



ÁGAR IRIS *SALMONELLA*®

MÉTODO DE DETECÇÃO PARA *SALMONELLA*

USO

IRIS *Salmonella*® é um método alternativo de pesquisa de *Salmonella* em alimentos e rações animais e em amostras ambientais.

Estudos realizados com o Ágar IRIS *Salmonella*® mostram uma grande especificidade para a detecção de *Salmonella*, inclusive espécies atípicas que são duvidosas em outros meios. De fato, a detecção de *Salmonella* Typhi e Paratyphi, *Salmonella* lactose positiva (*Salmonella* *senftenberg* e subespécies *S. arizonae* e *S. diarizonae*) e cepas sacarose positivas são asseguradas.

O meio permite a detecção de sorotipos imóveis (*S. pullorum* e *S. pallinarum*).

O agente seletivo permite a inibição de bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas. Ágar IRIS *Salmonella*® pode ser usado nos métodos padrão para a detecção de *Salmonella* como segundo meio de isolamento. Ágar IRIS *Salmonella*® possui certificação NF VALIDATION, de acordo com o protocolo de validação NF EN ISO 16140-2 de 2016 para todos os alimentos e rações, bem como amostras do ambiente. O método de referência usado para validação é o padrão NF EN ISO 6579-1 de 2017.

Ágar IRIS *Salmonella*® também é validado para a detecção de *Salmonella* em amostras de 50 g a 375 g para leite em pó, incluindo leite infantil com e sem probióticos e de 50 g a 125 g para farinhas em ração animal.

PRINCÍPIOS

O método permite a detecção de *Salmonella* com e sem mobilidade.

A análise pode ser declarada negativa após 37 horas de enriquecimento (Meio de enriquecimento de *Salmonella*) e diferenciação (Ágar IRIS *Salmonella*®).

A etapa de diluição de 1/10 da amostra é realizada em caldo de enriquecimento de *Salmonella* de acordo com as recomendações NF EN ISO 6579.

A etapa de enriquecimento é realizada com a adição do suplemento seletivo IRIS *Salmonella*® no caldo e na mistura da amostra. O caldo de enriquecimento de *Salmonella* obtido é incubado por 16 a 24 horas a $41,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

A etapa de diferenciação é realizada estriando o caldo em Ágar IRIS *Salmonella*® e incubando por 21 horas a 37°C .

As colônias de *Salmonella* são magentas, enquanto outras espécies são azul-violeta ou incolores.

Os agentes seletivos permitem a inibição de bactérias Gram-positivas e algumas bactérias Gram-negativas.

Uma eventual etapa de confirmação pode ser realizada por testes clássicos descritos em métodos padrão ou por um teste de látex diretamente de uma colônia magenta isolada do Ágar IRIS *Salmonella*®

COMPOSIÇÃO TÍPICA

(A composição pode ser ajustada para obter um desempenho ideal).

Meio de Enriquecimento para *Salmonella*:

Para 1 litro de meio desidratado:



- Peptona..... 10,00 g
- Cloreto de sódio..... 5,00 g
- Tampão de fosfato..... 5,06 g

pH do meio pronto para uso a 25°C: 7,0 ± 0,2

Nota: A composição do meio de enriquecimento para *Salmonella* está de acordo com a da Água Peptonada Tamponada.

Meio de Enriquecimento para *Salmonella* com concentração dupla tamponada

Para 1 litro de meio:

- Peptona..... 10,00 g
- Cloreto de sódio..... 5,00 g
- Tampão de fosfato..... 10,12 g

pH do meio pronto para uso a 25°C: 7,0 ± 0,2

Suplemento IRIS *Salmonella*® (Qsp 225 mL)

Para um tablete:

- Sistema seletivo..... 0,1 g
- Agente de coloração..... 0,005 g

Suplemento IRIS *Salmonella*® (Qsp 90 mL)

Para um tablete:

- Sistema seletivo..... 0,04 g
- Agente de coloração..... 0,002 g

Suplemento líquido IRIS *Salmonella*®

Para um frasco de 50 mL:

- Sistema seletivo..... 2 g
- Agente de coloração..... 0,1 g

Ágar IRIS *Salmonella*®

Para um litro de meio:

- Peptona..... 10,0 g
- Extrato de levedura..... 5,0 g
- Cloreto de sódio..... 5,0 g
- Tampão de fosfato..... 7,0 g
- Agentes seletivos..... 10,2 g
- Mistura cromogênica..... 1,0 g
- Ágar bacteriológico..... 16,0 g
- Agentes opacificantes..... 6,5 g

pH do meio pronto para uso a 25°C: 7,0 ± 0,2

PREPARAÇÃO

**Preparação do Meio de Enriquecimento para *Salmonella* desidratado:**

- Dissolver 20,0 g de meio desidratado (BK194) em 1 litro de meio em água destilada ou deionizada.
- Misturar bem até a dissolução completa.
- Distribuir em tubos de 9 mL ou em frascos de 225 mL.
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Resfriar em temperatura ambiente.

- Reconstituição:
20,0 g/L

- Esterilização:
15 min a 121°C

Preparação do Meio de Enriquecimento para *Salmonella* desidratado com concentração dupla tamponada:

- Dissolver 25,1 g de meio desidratado (BK225) em 1 litro de meio em água destilada ou deionizada.
- Misturar bem até a dissolução completa.
- Distribuir em tubos de 9 mL ou em frascos de 225 mL.
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Resfriar em temperatura ambiente.

- Reconstituição:
25,1 g/L

- Esterilização:
15 min a 121°C

Preparação de meio desidratado Ágar IRIS *Salmonella*®:

- Dissolver 60,7 g de meio desidratado (BK212) em 1 litro de meio em água destilada ou desmineralizada.
- Lentamente leve à ebulição, mexendo sempre com agitação, até a dissolução completa.
- Deixar ferver por exatamente 2 minutos.
- Não superaquecer.
- **Não autoclavar**
- Dispensar a quantidade apropriada nas placas de Petri.
- Resfriar em uma superfície fria.

- Reconstituição:
60,7 g/L

- Manter em ebulição por 2 min.
Não superaqueça.
Não autoclave.

INSTRUÇÃO DE USO

Sempre use boas práticas de laboratório.

Consulte a norma NF EN ISO 7218.

Protocolo certificado NF VALIDATION para amostras até 25 g (alimentos, rações e amostras ambientais):

- Adicionar assepticamente (x) g da amostra a ser testada em 9 (x) mL de meio de enriquecimento de *Salmonella* pronto para uso.

NOTAS:

- Usar o enriquecimento de *Salmonella* com tween para suspensão inicial e enriquecimento de matrizes com mais de 20% de gordura.
- Usar o enriquecimento de *Salmonella* com tampão duplo para matrizes ácidas e acidificantes.
- Adicionar 0,1 mL do suplemento IRIS *Salmonella*® (BS078), para cada grama de amostra (ou seja, 37,5 mL para 375 g de amostra).
- Para 25 g de amostra, adicionar diretamente um comprimido do suplemento IRIS *Salmonella*® (BS077) em 225 mL de caldo.
- Para 10 g de amostra, adicionar diretamente um comprimido do suplemento IRIS *Salmonella*® (BS093) em 90 mL de caldo.

- Enriquecimento:

Diluição de 1 : 10,

16-24 h a 41.5°C

- Detecção:
Repetição 10 µL,
24h a 37°C



- Misture bem.
- Incubar o caldo a $41,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 16 a 24 horas.
- Repetir 10 μL do enriquecimento na superfície do Ágar IRIS *Salmonella*®
- Incubar a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas $\pm$ 3 horas

Nota sobre armazenamento refrigerado do meio:

O caldo de enriquecimento após a incubação, pode ser mantido até 3 dias a $2-8^{\circ}\text{C}$ antes de ser repassado para o Ágar IRIS *Salmonella*® para todos os alimentos e amostras ambientais. Da mesma forma, após a incubação as placas de Ágar IRIS *Salmonella*® podem ser guardadas até 3 dias a $2-8^{\circ}\text{C}$ antes da leitura e confirmações subsequentes.

No contexto da VALIDAÇÃO NF, amostras maiores que 25 g não foram testadas.

Protocolo certificado pela NF VALIDATION para leite em pó (incluindo leite infantil com e sem probióticos) de 50 a 375 g.

- Adicionar assepticamente (x) g da amostra a ser testada em 9 (x) mL do caldo de enriquecimento para *Salmonella* pré-aquecido a $41,5^{\circ}\text{C}$
- Adicionar 0,1 mL do suplemento IRIS *Salmonella*® (BS078), para cada grama de amostra (ou seja, 37,5 mL para 375 g de amostra).
- Misturar bem.
- Incubar o caldo a $41,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.
- Adicionar 10 μL do caldo de enriquecimento na superfície do Ágar IRIS *Salmonella*®.
- Incubar a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas $\pm$ 3 horas.

Nota sobre armazenamento refrigerado do meio:

O caldo de enriquecimento após a incubação, pode ser mantido até 3 dias a $2-8^{\circ}\text{C}$ antes de ser repassado para o Ágar IRIS *Salmonella*®.

Da mesma forma, após a incubação, as placas de Ágar IRIS *Salmonella*® podem ser mantidas até 3 dias a $2-8^{\circ}\text{C}$ antes da leitura e confirmações subsequentes.

No contexto da VALIDAÇÃO NF, é possível usar meio de enriquecimento para *Salmonella* ou meio de enriquecimento para *Salmonella* em concentração dupla tamponada para a suspensão mãe de matrizes ácidas e acidificantes.

- Enriquecimento:
Diluição de 1 :10,
18-24 h a $41,5^{\circ}\text{C}$
- Detecção:
Plaquear 10 μL ,
24h a 37°C

Protocolo certificado NF VALIDATION para farinhas e croquetes em rações animais, de 50 a 125 g.

- Adicionar assepticamente (x) g da amostra a ser testada em 9 (x) mL do caldo de enriquecimento para *Salmonella* pré-aquecido para $41,5^{\circ}\text{C}$.
- Adicionar 0,1 mL do suplemento IRIS *Salmonella*® (BS078) para cada grama de amostra (ou seja, 12,5 mL para amostra de 125 g).
- Misturar bem.
- Incubar o caldo a $41,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.
- Adicionar 10 μL do caldo de enriquecimento na superfície do Ágar IRIS *Salmonella*®
- Incubar a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas $\pm$ 3 horas.

Nota sobre armazenamento refrigerado do meio:

Após a incubação, as placas de Ágar IRIS *Salmonella*® podem ser mantidas até 3 dias entre $2-8^{\circ}\text{C}$ antes da leitura e confirmações subsequentes.

No contexto da VALIDAÇÃO NF, apenas amostras entre 50 g e 125 g foram testadas para as farinhas em alimentos e rações.

- Enriquecimento:
Diluição de 1:10,
18-24 h a $41,5^{\circ}\text{C}$
- Detecção:
Plaquear 10 μL ,
24h a 37°C



RESULTADO

Características das colônias no Ágar IRIS *Salmonella*®:

Microrganismos	Características das colônias
<i>Salmonella</i> spp. (incluindo <i>Salmonella typhi</i> , <i>paratyphi</i> , lactose positiva, sacarose positiva, imóvel, monofásico, <i>dublin</i> , <i>bongori</i>)	Rosa para magenta
<i>Escherichia coli</i>	Sem cor
<i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp.	Azul esverdeado para violeta
<i>Proteus</i> spp.	Sem cor a acastanhado
Gram positivo	Inibido

Veja o ANEXO 1: SUPORTE FOTOGRÁFICO.

CONFIRMAÇÃO

No contexto da VALIDAÇÃO NF, todos os resultados positivos devem ser confirmados com um dos seguintes protocolos:

- Opção 1: realizar testes clássicos descritos nos métodos normalizados (incluindo a etapa de purificação), partindo de uma colônia magenta isolada no Ágar IRIS *Salmonella*®.
- Opção 2: Executar o teste CONFIRM' *Salmonella* ou de *Salmonella* Latex (Oxoïd) de uma colônia magenta isolada.
- Opção 3: Uso de qualquer outro método certificado NF VALIDATION de princípio diferente. O protocolo validado do segundo método deverá ser respeitado como um todo, ou seja, todas as etapas anteriores ao intermediário do qual a confirmação deve ser comum aos dois métodos. Os dois métodos validados (um usado na detecção e outro na confirmação), deve, portanto, ter um núcleo comum.

Em caso de resultados discordantes, o laboratório deve assegurar por todos os meios possíveis a veracidade dos resultados obtidos. É possível, por exemplo, proceder com testes bioquímicos ou sondas de DNA conforme descrito no padrão NF EN ISO 7218.

CONTROLE DE QUALIDADE

Resultado de colônias típicas após 24 horas de incubação a 37°C no Ágar IRIS *Salmonella*®:

Microrganismos	Crescimento
<i>Salmonella eyphimurium</i> WDCM 00031	Bom, colônias magentas
<i>Salmonella enteritidis</i> WDCM 00030	Bom, colônias magentas
<i>Enterobacter aerogenes</i> WDCM 00175	Bom, colônias azuis
<i>Escherichia coli</i> WDCM 0013	Parcialmente inibidas, colônias sem cor
<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034	Inibido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00025	Inibido

ARMAZENAMENTO / VALIDADE DE PRATELEIRA

Meio de Enriquecimento para *Salmonella*, Meio de Enriquecimento para *Salmonella* tamponado com dupla força:

Meio desidratado: 2-30°C.

Meio pronto para uso em frascos ou bolsas flexíveis: 2-25°C.

Meio de Enriquecimento para *Salmonella* com Tween:

Meio pronto para uso em frascos ou bolsas flexíveis: 2-25°C.

**Suplemento IRIS *Salmonella*®**

Suplemento líquido: 2-8°C.

Comprimidos: 2-8°C

Ágar IRIS *Salmonella*®:

Meios pré-vazados em placas de Petri (Ø 90 mm): 2-8°C.

Ágar IRIS *Salmonella*® desidratado: 2-8°C.

Meio preparado em placas (valor de referência*): 1 mês a 2-8°C, protegido da luz.

(*) Valor de referência determinado sob condições de preparação padrão, seguindo as instruções do fabricante.

CONFIRM' *Salmonella*:

Kit: 2-8°C.

As datas de validade estão indicadas nas etiquetas.

APRESENTAÇÃO**Meio de Enriquecimento para *Salmonella*:**

- Frasco de 500 g.....BK194HA
- Balde de 5 kg.....BK194GC
- Frascos 10 x 225 mL.....BM13608
- Saco flexível 3 x 3 L.....BM13708
- Saco flexível 2 x 5 L.....BM14408

Meio de Enriquecimento para *Salmonella* + Tween® 80 (10 g / L):

- Saco flexível 3 x 3 L.....BM16308
- Saco flexível 2 x 5 L.....BM19808
- Frascos 10 x 225mL.....BM21608

Meio de Enriquecimento de *Salmonella* com concentração dupla tamponada:

- Frasco de 500 g.....BK225HA
- Balde de 5 kg.....BK225CG
- Saco flexível 2 x 5 L.....BM20008
- Frascos 10 x 225 mL.....BM20108

Suplemento IRIS *Salmonella*®:

- Frascos 10 x 50 mL.....BS07808
- 120 tabletes (qsp 225 mL).....BS07708
- 120 tabletes (qsp 90 mL).....BS09308

Ágar IRIS *Salmonella*®:

- 20 placas (Ø 90 mm).....BM16008
- 120 placas (Ø 90 mm).....BM16108
- Frasco de 500 g.....BK212HA

Teste de aglutinação de látex:

- CONFIRM' *Salmonella*:.....BT01108



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NF EN ISO 6579-1. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: detection of Salmonella spp.

NF EN ISO 16140. Octobre 2003. Microbiologie des aliments. Protocole pour la validation des méthodes alternatives. Modifiée en Octobre 2011 par l'amendement A1.

NF EN ISO 7218. Octobre 2007. Microbiologie des Aliments. Exigences générales et recommandations. Modifiée en Décembre 2013 par l'amendement A1.

OUTRAS INFORMAÇÕES

IRIS *Salmonella*® é uma marca registrada da SOLABIA SA.

As informações fornecidas nos rótulos têm precedência sobre as formulações ou instruções descritas neste documento e são suscetíveis de modificação a qualquer momento, sem aviso prévio.

Código do documento: IRIS SALMONELLA_Env6

Data de criação: 02-2011

Atualizada: 11-2019

Origem da revisão: Renovação

ANEXO 1: SUPORTE FOTOGRÁFICO

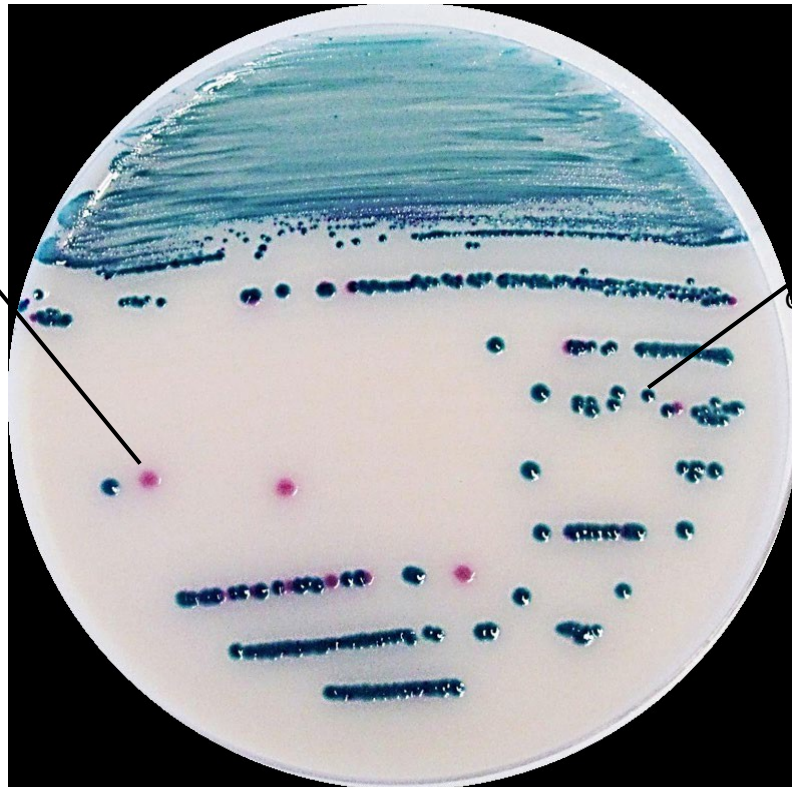
Ágar IRIS *Salmonella*®

Detecção de *Salmonella*

Crescimento obtido após 24 horas de incubação a 37°C

***Salmonella* spp.**

Colônia característica
Cor magenta



***Enterobacter* spp.**

Colônia não característica
Cor azul