



CALDO MUELLER-KAUFFMANN TETRATIONATO – NOVOBIOCINA (MKTTN)

ENRIQUECIMENTO SELETIVO DE SALMONELLA

USO

O caldo MKTTn é usado como um dos dois meios de enriquecimento seletivo para a detecção de *Salmonella* seguindo o método horizontal descrito no padrão ISO 6579-1. Associado ao meio MSRV, também é utilizado no protocolo para isolamento e identificação de *Salmonella* em ambientes de produção animal (NF U 47-100), em aves (NF U 47-101) e em mamíferos (NF U 47-102).

O caldo MKTTn também é usado como um segundo caldo de enriquecimento seletivo para a detecção de *Salmonella* em águas seguindo o protocolo descrito na norma NF ISO 19250.

HISTÓRIA

O meio foi descrito por Muller em 1923 para favorecer a inibição de bactérias coliformes ao mesmo tempo em que permitia o desenvolvimento de bacilos tifóides e paratífóides. Kauffamann modificou a fórmula e obteve um maior número de resultados positivos com este método direto de isolamento em meio seletivo.

PRINCÍPIOS

Os sais biliares e o verde brilhante inibem principalmente o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas.

A produção de tetrionato resultante da ação da solução de iodo-iodeto sobre o tiosulfato de sódio inibe bactérias coliformes e a maioria das bactérias intestinais.

Novobiocina inibe o desenvolvimento de *Proteus*.

O carbonato de cálcio neutraliza o ácido sulfúrico produzido quando o tetrionato é reduzido. O efeito resultante é manter o pH em um nível constante.

COMPOSIÇÃO TÍPICA

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

Para 1025 mL de meio:

- Triptona	8,6 g
- Extrato de carne	4,3 g
- Sais biliares	4,78 g
- Cloreto de Sódio	2,6 g
- Carbonato de Cálcio	38,7 g



- Tiosulfato de Sódio, anidro*30,45 g
 - Verde brilhante9,6 mg
 - Iodo4,0 g
 - Iodeto de Potássio 5,0 g
 - Novobiocina 40 mg
- pH do meio pronto para uso a 25°C: 7,0 – 8,0.

Para 89,5 g de base desidratada BK208

- Triptona 8,6 g
- Extrato de carne 4,3 g
- Sais biliares 4,78 g
- Cloreto de sódio 2,6 g
- Carbonato de cálcio38,7 g
- Tiosulfato de sódio, anidro* 30,45 g
- Verde brilhante 9,6 mg
- Novobiocina 40 mg

Iodo, Iodeto de potássio:
Não adicionado

Para 89,5 g de base desidratada BK169

- Triptona 8,6 g
- Extrato de carne 4,3 g
- Sais biliares 4,78 g
- Cloreto de sódio 2,6 g
- Carbonato de cálcio38,7 g
- Tiosulfato de sódio, anidro* 30,45 g
- Verde brilhante 9,6 mg

Para um frasco de suplemento BS056

- Novobiocina 40mg

Para um frasco de suplemento BS033

- Novobiocina 10mg

Iodo, Iodeto de potássio:
Não adicionado

*NOTA: 30,45 g de Tiosulfato de Sódio anidro é igual a 47,8 g de Tiosulfato de Sódio pentahidratado.

PREPARAÇÃO

Preparação do meio base BK208

- Dissolver 89,5 g de meio base desidratado (BK208) em 1 litro de água destilada ou desmineralizada.
- Levar lentamente à ebulição com agitação constante.
- Manter em fervura por 2 minutos.
- Não autoclavar.
- Resfriar em média a 25°C.
- Dissolver 4 g de iodo em 20 mL de uma solução contendo 5 g de iodeto de potássio em um frasco estéril.

- ✓ **Reconstituição**
89,5 g/L
- ✓ **Esterilização**
Não autoclavavar
- ✓ **Adição**
Iodo-iodeto



- Adicionar a solução de iodo-iodeto ao meio.
- Misturar bem o conteúdo.
- Distribuir assepticamente em tubos 10 mL (ou 20 mL) por tubo.

Preparação a partir da base desidratada BK169

- Seguir a mesma preparação acima.
- Antes de dispensar em tubos, adicionar a novobiocina da seguinte forma:
- Reconstituir 10 mg de suplemento seletivo de Novobiocina (BS033) com 5 mL de água destilada estéril ou os 40 mg de suplemento seletivo de Novobiocina (BS056) com 20 mL de água destilada estéril.
- Misturar bem ou passar no vórtex para garantir a dissolução completa, evitando a formação de espuma.
- Adicionar 40 mg da solução estéril de Novobiocina.
- Misturar bem os componentes.
- Distribuir assepticamente em tubos 10 mL (ou 20 mL) por tubo.

INSTRUÇÕES DE USO

- Transferir 1 mL de caldo de enriquecimento para os tubos MKTTn completos preparados como acima ou em meio pronto para uso (BM078).
- Incubar por 24 horas $\pm$ 3 horas:
 - a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para detecção de *Salmonella* na água;
 - entre 34 a 38°C para detecção de *Salmonella* em protocolos de microbiologia alimentar;
 - a $41,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para a detecção de *Salmonella* em um contexto de saúde animal.

✓ **Inoculação**
1 mL em 10 mL
✓ **Incubação**
24 h a 36, 34 a 38
ou $41,5^{\circ}\text{C}$

RESULTADOS

Isolar em ágar XLD e em um segundo meio de isolamento seletivo, com uma alça de platina. Na presença de colônias características, proceder com as confirmações necessárias.

CONTROLE DE QUALIDADE

Meio desidratado: pó esbranquiçado e homogêneo.

Meios preparados e completos: suspensão opaca azulada, com precipitado abundante quando deixado em repouso.

Resultado do cultivo após enriquecimento por 24 horas de incubação a 37°C (NF EN ISO 11133; FD T 90-461):



Microrganismos		Crescimento
<i>Salmonella enteritidis</i>	WDCM 00030	> 10 colônias características
+ <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	
+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	
<i>Salmonella typhimurium</i>	WDCM 00031	> 10 colônias características
+ <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	
+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	≤ 100 colônias
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	< 10 colônias

ARMAZENAMENTO / VALIDADE DE PRATELEIRA

Meio desidratado: 2 – 30°C.

Meios em tubos prontos para uso: 2 – 8°C.

Suplementos liofilizados de Novobiocina: 2 – 8°C.

As datas de validade estão indicadas nos rótulos.

Suplementos reidratados de Novobiocina (*): 30 dias a 2 – 8°C.

Meio base preparado em tubos ou frascos (*): 30 dias a 2 – 8°C.

Meios completos preparados em tubos ou frascos (*): 8 dias a 2 – 8°C.

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

EMBALAGEM

Meio base desidratado (sem iodo nem novobiocina):

Garrafa de 500 g BK169HA

Meio base desidratado (sem iodo):

Garrafa de 500 g BK208HA

Suplemento seletivo de Novobiocina:

10 frascos de 10 mgBS03308

8 frascos de 40 mgBS05608

Meio completo pronto para uso:

Tubos 50 x 10 mLBM07808

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Biokar Diagnostics – Rue des Quarante Mines – ZAC de Ther – Allonne – B. P. 10245 – F60002 Beauvais Cedex – França

Tel: + 33 (0)3 44 14 33 33 – Fax: + 33 (0)3 44 14 33 34 –www.biokar-diagnostics.com



Müller, L.. 1923. Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques. Comptes Rendus de la Société de Biologie, 89 : 434-437.

Kauffmann, F.. 1935. Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonella bazillen. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheit, 117 : 26-32.

Jeffries, L.. 1959. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of salmonellae in feces. Journal of Clinical Pathology, 12 : 568-571.

NF U47-100. Juillet 2007. Méthodes d'analyse en santé animale. Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales.

NF U47-101. Novembre 2007. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les oiseaux.

NF U47-102. Janvier 2008. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les mammifères.

NF EN ISO 19250. Juin 2013. Qualité de l'eau. Recherche de Salmonella spp.

NF EN ISO 11133. Juillet 2014. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture (Tirage 2 (2016-01-01)).

FD T90-461. Août 2016. Qualité de l'eau - Microbiologie - Contrôle qualité des milieux de culture.

NF EN ISO 6579-1. Avril 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des Salmonella - Partie 1 : recherche des Salmonella spp.

NF EN ISO 6579-1/A1. March 2020. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1 : detection of Salmonella spp. - Amendment 1 Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

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: MKTTN_Env13.

Data de criação: 06- 2002.

Data de revisão: 06 – 2020.

Motivo da revisão: Atualização de acordo com a norma NF EN ISO 6579-1/A1.