmonella* para avaliar a qualidade de águas potáveis é que este organismo é um patógeno e, portanto, a sua detecção numa água seria só para confirmar o agente etiológico de uma epidemia. E no caso de a água ser utilizada para bebida, quando essas bactérias fossem detectadas, a água já teria sido consumida. Além disso, considerando-se que o lançamento de salmonelas em esgoto é intermitente e está na dependência das condições de saúde das populações humanas e animais da região, sua ausência não indica que a água seja bacteriologicamente segura, não podendo, portanto, ser utilizada como único indicador de poluição fecal.

A utilização de *Salmonella* como indicador apresenta maior importância em águas utilizadas para fins recreacionais, sendo uma medida preventiva do aparecimento de pequenos ou grandes surtos epidêmicos. Na Inglaterra, na Austrália, em Israel e em outros países, já foram citados alguns casos de epidemias, todos eles originados de banhistas

que se contaminaram através de águas poluídas de piscinas, mar, lagoas, etc.

A extrema resistência de bactérias do gênero *Salmonella* aos fatores ambientais justifica também a utilização deste parâmetro em estudos que visam avaliar a eficácia dos processos de tratamento de águas residuárias e de lodos de esgoto, bem como do controle da qualidade de águas utilizadas em aquicultura.

O primeiro passo para a detecção de *Salmonella* em água requer a concentração da amostra, pois normalmente é relativamente baixo o número dessas bactérias, quando comparado com a densidade de coliformes encontrada em águas contaminadas. Atualmente contamos com bons métodos de concentração, podendo-se utilizar a concentração de volumes determinados da amostra em membrana filtrante (porosidade 0.45 µm), em terra diatomácea, através de floculação com hidróxido de alumínio ou sulfato de alumínio e através de centrifugação direta. Outro método utilizado é a técnica de Moore, através da qual um volume desconhecido da amostra é concentrado em mecha de gaze imersa durante um período determinado na água ou no esgoto a ser analisado. As amostras de solo, de resíduos sólidos, de sedimento, de alimentos e de outras origens, podem ser submetidas a um pré-enriquecimento para recuperação das salmonelas estressadas. O isolamento e a identificação de *Salmonella* envolve vários procedimentos complexos (não acessíveis a todos os laboratórios) e requer uma equipe altamente treinada no reconhecimento e no isolamento das colônias consideradas suspeitas e na interpretação de provas bioquímicas e sorológicas.

1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o método qualitativo e quantitativo para isolamento e identificação de *Salmonella* em amostra de água, de esgoto e de resíduo sólido, com a finalidade de:

- a) avaliar a qualidade de corpos d'água receptores de despejos industriais, domésticos e hospitalares;
- b) avaliar a eficiência dos processos de tratamento de água de esgoto e resíduo sólido na remoção desse patógeno;
- c) avaliar possíveis fontes poluidoras e riscos de contaminação, por *Salmonella* no caso de águas utilizadas para fins recreacionais, inclusive águas marinhas;
- d) avaliar a qualidade de águas destinadas à irrigação de hortaliças e plantas, à aquicultura de espécies destinadas à alimentação humana ou animal, à dessedentação de animais, etc;
- e) obter dados para estudos de correlação entre a densidade de organismos indicadores de poluição de origem fecal e a ocorrência de *Salmonella*;
- f) obter dados mais completos sobre determinadas fontes de poluição em áreas específicas e relacionar com os inquéritos epidemiológicos.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- Norma CETESB M1.001 Lavagem, preparo e esterilização em materiais de laboratório de microbiologia;
- Norma CETESB L5.215 Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos;
- Norma CETESB L5.216 Controle de qualidade de meios de cultura;
- Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água - CETESB, 1988

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.11.

3.1 *Salmonella*

O gênero *Salmonella* compreende atualmente mais de 2 mil sorotipos caracterizados por reações bioquímicas, antígenos somáticos e flagelares. São bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, com 0,7 a 1,5 μm de diâmetro por 2,0 a 5,0 μm de comprimento. Reduzem nitratos a nitritos e a maioria é móvel por meio de flagelos peritríquios. Fermentam a glicose e o manitol, usualmente com produção de gás. Não liquefazem a gelatina e não crescem em KCN. Em geral, produzem sulfeto de hidrogênio, utilizam o citrato como única fonte de carbono e não fermentam a lactose, a sacarose, a salicina e o inositol. Não possuem urease nem desaminases, porém, são lisina e ornitina descarboxilase positivos. Dentro do gênero *Salmonella* existem alguns sorotipos, cujas reações bioquímicas não seguem a regra geral; por exemplo: as salmonelas aviárias - *S. gallinarium* ou *S. pullorum* são sempre imóveis; *S. typhi*, uma importante exceção, nunca produz gás, não utiliza o citrato e não descarboxila a ornitina; algumas cepas de *S. choleraesuis* e a maioria das *S. paratyphi-A* não produzem sulfeto de hidrogênio (H_2S), sendo que essa última é também incapaz de descarboxilar a lisina e utilizar o citrato; algumas cepas de *S. typhimurium* podem apresentar indol positivo e/ou lisina negativa, constituindo esses casos, no entanto, raras exceções.

3.2 Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica ou de bastonete.

3.3 Bactérias anaeróbias facultativas

Bactérias que crescem tanto na presença como na ausência de oxigênio livre.

3.4 Epidemia

Elevação brusca, temporária e significativa da incidência de uma doença em uma comunidade ou região.

3.5 Ágar XLD

Ágar xilose lisina desoxicolato; meio de Taylor, usado para isolamento e diferenciação de bactérias enteropatogênicas, especialmente as do gênero *Salmonella* e *Shigella*.

3.6 Ágar BG

Ágar verde brilhante, originalmente descrito por Kristensen, Lester e Jurgens (1925) e modificado por Kauffmann; meio sólido, altamente seletivo e diferencial, que favorece o isolamento de *Salmonella*, não sendo apropriado para o isolamento de *S. typhi*, *S. paratyphi-A* e *S. choleraesuis*.

3.7 Concentração

Processo pelo qual se reduz a porção líquida de uma amostra, mantendo todo o seu conteúdo sólido.

3.8 Concentração por filtração

Concentração efetuada com o uso de membrana filtrante.

3.9 p.a.

Para análise.

3.10 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

3.11 EDTA

Ácido etilenodiaminotetracético.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1 g ao serem pesados 150 g.¹

4.1.2 Banho-maria (55°C)

Equipado com termostato para temperatura de 55°C, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo meios de cultura, cuja temperatura deve ser estabilizada antes de sua distribuição em placas de Petri.²

4.1.3 Banho-maria (42,5°C)

Equipado com termostato para manter a temperatura na faixa de 42,5 ± 0,5°C.² O volume de água no banho-maria deve ser suficiente para emergir os erlenmeyers até o nível superior do meio de cultura neles contidos. Pode-se substituir o banho-maria por uma incubadora bacteriológica termostatizada para temperatura de 42,5 ± 0,5°C e com umidade relativa entre 75 e 85%.

4.1.4 Destilador de água ou aparelhos para desionização

Devem produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam a multiplicação bacteriana ou interfiram nela³, cuja condutividade deve ser inferior a 2µS/cm² a 25°C e pH na faixa de 5,5 a 7,5.

4.1.5 Equipamentos para esterilização

4.1.5.1 Autoclave

É normalmente operado a uma pressão de 103 393 Pa (1,05 kgf/cm² ou

1 As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura; precisam ser mantidas limpas e manuseadas por pessoal que conheça seu funcionamento.

2 Devem ser feitos registros contínuos e periódicos de temperatura e os termômetros usados graduados com intervalo de escala de 0,1°C. As estantes a serem colocadas no banho-maria têm que ser de aço inoxidável ou aço galvanizado.

3 A densidade de bactérias heterotróficas na água recém-destilada deve ser inferior a 1000 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) e a 10 000 UFC/mL na água destilada armazenada, devendo esse controle ser efetuado com frequência mínima mensal (Norma CETESB L5.215).

15 lb/pl²) produzindo uma temperatura de 121,6°C. ao nível do mar. Em seu funcionamento deve-se observar a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara; a operação total desse equipamento precisa durar, no mínimo, uma hora; é recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

4.1.5.2 Estufa de esterilização

Mantida a uma temperatura de 170 ± 10°C durante o período de esterilização (mínimo de duas horas).

4.1.6 Equipamento para concentração em membrana filtrante

4.1.6.1 Vasilhame de pressão

De aço inoxidável, com capacidade para cinco a dez litros.

4.1.6.2 Porta-filtro

De aço inoxidável, com 142 mm ou 293 mm de diâmetro.

4.1.6.3 Mangueiras de borracha

Com parede espessa e resistentes a pressão.

4.1.6.4 Fonte de vácuo e pressão

Bomba de vácuo e pressão, ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão de 147.1 kPa.

4.1.7 Incubadora bacteriológica termostaticada

Deve manter a temperatura na faixa de 35 ± 0,5°C e a umidade relativa entre 75 e 85%.⁴

4.1.8 Medidor de pH

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH e sua calibração ser feita pelo menos duas vezes ao dia com, no mínimo, duas soluções-tampão padrões (pH 4,0, pH 6,86 ou pH 9,18).

4.1.9 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 10°C.

4.2 Vidraria

4.2.1 Balões

De borossilicato ou de vidro neutro, com capacidade adequada para o preparo de meios de cultura.

4.2.2 Frascos para coleta de amostras

De vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 5 litros, boca larga e tampa à prova de vazamento.

4.2.3 Frascos de Erlenmeyer

De borossilicato ("pyrex") ou de vidro neutro, com capacidade de 300 mL.

4.2.4 Frascos para solução fisiológica

De borossilicato ("pyrex") ou de vidro neutro, com tampas de rosca que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis.

⁴ A verificação da temperatura deve ser feita periodicamente (mínimo de duas vezes ao dia) através de termômetros (com bulbo submerso em água, em glicerina ou em óleo mineral) colocados em pontos representativos da incubadora, sendo aconselhável também a colocação de um termômetro de máxima e de mínima na sua parte central. A estratificação da temperatura na incubadora pode ser evitada através da colocação, em seu interior, de um dispositivo para circulação do ar.

4.2.5 Pipetas

De borossilicato, tipo Mohr, para 5 mL e 10 mL, com graduação de 1/10 e erro de calibração inferior a 2.5%, com bocal para tampão de algodão.

4.2.6 Pipetas Pasteur

4.2.7 Placas de petri de vidro

Devem ser de borossilicato ("pyrex") ou de vidro neutro de boa qualidade, com 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura.

4.2.8 Placa de acrílico perfurada

Para distribuição do vascar (vaselina + cera de carnaúba) nos tubos.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0.5 mm de diâmetro e 70 a 80 mm de comprimento, com uma alça de 7 mm de diâmetro na extremidade, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle).

4.3.2 Bico de Bunsen ou similar

Deve ter funcionamento adequado de modo a produzir combustão completa

4.3.3 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para esterilização de materiais.

4.3.4 Caixas de Huddlenson

Para teste de aglutinação rápida. Caixa de madeira pintada internamente de preto, salvo uma face, pintada de branco, provida de uma lâmpada e uma placa de vidro quadriculada.

4.3.5 Estantes

De tamanho adequado para a colocação dos tubos de ensaio empregados na análise.

4.3.6 Estojo para pipetas

Usar, para acondicionamento e esterilização das pipetas, estojos de alumínio ou de aço inoxidável de tamanho adequado. Opcionalmente, as pipetas podem ser embrulhadas individualmente em papel Kraft para esterilização.

4.3.7 Luvas cirúrgicas ou descartáveis

4.3.8 Máscaras cirúrgicas assépticas

4.3.9 Membranas de éster de celulose

Mistura de nitrato e acetato de celulose, com porosidade de 0.45 μm (previamente esterilizadas ou autoclaváveis). Deverão ser de boa qualidade e apresentar retenção total de bactérias e velocidade de filtração satisfatória.

4.3.10 Papel alumínio

4.3.11 Papel Kraft

4.3.12 Pinças

De aço inoxidável, com extremidades arredondadas.

4.3.13 Pipetador de segurança ou pera de sucção

4.3.14 Tela de amianto

4.3.15 Termômetros

4.3.16 Tesoura

De aço inoxidável, com ponta fina.

4.3.17 Tripé

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

O método baseia-se na concentração de volumes representativos de amostras de água tratada, superficial e subterrânea, através de membrana filtrante ou mecha de gaze ou na inoculação direta das amostras de esgoto, de solo, de sedimento e de resíduo sólido. As amostras são posteriormente incubadas em meios de enriquecimento (Rappaport tetracionato e/ou selenito novobiocina) próprios para inibir outras bactérias e favorecer o crescimento de *Salmonella*, ou pré-enriquecimento (água peptonada tamponada). As colônias típicas, isoladas em placa contendo o meio ágar seletivo e diferencial (XLD e BG) são submetidas a testes bioquímicos e sorológicos para confirmação.

5.2 Reagentes e materiais

5.2.1 Para a preparação do meio de cultura e soluções utilizadas neste ensaio, os reagentes necessários são os seguintes:

- Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) p.a.;
- Ágar;
- Água destilada;
- Álcool etílico absoluto;
- Azul de bromotimol;
- Cera de carnaúba em pedaços;
- Citrato férrico amniacal p.a.;
- Cloreto de magnésio hexa-hidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) p.a.;
- Cloreto de sódio ($NaCl$) p.a.;
- Cristal de iodo (I_2) p.a.;
- Desoxicolato de sódio ($C_{24}H_{39}NaO_4$) p.a.;
- Dextrose (glicose) p.a.;
- EDTA p.a.;
- Extrato de carne;
- Extrato de levedura;
- Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) p.a.;
- Fosfato de sódio dibásico penta-hidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 5H_2O$);
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) p.a.;
- Hidróxido de sódio ($NaOH$) p.a.;
- Iodeto de potássio (KI) p.a.;
- Lactose p.a.;
- L-lisina;
- L-triptofano;
- Nitrato de potássio (KNO_3) p.a.;
- Novobiocina sódica;
- p-dimetilaminobenzaldeído ($C_9H_{11}NO$) p.a.;
- Peptona p.a.;
- Púrpura de bromocresol;
- Sacarose p.a.;
- Selenito de sódio;

- Tioglicolato de sódio;
- Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) p.a.;
- Tiosulfato de sódio penta-hidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) p.a.;
- Triptona p.a.;
- Uréia p.a.;
- Vaselina líquida;
- Verde brilhante;
- Verde malaquita;
- Vermelho de fenol;
- Xilose p.a.

5.2.2 Soros polivalentes anti-*Salmonella*:

- Soro anti-*Salmonella* polivalente somático;
- Soro anti-*Salmonella* polivalente flagelar.

5.2.3 Os reagentes devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalteradas, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos bem como de carboidratos inespecíficos.

5.2.4 Os materiais a utilizar são os seguintes:

- a) algodão cardado;
- b) algodão hidrófilo;
- c) membranas filtrantes estéreis, com diâmetro de 142 mm de porosidade de 0.45 mm. Deverão ser de boa qualidade, apresentar retenção total de bactérias e velocidade de filtração satisfatória;
- d) papel alumínio;
- e) papel Kraft;
- f) rolo de gaze.

5.3 Meios de cultura

5.3.1 Água peptonada tamponada

Fórmula:

Peptona	10.0 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5.0 g
Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4).....	3.5 g
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4).....	1.5 g
Água destilada.....	1 000.0 mL

pH final após esterilização: 7.2 ± 0.2 a 25°C

Preparo:

Pesar 20 g do meio desidratado "buffered peptone water" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volume de 225 mL em erlenmeyers com capacidade de 500 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C , durante 15 minutos. Armazenar a temperatura ambiente durante o período máximo de quatro semanas.

5.3.2 Caldo selenito novobiocina

Fórmula:

Triptona.....	5.0 g
Lactose.....	4.0 g
Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4).....	10.0 g

Selenito de sódio.....	4.0 g
Novobiocina sódica.....	0.04 g
Água destilada.....	1 000.0 mL

pH final após esterilização: 7.0 ± 0.2 a 25°C .

Nota: Não esterilizar em autoclave.

Preparo:

Pesar 23 g do meio desidratado "selenit broth" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. O meio não pode ser superaquecido. Adicionar 0,04 g do antibiótico novobiocina sódica. Distribuir assepticamente volumes de 100 mL em erlenmeyers com capacidade de 250 mL previamente esterilizados e tamponados. Armazenar sob refrigeração (2 a 8°C), durante o período máximo de uma semana.

5.3.3 Meio de Rappaport tetracionato modificado por Hofer

Fórmula:

Solução A (meio básico).....	100.0 mL
Solução B (cloreto de magnésio 40%).....	10.0 mL
Solução C (verde malaquita 0,4%).....	3.0 mL
Solução D (tiosulfato de sódio 20%).....	10.0 mL
Solução E (iodo-iodeto).....	2.0 mL

Preparo:

Este meio deve ser preparado como segue:

a) preparar a solução A (meio básico) com a seguinte composição:

Triptona.....	5.0 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	8.0 g
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4).....	1.6 g
Água destilada.....	1 000.0 mL

pH final após esterilização: $6.5 - 6.8$ a 25°C

Para o preparo desta solução, pesar os ingredientes e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 100 mL em erlenmeyers de 250 mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar sob refrigeração (2 a 8°C), durante o período máximo de quatro semanas.

b) preparar a solução B (cloreto de magnésio 40%) com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	40.0 g
Água destilada q.s.p.....	100.0 mL

Para o preparo desta solução, pesar 40 g de cloreto de magnésio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do cloreto de magnésio. Esterilizar em vapor fluente ou banho-maria a 100°C durante 30 minutos. Armazenar sob refrigeração (2 a 8°C), durante o período máximo de quatro semanas.

c) preparar a solução C (verde malaquita 0,4%) com a seguinte composição:

Verde malaquita.....	0.4 g
Água destilada q.s.p.....	100.0 mL

Para o preparo desta solução, pesar 0,4 g de verde malaquita, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do verde malaquita. Esterilizar em vapor fluente ou banho-maria a 100°C durante 30 minutos. Armazenar em frasco âmbar, sob refrigeração (2 a 8°C), durante o período máximo de uma semana.

- d) Preparar a solução D (tiossulfato de sódio a 20%) com a seguinte composição:
- | | |
|--|----------|
| Tiossulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃)..... | 20,0 g |
| Água destilada q.s.p..... | 100,0 mL |

Para o preparo desta solução, pesar 20 g de tiossulfato de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do tiossulfato de sódio. Esterilizar em vapor fluente ou banho-maria a 100°C durante 30 minutos. Armazenar sob refrigeração (2 a 8°C), durante o período máximo de quatro semanas.

- e) preparar a solução E (iodo-iodeto) com a seguinte composição:
- | | |
|--|---------|
| Cristal de iodo (I ₂)..... | 5,0 g |
| Iodeto de potássio (KI)..... | 8,0 g |
| Água destilada q.s.p..... | 40,0 mL |

Para o preparo desta solução, pesar os ingredientes, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 40 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução dos ingredientes. Armazenar em frasco âmbar sob refrigeração (2 a 8°C), durante o período máximo de uma semana.

- f) no momento do uso do meio Rappaport tetracionato, para cada 100 mL da solução A (base), adicionar 10 mL da solução B e D, 3 mL da solução C e 2 mL da solução E.

5.3.4 Ágar verde brilhante, descrito por Kristensen, Lester e Jürgens em 1925 e modificado por Kauffmann em 1966 (ágar BG)

Fórmula:

Extrato de levedura	3,0 g
Peptona.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Lactose.....	10,0 g
Sacarose.....	10,0 g
Vermelho fenol.....	0,08 g
Verde brilhante.....	0,0125 g
Ágar.....	20,0 g
Água destilada.....	1 000,0 mL

pH final após esterilização: 6,9 ± 0,2 a 25°C.

Preparo:

Pesar 58 g do meio desidratado "brilliant green agar" e acrescentar 1 000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Estabilizar o meio de cultura a uma temperatura de 55 a 60°C, em banho-maria. Distribuir volumes de aproximadamente 12 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, previamente esterilizadas. As placas de Petri contendo o meio de ágar BG podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C), durante o período máximo de duas semanas.

5.3.5 Ágar xilose lisina desoxicolato, segundo Taylor (ágar XLD)

Fórmula:

Extrato de levedura.....	3.0	g
L-lisina.....	5.0	g
Xilose.....	3.75	g
Lactose.....	7.5	g
Sacarose.....	7.5	g
Desoxicolato de sódio.....	2.5	g
Citrato férrico amoniaco.....	0.8	g
Tiosulfato de sódio.....	6.8	g
Cloreto de sódio.....	5.0	g
Vermelho de fenol.....	0.08	g
Ágar.....	15.0	g
Água destilada.....	1 000.0	mL

pH final: 7.4 ± 0.2 a 25° C

Não autoclavar.

Preparo:

Pesar 57 g do meio desidratado "XLD ágar" e acrescentar 1000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Estabilizar o meio de cultura a uma temperatura de 55 a 60°C, em banho-maria. Distribuir volumes de aproximadamente 12 mL em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, previamente esterilizadas. As placas de Petri, contendo o meio de ágar XLD, podem ser armazenadas sob refrigeração, durante o período máximo de duas semanas.

5.3.6 Meio de Rugai e lisina-motilidade (IAL), segundo Pessoa & Silva

O meio de cultura completo é constituído de quatro fases:

- interfase (vascar);
- fase inferior (lisina-motilidade);
- fase superior (meio de Rugai & Araújo);
- tampão (com reativo para indol).

5.3.6.1 Intérfase (vascar; vaselina-carnaúba)

Fórmula:

Vaselina líquida.....	90.0	mL
Cera de carnaúba.....	18.0	g

Preparo:

Pesar 18 g de cera de carnaúba e acrescentar 90 mL de vaselina líquida. Aquecer até a completa fusão da cera. Retirar do fogo e verter sobre uma placa de acrílico perfurada (ver A-12). Deixar esfriar, retirar o excesso da cera sobre a placa de acrílico com ajuda de uma espátula. Armazenar à temperatura ambiente. No momento do uso, deixar a placa na geladeira durante 30 minutos. Com ajuda de um bastão de vidro, retirar a cera dos orifícios e colocar em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm para que se forme um anel vedatório de aproximadamente 1 mm de espessura.

5.3.6.2 Fase inferior - Meio para testes de descarboxilação da lisina e de motilidade

Fórmula:

Extrato de levedura.....	3,0 g
Dextrose.....	0,5 g
Nitrato de potássio (KNO ₃).....	0,5 g
L-lisina.....	5,0 g
Solução alcoólica de púrpura de bromocresol 0,2%.....	10,0 mL
Ágar.....	4,0 g
Água destilada.....	1000,0 mL

pH final após esterilização: 6,4 a 25°C

Preparo:

Pesar o extrato de levedura, a dextrose, o nitrato de potássio e o ágar. Acrescentar 1000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Acrescentar a L-lisina. Homogeneizar e ajustar o pH para 6,4 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH - 1N). Acrescentar 10 mL da solução alcoólica de púrpura de bromocresol a 0,2%. Homogeneizar e distribuir volumes de 1,5 mL em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm, nos quais já foi colocado o vascar (interfase). Tamponar com algodão hidrófilo e esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após a autoclavagem, os tubos contendo o meio devem ser conservados em posição vertical para a formação do menisco vedatório de vascar. Armazenar em caixas ou sacos plásticos sob refrigeração (2-8°C) durante o período máximo de quatro semanas.

5.3.6.3 Fase superior (meio de Rugai & Araújo)**Fórmula:**

Solução 1 (base).....	800,0 mL
Solução 2 (solução de indicador e substratos).....	14,0 mL

Preparo:

Este meio deve ser preparado como segue:

- preparar a solução 1 (base) com a seguinte composição:

Triptona.....	10,0 g
Extrato de carne.....	2,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5,0 g
Fosfato de sódio dibásico penta-hidratado (Na ₂ HPO ₄ .5H ₂ O).....	2,0 g
L-triptofano.....	1,0 g
Solução alcoólica de azul de bromotimol 1,5%.....	2,0 mL
Ágar.....	11,0 g
Água destilada.....	1000,0 mL

pH final após esterilização: 7,4 a 25°C

Preparo:

Pesar os reagentes, com exceção da solução de azul de bromotimol e acrescentar 1000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Ajustar o pH para 7,4 com solução normal de hidróxido de sódio (NaOH - 1N). Acrescentar 2 mL de solução alcoólica a 1,5% de azul de bromotimol. Distribuir em balões. Tamponar e esterilizar em autoclave, a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira (2-8°C) ao abrigo da luz.

- preparar a solução 2 (solução de indicador e substratos), com a seguinte composição:

Citrato de ferro amoniacal (verde).....	2,0 g
Tiosulfato de sódio penta-hidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).....	2,0 g
Sacarose.....	80,0 g
Dextrose.....	10,0 g
Uréia.....	40,0 g
Água destilada.....	85,0 mL

Preparo:

Pesar todos os reagentes, colocá-los em um frasco esterilizado de 150 mL e acrescentar 85 mL de água destilada esterilizada. Tamponar com tampa de rosca ou rolha de cortiça esterilizada. Aquecer em banho-maria a 65°C, agitando frequentemente até a completa dissolução dos reagentes. Pasteurizar, mergulhando o frasco até o gargalo em banho-maria a 65°C, durante uma hora. Armazenar em geladeira (2 a 8°C), ao abrigo da luz.

5.3.6.4 Reativo para indol

Fórmula:

p-Dimetilaminobenzaldeído.....	1,0 g
Ácido ortofosfórico.....	20,0 mL
Álcool etílico absoluto.....	50,0 mL
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar o p-Dimetilaminobenzaldeído, colocar em um balão volumétrico e homogeneizar. Adicionar o ácido ortofosfórico a 50 mL de água destilada e juntar ao p-Dimetilaminobenzaldeído dissolvido em álcool. Completar o volume com água destilada. Homogeneizar e armazenar em vidro com tampa esmerilhada ou de rosca, sob refrigeração (2 a 8°C) durante o período máximo de quatro semanas.

Nota: Na aplicação do reativo para indol no tampão de algodão devem ser observados os seguinte itens:

- colocar aproximadamente 10 mL do reativo em uma placa de Petri estéril, mantida em posição inclinada, contendo no fundo papel de filtro esterilizado;
- não embeber o tampão de algodão diretamente no reativo, mas apenas tocar levemente no papel de filtro um pouco acima do nível do reativo;
- trabalhar rapidamente, com assepsia, de preferência em ambiente estéril.

5.3.6.5 Corantes utilizados no preparo do IAL

- a) Azul de bromotimol (solução alcoólica a 1,5%)

Fórmula:

Azul de bromotimol.....	1,5 g
Álcool etílico absoluto q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 1,5 g de azul de bromotimol, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com álcool etílico absoluto. Guardar a solução em frasco com tampa de rosca ao abrigo da luz.

b) Púrpura de bromocresol (solução alcoólica a 0,2%)

Fórmula:

Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N)...	1,0 mL
Água destilada.....	49,0 mL
Púrpura de bromocresol.....	0,2 g
Álcool etílico absoluto q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Adicionar em um balão volumétrico 1 mL de uma solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N) a 49 mL de água, destilada. Esperar meia hora para estabilizar. A seguir, dissolver 0,2 g de púrpura de bromocresol nesta solução estabilizada. Após a dissolução, completar o volume para 100 mL com álcool etílico absoluto. Guardar a solução em frasco com tampa de rosca ao abrigo da luz.

5.3.6.6 Preparo final do meio de Rugai e lisina-motilidade (IAL)

Fundir a base do meio Rugai & Araújo em banho-maria e estabilizar a 60-65°C. Adicionar assepticamente a solução de indicador de substratos. Homogeneizar. Distribuir porções de aproximadamente 3 mL em tubos de 12 mm x 120 mm já contendo a lisina e o vascar, aproveitando a manobra para impregnar o tampão com reativo para indol. Deixar esfriar, inclinando de tal maneira que a base seja aproximadamente um terço da altura do ápice. Fazer prova de esterilidade, em estufa a 35°C por 24 horas.

5.3.7 Ágar nutriente modificado

Fórmula:

Extrato de carne.....	4,0 g
Peptona.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000,0 mL

pH final após esterilização: 7,6 ± 0,2 a 25°C

Preparo:

Pesar os componentes e acrescentar 1000 mL de água destilada fria, deixando em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa fusão do ágar, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 6 a 7 mL em tubos de ensaio de 12 mm x 120 mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após a esterilização, e enquanto o meio estiver ainda quente, colocar os tubos em posição vertical até que o meio se solidifique.

5.3.8 Meio de transporte "Cary e Blair"

Fórmula:

Tioglicolato de sódio.....	1,5 g
Fosfato dibásico de sódio anidro.....	1,1 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar.....	5,0 g
Água destilada.....	991,0 mL

pH final após esterilização: 8,4 ± 0,2

Preparo:

Pesar 12,6 g do meio desidratado "Cary and Blair transport medium" e acrescentar 991 mL de água destilada fria. Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer, agitando freqüentemente, até a

completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Colocar em banho-maria a 50°C para estabilização. Adicionar assepticamente 9 mL de uma solução aquosa a 1% de cloreto de cálcio recém preparada. Esterilizar o meio em vapor fluente durante 15 minutos. Após a esterilização, manter a solução em banho-maria a 55°C, para estabilização da temperatura. Ajustar o pH para 8.4 com NaOH-1N, se necessário. Com todos os cuidados de assepsia, distribuir volumes de 300 mL em frascos de coleta, previamente esterilizados. O meio preparado deve ser armazenado sob refrigeração (2 a 8°C), devidamente protegido da luz, durante um período máximo de 19 semanas.

5.4 Soluções

5.4.1 Solução fisiológica

Fórmula:

Cloreto de sódio.....	8.5 g
Água destilada.....	1000.0 mL

Preparo:

Pesar 8.5 g de cloreto de sódio e dissolver em 1000 mL de água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do cloreto de sódio. Distribuir volumes de aproximadamente 50 mL em frascos de borossilicato ou de vidro neutro. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar à temperatura ambiente.

5.4.2 Solução salina a 2%

Fórmula:

Cloreto de sódio.....	20.0 g
Água destilada.....	1000.0 mL

Preparo:

Pesar 20.0 g de cloreto de sódio e dissolver em 1000 mL de água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do cloreto de sódio. Distribuir volumes de aproximadamente 50 mL em frascos de borossilicato ou de vidro neutro. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Armazenar à temperatura ambiente.

5.4.3 Solução normal de hidróxido de sódio (NaOH-1N)

Fórmula:

Hidróxido de sódio.....	40.0 g
Água destilada.....	1000.0 mL

Preparo:

Pesar 40 g de hidróxido de sódio. Colocar em um balão volumétrico e adicionar 500 mL de água destilada. Homogeneizar até a completa dissolução do hidróxido de sódio e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Armazenar em frasco bem vedado ao abrigo da luz.

5.4.4 Solução de tiosulfato de sódio a 1.8%

Fórmula:

Tiosulfato de sódio (Na ₂ S ₂ O ₃) p.a.....	18.0 g
Água destilada q.s.p.....	1000.0 mL

Preparo:

Pesar 18 g de tiosulfato de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do tiosulfato de sódio. Armazenar em frasco bem vedado.

5.4.5 Solução de EDTA a 15%**Fórmula:**

EDTA.....	150,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000,0 mL

Preparo:

Pesar 150 g de EDTA, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do reagente. Ajustar o pH para 6,5. Armazenar em frasco bem vedado.

5.4.6 Solução aquosa de cloreto de cálcio (Solução estoque 1%)**Fórmula:**

Cloreto de cálcio.....	1,0 g
Água destilada.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 1,0 g de cloreto de cálcio e dissolver em 100 mL de água destilada. Armazenar em frasco bem vedado, previamente esterilizado.

5.4.7 Água de diluição**Fórmula:**

Solução-estoque A.....	1,25 mL
Solução-estoque B.....	5,00 mL
Água destilada.....	1000,0 mL

pH final após esterilização: 7,2 ± 0,1

Preparo:

A água de diluição deve ser preparada como segue:

- preparar a solução-estoque A com a seguinte composição:

Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	34,0 g
Água destilada q.s.p.....	1000,0 mL

 Dissolver o fosfato de potássio monobásico com 500 mL de água destilada, ajustar o pH para 7,2 ± 0,1 com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Distribuir os volumes, adequados à necessidade de uso do laboratório, em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira.
- preparar a solução-estoque B com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio (MgCl ₂ .6H ₂ O).....	81,1 g
Água destilada q.s.p.....	1000,0 mL

 Dissolver o cloreto de magnésio em 500 mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Distribuir os volumes, adequados à necessidade de uso do laboratório, em frascos com tampa de rosca. Rotular e armazenar em geladeira.

- c) adicionar 1,25 mL da solução-estoque A e 5 mL da solução-estoque B e completar o volume para 1000 mL com água destilada;
- d) distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas que, após autoclavagem a 121°C durante 15 minutos, assegurem volumes de 90 ± 2 mL.

Nota: Antes da utilização da solução-estoque A, deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

5.5 Reações

5.5.1 Meio de pré-enriquecimento

5.5.1.1 Água peptonada tamponada

É um meio de enriquecimento prévio usado para a multiplicação e recuperação de espécies de *Salmonella* estressadas, principalmente em amostra de lodo, de solo e de águas residuárias antes do enriquecimento seletivo. Meio de baixa seletividade onde o pH se mantém constante durante o período de incubação.

5.5.2 Meios de enriquecimento

5.5.2.1 Caldo selenito novobiocina

O caldo selenito é um meio de enriquecimento seletivo para *Salmonella*. O selenito propicia o crescimento de *Salmonella*, enquanto inibe o crescimento de enterococos e coliformes fecais. O antibiótico novobiocina é adicionado ao caldo selenito por sua ação inibitória sobre as bactérias do gênero *Proteus*, que estão entre as não fermentadoras de lactose mais sensíveis à ação deste antibiótico.

5.5.2.2 Meio de Rappaport tetrato modificado por Hofer

Este meio de enriquecimento é seletivo para *Salmonella*, com exceção da *S. typhi*. A ação inibitória sinérgica do verde malaquita e cloreto de magnésio suprime o crescimento de bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*.

5.5.3 Meios seletivos diferenciais

5.5.3.1 Ágar verde brilhante (BG)

É um meio altamente seletivo e diferencial para isolamento de *Salmonella*. O metabolismo das salmonelas neste meio é essencialmente proteolítico, resultando na formação de produtos finais alcalinos, evidenciados pela coloração rosa e vermelha de suas colônias, uma vez que o indicador de pH presente na composição deste meio (vermelho de fenol) apresenta essa coloração em pH básico. Nesse meio, o agente seletivo verde brilhante suprime quase por completo o crescimento de outras bactérias. Esse meio não é adequado para o isolamento de *S. typhi*; no entanto, algumas cepas de *S. typhi* e *Proteus* podem crescer formando colônias vermelhas.

5.5.3.2 Ágar xilose lisina desoxicolato (ágar XLD)

É um meio seletivo diferencial para isolamento de bactérias enteropatógenas, especialmente do gênero *Salmonella*. As salmonelas utilizam a xilose, acidificando o meio e, a seguir, descarboxilam a lisina produzindo a cadaverina, uma diamina capaz de

reverter o pH para alcalino. Em geral reduzem o tiosulfato a sulfeto de hidrogênio (H_2S) apresentando-se sob a forma de colônias vermelhas com centro escuro, excetuando-se a *S. choleraesuis* e os sorotipos de *S. enteritidis*, *S. paratyphi A*, *S. pullorum* e *S. gallinarum*, cujas colônias são inteiramente vermelhas, semelhantes à *Shigella*, *Providencia* e *Proteus rettgeri*.

5.5.3.3 Meio de Rugai e lisina-motilidade (IAL), segundo Pessoa & Silva

a) fase inferior: lisina e motilidade

- lisina - as salmonelas descarboxilam este aminoácido através da enzima L-lisina descarboxilase dando formação à respectiva amina cadaverina. A amina formada neutraliza a acidez do meio proveniente da fermentação da glicose e o alcaliniza o suficiente para fazer com que o indicador púrpura de bromocresol vire para a cor violeta nesse pH;
- motilidade - as salmonelas são dotadas de flagelos, apresentando, portanto, crescimento difuso em ágar semi-sólido;

b) fase superior: Rugai

- glicose (dextrose) - a *Salmonella* fermenta a glicose, com produção de ácido, o que determina o aparecimento da coloração amarela ao meio, decorrente da viragem do indicador de pH. Na superfície do meio, no entanto, a proliferação é muito abundante e a acidez resultante da fermentação da glicose é neutralizada pelos produtos do metabolismo protéico, o que determina o aparecimento da coloração azul. Na base do meio, onde o crescimento é menor em relação à superfície, os produtos do metabolismo protéico não são suficientes para neutralizar a acidez, permanecendo a coloração amarela da do meio;
- gás - as salmonelas produzem gás, havendo formação de bolhas no meio;
- sulfeto de hidrogênio (H_2S) - as salmonelas são capazes de reduzir o tiosulfato a sulfeto de hidrogênio. Este, por sua vez, combina-se com o íon ferro presente no citrato férrico amoniacal dando origem ao sulfeto férrico que causará enegrecimento do meio;
- indol - as salmonelas, com raras exceções, não possuem a enzima triptofanase, sendo, portanto, incapazes de degradar o aminoácido heterocíclico triptofano e formar o indol. A formação de indol é verificada pela presença da cor vermelha nos tampões do IAL que contém o reativo p-dimetilamonobenzaldeído;
- L-triptofano desaminase (LTD) - as salmonelas não possuem a L-triptofano desaminase, sendo incapazes de desaminar o triptofano e produzir o ácido indol pirúvico; portanto, o ápice do IAL se apresentará azul;
- urease - as salmonelas são urease negativas, logo, não desdobram a uréia em amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2), não apresentando cor azul na parte inferior, característica das bactérias urease positivas;
- sacarose - as salmonelas não fermentam a sacarose; portanto, o ápice do IAL se apresentará com a coloração azul.

5.6 Amostragem

Deve ser realizada conforme descrito no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água, CETESB, 1988.

5.6.1 Amostra

5.6.1.1 Identificação

A amostra deve ser bem identificada, e todas as informações sobre ela devem ser completas (n^o da amostra, data, local, pH, temperatura, cloro residual e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente).

5.6.1.2 Agente neutralizador de cloro residual

Para a coleta de amostras de águas tratadas deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Esta quantidade de tiossulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada para as amostragens de rotina. Em situações especiais, como, por exemplo, em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma quantidade maior de tiossulfato é requerida. Nesses casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

5.6.1.3 Agentes quelantes

Para a coleta de amostras de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,1 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de coleta, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 mL da amostra, além do tiossulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco de coleta, separadamente ou já combinada com a solução de tiossulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante reduzindo a ação tóxica de metais, apresentando uma ação mais ampla que o tiossulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

5.6.1.4 Transporte e conservação

Após a coleta, a amostra deverá ser enviada ao laboratório o mais rápido possível. O tempo máximo ideal entre a coleta da amostra e o início do exame não deve exceder a oito horas, sendo que o tempo limite não deve exceder a 24 horas. As amostras devem ser transportadas sob refrigeração (4 a 10°C) e conservadas assim até o início do exame.

5.7 Procedimento

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para o isolamento de *Salmonella* do meio ambiente, sendo que a escolha do método adequado depende do tipo de amostra a ser analisada e da capacidade analítica do laboratório. Para amostras líquidas com baixa densidade de *Salmonella* deve-se utilizar métodos de concentração antes da inoculação nos meios de enriquecimento. Amostras com alta densidade de *Salmonella* podem ser inoculadas diretamente nos meios de enriquecimento, sendo necessário em alguns casos um pré-enriquecimento para recuperação de salmonelas estressadas.

5.7.1 Técnica de concentração em membrana filtrante

5.7.1.1 Volume da amostra

O volume da amostra a ser concentrado depende do tipo e característica da água a ser analisada; entretanto um volume mínimo deve ser utilizado:

Água de esgoto.....	100 mL
Água superficial.....	5 litros
Água para consumo.....	10 litros

5.7.1.2 Antes de iniciar o exame, desinfetar a bancada de trabalho usando um desinfetante que não deixe resíduos.

5.7.1.3 Dispor sobre a bancada de trabalho o material necessário à execução de análise, a saber:

- vasilhame de pressão, conectado à bomba de pressão positiva;
- porta-filtro de 142 mm de diâmetro previamente esterilizado, conectado ao vasilhame de pressão;
- membranas filtrantes estéreis com 142 mm de diâmetro e 0,45 μ m de porosidade;
- dois erlenmeyers de 250 mL, identificados com o número da amostra (que deverão conter), o volume a ser filtrado e a data; um deles contendo 100 mL do meio de enriquecimento Rappaport tetracionato e o outro, 100 mL do meio de enriquecimento caldo selenito novobiocina;
- pinça com as extremidades mergulhadas em álcool;
- tesoura com ponta fina, com as extremidades mergulhadas em álcool;
- bico de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem da pinça e da tesoura.

5.7.1.4 Preparação do porta-filtro

- retirar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça flambada e esfriada, colocar uma membrana filtrante estéril, centralizando-a sobre a parte inferior do porta-filtro;
- acoplar a parte superior do porta-filtro tendo cuidado para não danificar a membrana.

5.7.1.5 Preparação da amostra para a filtração

Homogeneizar a amostra e verter cuidadosamente no vasilhame de pressão o volume a ser examinado.

5.7.1.6 Fechar o vasilhame de pressão, ligar a bomba de pressão positiva e proceder a filtração, a uma pressão de 147,1 kPa.

5.7.1.7 Desligar a bomba de pressão ao finalizar a operação. Abrir a válvula de segurança do vasilhame de pressão e do porta-filtro.

5.7.1.8 Colocar os erlenmeyers contendo os meios de enriquecimento (Rappaport e selenito) em frente do conjunto de filtração.

5.7.1.9 Retirar a parte superior do porta-filtro, tendo cuidado para não danificar a membrana.

5.7.1.10 Dividir a membrana em duas partes com o auxílio de uma pinça e de uma tesoura, previamente flambadas, e transferir cada uma das metades da membrana para os meios de enriquecimento (Rappaport e selenito).

5.7.1.11 Após a utilização do equipamento de filtração para a concentração da amostra, efetuar sua esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.7.1.12 Incubar o erlenmeyer contendo o meio de Rappaport com a amostra à temperatura de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e o erlenmeyer contendo o caldo selenito novobiocina com a amostra à temperatura de $42,5^\circ\text{C}$, durante 18-24 horas.

5.7.1.13 Após o período determinado de incubação, identificar as placas contendo os meios seletivos e diferenciais BG e XLD, uma placa de cada meio, para cada um dos meios de enriquecimento.

5.7.1.14 Flambar e resfriar uma alça de inoculação de platina ou de níquel-cromo, com a parte final formando um círculo de aproximadamente 7 mm de diâmetro.

5.7.1.15 Homogeneizar o erlenmeyer contendo a amostra enriquecida com o meio de Rappaport, coletar o material mergulhando a extremidade da alça de inoculação no líquido do erlenmeyer a uma profundidade de aproximadamente 1 cm e proceder a semeadura do inóculo, como segue:

- a) depositar o inóculo em um ponto nas bordas da placa contendo o meio seletivo e diferencial XLD; girá-la e iniciar o espalhamento na superfície do primeiro quadrante, tomando cuidado para que a parte encurvada da alça toque apenas a superfície do meio, evitando ferir o ágar (ver Figura 1):

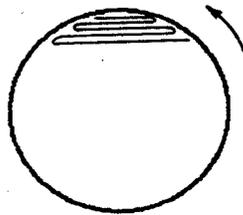


FIGURA 1

- b) girar novamente a placa e continuar o espalhamento no segundo quadrante (ver Figura 2):

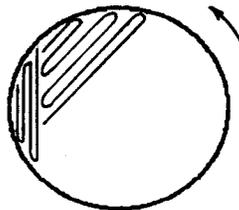


FIGURA 2

- c) proceder dessa maneira até completar a sementeira em toda a superfície do ágar (ver Figura 3):



FIGURA 3

- d) fechar e incubar a placa em posição invertida durante 24 ± 2 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

- 5.7.1.16 Repetir o procedimento para a sementeira do inóculo na placa contendo o meio seletivo e diferencial BG (itens 5.7.1.14 e 5.7.1.15).
- 5.7.1.17 Homogeneizar o erlenmeyer contendo a amostra enriquecida no meio de selenito e proceder como em 5.7.1.15 e 5.7.1.16.
- 5.7.1.18 Após a retirada dos inóculos para a sementeira em placas, incubar os meios de enriquecimento com a amostra durante mais 18-24 horas, às respectivas temperaturas (35°C para o meio de Rappaport e $42,5^\circ\text{C}$ para o caldo selenito novobiocina).
- 5.7.1.19 Após o período determinado de incubação dos meios de enriquecimento com a amostra, proceder como em 5.7.1.13, até 5.7.1.17.
- 5.7.1.20 Após a retirada dos inóculos para a sementeira em placas, desprezar o meio de Rappaport e incubar o caldo selenito com a amostra, durante mais três dias (completando cinco dias de incubação), sempre à temperatura de $42,5^\circ\text{C}$.
- 5.7.1.21 Proceder como em 5.7.1.17 (trabalhando agora apenas com o caldo selenito contendo a amostra).
- 5.7.1.22 Após o período determinado de incubação das placas contendo os meios seletivos e diferenciais BG e XLD, efetuar a leitura, separando aquelas que apresentarem colônias típicas de *Salmonella* (colônias de coloração rosa no meio de BG e colônias vermelhas com centro escuro ou vermelhas no meio de XLD).
- 5.7.1.23 Da placa de cada meio seletivo e diferencial correspondente ao isolamento a partir de cada meio de enriquecimento, selecionar de oito a dez colônias típicas de *Salmonella* e, com o auxílio de uma alça de inoculação flambada e esfriada, transferir cada colônia típica selecionada para o tubo de Rugaiolisina motilidade (IAL) previamente identificado. A inoculação é feita através de picada em profundidade e de estrias na superfície.
- 5.7.1.24 Após a transferência, incubar os tubos de IAL a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

5.7.1.25 Leitura das características bioquímicas de *Salmonella sp* no meio de IAL:

- a) fase inferior:
- motilidade-positiva:**
crescimento difuso a partir da picada (exceções: *S. gallinarum* e *S. pullorum*, que apresentam motilidade de negativa e, portanto, não turvam o meio);
 - lisina-descarboxilase positiva:**
cor violeta (exceções: *S. paratyphi A* e algumas culturas de *S. typhimurium* que não descarboxilam a lisina);
- b) fase superior:
- triptofano desaminase negativa:**
não se verifica a coloração verde-acastanhada na superfície inclinada;
 - sacarose negativa:**
coloração azul na superfície da fase superior;
 - glicose positiva:**
evidenciada pela coloração amarela na profundidade da fase superior;
 - sulfeto de hidrogênio (H₂S) positivo:**
evidenciada pela coloração negra na profundidade da fase superior. (Exceções: *S. paratyphi A* e *S. choleraesuis* não produzem sulfeto de hidrogênio, sendo que a *S. typhi* só produz H₂S após 48 horas);
 - urease negativa:**
não se verifica a coloração azul na profundidade da fase superior;
 - gás positivo:**
presença de bolhas na profundidade da fase superior, efeito não observado para *S. typhi*, uma vez que esta bactéria não produz gás;
- b) tampão de algodão com reativo:
- índol negativo:**
ausência de coloração vermelha ou rosa (algumas culturas de *S. typhimurium* podem apresentar a produção de índol, constituindo, no entanto, raras exceções).

5.7.1.26 Após o período determinado de incubação, efetuar a leitura considerando resultado positivo para os tubos que apresentarem reações características de *Salmonella* no meio IAL e desprezando os tubos com resultado negativo.

5.7.1.27 A partir de cada tubo de IAL com reações características de *Salmonella*, proceder da seguinte maneira:

- a) com o auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e esfriada, transferir o inóculo da cultura para um tubo contendo ágar nutriente previamente identificado. A inoculação é feita através de picada em profundidade e de estrias no ápice. Após a transferência, incubar todos os tubos de ágar nutriente a (35 ± 0,5°)C durante 24 ± 2 h;
- b) efetuar a confirmação de cada cultura por meio de testes sorológicos utilizando os soros anti-*Salmonella*

polivalente somático e anti-*Salmonella* polivalente flagelar e o teste de aglutinação com solução fisiológica (controle negativo).

5.7.1.28 Para a realização dos testes sorológicos o procedimento é o seguinte:

- a) introduzir, em cada tubo de IAL com a cultura em teste, uma pequena quantidade de algodão hidrófilo; a seguir, utilizando uma pipeta Pasteur, adicionar ao tubo cerca de cinco gotas de solução fisiológica (0,85% NaCl);
- b) com a ponta da pipeta Pasteur, passar delicadamente o algodão na superfície do meio de cultura deslocando o crescimento bacteriano e obtendo uma suspensão densa da cultura em solução fisiológica;
- c) ainda com a pipeta Pasteur, colher um inóculo da suspensão da cultura e distribuir uma gota em cada um de três quadrados de uma placa de vidro (com quadriculado em sua superfície de 20 X 20 mm), adaptada a uma caixa de Huddleson;
- d) adicionar a uma das gotas de suspensão da cultura uma gota de soro anti-*Salmonella* polivalente flagelar; à outra, uma gota do soro anti-*Salmonella* polivalente somático; à última, uma gota de solução salina 2%;
- e) em cada quadrado, efetuar a homogeneização dos soros e da solução salina a 2% com a suspensão bacteriana, usando pequenos bastões de vidro e fazendo movimentos circulares durante dois a três minutos. Utilizar um bastão para cada homogeneização;
- f) proceder à leitura verificando a ocorrência ou não de aglutinação. Se a bactéria em teste for *Salmonella*, ocorrerá reação antígeno-anticorpo com os soros somáticos e/ou flagelar, evidenciada pela aglutinação da cultura e nenhuma alteração na suspensão à qual se adicionou a solução salina a 2% (controle negativo). Se a colônia for rugosa, haverá aglutinação com os soros e com a solução salina 2%. Neste caso, a cultura deverá ser enviada a um laboratório de referência para exame específico.

5.7.1.29 Após o período determinado de incubação, os tubos contendo as culturas em ágar nutriente (5.7.1.27), cujos testes sorológicos revelaram a ocorrência de aglutinação, serão identificados e guardados com óleo mineral, tamponados com rolha de borracha estéril para, se necessário, posterior identificação dos sorotipos, utilizando soros específicos. (Esquema de Kaufmann-White).

5.7.2 Concentração através da técnica de Moore modificada
A técnica de Moore modificada é um procedimento alternativo para a concentração de amostras líquidas (água bruta e água de esgoto).

5.7.2.1 A técnica de Moore consiste na instalação de *swabs* (mechas de gaze) no local de estudo, fazendo com que ela permaneça completamente imersa no líquido. A mecha é fixada no local através de fio de arame, de náilon ou de barbante, por um período de um a três dias.

5.7.2.2 Após período de exposição, retirar a mecha com os devidos cuidados e transferir para um frasco esterilizado de boca larga, contendo meio de transporte Cary-Blair. Fechar e refrigerar, se possível.

Nota: Se a refrigeração não for possível, mantê-lo em local não muito quente.

5.7.2.3 Enviar o mais rápido possível para o laboratório, sendo que o período máximo permissível de estoque-trânsito é de seis horas.

5.7.2.4 No laboratório, deixar a amostra por cinco minutos em banho-maria, a 44,5°C. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta estéril, munida de um pipetador de segurança ou uma pera de borracha, homogeneizar a amostra e transferir 20 mL para erlenmeyers contendo 100 mL dos meios caldo selenito novobiocina e caldo Rappaport tetracionato.

5.7.2.5 Prosseguir de acordo com as seções de 5.7.1.12 a 5.7.1.29.

5.7.2.6 Mecha de gaze

Preparação da mecha: usar atadura de crepe ou de gaze com aproximadamente 23 cm de largura, sendo que para cada mecha se utilizam 180 cm. A atadura é dobrada cinco vezes no sentido do comprimento e suas dimensões finais serão de 23 cm de largura por 36 cm de comprimento. A partir da base inferior de 23 cm, cortam-se cinco tiras de 45 cm de largura e 26 cm de comprimento, deixando-se, portanto, 10 cm na parte superior sem cortar, onde será fixado o fio de náilon para servir de suporte para a mecha. Embrulhar em papel Kraft e autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Retirada da mecha: a pessoa indicada para a execução dessa tarefa deverá ser devidamente treinada e adequadamente protegida de modo a evitar problemas de contaminação.

O uso de luvas deve ser obrigatório. Se o líquido escorrer para fora do frasco, limpar com algodão e álcool iodado.

Após a coleta, retirar as luvas e colocar em solução de formol.

Obs.: Quando tampar o frasco, não tocar com luvas sujas pois o material é altamente contaminado e pode causar riscos à saúde do coletor ou do técnico durante a manipulação da amostra.

5.7.3 Inoculação direta

Este procedimento é normalmente utilizado na análise de água de esgoto e em amostras ambientais com alta densidade de *Salmonella*.

5.7.3.1 Homogeneizar a amostra e transferir com o auxílio de uma pipeta estéril, munida de um pipetador de segurança ou uma pera de borracha, 10 mL da amostra para erlenmeyers contendo 100 mL dos meios de enriquecimento caldo selenito novobiocina e caldo Rappaport tetracionato.

5.7.3.2 Prosseguir de acordo com as seções de 5.7.1.12 a 5.7.1.29.

5.7.4 Inoculação direta com pré-enriquecimento

Este procedimento é normalmente utilizado na análise de amostras de solo, de sedimento e de resíduos sólidos, sendo de grande importância na recuperação da salmonellas estressadas.

5.7.4.1 Homogeneizar a amostra e transferir uma quantidade significativa para um béquer de 1 000 mL.

5.7.4.2 Macerar a amostra já separada no béquer e, se necessário, retirar, com o auxílio de uma pinça, pedaços de madeira, de papel, de pedra, etc.

5.7.4.3 Pesar 25 g da amostra já macerada e homogeneizada e transferir para um erlenmeyer de 500 mL com 225 mL do meio de pré-enriquecimento de água peptonada tamponada.

5.7.4.4 Incubar o erlenmeyer contendo o meio de pré-enriquecimento com a amostra à temperatura de $(35 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ durante (18 ± 2) horas.

5.7.4.5 Após o período determinado de incubação, homogeneizar o erlenmeyer contendo a amostra pré-enriquecida no meio de água peptonada tamponada e transferir com auxílio de uma pipeta estéril, munida de um pipetador de segurança ou uma pera de borracha, 10 mL da amostra para erlenmeyers contendo 100 mL do meio de enriquecimento caldo selenito novobiocina e caldo Rappaport tetrationsato.

5.7.6 Prosseguir de acordo com as seções de 5.7.1.12 a 5.7.1.29.

Nota: O esquema de procedimento completo é apresentado na Figura 4.

5.8 Determinação de *Salmonella* em amostras de água pela técnica de tubos múltiplos

A quantificação de *Salmonella* em uma dada amostra pode ser efetuada pela determinação do número mais provável através da técnica dos tubos múltiplos. Essa técnica consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra em meio de cultivo adequado para o crescimento dos microrganismos investigados, sendo cada volume inoculado em cada série de tubos. Através de sucessivas diluições da amostra, são obtidos inóculos cuja sementeira oferece resultados negativos em, pelo menos, um tubo da série em que foram inoculados; a combinação de resultados positivos e negativos permite uma estimativa da densidade original das bactérias investigadas (NMP) através da aplicação de cálculos de probabilidade.

Para a determinação do número mais provável de *Salmonella* em amostras de água, os volumes inoculados são normalmente superiores aos dos utilizados nos indicadores de contaminação fecal, já que a *Salmonella* se encontra em menores densidades nessas amostras. Os volumes mais comumente utilizados para águas superficiais são 1 000, 100, 10 e 1 mL, em série de três tubos. Os volumes de 1 000 e 100 mL são concentrados em membrana filtrante e inoculados em meio de enriquecimento (Rappaport e/ou selenito com novobiocina).

5.8.1 Procedimento do método

5.8.1.1 Metodologia para água salgada

- a) preparar o material necessário para a realização de cada amostra e dispor na bancada em ordem:
9 erlenmeyers de 300 mL, contendo 100 mL de selenito com novobiocina, sendo três para volumes de 1 000 mL, três para volumes de 100 mL e três para volumes de 10 mL da amostra.

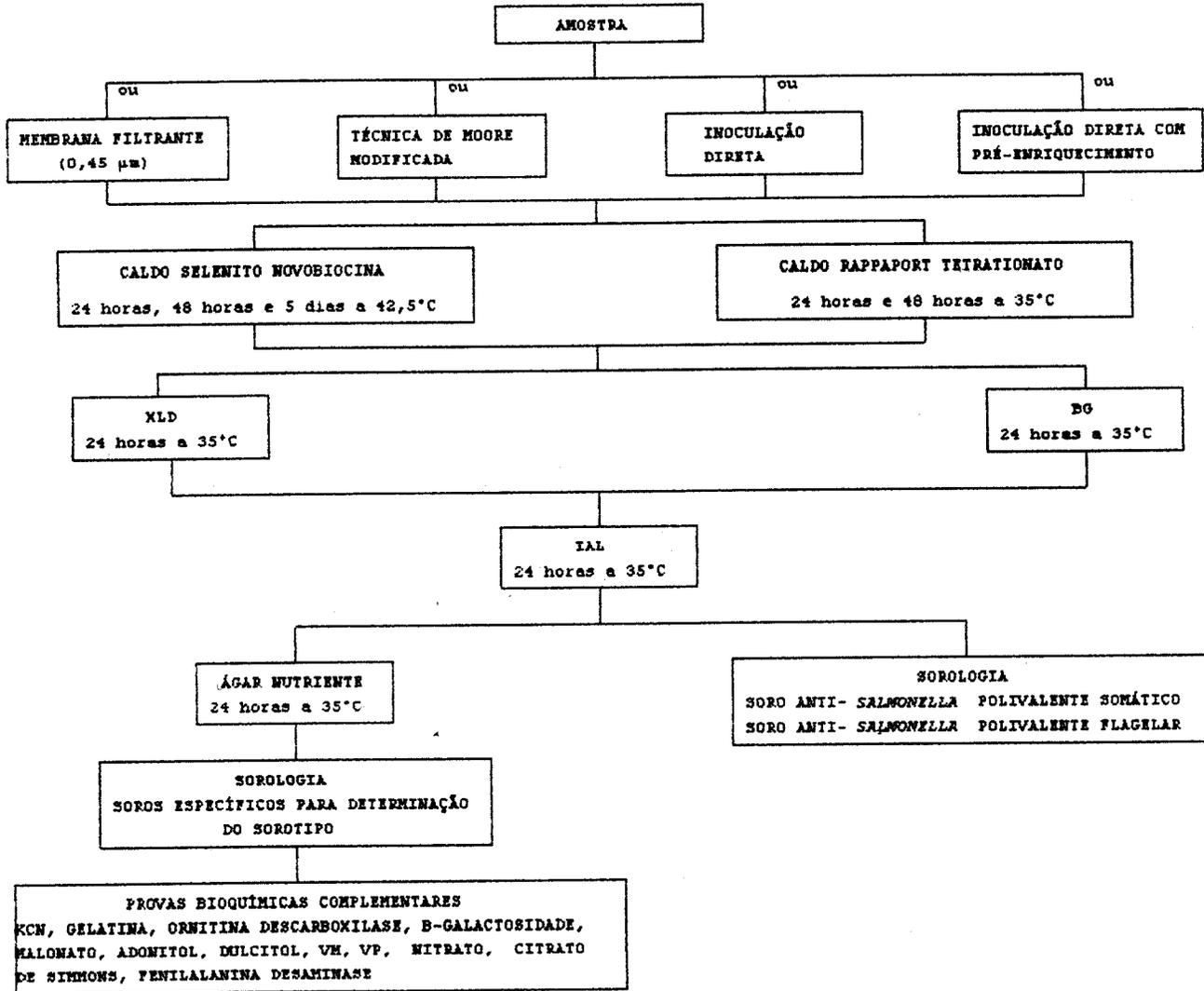


FIGURA 4 - Esquema de procedimento

- b) proceder à marcação dos erlenmeyers anotando o número da amostra, o volume selecionado da amostra a ser inoculado, a data e as posições que cada um dos erlenmeyers ocupar na série de três, com as letras A, B e C.
- c) para a série de 1 000 mL: homogeneizar a amostra, medir um volume de três litros e verter cuidadosamente no vasilhame de pressão já conectado à bomba de vácuo e ao porta-filtro de 142 mm, contendo membrana filtrante de 0,45 μm de porosidade. Conectar a bomba e proceder à filtração. A seguir, desconectar a bomba e retirar cuidadosamente a parte superior do porta-filtro e, com ajuda de uma pinça e uma tesoura, cujas extremidades tenham sido flambadas, dobrar a membrana ao meio e cortar em três partes iguais. Colocar cada uma das partes (concentração correspondente ao volume de 1 000 mL) nos erlenmeyers contendo selenito com novobiocina, cortando cada pedaço em tiras pequenas. Homogeneizar bem para o desprendimento do material da superfície da membrana.
- d) para a série de 100 mL: homogeneizar a amostra, medir um volume de 100 mL e proceder à filtração no porta-filtro de 47 mm e membrana de 0,45 μm de porosidade, como segue:
- retirar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça flambada e esfriada, colocar na base do suporte do filtro uma membrana estéril de 0,45 μm de porosidade
 - recolocar a parte superior do porta-filtro, tendo cuidado para não danificar a membrana; ajustar e rosquear;
 - verter cuidadosamente no porta-filtro 100 mL da amostra, evitando que a água respingue;
 - ligar a bomba de vácuo e proceder à filtração;
 - após a filtração da amostra, enxaguar o porta-filtro três vezes com porções de 20-30 mL de água de diluição estéril;
 - desligar a bomba de vácuo ao finalizar a operação; evitar secagem excessiva da membrana filtrante;
 - retirar a parte superior do porta-filtro e, com o auxílio de uma pinça flambada e esfriada, retirar a membrana e colocá-la no erlenmeyer contendo selenito com novobiocina, cortando em tiras pequenas;
 - recolocar a parte superior do porta-filtro e lavar com 20 a 30 mL de água de diluição estéril e proceder à filtração de mais dois volumes de 100 mL, para completar a série de três.
- e) para a série de 10 mL: homogeneizar a amostra e transferir 10 mL para cada um dos três erlenmeyers contendo selenito com novobiocina.
- f) após a inoculação de todos os volumes da amostra, incubar os erlenmeyers contendo selenito com novobiocina a 42,5°C, durante 24, 48 e 120 horas.
- g) a seguir, proceder como em 5.7.1.17 até 5.7.1.29.

Nota: O esquema de procedimento é apresentado na Figura 5.

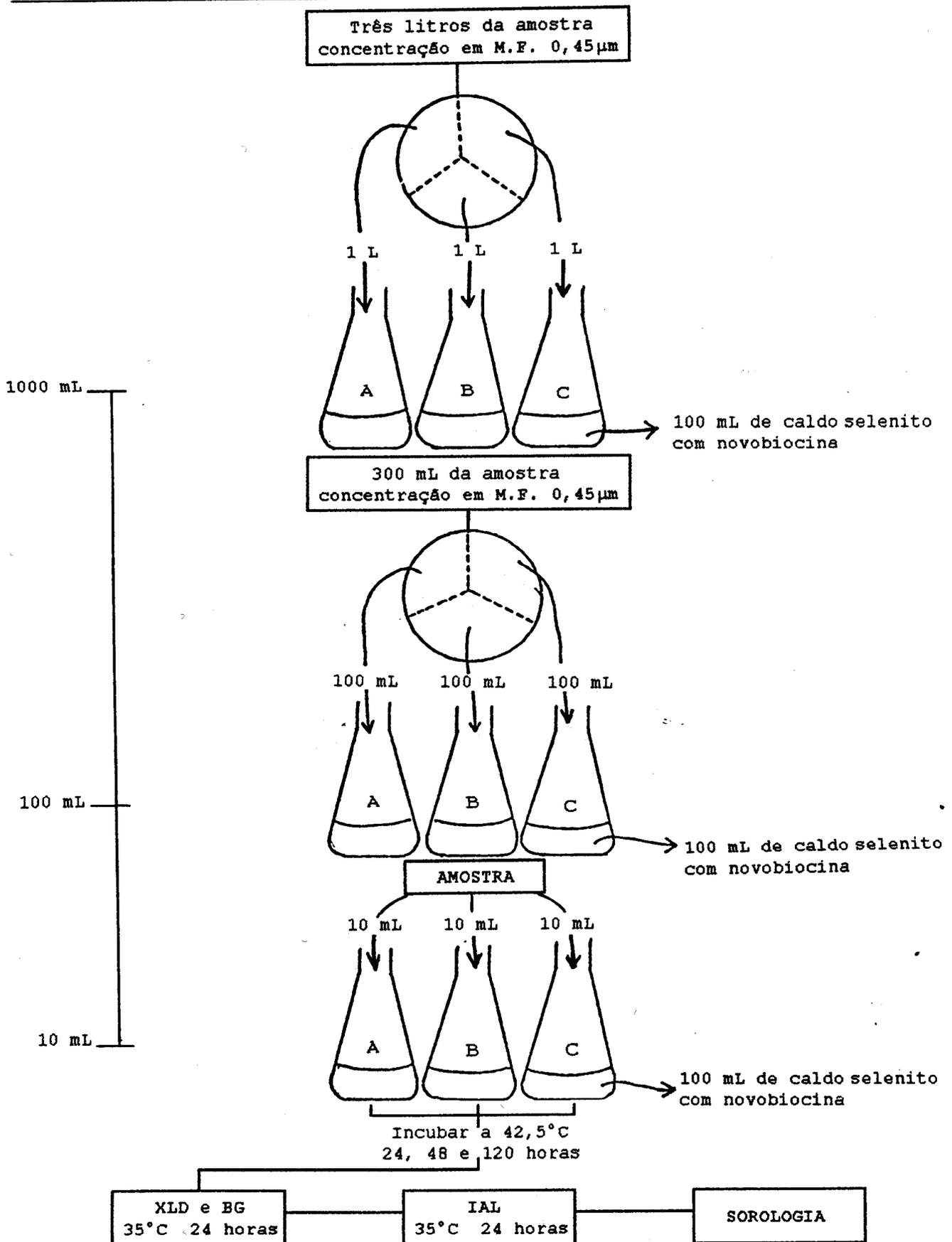


FIGURA 5 - Esquema de procedimento para água salgada

5.8.1.2 Metodologia para água doce (águas superficiais, subterâneas e tratadas)

- a) preparar o material necessário para a realização de cada amostra e dispor na bancada em ordem:
- 9 erlenmeyers de 300 mL, contendo 100 mL de selenito com novobiocina, sendo três para volumes de 1000 mL, três para volumes de 100 mL e três para volumes de 10 mL da amostra;
 - 9 erlenmeyers de 300 mL, contendo 100 mL de Rappaport, sendo três para volumes de 1000 mL, três para volumes de 100 mL e três para volumes de 10 mL da amostra;
 - 3 tubos de 16 x 150 mm, contendo 10 mL de selenito com novobiocina para volumes de 1 mL da amostra;
 - 3 tubos de 16 x 150 mm, contendo 10 mL de Rappaport para volumes de 1 mL da amostra; verter cuidadosamente no vasilhame de pressão já conectado à bomba de vácuo e ao porta-filtro de 142 mm, contendo membrana filtrante de 0,45 μ m de porosidade. Conectar a bomba e proceder à filtração. A seguir, desconectar a bomba e retirar cuidadosamente a parte superior do porta-filtro e, com ajuda de uma pinça e uma tesoura, cujas extremidades tenham sido flambadas, dobrar a membrana ao meio e cortar em 6 partes. Colocar cada uma das partes (concentração correspondente ao volume de 1000 mL) nos erlenmeyers contendo selenito com novobiocina e Rappaport, cortando cada pedaço em tiras pequenas. Homogeneizar bem para o desprendimento do material da superfície da membrana.
- b) proceder de acordo com 5.8.1.1.b.
- c) para a série de 1000 mL: homogeneizar a amostra, medir um volume de seis litros e verter cuidadosamente no vasilhame de pressão já conectado à bomba de vácuo e ao porta-filtro de 142 mm, contendo membrana filtrante de 0,45 μ m de porosidade. Conectar a bomba e proceder à filtração. A seguir, desconectar a bomba e retirar cuidadosamente a parte superior do porta-filtro e, com a ajuda de uma pinça e de uma tesoura, cujas extremidades tenham sido flambadas, dobrar a membrana ao meio e cortar em seis partes iguais.
- d) para série de 100 mL: proceder de acordo com 5.8.1.1.d. e fazer o mesmo utilizando o meio de Rappaport.
- e) para série de 10 mL: proceder de acordo com 5.8.1.1.e. e fazer o mesmo utilizando o meio de Rappaport.
- f) para série de 1 mL: homogeneizar a amostra e transferir 1 mL para cada um dos três tubos contendo selenito com novobiocina e Rappaport.
- g) após a incubação de todos os volumes da amostra, incubar os erlenmeyers e os tubos contendo selenito com novobiocina a 42,5°C, durante 24, 48 e 120 horas e os erlenmeyers e tubos contendo Rappaport a 35°C, durante 24 e 48 horas.
- h) a seguir, proceder como em 5.7.1.17 até 5.7.1.29.

Nota: O esquema de procedimento é apresentado na Figura 6.

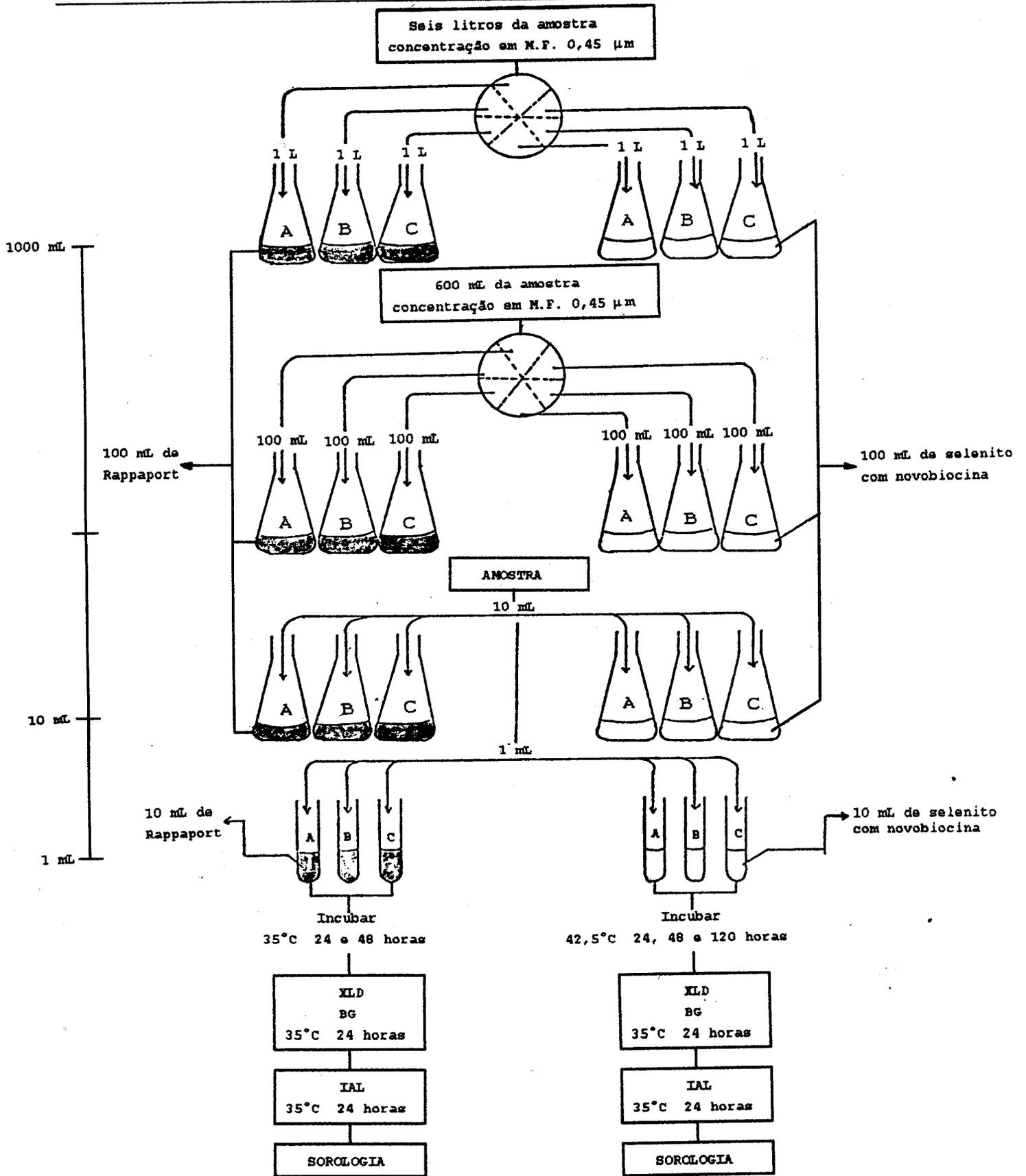


FIGURA 6 - Esquema de procedimento para água doce

5.8.1.3 Metodologia para água de esgoto

- a) preparar o material necessário para a realização de cada amostra e dispor na bancada em ordem:
 - 6 erlenmeyers de 300 mL, contendo 100 mL de selenito com novobiocina, sendo três para volumes de 100 mL e três para volumes de 10 mL da amostra;
 - 6 tubos de 16 x 150 mm, contendo 10 mL de selenito com novobiocina, sendo três para volumes de 1 mL e três volumes de 0,1 mL da amostra;
- b) proceder de acordo com 5.8.1.1.b.
- c) proceder de acordo com 5.8.1.1.d.
- d) proceder de acordo com 5.8.1.1.e.
- e) para série de 1 mL: homogeneizar a amostra e transferir 1 mL para cada um dos três tubos contendo selenito com novobiocina.
- f) para série de 0,1 mL: homogeneizar a amostra e transferir 1 mL para um frasco com 90 ± 2 mL de água de diluição tamponada. Homogeneizar e transferir 1 mL da diluição para cada um dos três tubos contendo selenito com novobiocina.
- g) proceder de acordo com 5.8.1.1.f.
- h) proceder de acordo com 5.7.1.17 a 5.7.1.29.

Nota: O esquema de procedimento é apresentado na Figura 7.

6 RESULTADOS

O resultado final é emitido com base nas provas bioquímicas e sorológicas.

Se o exame limitar-se à pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella*, utilizando-se apenas os soros polivalentes, relatar o resultado como: ausência ou presença de *Salmonella* sp.

Se for realizada sorotipagem, a partir das culturas identificadas como pertencentes ao gênero *Salmonella*, relatar os sorotipos identificados.

Quando for empregada a técnica de tubos múltiplos, a densidade de *Salmonella* deve ser expressa como o NMP de *Salmonella* sp por 100 mL, obtido através de tabela específica, em que são dados os limites de confiança de 95% para cada valor do NMP determinado.

A Tabela 1 apresenta o NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são inoculadas três porções de 10 mL, três porções de 1 mL e três porções de 0,1 mL da amostra. Entretanto, essa Tabela também pode ser utilizada quando volumes maiores ou menores da amostra são inoculados. Neste caso, procura-se o código formado pelo número de erlenmeyers e tubos com resultado positivo para *Salmonella* sp obtido nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o valor de NMP correspondente a ele. O NMP/100 mL será dado através da seguinte fórmula:

$$\text{NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado}}$$

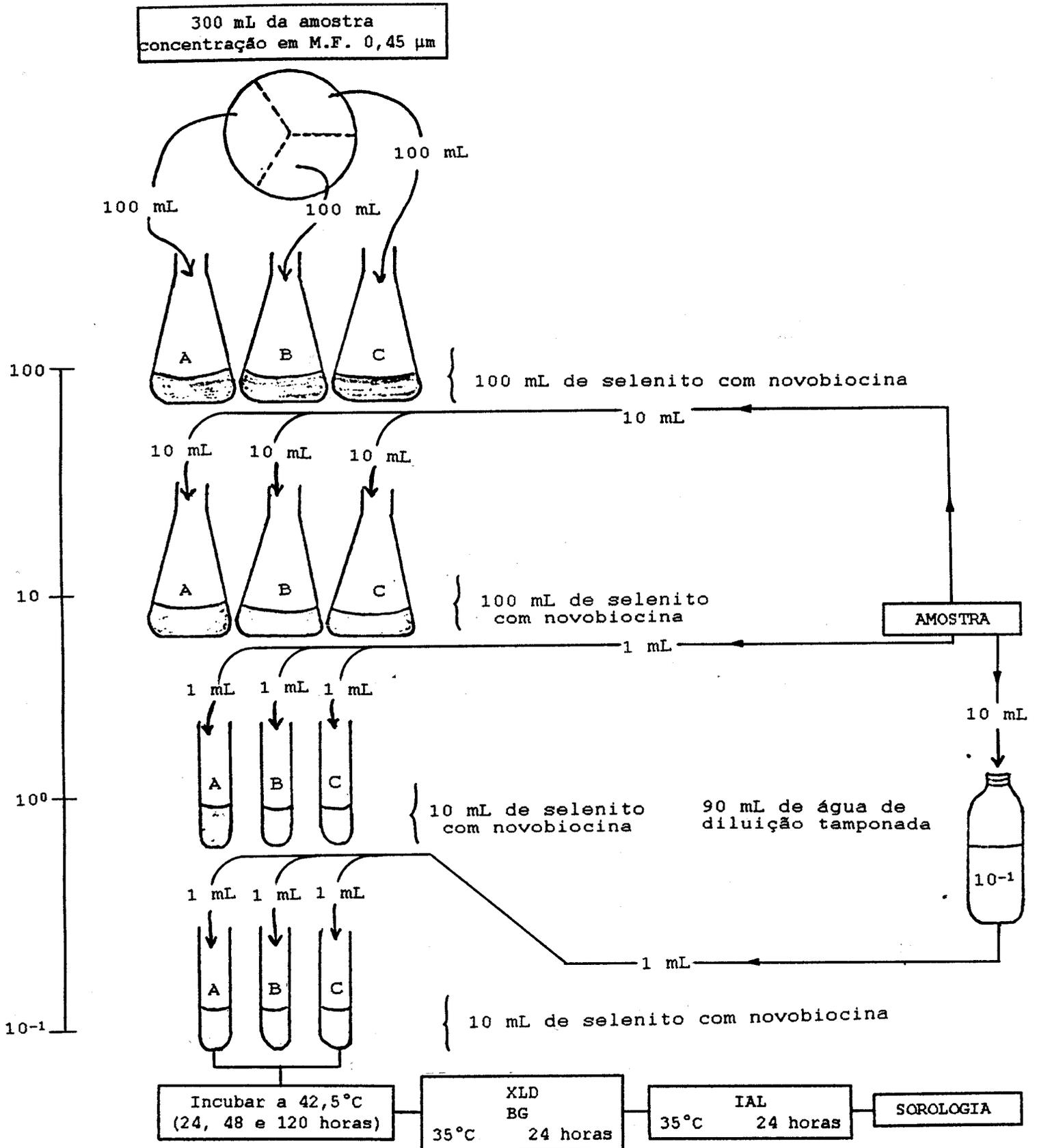


FIGURA 7 - Esquema de procedimento para água de esgoto

TABELA 1 - Índice de NMP e limites de confiança de 95% para várias combinações de resultados positivos e negativos quando são utilizadas três porções de 10 mL, três porções de 1 mL e três porções de 0,1 mL

Número de tubos com reação positiva de:			Índice de NMP/100 mL	95% de limite de confiança	
3 de 10 mL	3 de 1 mL	3 de 0,1 mL		Mínimo	Máximo
0	0	0	< 3	-	-
0	0	1	3	< 0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	> 2400	-	-

Considerando-se o seguinte exemplo:

Volumes decimais inoculados	Série			Código	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100 mL
	A	B	C				
1000 mL	+	+	+	3	93	$93 \times \frac{10}{1000}$	0,93
100 mL	+	-	+	2			
10 mL	-	-	-	0			

/ANEXO A

/ANEXO A

ANEXO A - PRESCRIÇÕES GERAIS

A-1 Provas complementares para a identificação de *Salmonella*
Caso haja necessidade de realizar a série bioquímica completa, efetuar as seguintes provas: urease, B-galactosidase (teste ONPG), ornitina, descarboxilase, crescimento em presença de KCN, hidrólise da gelatina, fermentação dos carboidratos: lactose, dulcitol, mucato, utilização do malonato e citrato de Simmons, VM e VP, fenilalanina desaminase. Uma prova adicional que também deve ser realizada é o exame microscópico do esfregaço de cultura corado pelo método de Gram.

A-2 Seleção de meios de cultura para a recuperação de *Salmonella*

Foi desenvolvido um estudo na Divisão de Microbiologia da CETESB, com o objetivo de se verificar a eficiência de diferentes meios de cultura para enriquecimento e isolamento de *Salmonella* em amostras de esgoto e diferentes tipos de água (doce e salgada), tendo sido testadas várias temperaturas de incubação.

Para o enriquecimento de *Salmonella* em amostras de esgoto e água salgada, resultados superiores foram obtidos com o caldo selenito novobiocina a 45°C em relação ao meio Rappaport tetratonato modificado por Hofer. Com base nesses resultados, nas análises rotineiras para a recuperação de *Salmonella* de amostras de esgoto e de água salgada, tem-se efetuado nesse laboratório o enriquecimento dessas bactérias apenas em caldo selenito novobiocina.

Em relação a amostras de água doce, entretanto, o fato de terem sido obtidos, algumas vezes, para a mesma amostra, resultados negativos em caldo selenito e positivos em meio Rappaport tetratonato modificado por Hofer, demonstra a necessidade de utilização simultânea destes dois meios de enriquecimento para *Salmonella*, dependendo dos diferentes tipos de água.

Em relação aos meios seletivos e diferenciais testados para o isolamento dessas bactérias, constatou-se a superioridade dos meios ágar-xilose-lisina-desoxicolato e ágar verde brilhante para ambos os tipos de amostras.

Em casos específicos, relativos à vigilância sanitária, é conveniente, entretanto, utilizar uma maior variedade de meios de enriquecimento e meios seletivos diferenciais com o objetivo de detectar diferentes sorotipos de *Salmonella*.

A-3 Esterilização das soluções e meios de cultura

A-3.1 Filtração

A filtração de meios de soluções ou de meios de cultura que contêm substâncias termolábéis é feita com vácuo, usando-se membrana de éster de celulose com porosidade de 0,22 µm.

Todos os materiais e equipamentos utilizados na filtração deverão ser esterilizados previamente por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos.

A-3.2 Autoclavagem

Esterilização de soluções ou de meios de cultura em autoclave, deve ser feita em temperatura de 121°C durante 15 minutos. Durante a autoclavagem de meios de cultura não deve haver excesso de aquecimento para evitar uma sobrecarga térmica que possa produzir hidrólise, peptonação, caramelização ou outro tipo de destruição das substâncias que constituem os meios de cultura.

A-4 Controle de esterilidade das soluções e meios de cultura

Após terem sido preparados e antes de serem usados, quaisquer soluções ou meios de cultura devem ser testados quanto à presença de fungos ou de bactérias contaminantes.

A-5 Estocagem das soluções

As soluções são estocadas em geladeira (2 a 8°C). São mantidas em frascos bem fechados, com rolhas de borracha ou tampa com rosca, pois os tampões de algodão podem permitir a entrada e a consequente absorção de substâncias, tais como a formalina e a amônia. Soluções alcalina não devem ser estocadas em frascos de vidro por muito tempo, pois esses frascos são lentamente dissolvidos e ions de metais pesados são posteriormente encontrados nessas soluções.

A-6 Cuidados especiais com a vidraria

Devem ser obedecidas as prescrições da Norma CETESB M1.001.

A-7 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos de *Bacillus stearothermophilus* em meio de cultura colocando-as entre os frascos ou os materiais a serem esterilizados. Estas ampolas depois da autoclavagem, são incubadas em banho-maria a 55°C durante 24-48 horas. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, isso significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

A-8 Controle de qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada no preparo de meios de cultura e soluções, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar a sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade através da realização de ensaios específicos. Ver Norma CETESB L5.215.

A-9 Armazenamento de meios de cultura desidratados

Os frascos de meio de cultura devem ser mantidos hermeticamente fechados em suas embalagens e mantidos em local fresco e seco, protegidos da luz.

**A-10 Lavagem e esterilização do equipamento de filtração
(Vasilhame de pressão e porta-filtro)**

Ver Norma CETESB M1.002.

**A-11 Desinfecção do equipamento de filtração
(Vasilhame de pressão, porta-filtro e mangueiras)**

Após a concentração da amostra, fazer passar pelo sistema de filtração cinco litros de uma solução de hipoclorito de sódio a 2% de cloro livre por litro e deixar esta solução em contato durante uma hora. Esgotar então, a solução de hipoclorito de sódio e fazer passar cinco litros de uma solução de tiosulfato de sódio a 0,5% para neutralizar o cloro residual. A verificação desta neutralização é feita colocando, em um volume de 9,5 mL da água que sai do sistema, 0,5 mL de solução de ortotoluidina. A ausência de coloração na água indica que o cloro residual foi neutralizado. Esgotar, então, a solução de tiosulfato de sódio e fazer passar cerca de cinco litros de água destilada. Esgotar a água do sistema e vedar a entrada e saída das mangueiras com folha de alumínio.

A-12 Preparo de pílulas de vascar para o meio de IAL

A-12.1 As pílulas de vascar são utilizadas como anel vedatório entre as duas fases do meio de IAL. Para facilitar o preparo, é utilizado um sistema que consta de uma placa de acrílico de 250 mm de largura e 300 mm de comprimento perfurada com orifícios de 7 mm de diâmetro, colocada e ajustada em um suporte de madeira (ou acrílico) com três bordas elevadas servindo como base (ver Figura 8).

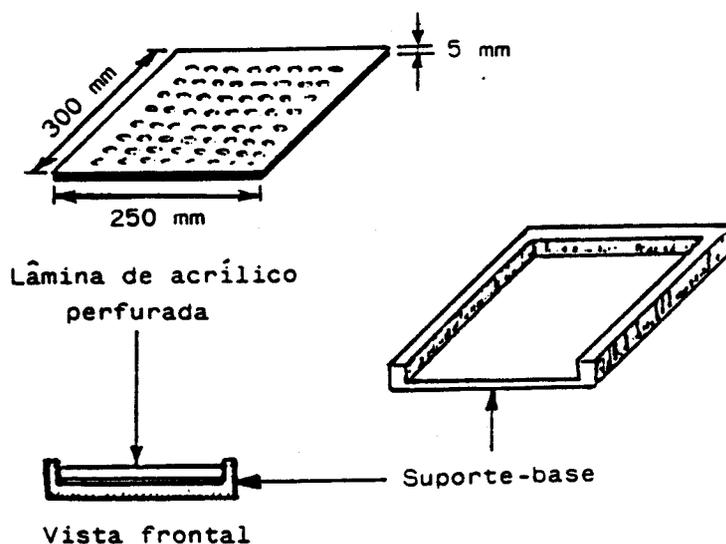


FIGURA 8

A-12.2 Técnica

Acoplar a lâmina de acrílico perfurada no suporte-base e verter a mistura de vascar fundido até o preenchimento de todos os orifícios. Retirar o excesso com espátula e colocar o sistema lâmina-suporte em geladeira ou "freezer" por 30 minutos para que ocorra solidificação total da mistura. Retirar as pílulas, agora formadas, com bastão de vidro ou barra de metal ou madeira que possua menor diâmetro que as mesmas. Colocá-las em tubos de ensaio de 12 x 120 mm antes de adicionar a fase inferior de lisina-motilidade, ou conservar em geladeira até o momento de serem usadas.

ANEXO B - LEITURA DO MEIO DE IAL

Gêneros	Reações bioquímicas	L-lisina decarboxilase	Motilidade	Produção de gás	Fermentação da glicose	Fermentação da sacarose	Produção de H ₂ S	Hidrólise da uréia	Desaminação do L-triptofano	Produção de indol
<i>Escherichia coli</i>		V	V	V	+	V	-	-	-	+
<i>Shigella</i>		-	-	- (1)	+	-	-	-	-	V
<i>Edwardsiella</i>		+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Salmonella</i>		(4) + (7)	+ (2)	+ (3)	+	-	(4) + (5)	-	-	- (7)
<i>Citrobacter</i>		-	+	+	+	V	+ (6)	-	-	- (6)
<i>Enterobacter</i>		V	+	++	+	V	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>		V	-	++	+	V	-	-	-	-
<i>Proteus</i>		P	V	P	P	P	V	+	+	P
<i>Providencia</i>		V	V	V	+	V	-	-	+	V
<i>Vibrio</i> *		+	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>Aeromonas</i> *		-	+	V	+	V	-	-	-	V
<i>Pleisomonas</i> *		+	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *		Meio inalterado - Induto bacteriano escuro								

* São todas oxidase (+)

V = variável

P = prejudicado

- = negativo

+ = positivo

++ = intensamente positivo

(1) *Shigella flexneri*, 6: gás positivo e indol negativo

(2) *Salmonella gallinarum* e *S. pullorum*: imóvel

(3) *Salmonella typhi*: gás negativo

(4) *Salmonella paratyphi* A: lisina negativa e H₂S negativo

(5) *Salmonella choleraesuis*: H₂S negativo

(6) *Citrobacter intermedium*: H₂S negativo e indol positivo

(7) *Salmonella typhimurium*: algumas culturas podem apresentar indol negativo e/ou lisina negativa

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 18 ed., Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1992, p. 9.87-9.89.
- C-2 CABELLI, V.J.; LEVIN, M.A.; DUFOUR, A.P. & MAC CABE, L.J. The development of criteria for recreational water. In: **International symposium on discharge of sewage from sea out falls**. London, 1974. (Proceedings) London, Pergamon press, 1974 (paper n^o 7).
- C-3 CETESB. **Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia - Procedimento**. São Paulo, 1987, 1^a rev. (Norma Técnica M1.001).
- C-4 CETESB. **Controle de qualidade de meios de cultura - Método de ensaio**. São Paulo, 1987 (Norma Técnica L5.216).
- C-5 CETESB. **Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos - Método de ensaio**. São Paulo, 1985, 1^a rev. (Norma Técnica L5.215).
- C-6 CETESB. **Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água - Procedimento**. São Paulo, 1989 (Norma Técnica L5.010).
- C-7 CETESB. **Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água**. São Paulo, 1988, 201 p.
- C-8 DIFCO LABORATORIES. **Difco Manual: Dehydrated culture media and reagents for microbiology**, 10 ed., Detroit, 1984, 1155 p.
- C-9 DUTKA, B.J. & BELL, J.B. Isolation of *Salmonella* from moderately polluted waters. **Journal Water Polluted Control Federation**, 45 (2):316-324, 1973.
- C-10 LE MINOR, L. Facultatively anaerobic gram-negative rods: Family I - Enterobacteriaceae - Genes III - *Salmonella* Lignières 1900, 389^{AL}. In: KRIEG, N.R. et al **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkings, 1984, V.1; sec. 5, p. 427-458.
- C-11 MARTINS, M.T. *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. São Paulo, 1979, 354 p. (Dissertação de Doutora do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- C-12 MARTINS, M.T.; PESSOA, G.V.A.; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.; MONTEIRO, C.K.; COIMBRÃO, C.A.; MARQUES, E. & IRINO, K. Isolamento de *Salmonella* do ambiente aquático: Significado sanitário. **Revista de Microbiologia**, 19(1): 29-39, 1988.
- C-13 PESSOA, G.V.A. Caldo selenito novobiocina, um meio de maior seletividade para o isolamento de *Salmonella* de fezes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 31: 1-3, 1971.

- C-14 PESSOA, G.V.A. Meio de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 32: 97-100, 1972.
- C-15 PESSOA, G.V.A.; KANO, E.; CALZADA, C.T.; IRINO, K. & SIMONSEN, V. Ocorrência em São Paulo de um biotipo de *Salmonella typhimurium* lisina descarboxilase negativa. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 38 (1): 33-35, 1978.
- C-16 VAN SCHOTHORST, M. & VAN LEUDSDEN, F.M. Studies on the multiplication of salmonellae in various enrichment media at different incubation temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 157-163, 1977.
-