

Métodos alternativos para a pesquisa de *Salmonella* spp.

Programa de Avaliação Externa da Qualidade em
Microbiologia de Águas
Reunião Nacional

20 de Janeiro de 2012

Carla Coelho

Laboratório de Microbiologia – Unidade de Água e Solo
Departamento de Saúde Ambiental

Porto



Ministério da Saúde

Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge



Estudo desenvolvido para Avaliação da Qualidade das Águas Balneares para definição das Zonas de Risco na orla costeira.

Durante a época Balnear de 2008 o Laboratório de Microbiologia estudou o desempenho de diferentes meios de cultura, em paralelo com o método de referência (ISO 6340:1995), para a pesquisa de *Salmonella* spp.



Local de amostragem



Colheita



Fichas de campo

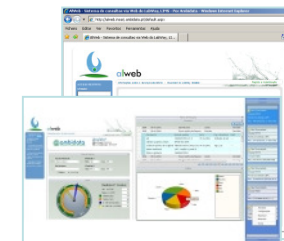
Recepção das amostras



Análise laboratorial



Resultados



Pesquisa de *Salmonella* spp. (ISO 6340:1995)

Filtração de 1 L de amostra

Pré-enriquecimento:
APT (36±2)°C (18±2)h

Enriquecimento Selectivo:

SC (36±2)°C
(21±3)h + (21±3)h

RV (42±0,5)°C
(21±3)h + (21±3)h



Pesquisa de *Salmonella* spp. (ISO 6340:1995)

Isolamento Selectivo:

XLD (36±2)°C
(21±3)h

VB (36±2)°C
(21±3)h

Isolamento :

Kligler Iron Agar(36±2)°C (21±3)h

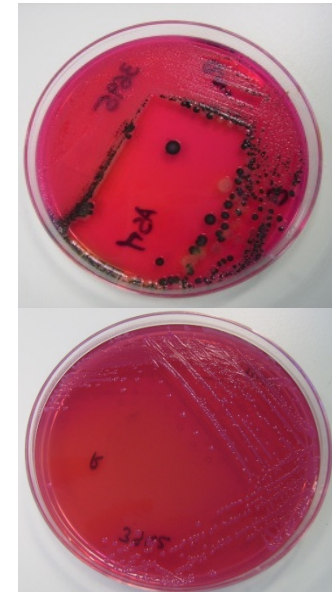
Gelose simples (36±2)°C (21±3)h

Confirmação Serológica:

Aglutinação com anti-soro
Salmonela O Poli A-I&Vi

Confirmação Bioquímica:

API 20E



Pesquisa de *Salmonella* spp.

Teste mini-VIDAS em paralelo com o método de referência.

MKTTn (36 ± 2)°C
(6-8)h

↓ 0,1 mL

Caldo M

1 mL

RV ($42 \pm 0,5$)°C
(6-8)h

↓ 1 mL

Caldo M ($42 \pm 0,5$)°C (16-20)h

1 mL

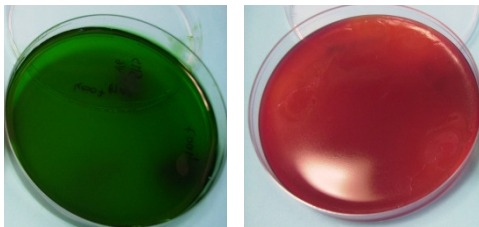
100 °C
(15 ± 1)min



Pesquisa de *Salmonella* spp.

Simple Method for Salmonela (SMS)

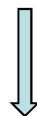
- **Detecção da descarboxilação da L – Lisina e mobilidade da salmonela.**
- **A salmonela produz um halo vermelho em redor do ponto de inoculação.**
- **A salmonela produz arcos de migração superior a 2 cm e a cor do meio muda de verde para vermelho.**



Pesquisa de *Salmonella* spp.

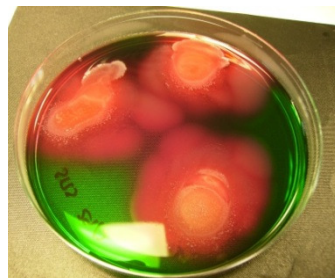
Filtração de 1 L de amostra

Pré-enriquecimento:
APT (36±2)°C (18±2)h

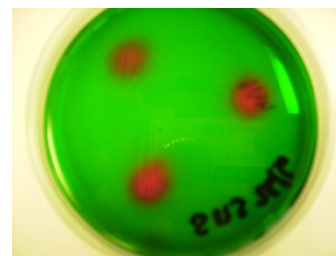


Inocular 0,1 mL em
três pontos

Simple Method for Salmonella (SMS)
(41±1)°C (21±3)h



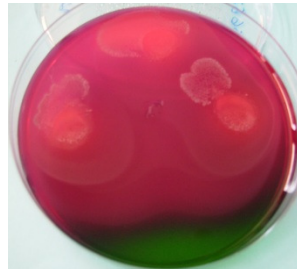
Positivo?



Negativo



Pesquisa de *Salmonella* spp.



SMS



Isolamento SALSA
(37±1)°C (24±2)h



SALSA

Uma placa com dois meios: o meio XLD e o meio cromogénico ASAP para a detecção de salmonela pela revelação da presença da C8-esterase.

Confirmação pelos testes utilizados no método de referência.

Pesquisa de *Salmonella* spp.

AES Salmonela Plate - ASAP

É um meio selectivo para a pesquisa de salmonela. A actividade da C8-esterase, que está presente em todas as salmonelas, é detectada através do substrato cromogénico. A actividade enzimática da salmonela é visualizada pela cor das colónias, cor-de-rosa a roxo.



Pesquisa de *Salmonella* spp.

Filtração de 1 L de amostra

Pré-enriquecimento:

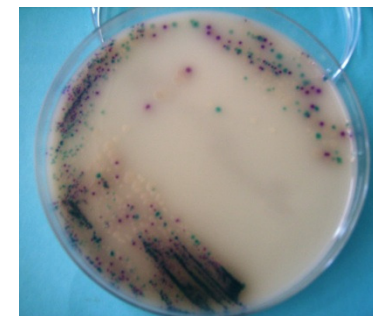
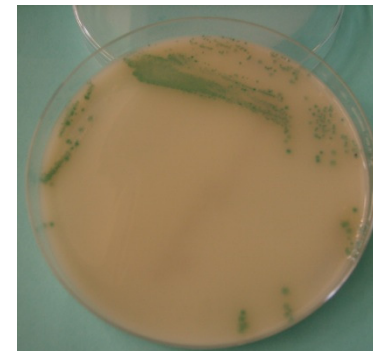
APT (36±2)°C (18±2)h

Enriquecimento Selectivo:

RV (42±0,5)°C
(21±3)h + (21±3)h

Isolamento: ASAP (37±2)°C
(24±3)h

Confirmação pelos testes utilizados
no método de referência.



Pesquisa de *Salmonella* spp.

		VIDAS		
		Negativo	Positivo	Total
ISO 6340:1995	Negativo	292	6	298
	Positivo	8	81	89
	Total	300	87	387

Pesquisa de *Salmonella* spp.

		SMS		
		Negativo	Positivo	Total
ISO 6340:1995	Negativo	82	1	83
	Positivo	4	23	27
	Total	86	24	110

		ASAP		
		Negativo	Positivo	Total
ISO 6340:1995	Negativo	88	1	89
	Positivo	1	30	31
	Total	89	31	120

Pesquisa de *Salmonella* spp.

Estudo do desempenho:

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Taxa Falsos Positivos	Taxa Falsos Negativos	Eficiência (%)
VIDAS	91,01	97,99	0,07	0,03	96,38
SMS	85,71	100	0,00	0,05	96,36
ASAP	96,88	100	0,00	0,01	99,17

Baseado na ISO/TR 13843:2000 Water Quality – guidance on validation of microbiological methods.

Pesquisa de *Salmonella* spp.

Conclusão do estudo

Utilização do XLD e ASAP

DSA ASMI-PE21_01 P- Pesquisa de *Salmonella* spp. método interno



ISO 19250:2010

Water quality — Detection of *Salmonella* spp.

Foreword

ISO (the International Organization for Standardization) is a worldwide federation of national standards bodies (ISO member bodies). The work of preparing International Standards is normally carried out through ISO technical committees. Each member body interested in a subject for which a technical committee has been established has the right to be represented on that committee. International organizations, governmental and non-governmental, in liaison with ISO, also take part in the work. ISO collaborates closely with the International Electrotechnical Commission (IEC) on all matters of electrotechnical standardization.

International Standards are drafted in accordance with the rules given in the ISO/IEC Directives, Part 2.

The main task of technical committees is to prepare International Standards. Draft International Standards adopted by the technical committees are circulated to the member bodies for voting. Publication as an International Standard requires approval by at least 75 % of the member bodies casting a vote.

Attention is drawn to the possibility that some of the elements of this document may be the subject of patent rights. ISO shall not be held responsible for identifying any or all such patent rights.

ISO 19250 was prepared by Technical Committee ISO/TC 147, *Water quality*, Subcommittee SC 4, *Microbiological methods*.

This edition cancels and replaces ISO 6340:1995, which has been technically revised.

Pesquisa de *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010)

Filtração de 1 L de amostra

Pré-enriquecimento:

APT (36±2)°C (18±2)h



**Enriquecimento
Selectivo:**

0,1 mL

1 mL

1 mL

RVS (41,5±1)°C
(24±3)h + (24±3)h

SC (36±2)°C
(24±3)h + (24±3)h

MKTTn (36±2)°C
(24±3)h + (24±3)h



Pesquisa de *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010)

ISO 19250:2010(E)

To detect slow-growing *Salmonella* spp., incubate the enrichment broth for a further (24 ± 3) h to a total of (48 ± 4) h at $(41,5 \pm 1,0)$ °C.

NOTE *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi A are usually not important in routine water quality monitoring, but can be relevant in epidemiological investigations. MKTTn broth is used for enrichment with incubation at (36 ± 2) °C for up to (24 ± 3) h and recovers most strains of *Salmonella*, including some strains of *Salmonella* Paratyphi, but is not thought to be able to recover strains of *Salmonella* Paratyphi C. MKTTn broth is not used if *Salmonella* Typhi is suspected after the use of selenite cystine broth.



Pesquisa de *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010)

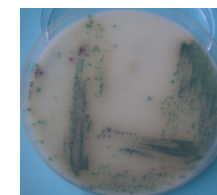
Isolamento selectivo:

XLD (36±2)°C
(24±3)h

VB, ASAP, SMID,...



Gelose simples (36±2)°C (24±3)h



Confirmação Serológica:

Aglutinação com anti-soro
Salmonela O Poli A-I&Vi



Confirmação Bioquímica:

TSI; Hidrólise da Ureia; Descarboxilação da L-Lisina

API 20E

Pesquisa de *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010)

ISO 19250:2010(E)

To detect slow-growing *Salmonella* spp., incubate the enrichment broth for a further (24 ± 3) h to a total of (48 ± 4) h at $(41,5 \pm 1,0)$ °C.

NOTE *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi A are usually not important in routine water quality monitoring, but can be relevant in epidemiological investigations. MKTTn broth is used for enrichment with incubation at (36 ± 2) °C for up to (24 ± 3) h and recovers most strains of *Salmonella*, including some strains of *Salmonella* Paratyphi, but is not thought to be able to recover strains of *Salmonella* Paratyphi C. MKTTn broth is not used if *Salmonella* Typhi is suspected after the use of selenite cystine broth.

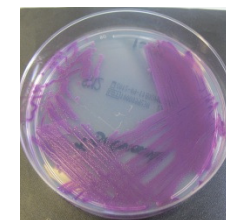
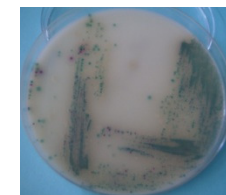
4.4 Plating out and recognition

From the cultures obtained in 4.3, two selective solid media are inoculated:

- a) xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar);
- b) any other solid selective medium complementary to XLD agar and, if applicable, appropriate for the isolation of lactose-positive *Salmonella* and *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi strains — the laboratory may choose which medium to use.

Incubate the XLD agar at (36 ± 2) °C and examine after (24 ± 3) h to check for the presence of colonies which are considered to be presumptive *Salmonella*. Incubate the second selective agar according to the manufacturer's recommendations.

NOTE For information, brilliant green agar (BGA), bismuth sulfite agar, etc., can be used as the second plating-out medium.



Águas Balneares

Decreto-Lei nº 135/2009

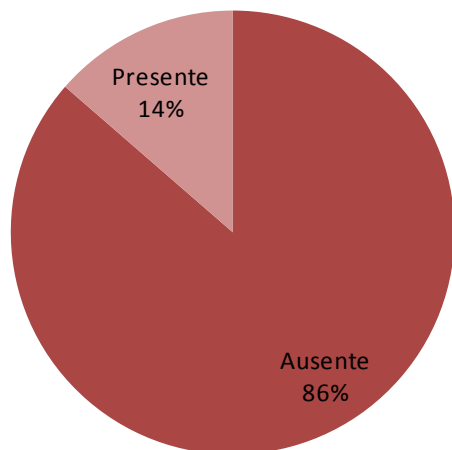
- Inspeção visual das águas balneares - detecção da poluição por resíduos de alcatrão, vidro, plástico, borracha e outros resíduos.
- Perfil das águas balneares com risco potencial de proliferação de cianobactérias - monitorização apropriada para permitir a identificação atempada de riscos para a saúde.
- Parâmetros microbiológicos :

Enterococos intestinais

Escherichia coli

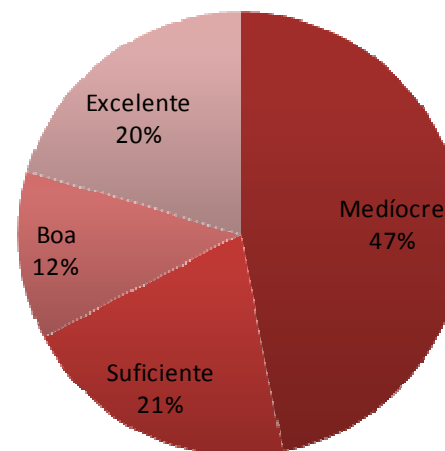


Águas Balneares



Distribuição percentual das amostras com *Salmonella* presente e ausente (360 amostras)

Distribuição percentual das praias com *Salmonella* (49 amostras)



Águas Balneares

Decreto-Lei n.º 135/2009

Avaliação da qualidade da água

- **Verificação da conformidade - Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e Desenvolvimento Regional**
- **Análises complementares para a avaliação do risco - Autoridade de Saúde**

OBRIGADA PELA VOSSA ATENÇÃO!

