

Sys 328734

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES ETAPAS DE ENRIQUECIMENTO  
SELETIVO NO ISOLAMENTO DE *Salmonella* sp. A PARTIR DE FEZES DE  
SUÍNOS DE TERMINAÇÃO**

Dissertação de Mestrado

Geovana Brenner Michael

Porto Alegre, 2000



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES ETAPAS DE ENRIQUECIMENTO  
SELETIVO NO ISOLAMENTO DE *Salmonella* sp. A PARTIR DE FEZES DE  
SUÍNOS DE TERMINAÇÃO**

Geovana Brenner Michael  
Farmacêutica Bioquímica (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre (RS), Brasil  
Maio, 2000

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO

M621c Michael, Geovana Brenner

Comparação de diferentes etapas de enriquecimento seletivo no isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos de terminação / Geovana Brenner Michael – Porto Alegre : G.B.Michael, 2000.

xi, 116f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2000.

1. Bactéria patogênica : Salmonella : Método de detecção : Fezes de suíno. I. Título.

CDD: 589.9

CDU: 576.85

Catálogo na publicação:

Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS

589.9  
M621c



## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso que como orientadora não representa e sim personifica um ideal, um referencial. O qual não é restrito a uma postura acadêmica, nem tão pouco ao tempo, e cuja compreensão não tem horário para se expressar. Somente cito, ainda, em agradecimento o nome do Professor Doutor José Carlos Germani responsável pela iniciação criteriosa deste processo de formação, que ocorreu muito antes de março de 1998, e do Professor Doutor Jacques Marre por sua constante disposição e bela visão da ciência.

Estendo agradecimentos anônimos a todos envolvidos neste processo e à ti que, mesmo não tendo participação direta, utiliza-se desta dissertação constituindo uma das maiores finalidades desta.

# COMPARAÇÃO DE DIFERENTES ETAPAS DE ENRIQUECIMENTO SELETIVO NO ISOLAMENTO DE *Salmonella* sp. A PARTIR DE FEZES DE SUÍNOS DE TERMINAÇÃO<sup>1</sup>

Autor: Geovana Brenner Michael

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

## SINOPSE

A detecção de *Salmonella* sp. é fundamental nos programas de controle de salmonelose. Métodos de detecção mais eficientes permitem uma melhor determinação do nível de infecção dos rebanhos, um melhor entendimento da epidemiologia da infecção por *Salmonella* sp. e o desenvolvimento de programas de controle do patógeno, que visem a segurança biológica do alimento. Nos métodos convencionais, o enriquecimento seletivo é uma etapa crítica, pois inibe a microbiota competitiva e permite a multiplicação de *Salmonella* sp. Vários caldos de enriquecimento seletivo têm sido comparados quanto à eficiência na recuperação de *Salmonella* sp. a partir de alimentos, contudo existem poucos estudos relativos a fezes de suínos. O objetivo deste trabalho foi comparar caldos de enriquecimento seletivo para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos. Numa primeira fase, amostras de fezes foram contaminadas artificialmente e os caldos Rappaport-Vassiliadis incubado a 42°C (RV), Tetrionato Müller-Kauffmann a 37°C (TMK37) e 42°C (TMK42), e Selenito Cistina (SC) a 37°C foram testados, em associação com meios sólidos seletivos: Rambach (RA), Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4), e Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (VB). Na segunda fase os caldos RV, TMK37 e TMK42, semeados nos meios XLT4 e VB, foram testados com amostras naturalmente contaminadas. Na primeira fase o RV, TMK42 e TMK37 foram mais eficientes que o SC. No isolamento de *Salmonella* sp. em amostras naturalmente contaminadas os caldos TMK42 e RV foram superiores ao TMK37. O desempenho destes influenciou diretamente a capacidade seletiva e indicadora dos meios sólidos seletivos. No presente estudo, a associação TMK42/XLT4 demonstrou ser mais sensível, e a RV/XLT4 mais específica. O ágar VB também é recomendado para aumentar a probabilidade de detecção do patógeno. Desta forma os caldos RV e TMK42 e o ágar XLT4 e o VB foram considerados os mais indicados para a implantação de protocolos de detecção de *Salmonella* sp. em fezes suínas.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. (117p.)

## COMPARISON OF DIFFERENT SELECTIVE ENRICHMENT STEPS FOR THE *Salmonella* sp. ISOLATION FROM SWINE FECES<sup>1</sup>

Author: Geovana Brenner Michael

Adviser: Prof. Dr<sup>a</sup> Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

### SUMMARY

Detection of *Salmonella* is a key point in veterinary *Salmonella* research and surveillance programs. Through an efficient method for pathogen detection, the herd infection level could be better determined, which would permit the understanding of *Salmonella* infection epidemiology and the developing of pathogen control programs in order to achieve biological food safety. In a conventional isolation method, the selective enrichment is a critical step because it suppresses competitive microflora and permits *Salmonella* sp. to proliferate. Several selective enrichment broths have been compared for recovering *Salmonella* sp. from foods. However the isolation from swine feces has been conducted in a few studies. The aim of this study was to compare the efficiency of different selective enrichment methods for the isolation of *Salmonella* sp. from swine feces. In a first step, swine feces samples were artificially contaminated and Rappaport-Vassiliadis broth incubated at 42°C (RV), Müller-Kauffmann tetrathionate broth at 37°C (MKT37) and 42°C (MKT42), and Selenite Cystine broth at 37°C (SC) were tested, in association with selective plating media: Xylose Lysine Tergitol 4 (XLT4), Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose (BG). Later, in a second step, RV, MKT42 and MKT37 broths were streaked in XLT4 and BG media and tested with naturally contaminated samples. At the first step RV, MKT42 and MKT37 broths were more efficient than SC broth. When *Salmonella* sp. were isolated from naturally contaminated samples MKT42 and RV broth were superior to MKT37. The performance of the broths affected the selectivity and differentiation capacity of the selective plating media used. In the present study the association MKT42/XLT4 was the most sensitive and RV/XLT4 was the most specific. The use of BG agar is also recommended to improve the likelihood of *Salmonella* sp. detection. Therefore, RV and MKT42 broth, and XLT4 and BG media were considered the most appropriated to be used in detection protocols of *Salmonella* sp. from swine feces.

---

<sup>1</sup> Master's Dissertation in Agriculture and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. (117p.)

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Características gerais.....	5
2.2. Nomenclatura.....	5
2.2.1. Divisão em sorotipos.....	6
2.3. Especificidade ao hospedeiro.....	7
2.4. <i>Salmonella</i> sp. como causa de toxinfecções alimentares.....	8
2.5. Importância do suíno como portador de <i>Salmonella</i> sp. ....	12
2.6. Métodos culturais de isolamento de <i>Salmonella</i> sp. ....	15
2.6.1. Etapa de pré-enriquecimento não seletivo.....	17
2.6.2. Etapa de enriquecimento seletivo.....	19
2.6.3. Etapa de semeadura em meio sólido seletivo.....	23
2.6.4. Confirmação.....	26
2.7. Outras metodologias.....	28
2.8. Escolha da metodologia.....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1. Metodologia para contaminação artificial das amostras.....	30
3.1.1. Microrganismos testes.....	30
3.1.2. Amostras de fezes.....	31
3.1.3. Contaminação das amostras.....	31
3.1.4. Preparo do inóculo de <i>Salmonella</i> sp. para a contaminação artificial.....	32
3.1.5. Metodologia para o isolamento de <i>Salmonella</i> sp. ....	35
3.1.5.1. Pré-enriquecimento em meio não seletivo.....	36
3.1.5.2. Enriquecimento seletivo.....	36
3.1.5.3. Isolamento em meio sólido seletivo.....	36
3.1.5.4. Triagem bioquímica.....	37
a) TSI.....	37
b) LIA.....	37
3.1.5.5. Confirmação sorológica.....	38
3.2. Amostras naturalmente contaminadas.....	38
3.2.1. Controle positivo.....	39
3.2.2. Metodologia para as amostras naturalmente contaminadas.....	39
3.2.2.1. Provas bioquímicas suplementares.....	41
a) Citrato.....	41
b) Fenilalanina desaminase.....	41
c) ONPG.....	42
d) SIM.....	42
e) Urease.....	42

	Página
3.2.3. Metodologia para determinação da sensibilidade e especificidade.....	43
3.3. Análise estatística.....	44
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1. Contaminação artificial das amostras de fezes de suínos.....	45
4.1.1 Primeira inoculação.....	47
4.1.2. Segunda inoculação.....	51
4.1.3. Terceira inoculação.....	51
4.2. Amostras de fezes naturalmente contaminadas.....	55
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
5.1. Contaminação artificial.....	62
5.1.1. Primeira inoculação.....	63
5.1.2. Segunda inoculação.....	70
5.1.3. Terceira inoculação.....	71
5.2. Amostras de fezes de suínos naturalmente contaminadas.....	73
5.2.1. Sorotipos de <i>Salmonella</i> sp. identificados.....	77
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>82</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>93</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Meios de cultura mais utilizados nas diferentes etapas do isolamento de <i>Salmonella</i> sp. ....	16
2. Tratamentos utilizados na contaminação artificial de amostras de fezes de suínos com <i>Salmonella</i> sp. ....	32
3. Tabela de contingência para cálculo da sensibilidade e da especificidade.....	43
4. Comparação da eficiência na recuperação de diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> sp. a partir de fezes de suínos contaminadas artificialmente através de quatro enriquecimentos seletivos, de acordo com o número de tubos positivos.....	47
5. Comparação da eficiência na recuperação de diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> sp. a partir de fezes de suínos contaminadas artificialmente através de quatro enriquecimentos seletivos, de acordo com o número de placas positivas.....	48
6. Comparação de três meios seletivos sólidos semeados com alíquotas do mesmo caldo de enriquecimento na recuperação de diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> sp.....	50
7. Eficiência de três meios sólidos no isolamento de <i>Salmonella</i> sp. a partir de fezes de suínos artificialmente contaminadas.....	51
8. Comparação da eficiência na recuperação de diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> sp. a partir de fezes de suínos contaminadas artificialmente através de quatro enriquecimentos seletivos, de acordo com o número de tubos positivos.....	52
9. Comparação da eficiência na recuperação de diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> sp. a partir de fezes de suínos contaminadas artificialmente através de quatro enriquecimentos seletivos, de acordo com o número de placas positivas.....	53
10. Comparação de três meios seletivos sólidos semeados com alíquotas do mesmo caldo de enriquecimento na recuperação de diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> sp.....	54

	Página
11. Eficiência de três meios sólidos no isolamento de <i>Salmonella</i> sp. a partir de fezes de suínos artificialmente contaminadas.....	55
12. Eficiência na recuperação de <i>Salmonella</i> sp. através de três enriquecimentos seletivos, de acordo com o número de placas positivas.....	56
13. Comparação de dois meios sólidos seletivos semeados com alíquotas do mesmo caldo de enriquecimento na recuperação de <i>Salmonella</i> sp. ....	57
14. Sensibilidade de três métodos de enriquecimento seletivo, em associação a dois meios sólidos seletivos, no isolamento de <i>Salmonella</i> sp. ....	57
15. Especificidade de três métodos de enriquecimento seletivo, em associação a dois meios sólidos seletivos, no isolamento de <i>Salmonella</i> sp.....	58
16. Eficiência de dois meios sólidos no isolamento de <i>Salmonella</i> sp. a partir de fezes de suínos naturalmente contaminadas.....	58
17. Total de colônias de <i>Salmonella</i> sp. isoladas a partir dos diferentes materiais coletados e o número de colônias enviadas para sorotipagem.....	59
18. Sorogrupos e sorotipos de <i>Salmonella</i> sp. isolados em três diferentes coletas, a partir de ração, fezes de lote e individualmente coletadas de suínos durante 3 visitas realizadas em uma propriedade de terminação.....	60

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Metodologia para a contaminação artificial das amostras.....	34
2. Metodologia para o isolamento de <i>Salmonella</i> sp. a partir de fezes contaminadas artificialmente.....	35
3. Metodologia para o isolamento de <i>Salmonella</i> sp. a partir de fezes naturalmente contaminadas.....	40
4. Tubos contendo caldos de enriquecimento seletivo para detecção de <i>Salmonella</i> sp. sem inóculo.....	46
5. Tubos contendo caldos de enriquecimento seletivo para detecção de <i>Salmonella</i> sp., inoculados com fezes de suínos e após o período de incubação..	46
6. Placas contendo meios sólidos seletivos com crescimento de colônias típicas de <i>Salmonella</i> sp., praticamente como cultura pura, semeados a partir do caldo TMK42 inoculado com fezes de suínos de terminação contaminadas artificialmente com o "Pool".....	49

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

- ATCC: Coleção de cultura tipo americana  
BHI: Infusão de Cérebro e Coração  
DT: Fagotipo definido  
HACCP: Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle  
KCN: Cianeto de potássio  
H<sub>2</sub>S: Ácido sulfídrico  
LIA: Ágar Ferro Lisina  
ONPG: Caldo para o teste da  $\beta$ -galactosidase  
ONPG: Reativo 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo  
PBS: Tampão Fosfato Salina  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase  
“Pool”: Mistura de três sorotipos, isolados a campo, de *Salmonella* (*S. Derby*, *S. Bredeney*, *Salmonella* sp.)  
RA: Ágar Rambach  
RV: Caldo Rappaport-Vassiliadis  
SC: Caldo Selenito Cistina  
SIM: Meio semi-sólido para identificação da produção de H<sub>2</sub>S, indol e motilidade.  
TMK37: Caldo Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C  
TMK42: Caldo Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C  
TSA: Ágar Soja Trypticaseína  
TSI: Ágar Ferro Trílice Açúcar  
UFC: Unidade formadora de colônia  
VB: Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose  
XLD: Ágar Xilose Lisina Desoxicolato  
XLT4: Ágar Xilose Lisina Tergitol 4

## 1. INTRODUÇÃO

A suinocultura está entre as atividades econômicas voltadas à produção de alimento para o consumo humano. A carne suína é considerada uma das mais nobres e saudáveis fontes protéicas de origem animal, disponíveis para o homem. De todo o consumo mundial de carne esta representa mais de 40%. Este consumo, tanto da carne como de seus derivados, vem aumentando, o que viabiliza e requer um aumento da produção e permite uma expansão de mercado. A suinocultura brasileira é um dos setores mais expressivos da atividade pecuária, representando 20% do valor bruto de produção, gerando grande número de empregos diretos e indiretos.

Para atender as exigências do mercado interno e externo, este setor vem modernizando-se, através de uma produção tecnificada que visa a obtenção de uma carne de elevada qualidade e de bom padrão sanitário. Desta forma, a implementação de programas que reduzam o nível de infecção dos animais por microrganismos patogênicos em todos os níveis de produção vem assumindo maior importância, devido a questões econômicas e de saúde pública.

Na literatura são freqüentes os relatos sobre o aumento do número de toxinfecções na população de diversos países, devido ao consumo de produtos suínos contaminados por *Salmonella* sp., e também sobre o isolamento destes microrganismos em suínos aparentemente saudáveis. Este fato expõe o risco que a presença de *Salmonella* sp. em suínos representa para a saúde pública.

O aumento das toxinfecções atribuídas à carne ou a produtos de origem suína contaminados com *Salmonella* sp. pode ser resultante, entre outros fatores, da pesquisa e utilização de metodologias com crescentes níveis de sensibilidade para a detecção desta bactéria.

O isolamento de *Salmonella* sp. depende das características ambientais e climáticas das regiões, nas quais pode haver a presença em maior número ou ausência de determinados sorotipos deste microrganismo; e também das condições do animal, da técnica para coleta, do volume coletado e do método de isolamento.

Os métodos encontrados na literatura para a detecção destes microrganismos, variam entre métodos culturais convencionais e novas técnicas que visam uma redução do tempo de isolamento, podendo ser culturais ou não. Os métodos culturais convencionais ainda são considerados métodos de escolha, e constituem um padrão ao qual outras metodologias são comparadas.

A etapa de enriquecimento seletivo, a qual faz parte de metodologias propostas para o isolamento de *Salmonella* sp. através de métodos culturais convencionais, permite a multiplicação de *Salmonella* sp. e inibe a microbiota competidora associada. Este fato tende a torná-la uma etapa crítica, principalmente para amostra com elevada contaminação como as fezes.

Como a infecção por *Salmonella* sp. em suínos causada pela maioria dos sorotipos não desenvolve sinais clínicos, os animais permanecem como portadores assintomáticos, excretando um baixo número do patógeno nas fezes, sendo este mais um fator que dificulta a sua detecção.

A sensibilidade e a especificidade do método de detecção é que vão determinar, assim, a confiabilidade dos resultados obtidos no isolamento de *Salmonella* sp. Quando o método não for muito específico para o isolamento do patógeno, ocorrerá um maior número de falso-positivos, resultando em dispêndio econômico e de tempo.

Quando este não apresentar sensibilidade suficiente para detecção de um número reduzido de *Salmonella* sp., o resultado será um falso-negativo. Este tipo de resultado, por sua vez, impede uma conduta apropriada por parte, de criadores e veterinários, no controle da *Salmonella* sp., e pode invalidar estudos epidemiológicos.

No Brasil a situação do rebanho suíno bem como dos produtos de origem suína em relação à presença de *Salmonella* sp. é ainda pouco conhecida. Projetos recentes envolvendo a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/SC) têm como objetivo determinar a prevalência da infecção por *Salmonella* sp. em suínos de terminação a fim de fornecer subsídios para programas de controle nos rebanhos brasileiros. Dados preliminares destes projetos indicam que o nível de portadores no rebanho suíno do Sul do Brasil pode alcançar níveis expressivos, e que a implementação destes programas será necessária para curto prazo.

Há um consenso que o controle de *Salmonella* sp. em suínos deve ser realizado através da identificação dos rebanhos infectados, e pelo correto manejo, principalmente na manutenção de condições de higiene nas granjas. Um manejo correto deve ser instituído em todas as unidades de produção, antes e durante o transporte, bem como durante o abate. Desta forma, pretende-se diminuir a possibilidade de contaminação do alimento através da cadeia de processamento do produto. Como fator determinante para alcançar a diminuição do nível de contaminação das carcaças e produtos industrializados encontra-se o número de portadores e excretadores sadios entre os animais abatidos. Esta parece ser a maior fonte de contaminação nos frigoríficos. Sendo assim, a estratégia dos programas de controle passam necessariamente pela determinação do nível de portadores e excretadores, principalmente através do isolamento da bactéria.

Como as pesquisas para o isolamento de *Salmonella* sp. relatadas na

literatura, apresentam variações da metodologia empregada e resultados controversos, o presente trabalho teve como objetivo determinar a metodologia de cultivo com maior eficiência para detecção de *Salmonella* sp. em fezes de suínos de terminação.

## 2. REVISÃO BILIOGRÁFICA

### 2.1 Características gerais

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bacilos Gram negativos, predominantemente móveis pela presença de flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos, que apresentam metabolismo respiratório e fermentativo. A *Salmonella* sp. produz ácido e geralmente gás a partir de D-glicose e outros carboidratos; são oxidase, indol e Voges-Proskauer negativas e vermelho de metila, citrato, e catalase positivas. Apresentam reação descarboxilase positiva para lisina e ornitina, e variável para a reação da arginina desidrolase (Holt et al., 1994). A produção de ácido sulfídrico (Kelly et al., 1985) e a utilização do malonato é variável, a uréia não é hidrolisada, crescem em cianeto de potássio (KCN), e reduzem o nitrato. Entre os carboidratos geralmente fermentados estão: L-arabinose, maltose, D-manitol, D-manose, L-ramnose, D-sorbitol, trealose e D-xilose (Holt et al., 1994). As bactérias deste gênero possuem uma ampla distribuição (Morse & Duncan, 1974), ocorrendo tanto no homem, como em animais de sangue quente e frio, nos alimentos e no ambiente (Holt et al., 1994).

### 2.2. Nomenclatura

A nomenclatura do gênero *Salmonella* ainda não está completamente definida (Euzéby, 1999). O gênero vem sofrendo várias modificações (LeMinor &

Popoff, 1987; Reeves et al., 1989), sendo dividido atualmente em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica*, e *houtenae* (Clarke & Gyles, 1993). A diferenciação entre as espécies e subespécies baseia-se em propriedades fenotípicas. Entretanto assume uma maior importância epidemiológica a identificação das bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* através do esquema de Kauffmann-White (Campos, 1999).

### 2.2.1. Divisão em tipos sorológicos

O esquema de Kauffmann-White utiliza a composição antigênica das células bacterianas pertencentes ao gênero *Salmonella* para dividi-las em tipos sorológicos (sorotipos ou sorovares). Os sorotipos são diferenciados através de antígenos O (somáticos), Vi (capsular) e H (flagelares), resultando em uma fórmula antigênica. Nesta os antígenos O, os quais também caracterizam o sorogrupo, são designados por números arábicos. Os antígenos flagelares, que podem ocorrer em duas fases (fase 1 específica e 2 não específica, Carter & Chengappa, 1990), são designados através de letras minúsculas do alfabeto e números arábicos. Já o antígeno Vi apresenta um único tipo imunológico, o qual pode ser encontrado nos sorotipos *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e *S. Dublin*, sendo representado desta forma pelas letras Vi (Campos, 1999). Assim a fórmula antigênica 1,4,[5],12:i:1,2 do sorotipo *S. Typhimurium* representa os antígenos O (1,4,5,12), os antígenos de fase 1H (i) e 2H (1,2) respectivamente (Carter & Chengappa, 1990). A fagotipagem é indicada quando há evidências de uma transmissão de *Salmonella* sp. de animais para o homem, permitindo um traçado epidemiológico (Jubb, 1985).

Os sorotipos pertencentes à *Salmonella enterica* subesp. *enterica* são nomeados, enquanto que os demais sorotipos após a subespécie a qual pertencem são

identificados por sua fórmula antigênica. A nomenclatura aplicada a um sorotipo (por exemplo o Typhimurium) pertencente à espécie *Salmonella enterica* e à subespécie *enterica* deveria apresentar-se do seguinte modo: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium. Formas simplificadas para esta representação podem ser encontradas como *Salmonella typhimurium*, *Salmonella* sorotipo Typhimurium, e *Salmonella* Typhimurium (Clarke & Gyles, 1993), a qual será utilizada nesta dissertação. Clarke & Gyles (1993) relatam ainda que a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* compreende a maioria dos microrganismos do gênero *Salmonella*.

Atualmente Euzéby (1999) propõe que o sorotipo Typhi seja novamente considerado como espécie do gênero, não sendo reduzido a um sorotipo, devido a sua importância como causador de doenças.

Ao todo, neste gênero, mais de 2500 sorotipos já foram isolados (Holt et al., 1994). Destes, menos de 50 são encontrados frequentemente como causadores de doenças (Clarke & Gyles, 1993). A maioria dos sorotipos não são adaptados a um único hospedeiro, podendo causar doenças tanto no homem como em animais (Wray & Sojka, 1977; Schwartz, 1996).

### **2.3 Especificidade ao hospedeiro**

O grau de adaptação da *Salmonella* sp. a hospedeiros, humano e animal, varia e afeta a patogenicidade do microrganismo (Varnam, 1991), o que possibilita a divisão de *Salmonella* sp. em três grupos (Wray & Sojka, 1977). No primeiro grupo encontram-se os sorotipos caracterizados pela especificidade ao homem, como Typhi, Paratyphi e Sendai, os quais normalmente causam doenças graves como febre tifóide e paratifóide, e não são patogênicos para animais (Varnam, 1991).

Outros sorotipos, com adaptação a um animal específico, constituem um segundo grupo. Entre os sorotipos pertencentes a este grupo estão: Abortusovis

adaptado a ovinos e Gallinarum a aves. O homem quando infectado por sorotipos pertencentes a este grupo normalmente não apresenta sintomas, ou estes se desenvolvem de forma moderada. Já o sorotipo Choleraesuis, mesmo tendo os suínos como hospedeiros primários, pode causar doenças sistêmicas severas no homem (Varnam, 1991).

Ao terceiro grupo pertencem a maioria dos sorotipos, os quais não são adaptados a um único hospedeiro, podendo causar doenças tanto no homem como em animais (Wray & Sojka, 1977; Schwartz, 1996). No entanto, apenas um pequeno número dentre estes sorotipos estão freqüentemente associados a doenças, como Typhimurium e Enteritidis (Wray & Sojka, 1977). Estes podem causar infecções intestinais de severidade variada, estando envolvidos nos casos clássicos de toxinfecções alimentares (Varnam, 1991).

#### **2.4 *Salmonella* sp. como causa de toxinfecções alimentares**

O gênero *Salmonella*, por sua larga distribuição no ambiente e presença em grande variedade de alimentos e seus ingredientes, constitui um grande problema para a agro-indústria (McCapes et al., 1991). A transmissão de *Salmonella* sp. ao homem, através da produção animal, pode ocorrer pelo contato direto com os animais tanto nas granjas, como no frigorífico. Mais freqüentemente, ocorre pela ingestão de produtos de origem animal contaminados (Wegener & Bager, 1997), o que pode resultar em toxinfecções alimentares (Leitão, 1984).

O risco de desenvolver uma salmonelose pelo consumo de alimento é influenciado por diversos fatores: a presença qualitativa e quantitativa de *Salmonella* sp., a composição do produto, manipulação e práticas no preparo do alimento, suscetibilidade dos consumidores primários, entre outros (Wegener & Bager, 1997). No entanto, quando processados adequadamente, os alimentos normalmente apresentam-se

seguros (McCapes et al., 1991). O consumo de carnes cruas ou não aquecidas suficientemente, ovos ou produtos sujeitos a muita manipulação têm sido frequentemente associado a surtos epidêmicos ou casos esporádicos de salmonelose (Fagerberg & Avens, 1976; Fang et al., 1991).

Fang et al. (1991) ainda consideram que as infecções entéricas adquiridas de animais e produtos de origem animal podem ser prevenidas através de uma melhor informação da indústria de alimentos e da população.

Dependendo do sorotipo e do alimento, a dose infectante em pessoas saudáveis pode variar de menos de  $10^3$  unidades formadoras de colônia (UFC) no caso de sorotipos adaptados ao homem, até  $10^5 - 10^7$  UFC para sorotipos não adaptados ao homem. Em alimentos com elevado conteúdo de gordura e proteína, a dose infectante pode ser menor devido à proteção das células contra o suco gástrico (Varnam, 1991).

Em comparação com outras intoxicações alimentares, como a estafilocócica, a salmonelose requer a presença de um número relativamente baixo de microrganismos no alimento (Carmo et al., 1996). Já que o desenvolvimento da salmonelose requer a colonização, invasão do trato intestinal e produção de toxinas (Carmo et al., 1996; Jubb, 1985), linhagens de *Salmonella* sp. não invasivas não são patogênicas (Jubb, 1985).

No homem os sorotipos não-tifóides são os principais causadores de doenças bacterianas transmitidas por alimentos (D'Aoust, 1994). A enterocolite é a característica de uma infecção causada por organismos não-tifóides, sendo normalmente auto-limitante (D'Aoust, 1994). Os sintomas característicos são: dor abdominal, diarreia, vômito e febre, os quais ocorrem normalmente dentro de 12 a 36 horas após a infecção (Varnam, 1991). No entanto, podem também levar a condições clínicas mais graves (D'Aoust, 1994). Isto ocorre principalmente em indivíduos muito jovens, idosos ou com doenças terminais, quando a infecção atinge outros sistemas do

corpo, além do intestino, podendo resultar até em morte (Fagerberg & Avens, 1976).

Já a febre entérica caracteriza-se por uma severa infecção sistêmica causada por *S. Typhi* e organismos paratífóides relacionados (D'Aoust, 1994). Normalmente acontecem após 10 a 15 dias de infecção, com sintomas como: anorexia, dor de cabeça, tosse seca e dor abdominal, acompanhados de febre de até 40°C (Varnam, 1991).

Os sorotipos mais associados à cadeia alimentar, como já citado, são os não-tifóides, entre estes: Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Heidelberg, Newport e Dublin (D'Aoust, 1994). No entanto, todos os sorotipos podem ser considerados patogênicos para o homem (D'Aoust, 1994; Taunay et al., 1996; Blaha, 1997).

Carne de aves e ovos, contaminados com *S. Enteritidis* são considerados importantes fontes de infecção para o homem (Clarke & Gyles, 1993). Embora a relação entre o desenvolvimento da doença no homem e a contaminação da carne suína ainda não esteja bem definida, a *Salmonella* sp. tem sido isolada de vários produtos de carne suína (Davies & Wray, 1997). Isto pode tornar a carne suína uma importante fonte de salmonelose humana, tanto em casos esporádicos como em surtos (Wegener & Bager, 1997).

De acordo com McCapes et al. (1991) as zoonoses transmitidas através dos alimentos estão entre as mais importantes quanto a sua ameaça à saúde humana. O autor associa ainda, o aumento de toxinfecções na população com o aumento das granjas e dos animais confinados, bem como com o consumo da carne e derivados. A relativa inabilidade no controle de *Salmonella* sp. é responsável por colocar a salmonelose entre as zoonoses mais importantes (Wegener & Bager, 1997).

Na Dinamarca, após um surto de salmonelose em 1993 causado pela contaminação das carcaças de suínos com *S. Infantis*, foi desenvolvido um programa nacional de pesquisa e controle de infecção subclínica de *Salmonella* sp. em rebanhos de suínos (Baggesen et al., 1996). Este programa tem como objetivo diminuir o nível

do patógeno nas carcaças.

Atualmente até a erradicação da *S. Typhimurium* fagotipo definido (DT) 104, nas granjas, tem sido proposta (Mogelmoose et al., 1999), já que este fagotipo apresenta uma grande importância como causador de toxinfecções, e possui um perfil de multiresistência a antibióticos, basicamente à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina (Baggesen et al., 1999).

Berends & Snijders (1997) consideram que a implementação do programa HACCP (Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle) durante o abate e o processamento garantiria a segurança biológica da carne. O programa utiliza os seguintes passos para garantir o controle do processo: análise de riscos, identificação de pontos críticos de controle, estabelecimento de critérios de controle e valores críticos de limite, monitoramento dos pontos críticos de controle, e ações corretivas e de verificação.

Para Jayarao et al. (1989) e Berends et al. (1996) com a detecção de animais excretores de *Salmonella* sp. nas granjas, estes poderiam ser separados dos demais, evitando a contaminação cruzada de outros animais durante o transporte para o abate e no frigorífico. Isto se deve ao fato de que animais recentemente infectados podem excretar nas fezes centenas até milhares de UFC de *Salmonella* sp. por grama (Berends & Snijders, 1997) e pela presença de *S. Typhimurium* nas fezes de suínos já haver sido detectada após 4 horas de exposição oral dos animais à mesma (Fedorka-Cray et al., 1995).

Nisbet et al. (1997) vêm desenvolvendo estudos com o objetivo de diminuir a colonização do trato gastrointestinal por *Salmonella* sp., através da competição por exclusão. Nesta, animais jovens têm seu trato gastrointestinal colonizado com uma microbiota intestinal saudável, o que diminuiria a colonização por *Salmonella* sp. e consequentemente a excreção do patógeno nas fezes.

### 2.5 Importância do suíno como portador de *Salmonella* sp.

Tanto o homem quanto os animais podem apresentar-se como portadores assintomáticos de *Salmonella* sp., não desenvolvendo sinais clínicos, e difundir o microrganismo através das fezes. O primeiro isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes e linfonodos mesentéricos de animais assintomáticos, especificamente no caso de suínos, foi realizado por Hormaeche & Salsamedi em 1936 (apud Alves et al., 1994, p. 173).

Como a maioria dos animais não desenvolvem sinais clínicos durante a infecção, o risco de contaminação do alimento é elevado (Schwartz, 1996). Wray & Sojka (1977) consideram os animais portadores assintomáticos como principal fonte de infecção para o homem e outros animais, mesmo que a *Salmonella* sp. possa permanecer viável no ambiente por longos períodos. O estado de portador pode ser desenvolvido através da interação de diversos fatores como: o sorotipo, idade do animal, e o número de bactéria ingerida.

No estado de portador o animal pode excretar até  $10^5$  UFC por grama nas fezes, o qual pode ser caracterizado de três formas. Uma, na qual o animal caracteriza-se como um excretor persistente (portador ativo) de *Salmonella* sp. por meses até anos, o que pode ocorrer após a recuperação clínica da doença (Clarke & Gyles, 1993). Este estado, normalmente, é produzido após o tratamento com antibióticos, os quais promovem a recuperação clínica, mas não a cura bacteriológica, tornando o animal fonte de contaminação para outros (Wray & Sojka, 1977).

Outra forma de desenvolvimento do estado de portador ocorre quando o animal encontra-se em um ambiente contaminado, ingere a *Salmonella* sp. e esta passa através do intestino com pouca ou nenhuma invasão dos linfonodos mesentéricos. Sendo assim, o animal (portador passivo) apenas excreta *Salmonella* sp. por um curto período de tempo até ser removido do ambiente contaminado (Clarke & Gyles, 1993).

Na terceira forma a *Salmonella* sp. está presente nos tecidos do animal (portador latente), não sendo normalmente excretada nas fezes, o que torna o animal um excretor intermitente (Clarke & Gyles, 1993).

Nos suínos a infecção por *Salmonella* sp., além de ocorrer de forma assintomática, pode causar enterocolite e septicemia (Schwartz, 1996), resultando em piores índices de conversão alimentar e queda no ganho de peso (Wilcock & Schwartz, 1992). A enterocolite normalmente é causada por *Salmonella* Typhimurium. A septicemia geralmente está associada ao sorotipo Choleraesuis, sendo o suíno considerado o hospedeiro natural deste sorotipo (Schwartz, 1996).

A presença de *Salmonella* sp. no trato gastrointestinal dos animais e o fato de o suíno poder ser uma fonte importante de alimentos contaminados, levam alguns autores (McCapes et al., 1991), a considerarem necessário o estabelecimento de um programa para o controle de *Salmonella* sp. já nas granjas.

Este controle diminuiria a exposição dos suínos à *Salmonella* sp. e em consequência, a contaminação do produto durante a cadeia de processamento do alimento (McCapes et al., 1991). No momento do abate dos suínos, as fezes são consideradas uma das maiores fontes de contaminação da carne por *Salmonella* sp., seguida da contaminação de origem faringiana e ambiental (Borch, 1996).

A melhor forma de controle da *Salmonella* sp. para alguns autores seria a prevenção (Borch et al. 1996; Robinson, 1996; Blaha, 1997), a qual proporcionaria maior segurança ao alimento (Blaha, 1996a), um menor risco à saúde pública, e em consequência a ampliação das áreas de comercialização dos produtos de suínos (Schwartz, 1996). Desta forma atenderia as exigências da população e do mercado, principalmente externo, que pode utilizar as exigências de qualidade sanitária dos produtos até como barreiras comerciais, para a proteção e manutenção do seu mercado de comercialização da carne e produtos suínos (Nielsen, 1998; Powel, 1998).

Neste sentido, Fedorka-Cray & Gray (1996), propõem a identificação e eliminação dos animais assintomáticos como uma forma de evitar doenças de origem alimentar. Isto torna-se difícil pela insuficiência de informação a respeito da epidemiologia e patogênese da salmonelose em suínos, e ainda pela ampla distribuição e persistência da *Salmonella* sp. no ambiente (Morse & Duncan, 1974; Blaha, 1997). Harris (1996) defende o controle de todos os nichos ecológicos, nos quais a *Salmonella* sp. poderia ser encontrada. Wierup (1997) enfatiza que um controle não deve ser baseado na análise da ração utilizada na terminação, já que nesta raramente *Salmonella* sp. é isolada, exceto quando apresentar uma elevada contaminação.

Tielen et al. (1997) consideram que programas com estratégias de controle da *Salmonella* sp., não devem estar baseados na erradicação do patógeno e sim em medidas que mantenham um equilíbrio entre o patógeno e o hospedeiro. Medidas estas que permitam a coexistência dos suínos e *Salmonella* sp. sem o desenvolvimento de doença ou danos. Robinson (1996) propõe que o programa HACCP seja implementado nas granjas, diminuindo assim o número de microrganismos aos quais os suínos seriam expostos através de todo o estágio de produção. Para Berends & Snijders (1997) a produção de suínos livres de *Salmonella* sp. seria a melhor e mais duradoura solução.

Apesar de métodos propostos para a detecção de *Salmonella* sp. em animais portadores assintomáticos, como o teste de ELISA, desenvolvido recentemente na Dinamarca (Nielsen et al. 1995), o isolamento do agente em amostras de fezes do rebanho ainda é a base dos programas de controle (Wierup, 1997). Da mesma forma, os métodos culturais de isolamento e identificação bacteriana são o padrão ao qual os outros métodos são comparados (Roof, 1996).

Di Guardo et al. (1992) citam algumas condições que influenciam no isolamento de *Salmonella* sp.: fatores geográficos e meteorológicos, sistema de criação, tipo de ração, idade e categoria do animal, métodos de coleta e amostragem, bem como

os métodos utilizados para o isolamento.

Outro fator que influencia o isolamento do microrganismo é a excreção intermitente e de pequeno número de *Salmonella* sp., que os animais portadores assintomáticos podem apresentar (Haddock, 1970). Isto exige dos métodos de detecção de *Salmonella* sp. nas fezes, um nível de sensibilidade que não só permita o isolamento do patógeno quando em elevado número, como ocorre na salmonelose clínica, mas principalmente, em quantidade reduzida como a excretada pelos animais aparentemente saudáveis (Bager & Petersen, 1991). Coletas repetidas e de um maior número de animais, desta forma, aumentam a probabilidade de que *Salmonella* sp. seja encontrada (Wierup, 1997).

### **2.6 Métodos culturais de isolamento de *Salmonella* sp.**

Associado a fatores anteriormente citados como interferentes na detecção de *Salmonella* sp. está a microbiota acompanhante e/ou competitiva que, principalmente nas fezes, encontra-se em um número elevado. Isto torna importante a escolha de uma metodologia que utilize meios de enriquecimento seletivo para o isolamento de *Salmonella* sp. (Schwartz, 1996), propiciando, assim, o aumento do número de células desta bactéria, e inibindo o crescimento dos competidores (Chen et al., 1993). O objetivo é que o método permita que os limites de detecção de *Salmonella* sp. sejam iguais ou inferiores a 10 UFC/g da amostra (Cherrington & In't Veld, 1993). No entanto, a principal dificuldade ao isolar *Salmonella* sp. através de métodos convencionais ("microbiologia clássica"), é encontrar um meio de enriquecimento seletivo eficiente (Arroyo & Arroyo, 1995).

Desde os primeiros isolamentos de *Salmonella* sp. e o reconhecimento desta como um patógeno (Thomas, 1977), vários métodos de cultivo para *Salmonella* sp. têm sido desenvolvidos. Nas últimas décadas, pode-se observar nos métodos um

certo consenso com relação às etapas a serem utilizadas: o pré-enriquecimento da amostra em meio não seletivo, o enriquecimento e o isolamento em meios seletivos, a triagem bioquímica e a confirmação sorológica (Nielsen & Baggesen, 1997). Na Tabela 1, estas etapas estão relacionadas com os meios de cultivo mais utilizados.

TABELA 1. Meios de cultura mais utilizados nas diferentes etapas do isolamento de *Salmonella* sp.

Etapas do cultivo	Meios de cultura mais utilizados
1. Pré-enriquecimento não seletivo	Água Peptonada Tamponada
2. Enriquecimento seletivo	Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) Caldo de Soja RV RV Semi-sólido Modificado Caldo Selenito Caldo Verde Brilhante Selenito Caldo Tetrionato Caldo Verde Brilhante Tetrionato Caldo Tetrionato Hajna
3. Semeadura em meio seletivo	Ágar Verde Brilhante Ágar Citrato Desoxicolato Ágar Rambach Ágar Xilose Lisina Desoxicolato Ágar Xilose Lisina Tergitol-4
4. Triagem	Ágar Ferro Lisina Ágar Ferro Trílice Açúcar Sistemas de testes de rápida identificação
5. Confirmação	Provas bioquímicas adicionais e sorotipagem

Fonte: Nielsen & Baggesen (1997)

Diferentes meios, tempos, e temperaturas de incubação são utilizados na tentativa de adequar o método de detecção de *Salmonella* sp. ao material analisado (Calderon & Furlanetto, 1991). No entanto, para amostras semelhantes também são

encontradas diferenças nas metodologias empregadas e nos resultados obtidos no isolamento deste microrganismo (Baggesen et al.,1996). Pesquisas com relação à metodologia têm sido realizadas com o objetivo de aumentar a especificidade e sensibilidade, e desenvolver métodos mais rápidos e simplificados. Considerações diversificadas, contraditórias e ambíguas, com relação à superioridade de um meio ou outro, dificultam ou até impossibilitam a comparação de resultados (Fagerberg & Avens, 1976).

Para Fagerberg & Avens (1976) a validade dos resultados depende diretamente das técnicas de laboratório e dos meios empregados nas análises. Entre as variáveis que podem afetar as análises de *Salmonella* sp. estão: tipo de enriquecimento e meios sólido, fatores técnicos que provocam variações no meio de enriquecimento e meio sólido, o número do patógeno versus competidores, o sorotipo, tipo de amostra e o tempo e temperatura de incubação.

Nielsen & Baggesen (1997) relacionam também a influência dos diferentes volumes de amostra coletados com o resultado do exame. Como exemplo, citam a maior sensibilidade no isolamento de *Salmonella* sp., de fezes de suínos portadores assintomáticos, com um volume de amostra entre 5-25g, ao obtido pela coleta através de suabe retal.

### **2.6.1 Etapa de pré-enriquecimento não seletivo**

Na análise de fezes, quando esta etapa é utilizada, normalmente o pré-enriquecimento em meio não seletivo (primeira etapa) é feito em Água Peptonada Tamponada. Nesta etapa amostras de 25g são incubadas a 37°C (Bager & Petersen, 1991; Cherrington & In't Veld, 1993; Davies & Wray, 1994). Alguns autores não fazem o pré-enriquecimento (Calderon & Furlanetto, 1991), no entanto utilizam uma quantidade menor de amostra (10g), a qual é colocada diretamente no enriquecimento

seletivo (segunda etapa), sempre mantendo a relação de volume indicada para o caldo em questão, 1:10 ou 1:100.

Esta etapa inicial é utilizada para permitir que as células bacterianas, quando lesadas, possam se recuperar e multiplicar. O que eleva, desta forma, o número de *Salmonella* sp. que serão inoculadas nos meios de enriquecimento seletivo. Consequentemente, a probabilidade de que *Salmonella* sp. permaneçam viáveis após esta segunda etapa será maior (Nielsen & Baggesen, 1997). Em alimentos que não sofreram tratamento térmico, considera-se que as células de *Salmonella* sp. não se apresentam lesadas e, desta forma, não seria necessário o uso de pré-enriquecimento (Fagerberg & Avens, 1976). Ao contrário, o pré-enriquecimento das amostras de fezes pode permitir uma melhor detecção de *Salmonella* sp., a exemplo do que ocorre com outros materiais como amostras ambientais e de ração, nos quais as células bacterianas podem estar lesadas devido à falta de umidade e o efeito potencial de desinfetantes (Nielsen & Baggesen, 1997; Kim et al., 1999a).

O tempo de incubação desta etapa, na maioria dos métodos, fica em torno de 20-24h, mas são citados também períodos menores, de 16h (Bager & Petersen, 1991). Chen et al. (1993) testaram a variação do tempo de incubação na etapa de pré-enriquecimento em Água Peptonada Tamponada. Com tempos reduzidos de 4-6h a recuperação de *Salmonella* sp. pode não ocorrer. Com um período maior, superior a 6h, a presença deste microrganismo foi detectada com a utilização de qualquer um dos meios seletivos empregados na etapa posterior. Dos caldos seletivos utilizados, o Selenito Cistina foi o único a permitir a detecção de *Salmonella* sp. presente em inóculos que haviam sido incubados por 4h (na primeira etapa). Este caldo também foi o mais eficiente para aqueles incubados por 6h, em comparação com o caldo Rappaport-Vassiliadis e o Tetracionato Verde Brilhante.

### 2.6.2 Etapa de enriquecimento seletivo

A etapa de enriquecimento seletivo, como já citado, permite o crescimento preferencial de *Salmonella* sp. Esta segunda etapa tem sua eficiência afetada pelo meio utilizado, o volume do inóculo proveniente do pré-enriquecimento, o tempo e a temperatura de incubação (Fagerberg & Avens, 1976; Peterz et al., 1989; Mackey, 1985; Bager & Petersen 1991; Calderon & Furlanetto, 1991), bem como pela matéria orgânica (MÜLLER..., 1987; SELENITE..., 1987) e microbiota presentes (Sharma & Parker, 1969; Van Schothorst et al., 1977; June et al., 1995).

Os meios de enriquecimento seletivo inibem o crescimento de outras bactérias que não *Salmonella* sp., geralmente através de compostos tóxicos, do pH, e da pressão osmótica. Tais fatores podem estar presentes de forma isolada ou combinada nos meios (Bager & Petersen, 1991). Pode-se encontrar a presença de mais de um inibidor (compostos tóxicos) no meio, os quais podem estar atuando de forma sinérgica, sendo esta ação ainda pouco compreendida (Arroyo & Arroyo, 1995).

O meio ideal, portanto, não deve ser inibitório à *Salmonella* sp., permitindo que esta se multiplique até níveis detectáveis, e ser suficientemente seletivo para evitar um grande crescimento da microbiota competitiva (Beckers et al., 1987), que no meio sólido pode dificultar o isolamento do patógeno. Até mesmo porque alguns destes microrganismos competidores, em determinados meios, apresentam características culturais semelhantes a *Salmonella* sp. (Dusch & Altwegg, 1995; Sherrod et al., 1995).

Do primeiro meio seletivo (Vincent 1890) constituído de cinco gotas de uma solução de fenol (5% p/v) em 10 ml de caldo nutriente, vários outros meios foram desenvolvidos. Nos caldos de enriquecimento seletivo de *Salmonella* sp. foram realizadas modificações que permitissem uma menor toxicidade à célula desta bactéria, e uma maior ação sobre a microbiota competidora (Arroyo & Arroyo, 1995).

Entretanto, um meio isoladamente ainda não é capaz de ter uma ação

satisfatória, pois mesmo favorecendo o crescimento de *Salmonella* sp., outros membros da família *Enterobacteriaceae* ou outras bactérias Gram negativas também podem ter um bom crescimento nestes meios. Algumas destas bactérias, principalmente *Pseudomonas* sp., têm demonstrado alta resistência à ação de inibidores presentes tanto nos caldos de enriquecimento seletivo, como nos meios sólidos seletivos utilizados na terceira etapa de isolamento de *Salmonella* sp. Além disto, alguns inibidores como sais biliares e desoxicolato podem não apresentar uma ação muito superior contra estas bactérias em comparação às células de *Salmonella* sp. (Arroyo & Arroyo, 1995).

Inibidores como sais biliares, desoxicolato de sódio e selenito de sódio demonstram ser muito eficientes em inibir o crescimento da flora Gram positiva, como *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp. A mesma eficiência não foi observada com o tetrionato de sódio e o tiosulfato de sódio (Arroyo & Arroyo, 1995).

A microbiota competitiva, principalmente algumas espécies já citadas da família *Enterobacteriaceae*, e a acompanhante constituem-se em um grande problema tanto para o isolamento como na identificação de *Salmonella* sp. Portanto, o uso de uma etapa de enriquecimento seletivo demonstra-se indispensável, até mesmo para os mais modernos sistemas de detecção de *Salmonella* sp. (Arroyo & Arroyo, 1995). Alguns dos meios mais utilizados têm sido o caldo Selenito, o caldo Tetrionato, e o caldo Rappaport-Vassiliadis (Bager & Petersen, 1991).

O caldo Selenito tem sua seletividade baseada na toxicidade do selenito e dos selenopolitionatos formados no meio, que são geralmente absorvidos mais rapidamente pelas outras bactérias do que pelas *Salmonella* sp. Estes compostos impedem a proliferação da microbiota competidora por serem incorporados às proteínas celulares destas bactérias (Bager & Petersen, 1991). A temperatura de incubação recomendada para este meio é de 37°C (SELENITE..., 1987).

Como na formulação original deste caldo as *Salmonella* sp. muitas vezes

também eram inibidas (SELENITE..., 1987), foi adicionado ao meio L-cistina, a qual diminuiu a toxicidade do meio e propiciou um maior crescimento de *Salmonella* sp., resultando no caldo Selenito Cistina (SC).

June et al. (1995) ainda relatam que a toxicidade do caldo SC não se restringe somente às células bacterianas. A presença do selênio torna o meio um perigoso material de descarte no laboratório.

O caldo Tetrionato torna-se seletivo para o isolamento de *Salmonella* sp. pela ação do tetrionato, formado no meio na reação entre o tiosulfato e a solução de iodo (MÜLLER..., 1987). A temperatura de incubação quando elevada a 43°C, apresenta efeito sinérgico com o tetrionato (Bager & Petersen, 1991). No entanto, pode ser inibitória para alguns sorotipos de *Salmonella* sp., sendo recomendável as temperaturas de 42°C ou 41,5°C (MÜLLER..., 1987; Peterz, 1989). A adição ao caldo Tetrionato de bile bovina e verde brilhante resultou no caldo denominado Tetrionato Müller-Kauffmann (TMK), amplamente utilizado (MÜLLER..., 1987).

O caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) resulta de várias modificações do caldo Rappaport, como diminuições na quantidade de meio e nas concentrações finais de verde malaquita. O caldo RV tem demonstrado uma grande eficiência na recuperação de *Salmonella* sp. e um alto nível de seletividade (Bager & Petersen, 1991).

A eficiência deste meio é devida à capacidade de multiplicação das *Salmonella* sp. em pressões osmóticas relativamente elevadas (concentração final do cloreto de magnésio hexaidratado de  $36 \pm 0,5$  g/l de meio), pH relativamente baixo ( $5,2 \pm 0,2$ ), temperaturas de 43°C, e por estas bactérias apresentarem necessidades nutricionais modestas (RAPPAPORT-VASSILIADIS..., 1987).

A temperatura de 43°C, como anteriormente citado, pode inibir o

crescimento de alguns sorotipos de *Salmonella* sp., desta forma a temperatura de incubação do caldo RV também tem sido reduzida para 42°C (Peterz et al., 1989).

O volume a ser inoculado do pré-enriquecimento, no caldo RV deve estar na proporção de 1:100, pois inóculos maiores podem comprometer a sensibilidade e a especificidade do meio (Vassiliadis et al., 1985). Nos caldos SC e TMK é possível a inoculação de volumes superiores, na proporção de 1:10 (SELENITE..., 1987; MÜLLER..., 1987).

Peterz et al. (1989) apontaram a forma de preparo do meio como outro fator que pode afetar a sensibilidade do enriquecimento seletivo. De forma semelhante ao caldo Tetrionato, o caldo RV quando preparado a partir de ingredientes individuais em alguns estudos, apresentou sensibilidade superior aos meios comerciais completos (Peterz et al., 1989, June et al., 1995). June et al. (1995) também observaram a importância da procedência do verde malaquita usado na preparação do caldo RV a partir de ingredientes individuais.

Bager & Petersen (1991) ainda relacionam a sensibilidade dos métodos para a detecção de *Salmonella* sp., com os diferentes sorotipos presentes na amostra. Algumas etapas de enriquecimento seletivo, com diferentes meios, tempos e temperaturas de incubação, podem permitir o isolamento de alguns sorotipos em detrimento de outros. Como exemplo disto, os autores observaram que o caldo SC (a 37°C por 24h) recuperou todos os tipos de sorotipos encontrados em amostras de fezes de suínos analisadas. Já o caldo RV e o caldo TMK demonstraram uma diminuição na recuperação de *Salmonella* GIVE e *Salmonella* Typhimurium, respectivamente.

Bello-Pérez (1993) enfatiza a importância dos meios de enriquecimento seletivo e, da mesma forma como Vassiliadis et al. (1987), e Bager & Petersen (1991), recomendam o uso de pelo menos dois tipos de meios para o enriquecimento seletivo, pois de acordo com o seu estudo, os caldos não recuperam com igualdade os sorotipos

de *Salmonella* sp.

### 2.6.3 Etapa de semeadura em meio sólido seletivo

A eficiência da etapa de enriquecimento seletivo permite uma melhor recuperação (com diminuição de falso-negativo e falso-positivo) de *Salmonella* sp. nos meios sólidos seletivos. A semeadura de alíquotas dos caldos de enriquecimento seletivo, em meios seletivos sólidos, constitui a terceira etapa do isolamento destas bactérias. Quanto maior for a seletividade obtida na etapa de enriquecimento seletivo, menor será o crescimento de microrganismos competidores no ágar, e melhor serão as condições para o isolamento de *Salmonella* sp. (Sherrod et al. 1995).

Segundo Tate et al. (1990) o crescimento em número elevado destes competidores no ágar (principalmente de bactérias Gram negativas) pode mascarar as *Salmonella* sp., quando estas não estiverem presentes em um número de colônias elevado. O ágar, desta forma, deve apresentar um nível de seletividade que diminua o crescimento destas bactérias competidoras, as quais não foram inibidas na etapa anterior (Sherrod et al., 1995), exercendo o mínimo possível de inibição sobre a *Salmonella* sp. (Fagerberg & Avens, 1976).

O ágar, além de ser seletivo, deve ainda conter um sistema confiável que permita a diferenciação das colônias de *Salmonella* sp. das outras bactérias (Rappold & Bolderdijk, 1979).

Miller et al. (1991) sugerem o uso de mais de um meio seletivo, pois alguns sorotipos de *Salmonella* sp. podem ser sensíveis ao inibidor presente em determinado meio. O uso de um meio adicional poderia permitir o isolamento do sorotipo que não foi detectado através do outro meio. Esta associação diminuiria, assim, os falso-negativos.

Vários meios seletivos têm sido descritos, e de forma semelhante aos caldos seletivos, muitas modificações são propostas. Estes meios consistem geralmente de um

meio nutricional básico adicionado de corantes, antibióticos, sais biliares e/ou outros inibidores químicos do crescimento de microrganismos indesejáveis, e um sistema indicador que através da coloração das colônias indique quais possivelmente sejam *Salmonella* sp. (Fagerberg & Avens, 1976). Em sua maioria, a diferenciação das colônias de *Salmonella* sp. das acompanhantes ocorre pela produção de ácido sulfídrico, ou utilização de açúcares como lactose (Sherrod et al., 1995; Fagerberg & Avens, 1976).

De acordo com Busse (1995) os meios sólidos seletivos podem ser classificados de acordo com o agente seletivo utilizado em meios contendo sais biliares (ágar Citrato Desoxicolato, *Salmonella-Shigella*, Hektoen Entérico, Xilose Lisina Desoxicolato, Rambach), verde brilhante (ágar Verde Brilhante, verde Brilhante Manitol Lisina Cristal Violeta), e bismuto sulfito (ágar Bismuto Sulfito). Atualmente novos meios têm sido formulados, através da adição de substratos cromogênicos, com o objetivo de permitir um melhor isolamento de *Salmonella* sp. e um sistema indicador mais eficiente (Cooke et al., 1999).

O ágar Verde Brilhante é normalmente utilizado em laboratórios de diagnóstico veterinário (Nielsen & Baggesen, 1997). Na literatura encontram-se alguns autores que utilizam variações do ágar Verde Brilhante, como, por exemplo, o Verde Brilhante Vermelho Neutro Lactose Sacarose (Sharma & Packer, 1969), Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (Moriñigo et al., 1989), Verde Brilhante Desoxicolato (Vassiliadis et al. 1987), Verde Brilhante com novobiocina (Waltman et al., 1993), Verde Brilhante Cristal Violeta Lisina Manitol (Coleman et al., 1995).

O sistema indicador destes meios, como o Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (VB), utiliza a capacidade dos microrganismos degradarem ou não lactose e sacarose. A degradação do açúcar resulta na acidificação do meio, sendo visualizada através da viragem do indicador vermelho de fenol para amarelo.

Microrganismos que não utilizam tais açúcares irão alcalinizar o meio através dos produtos finais do metabolismo das peptonas, com o desenvolvimento de uma coloração vermelha intensa. Como *Salmonella* sp. não fermentam tais açúcares, suas colônias terão uma coloração rosa forte, com um halo vermelho intenso no ágar, apresentando-se ainda como colônias translúcidas (Fagerberg & Avens, 1976; BPL...,1996; BPLS..., 1996). Estas seriam características de colônias típicas de *Salmonella* sp., entretanto, existem exceções, ou seja, algumas *Salmonella* sp. são capazes de fermentar lactose, resultando em uma colônia amarela, o que pode provocar resultados falso-positivos (Nielsen & Baggesen, 1997).

Miller et al. (1991) propõem a utilização de um meio no qual à base ágar Xilose Lisina foi acrescentado um agente surfactante, o Tergitol 4 (denominado atualmente Niaproof 4, Miller et al., 1995). Este meio, denominado Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4), inibe o crescimento de competidores como *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., e *Providencia* sp., o que permite um melhor isolamento de *Salmonella* sp., diminuindo assim os falso-negativos.

Detecta-se *Salmonella* sp. neste meio pela produção de ácido sulfídrico (XLT4..., 1996). O ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) formado pela degradação do tiosulfato de sódio reage com íons férrico presentes no meio, formando um precipitado preto nas colônias, o sulfeto ferroso (Ribeiro & Soares, 1993). Além disto, a base do meio ainda contém lisina, a qual a *Salmonella* sp. é capaz de degradar até cadaverina, provocando a elevação do pH do meio, visualizada pelo halo violeta produzido pela viragem do indicador de vermelho de fenol. Estas reações podem ocorrer simultaneamente ou sucessivamente, e a alteração da coloração pode exigir um tempo de incubação mais prolongado (XLD..., 1996). Microrganismos que degradarem os açúcares (lactose e sacarose) presentes, com a conseqüente acidificação do meio, resultarão em colônias amarelas com halo também amarelo. Outros que não produzirem H<sub>2</sub>S, nem

acidificarem o meio, formarão colônias incolores com um halo vermelho (XLT4..., 1996). Entretanto, alguns sorotipos de *Salmonella* sp. não produzem H<sub>2</sub>S, resultando em colônias atípicas (Nielsen & Baggesen, 1997) incolores e com halo vermelho.

Rambach (1990) desenvolveu um meio, ágar Rambach (RA), que permite a identificação de colônias de *Salmonella* sp. através de outra característica fenotípica, que não as utilizadas no VB e XLT4: a formação de ácido a partir de propilenoglicol. Colônias positivas desenvolveriam uma coloração rosa avermelhada. Outros microrganismos, principalmente os entéricos, seriam diferenciados através do substrato cromogênico (5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-galactopiranosídeo) que permite a detecção da produção da enzima β-D-galactosidase, resultando em colônias azuis. *Proteus* sp., o qual é negativo para estas duas reações, produziria colônias incolores, ao contrário de *Citrobacter* sp., positivo para as duas reações com colônias características violetas (Rambach, 1990). No entanto algumas *Salmonella* sp. podem não degradar o propilenoglicol, não produzindo a coloração vermelha característica (Gruenewald et al., 1991).

Sherrod et al. (1995) compararam a recuperação de *Salmonella* sp. em vários meios seletivos, e os melhores resultados foram obtidos com o ágar XLT4 e o RA, os quais apresentaram-se muito semelhantes. Dusch & Altwegg (1995) encontraram melhores resultados com a utilização do ágar XLT4, em relação ao ágar RA. O XLT4 além de ter apresentado maior sensibilidade, foi mais específico, sendo indicado por estes autores para a recuperação de *Salmonella* sp. não-tifóides a partir de fezes.

#### 2.6.4 Confirmação

As colônias supostamente classificadas como *Salmonella* sp. (típicas ou atípicas), encontradas nos meios sólidos, são submetidas a uma triagem bioquímica

(quarta etapa). Testes como ágar Ferro Lisina (LIA) e ágar Ferro Tríplice Açúcar (TSI) são utilizados como triagem inicial, a partir dos quais faz-se então uma série de provas bioquímicas adicionais, entre estas: citrato, fermentação de dulcitol, lactose e sacarose, crescimento em KCN, malonato, vermelho de metila, Voges-Proskauer, SIM e urease (Helrich, 1990), ou ainda fenilalanina desaminase,  $\beta$ -galactosidase (ONPG), fermentação de adonitol, rafinose e salicina (Kelly et al., 1985). Se estes ainda forem indicativos para *Salmonella* sp., então é realizado a confirmação (quinta etapa), através de sorologia (Silva, 1997), necessária para complementar os resultados obtidos pelos testes bioquímicos, pois tanto estes como o teste sorológico não são específicos para *Salmonella* sp. (Banwart, 1989).

A sorologia realizada através da técnica de aglutinação utiliza soros polivalentes que provocam a reação de aglutinação pela presença de anticorpos contra antígenos O, por exemplo (soro polivalente somático). Se um isolado for bioquimicamente característico de *Salmonella* sp. e não ocorrer a aglutinação, uma suspensão deste deve ser aquecida, pois desta forma os antígenos capsulares serão destruídos, não impedindo mais a reação do soro com os antígenos O. Entretanto, aproximadamente 5% dos sorotipos não apresentarão reação positiva, com a suspensão sendo aquecida ou não, pois o sorogrupo ao qual pertencem não é representado entre os reagentes dos soros (Kelly et al., 1985).

Após estas cinco etapas (pré-enriquecimento em meio não seletivo, enriquecimento seletivo, semeadura em meio sólido seletivo, triagem bioquímica e confirmação bioquímica e sorológica), que constituem os princípios básicos dos métodos de cultura convencionais, obtém-se então o diagnóstico final (Nielsen & Baggesen, 1997). No entanto, a realização da sorotipagem confere ao resultado um maior valor epidemiológico. Desta forma, como citado anteriormente, através do esquema de Kauffmann-White a *Salmonella* sp. é classificada de acordo com a

presença dos antígenos somáticos, capsular e flagelares (Campos, 1999).

## 2.7 Outras metodologias

Os métodos de cultura convencionais, que utilizam estas etapas descritas para a identificação de *Salmonella* sp., podem levar de 3 a 4 dias para apresentar um resultado presuntivo, e 5 a 6 dias para um resultado definitivo. Técnicas que visam reduzir este tempo de detecção têm sido desenvolvidas (Soumet, et al. 1997).

Métodos para a rápida detecção de *Salmonella* sp. têm sido citados ou desenvolvidos por alguns autores como: impedância, medidas de condutância, o uso de bacteriófagos salmonela-específicos, uma variedade de métodos imunológicos (Bager & Petersen, 1991), e métodos de detecção baseados em DNA (Nielsen & Baggesen, 1997). Estes métodos podem apresentar uma baixa sensibilidade e/ou especificidade, o que ainda representa um fator limitante na escolha dos mesmos (Marsiglia et al., 1997).

O nível de sensibilidade de alguns destes métodos pode ser aumentado com a utilização de uma etapa de enriquecimento seletivo, dos métodos de cultura convencionais (Soumet et al., 1997), como proposto para a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Aabo et al., 1995; Marsiglia et al., 1997; Kongmuag et al., 1994) e para a separação imunomagnética (Coleman et al., 1995).

Os novos métodos não culturais de rápida detecção de *Salmonella* sp., como o PCR e o teste de ELISA, não resultam no isolamento em cultura pura dos sorotipos de *Salmonella* sp. Desta forma, a tendência é que os mesmos sejam associados aos métodos culturais convencionais, que ao propiciarem este isolamento, permitem a caracterização completa dos sorotipos isolados, que fornecem dados importantes para as investigações epidemiológicas (Pignato et al. 1995; Wierup, 1997).

## 2.8 Escolha da metodologia

Nielsen & Baggesen (1997) afirmam que o resultado de uma pesquisa de *Salmonella* sp. é influenciado pelo método de detecção escolhido. Esta escolha deve levar em conta principalmente o tipo de material a ser analisado, pois este afeta a sensibilidade e a especificidade do método de isolamento. O método ideal, de acordo com estes autores, deveria apresentar as seguintes características: elevados níveis de sensibilidade e especificidade, fácil realização, baixo custo, rapidez e ser aplicável para a automação em larga escala. Os autores reconhecem que somente um método ainda não reúne todas estas características.

A comparação dos métodos descritos na literatura para o isolamento de *Salmonella* sp. é problemática. As dificuldades iniciam pelos diferentes tipos de amostras utilizadas, sendo que alguns estudos fazem a comparação das metodologias com amostras contaminadas artificialmente, enquanto outros utilizam amostras naturalmente contaminadas. Nestes, o isolamento de *Salmonella* sp. pode apresentar maiores dificuldades que no primeiro (Nielsen & Baggesen, 1997).

Os resultados obtidos na detecção de *Salmonella* sp. podem ser afetados também pelo número reduzido tanto de amostras positivas, como de diferentes sorotipos presentes na amostra (Nielsen & Baggesen, 1997).

Como Calderon & Furlanetto (1991, p. 129) afirmam, a detecção de *Salmonella* sp. “não está na dependência de apenas um fator isolado, mas de vários fatores que interagem mutuamente”. Isto reflete-se na forma como os resultados negativos para *Salmonella* sp. deveriam ser expressos: “*Salmonella* sp. não detectada” (Nielsen & Baggesen, 1997). A implementação de um programa de controle de *Salmonella* sp. visa não só a redução de perdas econômicas, como os riscos à saúde pública. Desta forma o controle de *Salmonella* sp. em suínos, baseado na detecção do patógeno a partir das fezes dos animais, depende em grande parte da eficiência do método de isolamento utilizado (Jayarao et. al. 1989).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido em duas etapas:

1° Contaminação artificial de amostras de fezes de suínos com *Salmonella* sp.

2° Pesquisa de *Salmonella* sp. em amostras de fezes naturalmente contaminadas.

#### 3.1. Metodologia para contaminação artificial das amostras

##### 3.1.1. Microrganismos testes

Foram utilizadas linhagens de *Salmonella* Typhimurium Coleção de Cultura Tipo Americana (ATCC) 15290 e de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, sorotipos citados na literatura entre os mais isolados a partir de produtos de origem animal (Baggesen et al., 1997). Foi utilizado também uma mistura de três amostras: *S.* Derby, *S.* Bredeney e *Salmonella* sp., isolados em diferentes granjas de suínos de terminação em um estudo prévio (Weiss et al., 1999). Esta mistura de amostras de campo será denominada de "Pool" no presente estudo.

Todas as linhagens de *Salmonella* sp. utilizadas apresentaram colônias típicas nos meios sólidos seletivos para *Salmonella* sp. e apresentaram perfil característico do gênero nas provas bioquímicas utilizadas na etapa de identificação, de

acordo com Holt et al. (1994).

### **3.1.2. Amostras de fezes**

Três coletas foram realizadas em diferentes granjas de suínos de terminação, na região do Vale do Taquari, nas quais em um estudo anterior (Weiss et al., 1999) não havia sido detectada a presença de *Salmonella* sp. As três coletas foram realizadas, respectivamente, nos meses de outubro e dezembro (1998) e março (1999). O objetivo das coletas em diferentes propriedades e processamento das mesmas separadamente foi o de propiciar a comparação das metodologias numa diversidade de microbiota acompanhante nas fezes, além de avaliar a reprodutibilidade dos resultados.

Foram coletadas aproximadamente 400g de fezes de lote, em cada granja. Entende-se por fezes de lote aquelas que se encontram depositadas no piso da baia e que são provenientes de diversos animais nesta alojados. As amostras foram acondicionadas em saco plástico, mantidos sob refrigeração durante o transporte até o laboratório, sendo processadas no mesmo dia da coleta.

A ausência de *Salmonella* sp. nestas amostras foi confirmada previamente através da análise de 25g das fezes de cada granja, utilizando as metodologias que seriam comparadas no presente estudo. Somente amostras negativas nesta triagem eram utilizadas para a comparação de metodologias.

### **3.1.3. Contaminação das amostras**

As amostras de fezes foram homogeneizadas com o auxílio de um misturador tipo "Stomacher" (Interscience) por 1 minuto e divididas em 7 alíquotas de 25g, para serem então submetidas aos diferentes tratamentos (Tabela 2).

TABELA 2. Tratamentos utilizados na contaminação artificial de amostras de fezes de suínos com *Salmonella* sp.

Alíquotas	Tratamentos
1	1 UFC <sup>a</sup> /g <i>Salmonella</i> Typhimurium
2	2 UFC/g <i>Salmonella</i> Typhimurium
3	1 UFC/g <i>Salmonella</i> Enteritidis
4	2 UFC/g <i>Salmonella</i> Enteritidis
5	1 UFC/g "Pool" <sup>b</sup>
6	2 UFC/g "Pool"
7	Sem contaminação com <i>Salmonella</i> sp.

<sup>a</sup> UFC: Unidade Formadora de Colônia

<sup>b</sup> "Pool": *S. Derby*, *S. Bredeney* e *Salmonella* sp.

O tratamento descrito foi repetido para cada uma das três diferentes amostras de fezes coletadas como descrito em 4.1.2. Uma alíquota não foi contaminada para assegurar a ausência de *Salmonella* sp. nas amostras, sendo submetida aos mesmos métodos de detecção que as amostras contaminadas artificialmente (controle negativo).

#### 3.1.4. Preparo do inóculo de *Salmonella* sp. para a contaminação artificial

A partir de culturas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Difco) de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e do "Pool" (semeado com uma colônia dos sorotipos Derby, Bredeney e *Salmonella* sp.), incubadas por 24 horas a 37°C, foram feitas diluições em solução salina fisiológica (Anexo 1) de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>. Das diluições 10<sup>-5</sup> até 10<sup>-8</sup>, 0,1ml foram semeados, em duplicata, na superfície de uma placa contendo ágar Soja Tripticaseína (TSA, Biobrás). As culturas em BHI foram estocadas a 4°C, e as placas de TSA foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após o cálculo de unidades formadoras de colônias nas placas de TSA, foi retirado dos caldos de BHI o volume

necessário para a obtenção do número de UFC, referente aos tratamentos utilizados na contaminação artificial das alíquotas.

A cada alíquota de fezes também foi adicionado 3 ml de solução Tampão Fosfato Salina (PBS, Anexo 2). Todas as alíquotas foram mantidas a 4°C por 48h (June et al., 1995), de acordo com a Figura 1. Após este período foram submetidas aos métodos de isolamento de *Salmonella* sp. testados no presente estudo.

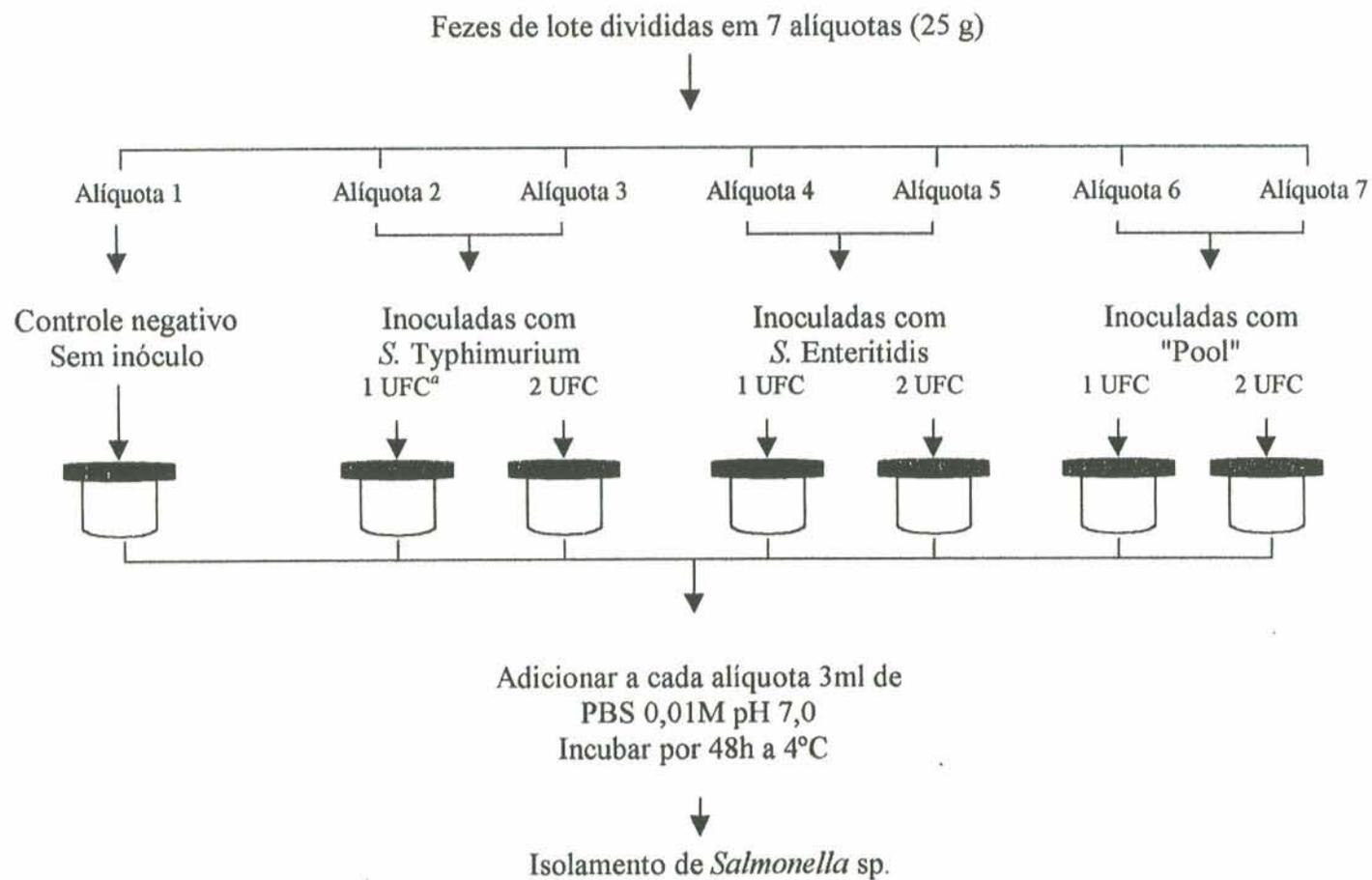


FIGURA 1. Metodologia para a contaminação artificial das amostras.

<sup>a</sup> UFC, Unidade Formadora de Colônia

### 3.1.5. Metodologia para o isolamento de *Salmonella* sp.

Cada alíquota de 25g contaminadas artificialmente, foi submetida a 4 etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, semeadura em meio sólido seletivo, triagem bioquímica e confirmação sorológica (Figura 2).

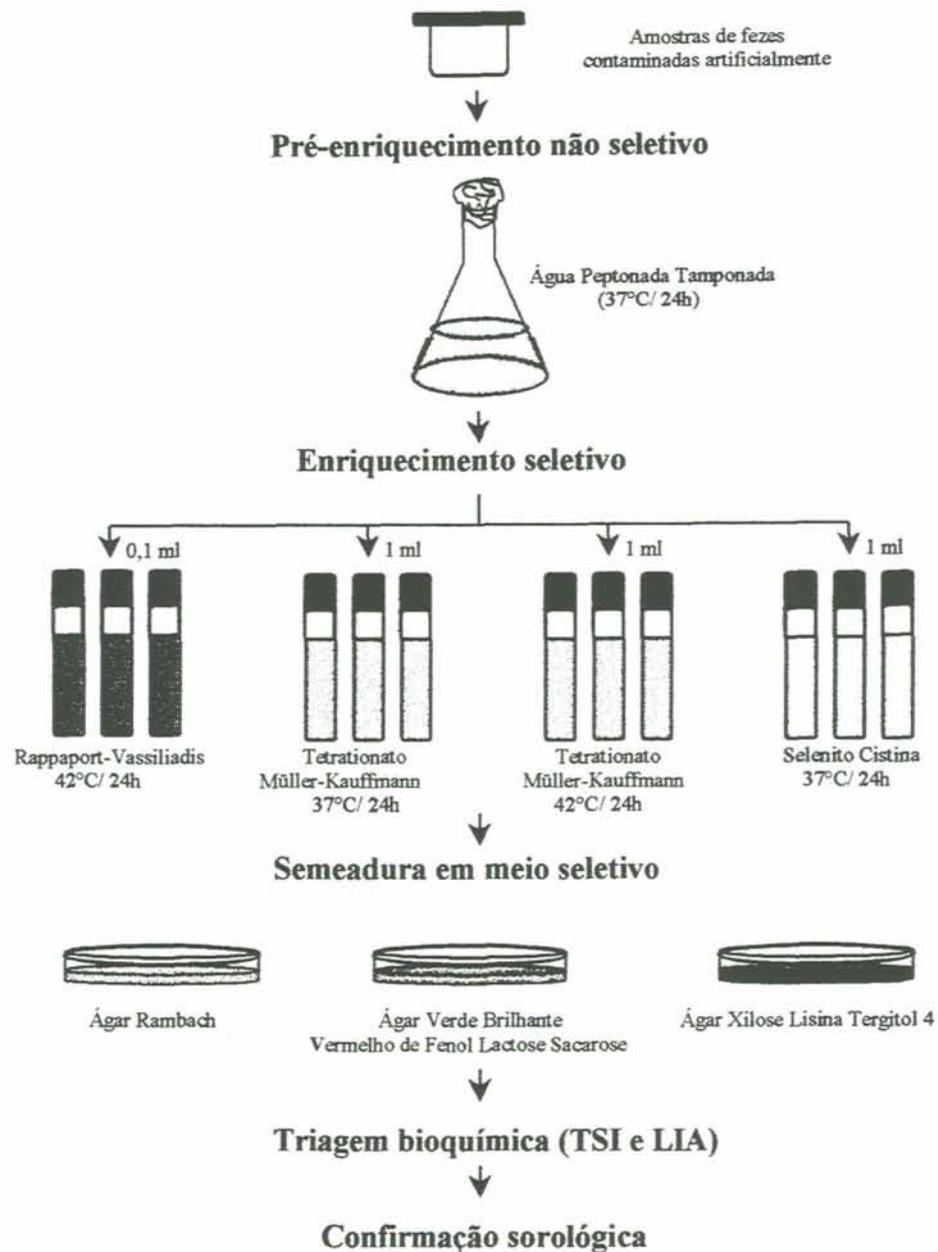


FIGURA 2. Metodologia para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes contaminadas artificialmente

### 3.1.5.1. Pré-enriquecimento em meio não seletivo

Cada alíquota de 25 g foi colocada em frascos Erlenmeyer contendo 225 ml de Água Peptonada Tamponada (Anexo 3), e incubada a 37°C. Após o período de 24h, alíquotas foram retiradas para a inoculação dos meios de enriquecimento seletivo.

### 3.1.5.2. Enriquecimento seletivo

Esta etapa foi realizada em triplicata para cada um dos métodos testados. Alíquotas de 1 ml de pré-enriquecimento não seletivo foram inoculadas em 9 ml de meios de enriquecimento seletivo: caldo Selenito Cistina (SC, Difco, Anexo 4), e caldo Tetracionato Müller-Kauffmann (TMK, Difco, Anexo 4). Alíquotas de 0,1ml foram inoculadas em 9,9 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Merck, Anexo 4).

Os caldos SC foram incubados a 37°C. Para o caldo TMK, 3 tubos foram incubados a 37°C (TMK37) e outros 3 tubos a 42°C (TMK42), assim como os caldos RV a 42°C. A incubação dos caldos na temperatura de 42°C foi feita em banho-maria, e de 37°C em estufa bacteriológica por 24h. Após este período, alíquotas dos caldos foram semeados em meios sólidos seletivos.

### 3.1.5.3. Isolamento em meio sólido seletivo

De cada tubo de enriquecimento seletivo, inóculos retirados com alça de platina foram semeados em diferentes meios seletivos (Anexo 5): ágar Xilose Lisina Tergitol-4 (XLT4, Difco), ágar Rambach (RA, Merck) e ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (VB, Difco). Após serem incubados a uma temperatura de 37°C por 24h, as placas foram analisadas quanto às características das colônias. A partir de cada meio sólido seletivo, quando possível, foram retiradas 3 colônias típicas de *Salmonella* sp., e isoladas em ágar TSA. Partindo de uma cultura

pura em TSA, foi realizada a triagem bioquímica.

#### **3.1.5.4. Triagem bioquímica**

A triagem teve início com a inoculação de uma colônia isolada, no ágar TSA, nos meios para provas bioquímicas: o ágar Ferro Tríplice Açúcar (TSI, Biobrás), e o ágar Ferro Lisina (LIA, Biobrás). Os meios foram preparados, semeados e interpretados conforme as instruções do fabricante e de Mac Faddin (1977). Nos casos em que os resultados foram característicos de *Salmonella* sp., estas bactérias suspeitas foram então confirmadas sorologicamente.

##### **a) TSI**

Esta prova determina a capacidade do microrganismo em fermentar glicose, sacarose e lactose com produção de ácido ou ácido com gás, e a produção de H<sub>2</sub>S. O meio é semeado com auxílio de um fio de platina, na base em picada e na superfície inclinada (bisel) em estrias. A reação típica de *Salmonella* sp. caracteriza-se pela coloração amarela na base devido a fermentação da glicose, e vermelha no bisel por não fermentar lactose nem sacarose. Normalmente a produção de gás resultante da fermentação da glicose é visualizada por bolhas e rachaduras no meio, a coloração negra indica a liberação de H<sub>2</sub>S.

##### **b) LIA**

Com esta prova verifica-se a capacidade do microrganismo em descarboxilar a lisina através da enzima lisina descarboxilase e liberar H<sub>2</sub>S. Como o TSI, o meio é semeado com auxílio de um fio de platina, na base em picada e no bisel em estrias. Na reação típica de *Salmonella* sp. (descarboxilação da lisina) o meio apresenta a coloração púrpura, tanto na base, como no bisel, e coloração escura na base

devido a produção de H<sub>2</sub>S.

### **3.1.5.5. Confirmação sorológica**

A sorologia para as bactérias presuntivamente identificadas como *Salmonella* sp. foi realizada com Soro *Salmonella* Polivalente Somático (Probac). Para esta prova sorológica utilizou-se a técnica de aglutinação em lâmina. Desta forma, sobre uma lâmina foi feita uma suspensão, em PBS, do microrganismo a ser testado. Este foi colhido de uma cultura pura em placa de ágar TSA, em quantidade suficiente para a obtenção de uma suspensão com aspecto leitoso. À suspensão bacteriana foi adicionado o soro, correspondendo ao dobro do volume da mesma. Após a homogeneização a lâmina foi mantida em movimento por até 2 minutos. Foram consideradas positivas as reações de aglutinação (formação de grumos) que ocorreram dentro deste período e foram completas.

### **3.2. Amostras naturalmente contaminadas**

Para a etapa de pesquisa de *Salmonella* sp. em fezes naturalmente contaminadas foram realizadas 2 visitas, com intervalo de 40 dias, em uma propriedade da região do Vale do Taquari. Esta propriedade alojava 359 suínos distribuídos em 30 baias e foi escolhida por haver sido encontrada amostra de fezes de lote positiva para *Salmonella* sp. neste grupo de animais em fase de terminação.

Para as coletas realizadas nas visitas o número de amostras foi determinado estatisticamente (NQUERRY..., 1995-1999) com base nos resultados obtidos na primeira fase do estudo, bem como por limitações práticas e econômicas.

Em cada coleta foram amostradas fezes de lote de 21 baias. Ao lado disto, amostras de fezes de 5 animais de cada baia foram coletadas diretamente do reto destes animais ou tão logo fossem defecadas (amostras individualmente coletadas),

totalizando 105 animais. Nas duas visitas realizadas à propriedade foram coletadas também amostras de ração. Todas as amostras foram colocadas em sacos plásticos individualizados e mantidos sob refrigeração durante o transporte até o laboratório, sendo processadas no mesmo dia da coleta.

### **3.2.1. Controle positivo**

O controle positivo nesta etapa consistiu da contaminação artificial de 25g de fezes, obtidas pela mistura de amostras de diversas baias tanto de lote como individuais, com 2 UFC/g de *Salmonella* Typhimurium ATCC 15290, conforme descrito no item 3.1.4. Esta amostra controle foi processada da mesma forma que as demais amostras analisadas.

### **3.2.2 Metodologia para as amostras naturalmente contaminadas**

De cada amostra de fezes individuais, fezes de lote ou ração foi pesado 25g, as quais foram processadas utilizando-se as mesmas etapas descritas em 3.1.5 (Figura 3).

No entanto, nesta fase do estudo, a etapa de enriquecimento foi realizada utilizando-se para cada amostra um tubo de cada um dos métodos de enriquecimento seletivo, RV, TMK42 e TMK37. Estes foram escolhidos com base nos resultados obtidos na primeira fase, na qual apresentaram uma maior eficiência. O ágar RA devido ao seu elevado custo e por não ter demonstrado uma superioridade significativa com relação aos outros meios testados, não foi utilizado nesta fase.

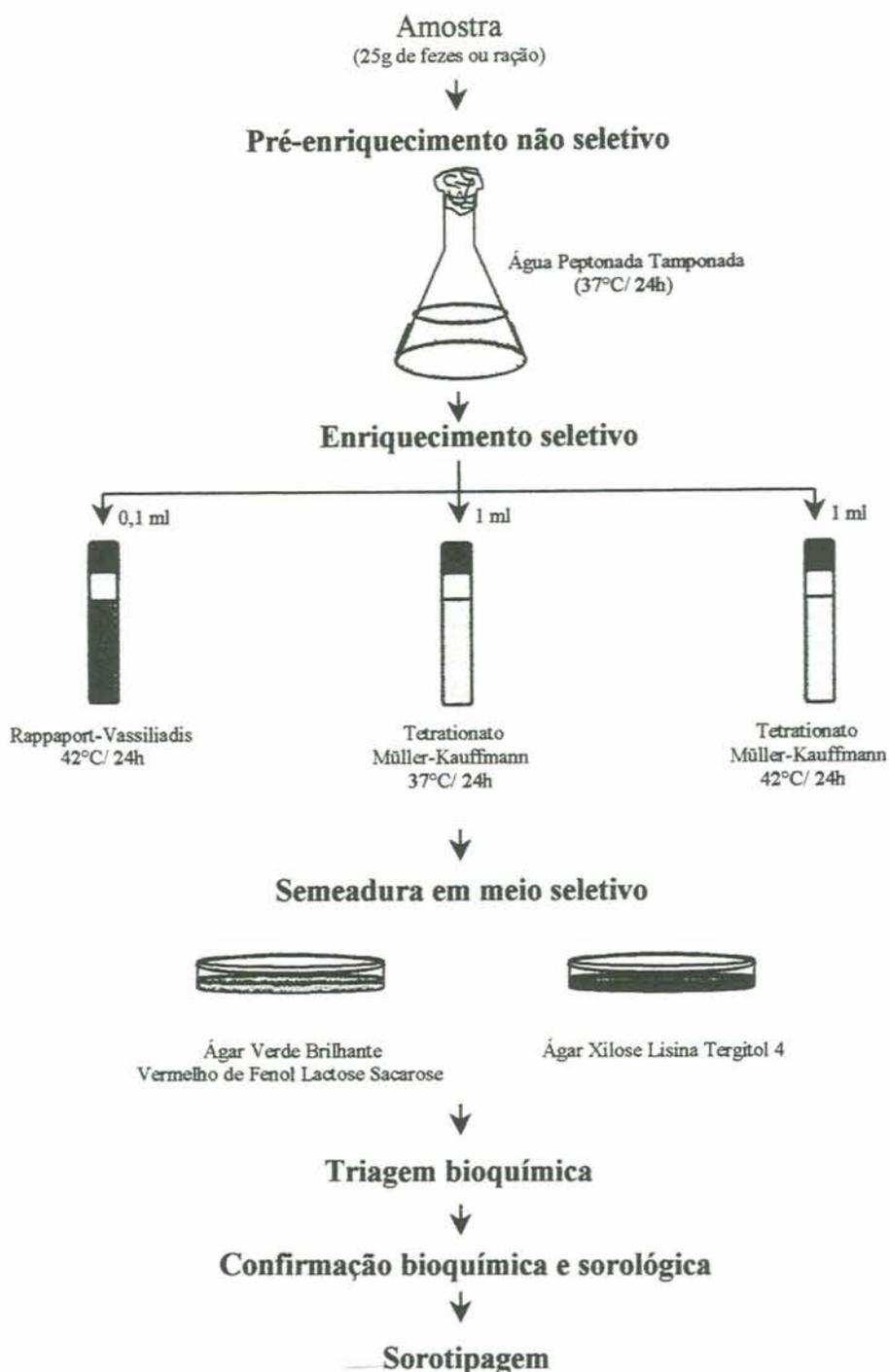


FIGURA 3. Metodologia para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes naturalmente contaminadas.

Foram isoladas até 3 colônias típicas por placa de meio sólido seletivo e também colônias atípicas, já que nesta etapa poderiam ser isoladas linhagens de *Salmonella* sp. cujas reações nos meios seletivos não fossem previamente conhecidas.

As colônias isoladas foram submetidas à triagem bioquímica e confirmação sorológica, conforme descrito nos itens 3.1.5.4 e 3.1.5.5. Nesta etapa posterior, entretanto, devido a possível presença de linhagens fermentadoras de lactose ou que apresentassem reação tardia para o H<sub>2</sub>S ou, ainda, que fossem lisina negativas, outras possibilidades para os resultados dos testes foram consideradas, como: base e bisel amarelos com presença de coloração escura ou base amarela e bisel vermelho com ausência de coloração escura, respectivamente, para o TSI; e meios com base amarela para o LIA.

Colônias confirmadas como *Salmonella* sp. foram selecionadas para serem enviadas para sorotipagem no Instituto Osvaldo Cruz. Estas colônias foram submetidas, antes de serem remetidas, a provas bioquímicas suplementares. As provas bioquímicas realizadas foram: citrato (ágar Citrato Simmons, Biobrás), fenilalanina desaminase (ágar Fenilalanina, Difco), ONPG (caldo β-galactosidase, ONPG, Anexo 6), SIM (meio SIM, Difco), e urease (caldo Uréia, Isofar). Os meios foram preparados, semeados e interpretados conforme as instruções do fabricante e de Mac Faddin (1977).

### **3.2.2.1. Provas bioquímicas suplementares**

#### **a) Citrato**

Esta prova permite determinar se o microrganismo é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono, com a conseqüente alcalinização do meio. O meio é semeado com o auxílio do fio de platina com uma estria central. Para *Salmonella* sp. esta prova é variável, quando positiva o meio torna-se azul.

#### **b) Fenilalanina desaminase**

Neste teste da fenilalanina desaminase é possível verificar a capacidade do microrganismo em desaminar a fenilalanina originando ácido fenilpirúvico. O ágar é semeado com alça de platina em estrias. A presença do ácido fenilpirúvico é

determinada pela reação com cloreto férrico a 10% (Anexo 7), resultando uma coloração verde. *Salmonella* sp. não possui a enzima fenilalanina desaminase, desta forma a reação é negativa, sem a produção da coloração verde.

#### **c) ONPG**

Neste teste verifica-se a presença ou ausência da enzima  $\beta$ -galactosidase através da utilização do composto orgânico *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo presente no meio. O caldo é semeado com alça de platina e a reação positiva é visualizada pela coloração amarela. Para *Salmonella* sp. a espécie *bongori* e alguns outros sorotipos de espécie *enterica* podem ser positivos, os demais apresentam reação negativa.

#### **d) SIM**

Através desta prova é possível a detecção da produção de  $H_2S$  e indol, e verificar se o microrganismo apresenta ou não motilidade. O meio é semeado com fio de platina em picada até 2/3 do meio. A produção de  $H_2S$  pela *Salmonella* sp. é verificada pela coloração escura do meio, e do indol é detectada pela adição do reativo de Ehrlich (Anexo 8), resultando em uma coloração rosa. Com exceção dos sorotipos Gallinarum e Pullorum, os demais são móveis. Observa-se a motilidade através da turvação do meio e não apenas da linha de inoculação. Devido à produção de  $H_2S$ , a visualização desta turvação fica prejudicada, o que se verifica é o escurecimento de todo o meio pelo  $H_2S$ , e não apenas na linha de semeadura.

#### **e) Urease**

O teste da produção de urease verifica a capacidade do microrganismo em degradar a uréia através da enzima urease, formando amônia. O caldo é semeado com

alça de platina. Como *Salmonella* sp. não possui a enzima urease, a reação negativa é verificada apenas pela turvação do caldo, sem o desenvolvimento da coloração rosa.

### 3.2.3 Metodologia para a determinação da sensibilidade e especificidade

A sensibilidade e a especificidade foram calculadas através de uma tabela de contingência (Tabela 3), e os resultados foram expressos em percentagem (Torrence, 1997).

TABELA 3. Tabela de contingência para cálculo da sensibilidade e da especificidade.

Método	Amostras	
	Amostras confirmadas com <i>Salmonella</i>	Amostras não confirmadas com <i>Salmonella</i>
Positivo	a (positivo verdadeiro)	b (falso-positivo)
Negativo	c (falso-negativo)	d (negativo verdadeiro)

Fonte: Torrence, 1997.

A sensibilidade de cada caldo de enriquecimento seletivo foi calculada através do número de amostras nas quais foi possível recuperar *Salmonella* sp. (a), através dos meios sólido seletivos, dividido pelo número total de amostras positivas (a + c), ou seja, amostras que foram positivas através do método em questão somadas com as positivas dos demais caldos testados. Sensibilidade =  $a/a + c$ .

A especificidade para cada metodologia de enriquecimento seletivo foi calculada através do número de amostras negativas para *Salmonella* sp., que não foram detectadas pelo método em questão e nenhum outro (d), nos meios sólidos seletivos, dividido pelo somatório de todas as amostras negativas (b + d), ou seja, aquelas

amostras que nenhuma metodologia detectou *Salmonella* sp., somado ao número de amostras que apresentaram colônias suspeitas de *Salmonella* sp., mas não foram confirmadas (falso-positivos). Especificidade =  $d/b + d$ .

### 3.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste MacNemar (GRAPHPAD..., 1990-1993), com nível de significância  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Contaminação artificial de amostras de fezes de suínos**

Nesta primeira fase, todos os 48 tubos inoculados a partir do tratamento controle, isto é, sem a contaminação com *Salmonella* sp., foram negativos em todos os meios sólidos semeados. A contaminação das fezes com 1 ou 2 UFC/g para todos os sorotipos de *Salmonella* testados não apresentou diferença entre si na recuperação, quando considerado um mesmo método de enriquecimento seletivo, desta forma os resultados foram analisados em conjunto. Os caldos comparados nesta fase, antes e após a incubação, estão representados nas Figuras 4 e 5.

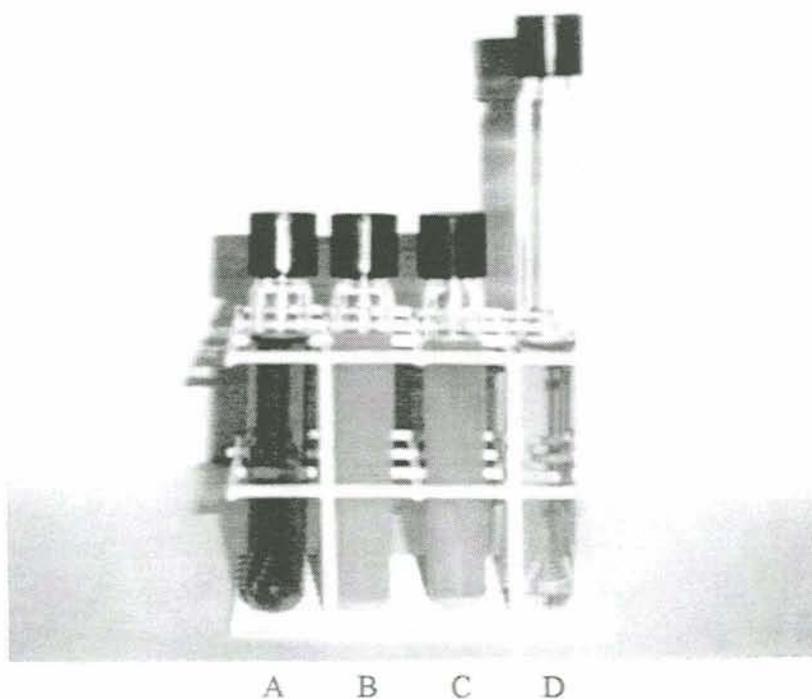


FIGURA 4. Tubos<sup>a</sup> contendo caldos de enriquecimento seletivo para detecção de *Salmonella* sp. sem inóculo.

<sup>a</sup> A, caldo Rappaport-Vassiliadis; B e C, caldo Tetrionato Müller-Kauffmann; D, caldo Selenito Cistina.

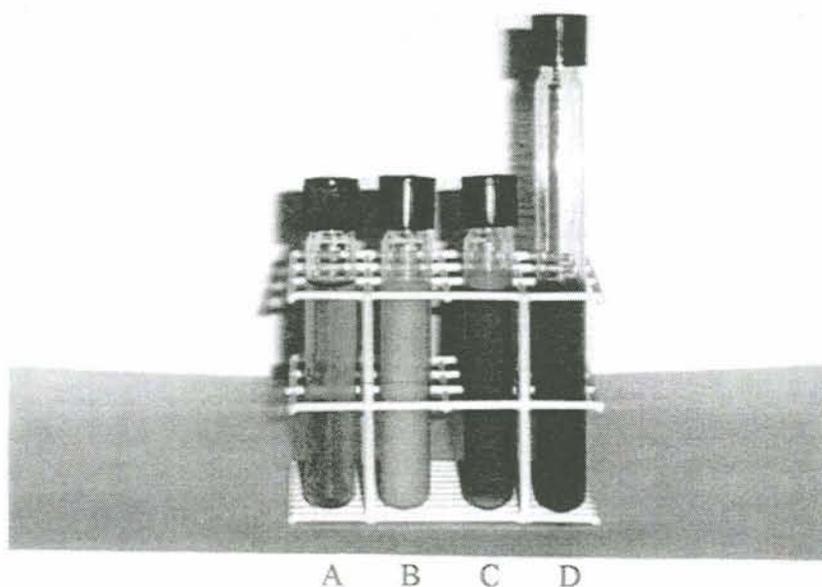


FIGURA 5. Tubos<sup>a</sup> contendo caldos de enriquecimento seletivo para detecção de *Salmonella* sp., inoculados com fezes de suínos e após o período de incubação.

<sup>a</sup> A, caldo Rappaport-Vassiliadis e B, caldo Tetrionato Müller-Kauffmann, incubados a 42°C; C, caldo Tetrionato Müller-Kauffmann e D, caldo Selenito Cistina, incubados a 37°C.

#### 4.1.1 Primeira inoculação

Neste primeiro experimento, quando comparado o número de tubos a partir dos quais em pelo menos uma placa semeada na etapa subsequente foi possível o isolamento de colônias de *Salmonella*, observa-se que todos os caldos apresentaram uma boa reprodutibilidade na recuperação da mistura de sorotipos de campo ("Pool"). Já para os sorotipos Enteritidis e Typhimurium, o caldo SC não propiciou o isolamento a partir de nenhum dos tubos inoculados (Anexo 9). No entanto, a diferença observada no desempenho do caldo SC em relação aos demais não pode ser estatisticamente assegurada ( $p > 0,05$ ) para nenhum dos sorotipos, como mostra a Tabela 4.

TABELA 4. Comparação da eficiência na recuperação de diferentes sorotipos de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos contaminadas artificialmente, através de quatro enriquecimentos seletivos<sup>a</sup>, de acordo com o número de tubos positivos.

Sorotipo	Nº de tubos inoculados	RV	Nº de tubos positivos		
			TMK42	SC	TMK37
<i>S. Enteritidis</i>	6	5	6	0	6
<i>S. Typhimurium</i>	6	6	6	0	6
"Pool" <sup>b</sup>	6	6	6	5	6

<sup>a</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>b</sup> *Salmonella* sp., *S. Bredeney* e *S. Derby*.

Quando comparados com o número de placas onde houve o isolamento de colônias características de *Salmonella* sp., os caldos RV, TMK42 e TMK37 apresentaram produtividade significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que o SC. Por outro lado, não foi observada diferença significativa na capacidade de recuperação daqueles caldos entre si. O caldo TMK42 obteve os melhores resultados, com todos os sorotipos. Para o sorotipo Enteritidis este caldo foi significativamente superior ao SC e ao TMK37, o que não foi observado em relação ao RV ( $p = 0,07$ ). De forma geral, este

sorotipo foi recuperado em um menor número de placas, quando estas foram semeadas a partir de enriquecimentos incubados a 37°C (Tabela 5).

TABELA 5. Comparação da eficiência na recuperação de diferentes sorotipos de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos contaminadas artificialmente através de quatro enriquecimentos seletivos <sup>a</sup>, de acordo com o número de placas positivas.

Sorotipo	Nº de placas Semeadas	Nº de placas positivas			
		RV	TMK42	SC	TMK37
<i>S. Enteritidis</i>	18	10 <sup>c</sup>	17 <sup>c,e</sup>	0 <sup>d</sup>	7 <sup>c,f</sup>
<i>S. Typhimurium</i>	18	18 <sup>g</sup>	17 <sup>g</sup>	0 <sup>h</sup>	14 <sup>g</sup>
“Pool” <sup>b</sup>	18	18 <sup>g</sup>	18 <sup>g</sup>	5 <sup>h</sup>	13 <sup>g</sup>

<sup>a</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>b</sup> *Salmonella* sp., *S. Bredeney* e *S. Derby*.

<sup>c, d ou e, f</sup> letras diferentes na mesma linha indicam diferenças com p<0,05.

<sup>g, h</sup> letras diferentes na mesma linha indicam diferenças com p<0,002.

Comparando os meios sólidos (Figura 6), com relação à recuperação de *Salmonella* (Tabela 6), o ágar XLT4 apresentou um bom desempenho no isolamento de todos os sorotipos a partir dos caldos RV, TMK42 e TMK37, sendo o único a recuperar os sorotipos de campo a partir do SC. O ágar RA apresentou o seu melhor desempenho a partir do caldo TMK42, recuperando todos os sorotipos. Com o caldo SC o ágar RA não permitiu o isolamento de nenhum dos sorotipos.

O ágar VB apresentou resultados semelhantes ao XLT4, para todos os sorotipos, quando semeado a partir dos caldos RV e TMK42. Obteve um menor desempenho com o TMK37 e, como o RA, não permitiu o isolamento de nenhum sorotipo a partir do SC. Neste ágar não foi possível recuperar o sorotipo Enteritidis, quando semeado a partir dos caldos RV e TMK37, além do SC. Estas diferenças, no entanto, não foram estatisticamente significativas (p>0,05).

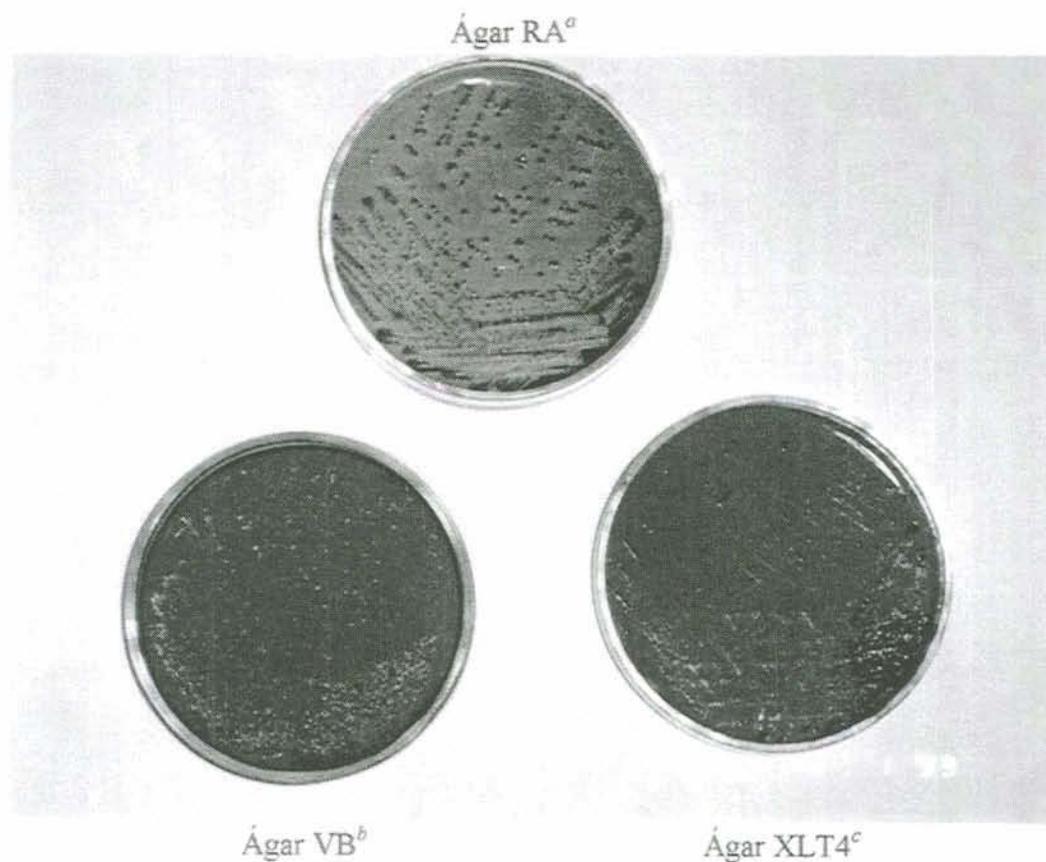


FIGURA 6. Placas contendo meios sólidos seletivos<sup>a, b, c</sup> com crescimento de colônias típicas de *Salmonella* sp., praticamente como cultura pura, semeados a partir do caldo TMK42 inoculado com fezes de suínos de terminação contaminadas artificialmente com o "Pool".

<sup>a</sup> Ágar Rambach com colônias vermelhas típicas de *Salmonella* sp. e colônias verde-azuladas típicas de microrganismos lactose positivos.

<sup>b</sup> Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose com colônias rosa forte típicas de *Salmonella* sp.

<sup>c</sup> Ágar Xilose Lisina Tergitol 4 com colônias pretas típicas de *Salmonella* sp.

TABELA 6. Comparação de três meios seletivos sólidos <sup>a</sup> semeados com alíquotas do mesmo caldo de enriquecimento <sup>c</sup> na recuperação de diferentes sorotipos de *Salmonella* sp.

Sorotipo	Nº de Placas <sup>b</sup>	RV			TMK42			SC			TMK37		
		X	R	V	X	R	V	X	R	V	X	R	V
<i>S. Enteritidis</i>	6	5	0	5	6	6	5	0	0	0	6	0	1
<i>S. Typhimurium</i>	6	6	6	6	6	5	6	0	0	0	6	3	5
“Pool” <sup>d</sup>	6	6	6	6	6	6	6	5	0	0	6	6	1

<sup>a</sup> X (XLT4), Xilose Lisina Tergitol 4; R (RA), Rambach; V (VB), Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> Número de placas semeadas em cada metodologia de enriquecimento.

<sup>c</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>d</sup> *Salmonella* sp., *S. Bredeney* e *S. Derby*.

Nas placas de RA semeadas a partir dos caldos RV e principalmente do TMK37, havia grande quantidade de colônias verde-azuladas (lactose positivas). Em muitas placas do ágar VB, principalmente quando semeadas a partir do TMK37 e do SC, o número de colônias isoladas era reduzido, dificultando a avaliação das características das colônias. O caldo SC permitiu um elevado crescimento de colônias lactose positivas, o que interferia na observação da coloração das colônias lactose negativas, características dos sorotipos utilizados neste experimento.

Com o ágar VB, principalmente a partir do TMK37, houve também o crescimento em véu de *Proteus* sp. Este ágar também foi o que permitiu um maior número de colônias falso-positivas, principalmente no isolamento de *S. Enteritidis* (49%), seguido do “Pool” (28,3%) e *S. Typhimurium* (12,3%). O ágar XLT4 possibilitou um maior isolamento dos sorotipos que o RA e o VB e, da mesma forma que o RA, não apresentou colônias falso-positivas (Tabela 7).

TABELA 7. Eficiência de três meios sólidos<sup>a</sup> no isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos artificialmente contaminadas.

Meio sólido	Sorotipo	N° de colônias suspeitas	N° de colônias confirmadas		N° de colônias falso-positivas	
			n	%	n	%
XLT4	<i>S. Enteritidis</i>	51	51	100	0	0
	<i>S. Typhimurium</i>	54	54	100	0	0
	"Pool" <sup>b</sup>	61	61	100	0	0
RA	<i>S. Enteritidis</i>	18	18	100	0	0
	<i>S. Typhimurium</i>	42	42	100	0	0
	"Pool"	54	54	100	0	0
VB	<i>S. Enteritidis</i>	53	27	51	26	49
	<i>S. Typhimurium</i>	57	50	87,7	7	12,3
	"Pool"	46	33	71,7	13	28,3

<sup>a</sup> XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; RA, Rambach; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> *Salmonella* sp., *S. Bredeney* e *S. Derby*.

#### 4.1.2 Segunda inoculação

Os resultados da contaminação artificial das fezes coletadas na segunda propriedade foram prejudicados devido ao tratamento com antimicrobianos que os animais estavam sendo submetidos. Neste experimento foi possível recuperar apenas os sorotipos do "Pool" através do caldo RV, de um tubo na contaminação com 1 UFC/g e outro com 2 UFC/g, os quais permitiram o isolamento de colônias características em todos os meios sólidos seletivos (Anexo 10). Todas as colônias suspeitas isoladas, foram confirmadas como *Salmonella* sp.

#### 4.1.3 Terceira inoculação

Neste terceiro experimento, também o sorotipo Enteritidis foi que o apresentou um menor isolamento de colônias características. Os sorotipos Typhimurium e do "Pool" foram isolados a partir de todos os tubos. O caldo TMK37



foi o que apresentou os melhores resultados (Anexo 11). Esta diferença de isolamento, no entanto, não foi estatisticamente significativa (Tabela 8).

TABELA 8. Comparação da eficiência na recuperação de diferentes sorotipos de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos contaminadas artificialmente através de quatro enriquecimentos seletivos<sup>a</sup>, de acordo com o número de tubos positivos.

Sorotipo	Nº de tubos inoculados	Nº de tubos positivos			
		RV	TMK42	SC	TMK37
<i>S. Enteritidis</i>	6	1	0	2	4
<i>S. Typhimurium</i>	6	6	6	6	6
“Pool” <sup>b</sup>	6	6	6	6	6

<sup>a</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>b</sup> *Salmonella* sp., *S. Bredeney* e *S. Derby*.

O sorotipo Enteritidis foi isolado em um pequeno número de placas, e em apenas um dos três meios sólidos inoculados a partir de cada tubo de enriquecimento seletivo. Diferentemente da primeira inoculação, o caldo TMK37 permitiu o melhor isolamento deste sorotipo, seguido do SC e RV. Ao contrário, a *S. Typhimurium* foi isolada de praticamente todos os meios e o “Pool” foi recuperado em todas as placas inoculadas com os caldos RV, TMK42 e TMK37. A partir do SC a recuperação foi significativamente menor para os sorotipos de campo (Tabela 9).

TABELA 9. Comparação da eficiência na recuperação de diferentes sorotipos de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos contaminadas artificialmente através de quatro enriquecimentos seletivos<sup>a</sup>, de acordo com o número de placas positivas.

Sorotipo	Nº de placas semeadas	RV	Nº de placas positivas		
			TMK42	SC	TMK37
<i>S. Enteritidis</i>	18	1	0	2	4
<i>S. Typhimurium</i>	18	17	17	18	17
“Pool” <sup>b</sup>	18	18 <sup>c</sup>	18 <sup>c</sup>	8 <sup>d</sup>	18 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>b</sup> *Salmonella* sp., *S. Bredeney* e *S. Derby*.

<sup>c, d</sup> letras diferentes na mesma linha indicam diferenças com  $p < 0,03$ .

O sorotipo Enteritidis, a partir do caldo RV, foi isolado em apenas uma placa de VB, e em 2 placas de XLT4, quando semeado com alíquotas retiradas do caldo SC. Para este sorotipo, o caldo TMK37 foi o que permitiu o isolamento em um número maior de placas. O ágar RA não permitiu o isolamento deste sorotipo.

A *S. Typhimurium* foi recuperada em quase todas as placas de todos os meios sólidos a partir de todos os caldos, o mesmo ocorrendo para o “Pool”, exceção feita ao caldo SC, que não permitiu o isolamento do “Pool” no RA. As diferenças observadas na recuperação de *Salmonella* sp. entre os meios sólidos semeados a partir dos mesmos caldos, não foram significativas para quaisquer dos sorotipos estudados (Tabela 10).

TABELA 10. Comparação de três meios seletivos sólidos<sup>a</sup> semeados com alíquotas do mesmo caldo de enriquecimento<sup>c</sup> na recuperação de diferentes sorotipos de *Salmonella* sp.

Sorotipo	Nº de placas <sup>b</sup>	RV			TMK42			SC			TMK37		
		X	R	V	X	R	V	X	R	V	X	R	V
<i>S. Enteritidis</i>	6	0	0	1	0	0	0	2	0	0	3	0	1
<i>S. Typhimurium</i>	6	6	6	5	6	6	5	6	6	6	6	6	5
“Pool” <sup>d</sup>	6	6	6	6	6	6	6	5	0	3	6	6	5

<sup>a</sup> X (XLT4), Xilose Lisina Tergitol 4; R (RA), Rambach; V (VB), Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> Número de placas semeadas em cada metodologia de enriquecimento.

<sup>c</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37, Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>d</sup> *Salmonella* sp., *S. Bredeney* e *S. Derby*.

Colônias falso-positivas foram observadas apenas a partir do ágar RA (1) e do VB (6). Comparando o número de colônias falso-positivas isoladas do ágar VB, no primeiro e no terceiro experimentos, observou-se uma redução das mesmas. Com o sorotipo Enteritidis houve uma considerável redução no número de colônias suspeitas isoladas no terceiro experimento (49 colônias isoladas a menos). O número de falso-positivos, no entanto, praticamente manteve-se no mesmo nível do primeiro experimento, respectivamente, 50% e 49%. Já com os sorotipos do “Pool” houve um acréscimo na quantidade de colônias suspeitas e redução no número de falso-positivas, anteriormente de 28,3%, para 9,8% (Tabela 11).

TABELA 11. Eficiência de três meios sólidos <sup>a</sup> no isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos artificialmente contaminadas.

Meio sólido	Sorotipo	N° de colônias suspeitas	N° de colônias confirmadas		N° de colônias falso-positivas	
			n	%	n	%
XLT4	<i>S. Enteritidis</i>	5	5	100	0	0
	<i>S. Typhimurium</i>	69	69	100	0	0
	“Pool” <sup>b</sup>	64	64	100	0	0
RA	<i>S. Enteritidis</i>	0	0	0	0	0
	<i>S. Typhimurium</i>	72	72	100	0	0
	“Pool”	54	53	98,1	1	1,9
VB	<i>S. Enteritidis</i>	4	2	50	2	50
	<i>S. Typhimurium</i>	54	54	100	0	0
	“Pool”	61	55	90,2	6	9,8

<sup>a</sup> XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; RA, Rambach; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> *Salmonella* sp., *S. Bredeney* e *S. Derby*.

#### 4.2 Amostras de fezes naturalmente contaminadas

Na coleta realizada na primeira visita 53 animais (50,4%) foram positivos. Em todas as 21 baias coletadas pelo menos um animal era positivo. Em uma baia todos os 5 animais coletados excretavam *Salmonella* sp. nas fezes. Nas fezes de lote, o microrganismo foi detectado em 14 das 21 baias coletadas. A amostra de ração também foi positiva para *Salmonella* sp.

Na segunda coleta, 7 animais (6,6%) foram positivos. Apenas 6 baias apresentaram animais com *Salmonella* sp. nas fezes. Nesta coleta não foi possível detectar *Salmonella* sp. nas fezes de lote e na ração.

No processamento das amostras todos os tubos de controle (6) inoculados com o pré-enriquecimento, contaminado com *Salmonella* Typhimurium, foram positivos em todos os meios sólidos semeados. Com relação aos caldos, na primeira coleta, o TMK42 foi significativamente superior ( $p < 0,0001$ ) ao RV e TMK37 (Anexo

12). No entanto, na segunda coleta, o caldo TMK42 e RV foram superior ao TMK37 (Anexo 13), mas apenas o desempenho do TMK42 apresentou diferença significativa com relação ao TMK37 (Tabela 12).

TABELA 12. Eficiência na recuperação de *Salmonella* sp. através de três enriquecimentos seletivos <sup>a</sup>, de acordo com o número de placas positivas.

Coleta	Placas semeadas	RV	TMK42	TMK37
1°	252	36 <sup>b</sup>	90 <sup>c</sup>	30 <sup>b</sup>
2°	252	10	12 <sup>d</sup>	5 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C.

<sup>b, c</sup> letras diferentes na mesma linha indicam diferença com  $p < 0,0001$ .

<sup>d, e</sup> letras diferentes na mesma linha indicam diferença com  $p < 0,05$ .

Nas duas coletas realizadas, a recuperação de *Salmonella* sp. nos meios seletivos XLT4 e VB, semeados a partir dos caldos RV e TMK42, não apresentou diferença significativa. Sendo que, somente na primeira coleta, o ágar XLT4 foi significativamente superior ( $p=0.006$ ) ao VB, quando ambos foram semeados a partir do caldo TMK37 (Tabela 13).

TABELA 13. Comparação de dois meios sólidos seletivos<sup>a</sup> semeados com alíquotas do mesmo caldo de enriquecimento<sup>b</sup> na recuperação de *Salmonella* sp.

Coleta	Placas semeadas	RV		TMK42		TMK37	
		XLT4	VB	XLT4	VB	XLT4	VB
1°	126	19	17	49 <sup>d</sup>	41 <sup>e</sup>	21 <sup>f</sup>	9 <sup>g</sup>
2°	126	5	5	6	6	3	2

<sup>a</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C.

<sup>b</sup> XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>d, e</sup> letras diferentes na mesma linha indicam diferença com  $p=0,0771$ .

<sup>f, g</sup> letras diferentes na mesma linha indicam diferença com  $p=0,006$ .

Com relação à sensibilidade dos caldos, na primeira coleta o caldo TMK42 apresentou a maior sensibilidade, tanto na combinação com o ágar XLT4 como com o VB. O RV e TMK37 apresentaram resultados semelhantes no ágar XLT4, mas a associação RV/VB foi muito superior à associação TMK37/VB. Já na segunda coleta não houve maiores diferenças entre os caldos RV e TMK42, mas ambos apresentaram uma maior sensibilidade que o caldo TMK37 em qualquer das associações com os meios sólidos (Tabela 14).

TABELA 14. Sensibilidade de três métodos de enriquecimento seletivo<sup>a</sup>, em associação a dois meios sólidos seletivos<sup>b</sup> no isolamento de *Salmonella* sp.

Coleta	RV		TMK42		TMK37	
	XLT4	VB	XLT4	VB	XLT4	VB
1°	36	32	92	81	40	17
2°	71	71	86	86	43	29

<sup>a</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C.

<sup>b</sup> XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

Na primeira coleta, a metodologia de enriquecimento com caldo RV apresentou maior especificidade, enquanto o TMK42 e o TMK37 foram menos específicos na associação com o ágar VB. Na segunda coleta os resultados foram

semelhantes para todas as associações testadas (Tabela 15).

TABELA 15. Especificidade de três métodos de enriquecimento seletivo<sup>a</sup>, em associação a dois meios sólidos seletivos<sup>b</sup>, no isolamento de *Salmonella* sp.

Coleta	RV		TMK42		TMK37	
	XLT4	VB	XLT4	VB	XLT4	VB
1°	100	100	98	87	96	91
2°	100	99	100	100	100	97

<sup>a</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C.

<sup>b</sup> XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose

O ágar XLT4, na primeira coleta, apresentou um desempenho superior ao VB, resultando em um menor número de colônias falso-positivas. Na segunda coleta não houve o isolamento de colônias falso-positivas no XLT4 (Tabela 16).

TABELA 16. Eficiência de dois meios sólidos<sup>a</sup> no isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos naturalmente contaminadas.

Coleta	Meio sólido	N° de colônias suspeitas	N° de colônias confirmadas		N° de colônias falso-positivas	
			n	%	n	%
1°	XLT4	252	241	95,6	11	4,4
	VB	220	186	84,5	34	15,5
2°	XLT4	40	40	100	0	0
	VB	44	34	77,3	10	22,7

<sup>a</sup> XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

Nenhuma das colônias atípicas isoladas a partir dos meios sólidos seletivos, nas duas coletas, foram confirmadas como *Salmonella*, sendo que todas as colônias típicas que foram confirmadas como *Salmonella* apresentaram resultados característicos nos testes TSI e LIA. Devido ao número de colônias confirmadas como *Salmonella* (652), através de triagem bioquímica e sorologia, apenas algumas foram

enviadas ao Instituto Oswaldo Cruz para serem sorotipadas (Tabela 17).

TABELA 17. Total de colônias de *Salmonella* sp. isoladas a partir dos diferentes materiais coletados<sup>a</sup> e o número de colônias enviadas para sorotipagem.

Coleta	Material	Total de colônias	Colônias sorotipadas
Triagem	Fezes de lote	23	3
1°	Fezes individuais	427	33
	Fezes de lote	112	5
	Ração	16	3
2°	Fezes individuais	74	6
Total		652	50

<sup>a</sup> Fezes de lote, fezes individuais e ração.

As amostras enviadas demonstraram pertencer a 15 sorotipos diferentes, os quais estão distribuídos em 6 sorogrupos. Da coleta de triagem todas as colônias selecionadas pertenciam ao sorotipo Rissen. Na primeira coleta, foram identificados os sorotipo Mbandaka e Tennessee da ração, os quais foram encontrados nas fezes coletadas individualmente, e nas fezes de lote (sorotipo Mbandaka). Nenhum destes foi identificado na segunda coleta. Por outro lado, os sorotipos Cerro, Heidelberg, Montevideo e Typhimurium foram encontrados nas fezes de animais na primeira e na segunda coleta (Tabela 18).

TABELA 18. Sorogrupos e sorotipos de *Salmonella* sp. isolados em três diferentes coletas, a partir de ração, fezes de lote e individualmente coletadas de suínos durante 3 visitas realizadas em uma propriedade de terminação.

Sorogrupo	Sorotipo	Coleta						
		T <sup>a</sup> FL <sup>b</sup>	R <sup>c</sup>	1 FI <sup>d</sup>	FL	R	2 FI	FL
c	<i>S. Agona</i>	0	0	1	0	0	0	0
	<i>S. Heidelberg</i>	0	0	1	0	0	1	0
	<i>S. sp.</i>	0	0	0	0	0	1	0
	<i>S. Typhimurium</i>	0	0	4	1	0	2	0
C <sub>1</sub>	<i>S. Infantis</i>	0	0	1	0	0	0	0
	<i>S. Mbandaka</i>	0	2	4	2	0	0	0
	<i>S. Montevideo</i>	0	0	2	0	0	1	0
	<i>S. Rissen</i>	3	0	4	0	0	0	0
	<i>S. Tennessee</i>	0	1	5	0	0	0	0
E <sub>1</sub>	<i>S. Anatum</i>	0	0	2	2	0	0	0
	<i>S. Lexington</i>	0	0	1	0	0	0	0
	<i>S. Orion</i>	0	0	2	0	0	0	0
G <sub>2</sub>	<i>S. Grupensis</i>	0	0	3	0	0	0	0
K	<i>S. Cerro</i>	0	0	2	0	0	1	0
L	<i>S. Minnesota</i>	0	0	1	0	0	0	0

<sup>a</sup> Triagem; <sup>b</sup> Fezes de lote; <sup>c</sup> Ração; <sup>d</sup> Fezes coletadas individualmente.

## 5. DISCUSSÃO

O maior risco de contaminação da carne suína por *Salmonella* sp. está associado com a infecção subclínica dos animais. Na maioria das investigações epidemiológicas, a cultura microbiológica tem sido usada para determinar o nível de infecção com *Salmonella* sp. em granjas de suínos e/ou em frigoríficos. Entretanto, a detecção de *Salmonella* sp., através de métodos culturais, em suínos com infecção subclínica é altamente influenciada pela excreção intermitente do microrganismo por estes animais, bem como o tipo e volume da amostra, além do protocolo seguido no exame cultural (Kim et al., 1999a).

O isolamento do patógeno, através de métodos sensíveis e específicos, que permitam estimar o nível real de infecção dos rebanhos, é de grande importância para o entendimento da epidemiologia da infecção por *Salmonella* sp. e para o desenvolvimento de estratégias de controle apropriadas (Nielsen & Baggesen, 1997; Kim et al., 1999b).

Para estimar o nível de infecção dos rebanhos nas granjas, normalmente as amostras coletadas limitam-se às fezes (Kim et al., 1999b). No entanto, entre os diferentes estudos ocorrem variações no volume de amostra coletado e na metodologia de isolamento (Funk et al., 1997; Nielsen & Baggesen, 1997). Nielsen & Baggesen (1997) consideram ainda, que alguns estudos avaliam a sensibilidade dos métodos apenas com amostras artificialmente contaminadas, o que, para os autores, dificulta a

comparação das metodologias, pois através deste tipo de amostras a facilidade em isolar *Salmonella* sp. pode ser maior do que em amostras naturalmente contaminadas.

Estas considerações determinaram que este estudo fosse realizado em duas fases, uma primeira com contaminação artificial das amostras e uma segunda com o isolamento de *Salmonella* sp. em amostras naturalmente contaminadas. Nestas duas fases foram comparadas metodologias de enriquecimento seletivo, etapa na qual deve ocorrer a inibição da microbiota competitiva e a multiplicação de *Salmonella* sp. até níveis em que o patógeno possa ser detectado (June et al., 1995).

Com a primeira fase buscou-se avaliar a capacidade das metodologias para o isolamento de *Salmonella* sp., através da recuperação de sorotipos com características fenotípicas conhecidas, a partir de alíquotas de fezes artificialmente contaminadas. Os resultados obtidos nesta fase serviram também para selecionar metodologias de enriquecimento seletivo e meios sólidos, os quais seriam então utilizados na segunda fase. Nesta, avaliou-se a sensibilidade e especificidade das metodologias no isolamento do patógeno, a partir de amostras naturalmente contaminadas, onde fatores como estresse dos microrganismos excretados (Beckers et al., 1987), variações fenotípicas das colônias (Moriñigo et al., 1989) e intermitência de excreção pelos animais (Bager & Petersen, 1991; Nielsen & Baggesen, 1997) estavam influenciando o desempenho das mesmas.

### **5.1. Contaminação artificial**

Busse (1995) considera que o isolamento de *Salmonella* sp., de certa forma, é propenso ao fracasso. O microrganismo pode não ser detectado por problemas já na amostragem e que, mesmo em amostras contaminadas artificialmente com *Salmonella* sp., esta pode não ser isolada, devido a problemas no enriquecimento seletivo. Observações como esta, determinaram que o presente estudo tivesse uma etapa inicial

de contaminação artificial das amostras de fezes.

### 5.1.1 Primeira inoculação

Nesta primeira contaminação artificial das amostras pode-se observar uma maior diferença no desempenho das metodologias no isolamento do sorotipo Enteritidis, no qual o caldo TMK42 apresentou o melhor desempenho. Este sorotipo foi recuperado em um menor número de placas, quando estas foram semeadas a partir de caldos incubados a 37°C. Isto pode ter ocorrido devido ao sorotipo Enteritidis não ter alcançado uma população mais elevada que os microrganismos competidores, o que dificultou o isolamento de colônias nos meios sólidos. Este mesmo sorotipo em temperaturas mais elevadas como TMK42, ao contrário, só não pode ser isolado em uma placa.

Para Rhodes et al. (1985) temperaturas de incubação mais elevadas inibem a microbiota competidora. Desta forma, na incubação a 42°C do caldo TMK, o número de *S. Enteritidis* teria excedido o de competidores, permitindo seu isolamento. Ao contrário, o TMK37 apresentou um grande número de placas com crescimento de outros microrganismos. O caldo RV, mesmo incubado a 42°C não obteve o mesmo desempenho que o TMK42, o que pode indicar uma maior sensibilidade da linhagem utilizada aos agentes seletivos do RV, uma vez que as placas semeadas a partir deste caldo não apresentaram elevado crescimento de competidores que pudessem dificultar a visualização e o isolamento de colônias típicas de *Salmonella* sp.

Pignato et al. (1995) também observaram diferenças na recuperação de alguns sorotipos, o que para os autores seria devido a uma variação na sensibilidade destes aos inibidores dos diferentes caldos seletivos. Bager & Petersen (1991) ao avaliarem a recuperação dos sorotipos com relação ao caldo de enriquecimento, no

entanto, não constataram uma menor recuperação de *S. Enteritidis* através do RV, mas sim do sorotipo Give. Obtiveram também uma menor recuperação de *S. Typhimurium* a partir do TMK, apenas quando este era incubado a 43°C.

No presente estudo, o caldo SC não permitiu o isolamento dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium, talvez devido a uma maior suscetibilidade destas amostras provenientes de uma coleção de culturas aos efeitos tóxicos do caldo SC, em comparação com as amostras de campo presentes no "Pool".

Para Van Schothorst et al. (1977) não haveria a sensibilidade de alguns sorotipos específicos ao agente seletivo do meio. Neste estudo foi avaliada a eficiência do caldo tetracionato bile verde brilhante na recuperação de *Salmonella* sp., não sendo evidenciada uma maior sensibilidade de determinado sorotipo ao tetracionato. Segundo os autores, é possível que, dentro de qualquer população, um número de células apresente sensibilidade ao agente seletivo. Desta forma, uma linhagem seria considerada sensível, quando apresentasse um elevado número de células sensíveis. A partir disto, os autores defendem o uso do pré-enriquecimento, pois com a inoculação de um maior número de células de *Salmonella* sp. no caldo seletivo, maior seria a probabilidade de se ter células menos sensíveis.

Para os outros sorotipos testados neste experimento, os caldos SC e o TMK37 demonstraram uma menor produtividade em comparação aos caldos RV e TMK42. No entanto, nos níveis de contaminação testados (1 e 2 UFC/g), para a *S. Typhimurium* e para o "Pool", não foi possível observar diferenças significativas entre os caldos RV, TMK42 e TMK37, apenas destes com relação ao caldo SC. Talvez fosse possível evidenciar uma maior diferença através de níveis de contaminação menores. A favor desta hipótese, Pignato et al. (1995) obtiveram o isolamento de *S. Enteritidis* em carnes contaminadas com até 0,4 UFC/g de amostra através do TMK incubado a 43°C

e não através do SC incubado a 37°C.

Para Beckers et al. (1987), em amostras contaminadas com *Salmonella* sp., o microrganismo poderá ou não ser detectado, dependendo das interações entre as células de *Salmonella* sp. e os microrganismos competidores. O que poderia justificar a discordância existente entre os autores.

June et al. (1995), em experimento com diferentes alimentos artificial e naturalmente contaminados, obtiveram resultados variados quanto à produtividade dos caldos seletivos, bem como das temperaturas de incubação. De modo geral, o caldo RV preparado a partir de ingredientes individuais foi superior aos caldos SC e Tetrionato Bile Verde Brilhante (incubados a 35°C), e ao RV disponível comercialmente.

A grande maioria dos experimentos que compararam a eficiência de etapas de enriquecimento seletivos, são realizados através da avaliação da frequência de isolamentos, e não da cinética que ocorre no processo de enriquecimento seletivo. Rhodes et al. (1985) desenvolveram um método para avaliar a cinética de crescimento de uma cultura mista em meios de enriquecimento de *Salmonella* sp. Este método seria uma forma de estudo e quantificação dos efeitos resultantes da variação do meio ou das condições de crescimento, sem que se realize uma comparação em larga escala da frequência de isolamento. No entanto, neste tipo de experimento, em que a contaminação é feita diretamente nos caldos seletivos, características próprias de uma amostra como: presença de outros competidores (Sharma & Parker, 1969; Van Schothorst et al., 1977; June et al., 1995) e matéria orgânica (MÜLLER..., 1987; SELENITE..., 1987), as quais podem influenciar na detecção de *Salmonella* sp., são desconsideradas.

Sharma & Parker (1969) compararam o isolamento de *Salmonella* Choleraesuis a partir de fezes contaminadas com o microrganismo, que haviam sido previamente autoclavadas e sem este tratamento. Os autores observaram uma redução

na detecção de *Salmonella Choleraesuis* nas amostras de fezes que não haviam sido autoclavadas, ou seja, onde havia a presença de uma microbiota.

Van Schothorst et al. (1977) também consideram que a microbiota competitiva pode influenciar na multiplicação da *Salmonella* sp. Entretanto, estes autores observaram que em cultura pura o crescimento de *Salmonella* sp. era inferior ao de cultura mista (presença de *Enterobacter* sp. ou de *Citrobacter* sp.), sugerindo uma possível diminuição da toxicidade do caldo através dos competidores presentes. Os autores consideram, ainda, que com a inoculação de um número elevado (aproximadamente  $10^3$  UFC) de *Salmonella* sp., esta poderá ser isolada independentemente da presença de competidores.

No presente estudo nenhum dos meios sólidos seletivos testados, quando semeados com alíquotas a partir do mesmo caldo de enriquecimento seletivo, apresentou diferença acentuada na recuperação de *Salmonella* sp. Isto demonstra que as condições de isolamento do microrganismo é mais dependente do desempenho da etapa de enriquecimento do que do próprio meio sólido, observação também feita por Sherrod et al. (1995).

No entanto, o ágar XLT4 foi superior aos demais meios testados. Isto deve-se tanto à maior inibição dos competidores que este ágar apresentou, quanto ao seu sistema indicador ter sido mais eficiente. Desta forma, o ágar XLT4 permitiu melhores condições para o isolamento de colônias típicas de *Salmonella* sp. do que os outros meios testados, como o ágar RA e VB.

O ágar RA demonstrou ser mais eficiente quando associado ao caldo TMK42, já com o caldo SC não permitiu o isolamento de nenhum dos sorotipos. Como o ágar RA está entre os meios sólidos que apresentam baixa seletividade (Busse, 1995), estes resultados também são indicativos de que, quando um meio sólido é semeado a partir de um enriquecimento com maior seletividade, como o TMK42 demonstrou ser

neste estudo, maior será a probabilidade de isolamento de *Salmonella* sp. (Sherrod et al., 1995).

Nas placas do ágar RA semeadas a partir do caldo SC inoculado com alíquotas de amostras contaminadas com *S. Enteritidis*, só houve o crescimento de microrganismos fermentadores de lactose. Nas placas de XLT4 e VB foi possível somente a visualização de colônias amarelas, também características de microrganismos lactose positivos, demonstrando desta forma, uma elevada superioridade do número destes microrganismos em relação ao de *Salmonella* sp. Em apenas uma placa da contaminação com *S. Typhimurium* e em 3 do Pool, não houve o crescimento exclusivo de colônias verde-azuladas no ágar RA, quando semeado a partir do caldo SC.

Para Beckers et al. (1987), em um experimento no qual realizaram contaminação artificial de carne com *Salmonella* sp., os microrganismos competidores, lactose positivos, foram os que desempenharam uma maior influência na detecção dos microrganismos deste gênero. Com um número elevado de microrganismos lactose positivos, a detecção de *Salmonella* sp. foi menor, o que não ocorreu quando um elevado número de microrganismos lactose negativos desenvolveu-se no enriquecimento seletivo. Estas observações indicam que a competição entre os microrganismos não é apenas uma questão de número, mas também de tipo, e não somente em relação à habilidade de formar colônias semelhantes às de *Salmonella* sp. no meio sólido, mas também com a possível interação entre *Salmonella* sp. e os microrganismos competidores durante o enriquecimento seletivo (Beckers et al., 1987). Para estes autores *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp. e *Proteus* sp. desempenham importante papel como competidores, sendo *Escherichia coli* isolada somente nas amostras que *Salmonella* sp. não foi detectada.

Da mesma forma que o ágar RA, o ágar VB apresentou melhores resultados

quando semeado a partir de enriquecimentos mais seletivos. Nestas condições seu desempenho assemelhou-se ao do XLT4. No entanto, pela comparação visual das placas, o VB apresentou uma menor seletividade em relação ao XLT4 e ao RA, dificultando a avaliação das características das colônias, principalmente quando o crescimento de colônias lactose positivas era elevado. Este problema ainda era agravado quando o VB era semeado a partir de enriquecimentos menos seletivos como o TMK37 que, com frequência, permitiu o crescimento em véu de *Proteus* sp., o que pode ter impedido a visualização de colônias de *Salmonella* sp. Desta forma evidenciou-se a necessidade de que a este ágar seja adicionado um inibidor do crescimento daquele microrganismo, como o antibiótico novobiocina (Tate et al., 1990).

A estas observações soma-se o fato que o ágar VB demonstrou possuir um sistema indicador que não permite uma boa identificação e diferenciação das colônias de *Salmonella* sp. como o XLT4 e o RA. Isto foi evidenciado pelo número de colônias falso-positivas isoladas deste ágar, o que não ocorreu no XLT4 nem no RA. O que deve-se principalmente pela dificuldade em diferenciar colônias lactose negativas que não são *Salmonella* sp. daquelas deste microrganismo. Para diminuir o trabalho no laboratório, no processamento de colônias falso-positivas, alguns autores recomendam a realização do teste da oxidase com as colônias suspeitas. Desta forma, somente as oxidase negativas seguiriam para posterior confirmação (Dusch & Altwegg, 1995).

Desta forma, confundir colônias que não são do gênero *Salmonella* com colônias características destes microrganismos tanto no ágar RA como no XLT4 é um pouco mais difícil que no ágar VB, pois o sistema indicador daqueles meios permite uma melhor diferenciação das colônias.

No RA a coloração vermelha só é apresentada por colônias de *Salmonella*

sp. e linhagens de *Citrobacter freundii* que são  $\beta$ -D-galactosidase negativas, as quais também assumiriam a coloração vermelha (Pignato et al., 1995). Em estudo realizado por estes autores, de 235 colônias isoladas, com coloração vermelha característica, apenas 5 não foram confirmadas como *Salmonella* sp. e sim como *Citrobacter freundii*, que não possuíam a enzima  $\beta$ -D-galactosidase. No entanto, o ágar RA possui limitações em sua sensibilidade devido a alguns sorotipos de *Salmonella* sp. que não degradam o propilenoglicol (Rambach, 1990) ou possuem a enzima  $\beta$ -D-galactosidase (Gruenewald et al., 1991).

O ágar XLT4 permite a diferenciação das colônias de *Salmonella* sp. de outras que também são H<sub>2</sub>S positivas. Aquelas apresentam a coloração negra mais intensa, os bordos são translúcidos e, com aproximadamente 24 horas de incubação, é possível visualizar um halo vermelho na colônia caracterizando a degradação da lisina (Miller et al., 1995; XLT4...,1996). Isto não ocorre com competidores como o *Citrobacter* sp., que normalmente não produzem colônias pretas com 24 horas de incubação. Neste ágar, colônias atípicas de *Salmonella* sp., não produtoras de H<sub>2</sub>S, apresentam-se com coloração rósea podendo ser diferenciadas de outras bactérias (lactose positiva) que apresentam coloração amarela (Miller et al., 1995).

No presente estudo, as placas dos 3 meios seletivos permitiram um melhor isolamento quando semeadas a partir de enriquecimentos com temperaturas mais elevadas. O que também foi obtido por Dusch & Altwegg (1995), que isolaram um menor número de colônias falso-positivas quando as amostras de fezes foram enriquecidas em caldos incubados a 42°C ao invés de 37°C. Os autores consideram que esta temperatura mais elevada melhora a recuperação dos sorotipos não tifóides. Entre os meios testados, o ágar XLT4 e especialmente o Rappaport-Vassiliadis semi-sólido modificado (SMRV) demonstraram ser excelentes no isolamento de sorotipos de não

tifóides, a partir de amostras de fezes.

Sherrod et al. (1995) também encontraram um menor número de falso-positivos e principalmente de falso-negativos quando os meios sólidos testados foram semeados a partir de caldos incubados a temperaturas mais elevadas. Para os autores isto foi devido a um menor crescimento da microbiota competidora nas placas. Entre os meios não houve grande diferença com relação à produtividade e o número de falso-positivos ou falso-negativos. O ágar XLT4 em alguns alimentos testados apresentou um menor número de falso-positivos que os outros meios. Os autores consideraram que na escolha de um ágar para o isolamento de *Salmonella* sp. além destes fatores como produtividade e resultados falsos, devem ser considerados outros fatores como: custo, tempo de preparo e tempo necessário para a adaptação com o meio.

Para Moriñigo et al. (1989) os meios seletivos apresentam tanto vantagens como desvantagens. No entanto os autores não recomendam o uso do ágar SS para a detecção de *Salmonella* sp., pelo baixo número do microrganismo recuperado por este meio. Obtiveram maior seletividade através dos meios Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e do VB, e melhores resultados com tempo de incubação das placas de 48 horas do que com 24 horas. Entretanto este experimento foi realizado com cultura pura de *Salmonella* sp., na ausência de microbiota competidora.

### 5.1.2 Segunda inoculação

Na segunda contaminação das amostras de fezes a avaliação do desempenho das metodologias foi prejudicada, pelo fato dos animais da propriedade coletada estarem sendo submetidos a tratamento com antimicrobianos. A permanência das amostras de *Salmonella* sp. inoculadas por 48 horas sob refrigeração em contato com as fezes onde havia antimicrobianos deve ter determinado a lesão das células destes microrganismos. Este efeito lesivo dos antimicrobianos tem sido utilizado

rotineiramente no controle de microrganismos indesejados em meios de cultivo bacteriológicos (Moriñigo et al., 1989).

O efeito tóxico dos antimicrobianos nas fezes, entretanto, não garante a sua eficiência sobre as células de *Salmonella* sp. *in vivo* ou seu efeito sobre o estado de portador dos animais. Quando presentes nos animais portadores, os microrganismos estão sujeitos a uma pressão de seleção, podendo já apresentar resistência ou adquirir pela troca de material genético com a microbiota normal, que possa ser resistente aos antibióticos usados (Finlay & Falkow, 1989; Trabulsi & Toledo, 1999). Além disso, o fato da *Salmonella* sp. ser uma bactéria intracelular facultativa, uma possível localização intracelular, impede a ação de antimicrobianos sobre as mesmas (Clarke & Gyles, 1993).

### 5.1.3 Terceira inoculação

Na terceira contaminação artificial das amostras foi novamente observada uma maior sensibilidade da *S. Enteritidis* ao enriquecimento. No entanto, os resultados não reproduziram os dados obtidos na primeira contaminação. Ao contrário dos primeiros resultados, o caldo TMK42 apresentou o pior desempenho. A *S. Enteritidis* foi melhor recuperada em caldos com temperaturas mais baixas como o TMK37 e do SC, a partir do qual anteriormente não havia sido isolada. No entanto, a produtividade dos todos os caldos nas placas foi baixa, permitindo apenas o isolamento de uma colônia em cada placa.

As diferenças na recuperação da *S. Enteritidis* pelos caldos, tanto na primeira contaminação como nesta, não foram estatisticamente asseguradas, demonstrando que com os níveis de contaminação testados (1 e 2 UFC/g) não haveria diferença entre os caldos. Se neste isolamento de *S. Enteritidis* fossem utilizados somente os meios seletivos XLT4 e RA, este sorotipo não seria detectado a partir do

caldo RV, já que deste caldo foi detectado apenas no ágar VB.

Para melhorar a recuperação da *S. Enteritidis*, talvez um tempo maior de incubação dos caldos seletivos fosse necessário, já que em ambas as contaminações a sua recuperação foi inferior aos demais sorotipos. Waltman et al. (1992) consideram que os melhores resultados na detecção de *Salmonella* sp. seriam obtidos com tempos de incubação maiores. Para estes autores, o isolamento de *Salmonella* sp. seria mais eficiente com a combinação de tempos de 24 horas com um enriquecimento secundário após o caldo ter sido mantido 5 dias a temperatura ambiente. Com esta associação de tempos foi possível a detecção de *Salmonella* sp. em 98% das amostras. Por outro lado, metodologias como esta tornariam o diagnóstico ainda mais demorado, o que inviabilizaria a sua utilização na rotina.

Para o sorotipo Typhimurium os resultados obtidos entre os caldos foram praticamente iguais entre si e, com exceção do caldo SC, também foram semelhantes ao da primeira contaminação. No entanto, mesmo que o SC apresentasse estes resultados para os demais sorotipos, ele ainda não seria o mais recomendável para o uso em rotina laboratorial, tanto por apresentar uma menor produtividade, com a recuperação de números reduzidos de colônias nos meios sólidos seletivos, como pela sua toxicidade. Este fato foi utilizado por outros autores como critério de exclusão do caldo SC (June et al., 1995).

Diferença significativa entre os caldos houve apenas com os sorotipos do "Pool", cujos resultados reproduzem os obtidos na primeira contaminação, ou seja, entre os caldos RV, TMK42 e TMK37 não haveria diferença, apenas destes com relação ao caldo SC.

Com relação à diversidade de microrganismos visualizada nas placas dos meios seletivos não houve muita diferença com relação à primeira inoculação. Onde houve uma menor recuperação de *Salmonella* sp. a diversidade também foi menor,

principalmente nas placas semeadas a partir do SC, com o crescimento predominante de colônias características de microrganismos fermentadores de lactose.

Nesta terceira inoculação, o caldo TMK37 apresentou melhores resultados que os demais caldos para os sorotipos Enteritidis e Typhimurium, o que está em desacordo com os resultados do primeiro experimento. No entanto, a superioridade deste caldo sobre os demais caldos só foi assegurada estatisticamente com relação ao SC e através das amostras contaminadas com o "Pool".

Da mesma forma que na primeira inoculação, os meios sólidos seletivos testados, quando semeados com alíquotas a partir do mesmo caldo de enriquecimento seletivo, não apresentam diferença significativa na recuperação de *Salmonella* sp. No entanto houve uma redução no número de colônias falso-positivas, provavelmente devido a uma maior familiarização com as características da colônia de *Salmonella* sp. nos meios seletivos, principalmente no caso do ágar VB.

## **5.2 Amostras de fezes de suínos naturalmente contaminadas**

Nesta fase as metodologias de enriquecimento foram avaliadas através de um maior número de amostras e na presença de diferentes sorotipos. Nielsen & Baggesen (1997) consideram que para validar comparações entre diferentes meios na detecção de *Salmonella* sp., seria necessária a utilização de um grande número de amostras, as quais deveriam ser naturalmente contaminadas.

Devido ao baixo rendimento na primeira fase e sua toxicidade, o caldo SC foi excluído desta fase. Este caldo, no entanto, já foi citado como um dos mais utilizadas no isolamento de *Salmonella* sp. em alimentos e ração (Bailey et al., 1981). Como o uso de mais de um caldo de enriquecimento aumenta as chances de isolamento de *Salmonella* sp. (Bailey et al., 1981), foram mantidos os caldos RV, TMK42 e TMK37. Inicialmente pretendia-se utilizar na segunda fase apenas duas metodologias

de enriquecimento, mas os resultados da primeira etapa não permitiram a exclusão de outro caldo além do SC. O ágar RA também não foi utilizado nesta fase, principalmente devido ao seu elevado custo.

Na primeira coleta, houve um grande número de animais positivos para *Salmonella* sp. (50,4%), podendo ter sido a ração provável e principal fonte de contaminação. Já na segunda coleta, foi possível a detecção do patógeno em um menor número de animais (6,6%) e não na ração. Esta diminuição do número de animais positivos aliado ao resultado negativo da ração pode indicar que muitos animais estavam excretando o patógeno na qualidade de portadores passivos na primeira visita ou tornaram-se portadores latentes. Muitos sorotipos são capazes de causar uma gastroenterite local, mas a persistência no hospedeiro e o predomínio de determinados sorotipos ainda não é compreendido (Lax et al., 1995).

A coleta de fezes de lote teve como objetivo uma comparação dos resultados que seriam obtidos com as fezes coletadas individualmente, no entanto como não foram coletadas amostras em diferentes pontos da baía (5x5g), não podemos traçar um comparativo confiável. Entretanto é possível relatar que, de acordo com a forma como foram coletadas (1x25g), as fezes de lote não forneceram resultados semelhantes ao de fezes individuais.

Apesar das fezes de lote serem propostas como diagnóstico de rebanhos infectados por *Salmonella* sp. (Stege et al., 1997), muitas vezes não permitem uma correta avaliação do nível de infecção dos animais. Se apenas fezes de lote houvessem sido coletadas na segunda visita, a granja teria sido considerada negativa para *Salmonella* sp. Comparando com os dados de fezes individuais, é possível constatar que existem 6% de animais excretando a bactéria, além de um número imprevisível de animais portadores latentes. Esta discrepância entre fezes de lote e presença de animais portadores já havia sido observada por Weiss et al. (1999).

De um modo geral, a comparação entre as etapas de enriquecimento, tanto entre os experimentos da primeira quanto da segunda fase, indica uma superioridade do caldo TMK incubado a 42°C, sendo que na primeira coleta da segunda fase observou-se diferença em níveis estatísticos mais significativos. O caldo RV, tanto em associação com o XLT4 como com o VB, apresentou maior especificidade nas duas coletas mas a sua sensibilidade, principalmente na primeira coleta, foi muito inferior ao TMK42, tanto que somente uma amostra foi positiva apenas para o caldo RV (Anexo 12 B).

Nenhum dos meios sólidos semeados com alíquotas do mesmo caldo de enriquecimento seletivo apresentou diferença acentuada na fase de contaminação artificial. No entanto, na primeira coleta da segunda fase, houve uma superioridade estatisticamente assegurada do XLT4 em relação ao VB, quando semeados a partir do caldo TMK37. Isto deve-se principalmente a baixa sensibilidade que a associação TMK37/VB apresentou em relação à associação TMK37/XLT4. Entretanto, a utilização do ágar VB é justificada pelo fato de aumentar a probabilidade de isolamento de *Salmonella* sp. Como na primeira fase do presente estudo, na primeira coleta desta segunda fase também houve um caso em que a amostra só pode ser considerada positiva pela detecção de *Salmonella* sp. no ágar VB a partir do caldo TMK42. Isto ocorreu com uma amostra de fezes coletada individualmente na baía 7, constituindo a única amostra positiva desta baía (Anexo 12 B). O uso em associação do ágar VB também é recomendado para o isolamento de *Salmonella* sp. atípica, produtora tardia de H<sub>2</sub>S ou não produtora (Nielsen & Baggesen, 1997).

Quando houve diferença entre as associações dos caldos seletivos testados com os meios sólidos, estas foram tanto mais sensíveis quanto específicas quando o ágar XLT4 estava presente. O ágar XLT4 permitiu melhores condições de visualização e diferenciação das colônias de *Salmonella* sp., resultando em uma maior especificidade, ou seja, um menor número de colônias falso-positivas. Desta forma, a

maior seletividade e o melhor sistema indicador do XLT4 resultaram em uma maior detecção de *Salmonella* sp., principalmente quando semeado a partir de um caldo que não permita a multiplicação das células de *Salmonella* sp. em níveis superiores aos dos competidores, como ocorreu com o TMK37.

Desta forma, a seletividade possui maior importância na etapa do enriquecimento em caldo, do que nos meios sólidos, mas estes serão decisivos quando o número de *Salmonella* sp. for baixo e a detecção do microrganismo for mais difícil. A seletividade dos meios sólidos possuía maior importância quando a metodologia de detecção de *Salmonella* sp. em amostras de fezes previa a semeadura direta nestes meios, sem a fase de enriquecimento seletivo. Por outro lado, a seletividade dos meios para detecção de *Salmonella* sp. vem diminuindo à medida que o sistema indicador é melhorado (Busse, 1995).

Para Busse (1995) a etapa de enriquecimento seletivo constitui um sistema ecológico e a competição entre *Salmonella* sp. e microbiota presente podem afetar os resultados. Desta forma, a discussão da problemática do enriquecimento seletivo não deveria basear-se apenas nos aspectos de seletividade e produtividade. O autor considera, ainda, que a dificuldade de detecção de *Salmonella* sp. pode justificar a quantidade de informações controversas com relação aos métodos de isolamento, mas não uma atitude de resignação ou desânimo com relação ao problema, devendo estimular pesquisas que permitam um maior entendimento sobre o processo de enriquecimento.

Davies et al. (1999) consideram que o emprego de diferentes metodologias de detecção de *Salmonella* sp., pelos pesquisadores, dificultam a comparação direta dos resultados. Mesmo assim, uma padronização rígida na metodologia de detecção de *Salmonella* sp. não seria prudente, já que os estudos podem apresentar diferentes objetivos e limitações.

Mesmo que o método microbiológico apresente todos estes problemas e limitações, ainda deve ser alvo de estudo (Davies et al., 1999), pois é a partir dele que outras metodologias, que poderão aumentar a sensibilidade e/ou a especificidade na detecção do patógeno, são padronizadas (Roof, 1996).

### 5.2.1 Sorotipos de *Salmonella* sp. identificados

Os sorotipos Typhimurium e Enteritidis estão entre os principais causadores de toxinfecções no homem, sendo que a *S. Typhimurium* também tem sido uma das mais isoladas a partir dos rebanhos de suínos e em carcaças de origem suína. No entanto, estes sorotipos normalmente não têm sido isolados a partir da ração (Wegener et al., 1997; Stege et al., 1997). Ao contrário, o sorotipo Infantis tem sido encontrado em diversos tipos de amostras inclusive ração. Desta forma, sorotipos que não sejam Typhimurium, Infantis e Enteritidis provavelmente sejam introduzidos no rebanho através de ração contaminada, além de outras fontes como roedores e fauna selvagem (Baggesen et al., 1996).

Como no presente estudo somente uma amostragem das colônias de *Salmonella* sp. isoladas foi sorotipada, não é possível afirmar quais os sorotipos predominantes nas diferentes amostras, nem estabelecer uma comparação entre os sorotipos e os caldos de enriquecimento a partir dos quais foi possível ou não o seu isolamento nos meios sólidos. Entretanto, o sorotipo Typhimurium isolado em fezes de lote e individuais não foi identificado a partir da ração, e o Infantis apenas em fezes individuais. O sorotipo Rissen, o único identificado na triagem (fezes de lote), também foi encontrado em fezes individuais na primeira coleta.

Baggesen et al. (1997) compararam o isolamento de sorotipos de *Salmonella enterica* em diferentes amostras (ração, rebanho suíno, carcaça de suínos e no homem) no ano de 1996, na Dinamarca. De todos sorotipos encontrados por estes autores, 10 estão entre os identificados no presente estudo. Para os autores seus

resultados demonstraram a grande variação existente na capacidade dos diferentes sorotipos de *Salmonella* sp., em serem transmitidos na cadeia de produção de alimentos e causar doença no homem. Entre os sorotipos que também foram isolados no presente estudo o sorotipo Infantis foi encontrado em todas as fontes pesquisadas pelos autores. Os sorotipos Agona, Anatum, Heidelberg, Mbandaka, Montevideo e Typhimurium, entre outras fontes, também foram isolados do homem. Da ração foram isolados os sorotipos Agona, Infantis, Lexington, Mbandaka, Montevideo, Orion, Tennessee

Surtos causados por sorotipos de *Salmonella* sp., que normalmente não são causadores de doença no homem, como o surto de meningite causado por *S. Gruposensis*, reforçam o fato de que qualquer sorotipo é potencialmente patogênico para o homem (D'Aoust, 1994; Taunay et al., 1996; Blaha, 1997). Cauduro et al. (1986) relatam o isolamento de *S. Tennessee*, em fezes humanas, também com o objetivo de alertar para o possível valor clínico e epidemiológico do isolamento de sorotipos que não Typhi ou Typhimurium.

Para Baggesen et al. (1997) a variação na habilidade dos diferentes sorotipos em serem transmitidos através da cadeia de produção do alimento e causar doença pode dever-se à capacidade da *Salmonella* sp. em resistir ao estresse extra-animal ou à habilidade de causar infecção nos animais ou no homem. Esta dependeria de fatores como: dose infectante, especificidade ao hospedeiro, capacidade de colonização e invasão, estado de portador, entre outros. Estes fatores ainda não são totalmente compreendidos, embora muitas pesquisas sejam conduzidas no sentido de estudar os mecanismos gerais da patogenicidade da *Salmonella* sp. (Lax et al., 1995).

Para Baggesen et al. (1997) são necessárias pesquisas que propiciem um maior entendimento da fisiologia do patógeno, e desenvolvimento tanto tecnológico como da medicina humana e veterinária. Os autores consideram ainda que os diferentes sorotipos e as diferenças na distribuição destes também podem ocorrer devido à

utilização de diferentes métodos de isolamento de *Salmonella* sp.

Os resultados obtidos no presente estudo, constituem uma etapa inicial, com a adequação dos métodos microbiológicos de isolamento de *Salmonella* sp. às condições locais. Tais métodos serão empregados em estudos visando um melhor entendimento da epidemiologia da infecção por *Salmonella* sp., para a obtenção de melhores condições de sanidade dos rebanhos de suíno e aumento na segurança biológica da carne e seus produtos. Pela prevenção e controle da infecção de *Salmonella* sp. nas granjas é possível se reduzir o número de patógenos aos quais os animais são expostos. Segundo Berends et al. (1996) este controle deve ser processado em todos os estágios da criação desde as granjas de criação, multiplicação e terminação, já que rebanhos identificados como livres de *Salmonella* sp. deveriam ser separados dos demais, evitando desta forma a contaminação cruzada durante o transporte, o período que antecede o abate dos animais e no decorrer do mesmo.

A prevenção e o controle da infecção por *Salmonella* sp. nos rebanhos suínos além de proporcionar uma maior segurança ao alimento, também diminui as perdas econômicas associadas com esta infecção (Rubino, 1997), e permite o acesso ao mercado externo (Martins, 1999).

De acordo com Martins (1999), as exportações brasileiras de carne suína tendem a crescer, já que outros países produtores, além de enfrentarem problemas de superpopulação, têm experimentado problemas com relação à sanidade, preservação ambiental e conforto dos animais, resultando em maiores dificuldades de produção que o Brasil, que ainda pela área territorial é capaz de grande produção de grãos.

O desenvolvimento de pesquisas com relação a *Salmonella* sp., visando a segurança biológica dos alimentos e o atendimento das exigências do consumidor e do mercado externo, proporcionam a implementação de práticas que reduzem os fatores de risco e os níveis de contaminação dos animais (Bahnsen, 1996). Desta forma, será

possível a certificação dos produtos através de rótulos onde estejam a seguinte afirmação: “Foram empregadas todas as medidas conhecidas para a redução da presença de *Salmonella* neste produto e prevenir a introdução de *Salmonella* sp. em cada nível e unidade de produção envolvida” (Blaha, 1996b, p.48).

## 6. CONCLUSÕES

Nas condições desenvolvidas no presente estudo é possível concluir:

1. No isolamento de *Salmonella* sp. em amostras contaminadas artificialmente, os caldos Rappaport-Vassiliadis incubados a 42°C e Tetrionato Müller-Kauffmann a 42°C e 37°C foram mais eficientes que o Selenito Cistina a 37°C. Com amostras naturalmente contaminadas, os caldos Rappaport-Vassiliadis e Tetrionato Müller-Kauffmann incubados a 42°C apresentaram um melhor desempenho que o Tetrionato Müller-Kauffmann a 37°C.
2. A eficiência do enriquecimento seletivo influenciou diretamente a capacidade seletiva e indicadora dos meios sólidos seletivos utilizados.
3. A metodologia mais eficiente para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos foi o enriquecimento seletivo em caldo Rappaport-Vassiliadis e Tetrionato Müller-Kauffmann incubados a 42°C associado ao isolamento em ágar Xilose Lisina Tergitol 4 e ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

## 7. PERSPECTIVAS

1. Determinar a sensibilidade mínima dos métodos de detecção de *Salmonella* sp., a partir dos caldos Rappaport-Vassiliadis e Tetrionato Müller-Kauffmann incubados a 42°C em associação com os meios sólidos seletivos Xilose Lisina Tergitol 4 e Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

2. Verificar a sensibilidade de alguns sorotipos específicos de *Salmonella* sp. aos caldos Rappaport-Vassiliadis e Tetrionato Müller-Kauffmann, e a diferentes temperaturas de incubação (37°C e 42°C), através de metodologias que permitam a avaliação da cinética de crescimento dos sorotipos.

3. Através destas metodologias, avaliar o efeito da microbiota associada na detecção de *Salmonella* sp. em fezes de suínos de terminação.

4. Detecção de *Salmonella* sp. na carne suína disponível ao consumidor no comércio, verificando se sorotipos encontrados nas fezes também o são no produto final, ou seja, se estes são mantidos durante o processamento industrial do alimento.

5. Estudar a prevalência e epidemiologia da infecção por *Salmonella* sp. em suínos, adotando as metodologias estabelecidas como mais adequadas no presente trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABO, S.; ANDERSEN, J.K.; OLSEN, J.E. Research note: detection of *Salmonella* in minced meat by polymerase chain reaction. **Letters Appl. Microbiol.**, Oxford, v.21, p.180-182, 1995.
- ALVES, J.C.; LÁZARO, N.S.; HOFER, E. et al. *Salmonella* sp. em linfonodos de suínos normais abatidos no Estado do Rio de Janeiro. **R. Bras. Med. Vet.**, [S.l.], v.16, n.4, p.172-176, 1994.
- ARROYO, G.; ARROYO, J.A. Selective action of inhibitors used in different culture media on the competitive microflora of *Salmonella*. **J. Appl. Microbiol.** London, v.78, p.281-289, 1995.
- BAGER, F.; PETERSEN, J. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. **Acta Vet. Scand.**, Vanloese, v.32, p.473-481, 1991.
- BAGGESEN, D.L.; WEGENER, H.C.; BAGER, F. et al. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infection in Danish slaughter pigs determined by microbiology testing. **Prev. Vet. Med.**, Amsterdam, v.26, p.201-213, 1996.
- BAGGESEN, D.L.; SORENSEN, L.L.; KRAUSE, P. et al. The occurrence of *Salmonella enterica* serotypes in animal feed, pig, pork and man. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p.56-59.
- BAGGESEN, D. L.; AAERSTRUP, F.; MOLBAK, K. The emergence of nalidixic acid resistant, multiresistant *S. Typhimurium* DT 104 in Denmark. An outbreak in humans traced back to pork. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1999. p.191-193.
- BAHNSON, P.U.S. *Salmonella* research in swine production food safety. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1996, Minnesota. **Proceedings**. Minnesota: [s.n.], 1996. p.10-14.

- BAILEY, J.S.; COX, N.A.; THOMSON, J.E. Efficiency of selenite cystine and TT enrichment broths for the detection of *Salmonella*. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.51, p.409-414, 1981.
- BANWART, G.J. **Basic food microbiology**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 773p. Cap. 6: Foodborne agents causing illness.
- BECKERS, H.J.; HEIDE, J.V.D.; FENIGSEN-NARUCKA, U. et al. Fate of salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Müller-Kauffmann's tetrathionate medium. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.62, p.97-104, 1987.
- BELLO-PÉREZ, L.A. Serotipos de *Salmonella* identificados en Chorizos que se expenden en Acapulco, Guerrero, México. **Rev. Lat.-Amer. Microbiol.**, México, v.35, p.377-381, 1993.
- BERENDS, B.R.; URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A. et al. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.30, p.37-53, 1996.
- BERENDS, B. R.; SNIJDERS, J. M. A. Risk factors and control measures during slaughter and processing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p.36-41.
- BLAHA, T. The impact of *Salmonella* on the swine industry: *Salmonella* Seminar. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1996, Minnesota. **Proceedings**. Minnesota: [s.n.], 1996a. p.1-2.
- BLAHA, T. Outlook and where to go. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1996, Minnesota. **Proceedings**. Minnesota: [s.n.], 1996b. p.48.
- BLAHA, T. The state of the art of salmonella. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1997, Minnesota. **Proceedings**. Minnesota: [s.n.], 1997. p.79-81.
- BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTESEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.30, p.9-25, 1996.
- BPL agar (brilliant-green phenol-red lactose agar to Kauffmann). In: MICROBIOLOGY manual merck. Darmstadt: Merck, 1996. p.63.
- BPLS agar (brilliant-green phenol-red lactose sacarose agar). In: MICROBIOLOGY manual merck. Darmstadt: Merck, 1996. p.64.
- BUSSE, M. Media for salmonella. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.26, p.117-131, 1995.
- CALDERON, D.F.; FURLANETTO, S.M.P. Isolamento de *Salmonella* em diferentes meios seletivos de enriquecimento, tempos e temperaturas de incubação. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, n.22, v.2, p.127-130, 1991.

- CAMPOS, L.C. Salmonella. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F. et al. (Eds.) **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.229-234.
- CARMO, L.S.; VIERIA, A.C.; REIS, J.D.P. et al. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.27, p.122-125, 1996.
- CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M. Enterobacteria. In: CARTER, G.R.; COLE, J.R. (Eds.) **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and micology**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1990. p.107-128.
- CAUDURO, P.F.; MEZZANI, A.; CÍCERO, A.G.D. Isolamento de *Salmonella* Tennessee em fezes humanas no Rio Grande do Sul. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.2, n.17, p.113-159, 1993.
- CHEN, H.; FRASER, A.D.E.; YAMAZAKI, H. Evaluation of toxicity of *Salmonella* selective media for shortening the enrichment period. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.18, p.151-159, 1993.
- CHERRINGTON, C.A.; IN'T VELD, J.H.J.H. Comparison of classical isolation protocols with a 24h screen to detect viable salmonellas in faeces. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.75, p.65-68, 1993.
- CLARKE, R.C.; GYLES, C.L. *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; CHARLES, O.T. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa State University, 1993. p.133-153.
- COLEMAN, D.J.; NYE, K.J.; CHICK, K.E. et al. A comparison of immunomagnetic separation plus enrichment with conventional *Salmonella* culture in the examination of raw sausages. **Letters Appl. Microbiol.**, Oxford, v.21, p.249-251, 1995.
- COOKE, V.M.; MILES, R.J.; PRICE, R.G. et al. A novel chromogenic ester agar medium for detection of *Salmonellae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washintong, v.65, n.2, p.807-812, 1999.
- D'AOUST, J.Y. *Salmonella* and the international food trade. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.24, p.11-31, 1994.
- DAVIES, P.R.; FUNK, J.A.; NICHOLS, M.G. et al. Effects of some methodologic factors on detection of *Salmonella* in swine feces. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1999. p. 30-32.
- Di GUARDO, G.; FONTANELLI, G.; PANFILI, G. et al. Occurrence of *Salmonella* in swine in the Latium Region (central Italy) from 1980 to 1989: a retrospective study. **The Vet. Quartely**, Utrecht, v.14, n.2, p.62-65, 1992.
- DUSCH, H.; ALTWEGG, M. Evaluation of five new planting media for isolation of *Salmonella* species. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.4, p.802-804, 1995.

- EUZÉBY, J. P. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) LeMinor and Popoff 1987 sp. nov., nom. ver. as the neotype of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (Approved List 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved List 1980). Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Spencers Wood, v.49, p.927-930, 1999.
- FAGERBERG, D.J.; AVENS, J.S. Enrichment and plating methodology for *Salmonella* detection in food. A review. *J. Milk Food Technol.*, Des Moines, v.39, n.9, p.628-646, 1976.
- FANG, G.; ARAUJO, V.; GUERRANT, R.L. Enteric infections associated with exposure to animal products. *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, Philadelphia, v.5, n.3, p.681-701.
- FEDORKA-CRAY, P.J.; KELLY, L.C.; STABEL, T.J.; GRAY, J.T. et al. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. *Infect. Immun.* Washington, v.63, p.2658-2664, 1995.
- FEDORKA-CRAY, P.J.; GRAY, J.T. Current state of *Salmonella* in swine: *Salmonella* Seminar. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1996, Minnesota. *Proceedings*. Minnesota: [s.n.], 1996. p.15-28.
- FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.53, n.2, p.210-230, 1989.
- FUNK, J. A.; DAVIES, P. R.; NICHOLS, M. G. Evaluation of sample weight for the isolation of *Salmonella* spp. from swine feces. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. *Proceedings*. Copenhagen: [s.n.], 1997. p.97-99.
- GRAPHPAD Instat. Versão 2.01. São Paulo: Graphpad Software, 1990-1993. Programa de computador.
- GRUENEWALD, R.; HENDERSON, R.W.; YAPPOW, S. Use of Rambach propylene glycol containing agar for identification of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.29, n.10, p.2354-2356, 1991.
- HADDOCK, R.L. Efficacy of examining rectal swabs to detect swine *Salmonella* carriers. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, v.31, n.8, p.1509-1512, 1970.
- HARRIS, I.T. *Salmonella* in swine feed: *Salmonella* Seminar. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1996, Minnesota. *Proceedings*. Minnesota: [s.n.], 1996, p.29-38.
- HELDRICH, K. (Ed.). *Salmonella*. In: OFFICIAL methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15.ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1990. p.467-476.

- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. (Eds.). Facultative anaerobic Gram-negative rods. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.186-187.
- JAYARAO, B.M.; BIRÓ, G.; KOVÁCS, S. et al. Prevalence of *Salmonella* serotypes in pigs and evaluation of rapid, presumptive test for detection of *Salmonella* in pig faeces. **Acta Vet. Hung.**, Budapest, v.37, n.1-2, p.39-44, 1989.
- JUBB, K.V.F. The alimentary system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 3.ed. Orlando: Academic Press, 1985. v.3, p.135-137.
- JUNE, G.A.; SHERROD, P.S.; HAMMACK, T.S. et al. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassiliadis Medium for the recovery of *Salmonella* from raw flesh and other highly contaminated foods: precollaborative study. **J. AOAC Int.**, [S.1], v.78, n.2, p.375-380, 1995.
- KELLY, M.T.; BRENNER, D.J.; FARMER, J.J. Enterobacteriaceae. In: LANNETTE, E.H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 4.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. p.271-272.
- KIM, J.Y.; BAHNSON, P.B.; TROUTT, H.F. et al. *Salmonella* prevalence in market weight pigs before and after shipment to slaughter. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1999a. p.191-193.
- KIM, J. Y.; BAHNSON, P. B.; KAKOMA, I.; et al. Effect of buffered peptone water pre-enrichment on detected prevalence of *Salmonella* in swine feces. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1999b. p. 69-71.
- KONGMUAG, U.; LUK, J.M.C.; LINDBERG, A.A. Comparison of three stool processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2, and by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, n.12, p.3072-3074, 1994.
- LAX, A.J.; BARROW, P.A.; JONES, P.W. et al. Current perspectives in salmonellosis. **Br. Vet. J.**, London, v.154, n. 4, p.351-337, 1995.
- LEITÃO, M.F. Controle do desenvolvimento microbiano no processamento industrial da carne e produtos cárneos. **Bol. ITAL**, Campinas, v.21, p.21-39, 1984.
- LeMINOR, L. ; POPOFF, M.Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. as type and only species of genus *Salmonella*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Spencers Wood, v.37, p.465-468, 1987.
- MAC FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins, 1977. 312p.

- MACKEY, B.M. Quality control monitoring of liquid selective enrichment media used for isolating *Salmonellae*. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.2, p.41-48, 1985.
- MARSIGLIA, M.L.; IKUTA, N.; FONSECA, A.K. et al. Development of a combined selective enrichment method and polymerase chain reaction (PCR) assay for sensitive detection of *Salmonella* in food samples. **World J. Microbiol. & Biotechnol.**, Oxford, v.13, n.6, p.649-654, 1997.
- MARTINS, C. Fatos e perspectivas mundiais na oferta e demanda da carne suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 19., 1999, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: [s.n.], 1999. p.53-61.
- McCAPES, R.H.; OSBURN, B.I.; REIMANN, H. Safety of foods animal origin: Responsibilities of veterinary medicine. **J. AM. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.199, n.7, p.870-874, 1991.
- MILLER, R.G.; TATE, C.R.; MALLINSON, E.T. Xylose-lysine-tergitol 4: an improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. **Poultry Sci.**, Champaign, v.70, p.2429-2432, 1991.
- MILLER, R. G.; TATE, C.R.; MALLINSON, E.T. et al. Improved XLT4 agar: small addition of peptone to promote stronger production of hydrogen-sulfide by *Salmonellae*. **J. Food Prot.**, Des Moines, n.1, v.58, p.115-119, 1995.
- MOGELMOSE, V.; NIELSEN, B.; SORENSEN, L.L. et al. Eradication of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections in 15 danish swine herds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1999. p.367-369.
- MORIÑIGO, M.A.; MARTINEZ-MANZANARES, E.; MUÑOZ, A. et al. Evaluation of different plating media used in the isolation of salmonellas from environmental samples. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, p.353-360, 1989.
- MORSE, E.V.; DUNCAN, M.A. Salmonellosis - An environmental health problem. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.165, n.11, p.1015-1019, 1974.
- MÜLLER Kauffmann tetrathionate broth. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.5, p.237-239, 1987.
- NIELSEN, B. Danish consumers perspectives of food safety. In: SWINE DISEASE CONFERENCE FOR SWINE PRACTITIONERS, 6., 1998, Ames. **Proceedings**. Ames: [s.n.], 1998. p.85-88.
- NIELSEN, B.; BAGGESEN, D.L. Update on laboratory diagnosis of subclinical salmonella infections in pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p.19-31.

- NIELSEN, B.; BAGGESEN, D.; BAGER, F. et al. The serological response to *Salmonella* serotypes Typhimurium and Infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.47, p.205-218, 1995.
- NISBET, D.N.; ANDERSON, R.C.; BUCKLEY, S.A. et al. Effect of competitive exclusion on *Salmonella* shedding in swine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p.176-177.
- PETERZ, M.; WIBERG, C.; NORBERG, P. The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in homemade and in commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broth. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, p.523-528, 1989.
- PIGNATO, S.; MARINO, A.M.; EMANUELE, M.C. et al. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonellae* in foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.61, n.5, p.1996-1999, 1995.
- POWEL, D. Communication of risk and risk assessment- Why food safety is reality. In: SWINE DISEASE CONFERENCE FOR SWINE PRACTITIONERS, 6., 1998, Ames. **Proceedings**. Ames: [s.n.], 1998. p.91-113.
- NQUERRY advisor. Versão 3.0. Los Angeles: [s.n.], 1995-1999. Programa de computador.
- RAMBACH, A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.56, n.1, p.301-303, 1990.
- RAMBACH agar. In: MICROBIOLOGY manual merck. Darmstadt: Merck, 1996. p.212-213.
- RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) broth. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.5, p.254-255, 1987.
- RAPPOLD, H.; BOLDERDIJK, R. Modified lysine iron agar for isolation of *Salmonella* from food. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.38, n.1, p.162-163, 1979.
- REEVES, M.W.; EVINS, G.M.; HEIBA, A.A. et al. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.27, p.313-320, 1989.
- RHODES, P.; QUESNEL, L.B.; COLLARD, P. Growth kinetics of mixed culture in salmonella enrichment media. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.59, p.231-237, 1985.
- RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática roteiro e manual: bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 1993. 112p. Unid. III: Investigação da atividade metabólica de bactérias.

- ROBINSON, A. Routes of transmission and risk factors for swine *Salmonella* infections: a review. *Salmonella Seminar*. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1996, Minnesota. **Proceedings**. Minnesota: [s.n.], 1996. p.3-9.
- ROOF, M. *Salmonella* diagnostics; past, present, and future. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1996, Minnesota. **Proceedings**. Minnesota: [s.n.], 1996. p.39-47.
- RUBINO, J.R. The economic impact of *Salmonella* infection. **Clin. Microbiol. News.**, Amsterdam, v.19, n.4, p.25-32, 1997.
- SALMONELLA enrichment broth acc. to Rappaport and Vassiliadis (RVS broth). In: MICROBIOLOGY manual merck. Darmstadt: Merck, 1996. p.227.
- SCHWARTZ, K.J. La salmonelosis en el cerdo. PIGS. **Enfermedades entericas**, Hong Kong, Mayo, 1996, p.18-21.
- SELENITE cystine broth. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.5, p.265-267, 1987.
- SHARMA, R.M.; PACKER, R.A. Evaluation of culture media for isolation of *Salmonellae* from faeces. **Appl. Microbiol.**, Washington, v.18, n.4, p.589-595, 1969.
- SHERROD, P.S.; AMAGUANA, R.M.; ANDREWS W.H. et al. Relative effectiveness of selective plating agars for recovery of *Salmonella* species from selected high-moisture foods. **J. AOAC Int.**, [S.l.], v.78, n.3, p.679-690, 1995.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p. Cap.5: Detecção de *Salmonella*.
- SOUMET, C.; ERMEL, G.; SALVAT, G. et al. Detection of *Salmonella* spp. in food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. **Letters Appl. Microbiol.**, Oxford, v.24, p.113-116, 1997.
- STEGE, H.; CARTENSEN, B.; FELD, N.C. et al. Subclinical *Salmonella* infection in danish finishing pig herds: association between serological and bacteriological testing. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p.114-118.
- TATE, C.R.; MILLER, R.G.; MALLINSON, E.T. et al. The isolation of salmonellae from poultry farm environmental samples by several enrichment procedures using plating media with and without novobiocin. **Poultry Sci.**, Champaign, v.69, p.721-726, 1990.
- TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T. et al. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.38, n.2, p.119-127, 1996. Resumo disponível na Internet. <http://www.bireme.br/cgi-bin/IAH2> em 7 jan. 2000.

- THOMAS, P. *Salmonella cholerae-suis* infection in pigs with special reference to England and Wales. **Vet. Bulletin**, Weybridge, v.47, n.10, p.731-739, 1977.
- TIELEN, M.J.M.; SCHIE VAN, F.W.; WOLF VAN DER, P.J. et al. Risk factors and control measures for subclinical *Salmonella* infection in pig herds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p. 32-35.
- TORRENCE, M. E. Surveillance. **Understanding epidemiology**. St. Louis: Mosby, 1997. p.165-169.
- TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M.R.F. Resistência bacteriana a drogas. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F. et al. (Eds.) **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.105-109.
- VAN SCHOTHORST, M.; VAN LEUSDEN, F. M; JEUNINK, J. et al. Studies on the multiplication of Salmonellae in various media at different incubation temperatures. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.42, p.157-163, 1977.
- VARNAM, A.H. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. Aylesbury: Wolfe, 1991. p.51-462.
- VASSILIADIS, P.; MAVROMMATI, C.; KALAPOTHAKI, V. et al. *Salmonella* isolation with Rappaport-Vassiliadis enrichment medium seeded with different size inocula of pre-enrichment cultures of meat products and sewage polluted water, **J. Hyg.**, London, v.95, p.139-147, 1985.
- VASSILIADIS, P.; MAVROMMATI, C.; TRICHOPOULOUS, D. et al. Comparison of procedures based upon Rappaport-Vassiliadis medium, with those using Müller-Kauffmann medium containing Teepol for isolation of *Salmonella* sp., **Epidem. Inf.**, Oxford, v.99, p.143-147, 1987.
- XLD agar (Xylose Lysine Desoxicolato Agar). In: **MICROBIOLOGY manual merck**. Darmstadt: Merck, 1996. p.300-301.
- XLT4 agar. In: **MICROBIOLOGY manual merck**. Darmstadt: Merck, 1996. p.302-303.
- WALTMAN, W.D.; HORNE, A.M.; PIRKLE, C. Influence of enrichment incubation time on the isolation of *Salmonella*. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.37, p.884-887, 1993.
- WEGENER, H.C.; BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997. Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p.3-8.

- WEISS, L.H.N.; NONNIG, R.; CARDOSO, M.R.I. et al. Occurrence of *Salmonella* in finishing pigs in south Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1999. p.184-185.
- WIERUP, M. Principles for integrated surveillance and control of *Salmonella* in swine production. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p.42-49.
- WRAY, C.W.; SOJKA, W.J. Reviews of the progress of dairy science: Bovine salmonellosis. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v.44, p.383-425, 1977.

## **9. ANEXOS**

## ANEXO 1. Solução Salina

Cloreto de sódio (NaCl) .....	8,5g
Água destilada .....	1.000ml

Modo de preparo: dissolver os componentes em água destilada, distribuir 9 ml em tubos e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

## ANEXO 2. Solução Tampão Fosfato Salina (PBS)

## Solução A

Fosfato de sódio dibásico 0,2M

Fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ..... 28,39g

Água destilada ..... 1.000ml

## Solução B

Fosfato de potássio monobásico 0,2M

Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ..... 27,21g

Água destilada ..... 1.000ml

## Solução salina

Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) ..... 8,5g

Água destilada ..... 1.000ml

Modo de preparo: para PBS 0.01M (pH 7) misturar 60 ml da solução A e 40 ml da solução B, retirar uma alíquota de 5 ml e a esta adicionar 95 ml de solução salina, e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

## ANEXO 3. Água Peptonada Tamponada

Peptona de carne .....	10,0g
Cloreto de sódio (NaCl) .....	5,0g
Fosfato de sódio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	9,0g
Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	1,5g
Água destilada .....	1000ml

Modo de preparo: dissolver os componentes em água destilada. Distribuir o volume de 225 ml em frascos e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

ANEXO 4. Constituintes dos caldos de enriquecimento seletivo<sup>a</sup> utilizados na detecção de *Salmonella* sp.

Ingrediente	Componente	Caldos seletivos (componente g/l)		
		RV	TMK	SC
Carboidrato	Lactose			4,0
Proteína	Extrato de levedura		1,8	
	Extrato de carne		5,0	
	Peptona de carne		10,0	
	Triptona			5,0
	Peptona de soja	4,5		
Aminoácido	L-cistina			0,01
Agente seletivo	Bile bovina		4,75	
	Cloreto de magnésio. 6 H <sub>2</sub> O	29,0		
	Hidrogeno selenito de sódio			4,0
	Tetrationato		<sup>b</sup>	
	Verde brilhante <sup>c</sup>		0,01	
	Verde malaquita	0,036		
Compostos inorgânicos	Carbonato de cálcio		45,0	
	Cloreto de sódio	8,0	3,0	
	Fosfato de potássio dibásico	0,4		
	Fosfato de potássio monobásico	0,6		
	Fosfato de sódio			10,0
	Iodeto de potássio <sup>d</sup>		5,0	
	Iodo <sup>e</sup>		4,0	
	Tiosulfato de sódio		50,0	

<sup>a</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK, Tetracionato Müller-Kauffmann; SC, Selenito Cistina. Os caldos e seus aditivos foram preparados de acordo com especificações dos rótulos dos meios de cultura.

<sup>b</sup> Formado *in situ* pela reação do iodo com o tiosulfato de sódio.

<sup>c, d, e</sup> Adicionados à base do caldo Tetracionato Müller-Kauffmann.

Fonte: MÜLLER..., 1987; SELENITE..., 1987; SALMONELLA..., 1996.

ANEXO 5. Constituintes dos meios sólidos seletivos<sup>a</sup> para o isolamento de *Salmonella* sp.

Ingrediente	Componente	Meios sólidos seletivos (componente g/l)		
		RA	XLT4	VB
Carboidrato	Lactose		7,5	10,0
	Propilenoglicol	10,5		
	Sacarose		7,5	10,0
	Xilose		3,75	
Proteína	Extrato de levedura		3,0	3,0
	Peptona	8,0		
	Proteose peptona Nº 3		1,6	10,0
Aminoácido	L-Lisina		5,0	
Sistema	Citrato de amônio férrico		0,8	
indicador H <sub>2</sub> S <sup>b</sup>	Tiosulfato de sódio		6,8	
Agente seletivo	Desoxicolato de sódio	1,0		
	Verde Brilhante			0,0125
	Tergitol-4 <sup>c</sup>		4,6 <sup>d</sup>	
Corante indicador	Vermelho de fenol		0,08	0,08
	Vermelho neutro	0,03		
Sal inorgânico	Cloreto de sódio	5,0	5,0	5,0
Substrato	5-bromo-4-cloro-3-indol			
enzimático	β-galactopiranosidase	0,1		
Agente solidificante	Ágar	15,0	18,0	20,0

<sup>a</sup> RA, Rambach; XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose. Os meios e a adição de suplemento foram feitos de acordo com especificações dos rótulos dos meios de cultura.

<sup>b</sup> Pela reação do tiosulfato de sódio e citrato de amônio férrico é formado *in situ* o sulfeto ferroso.

<sup>c</sup> Adicionado à base do ágar XLT4.

<sup>d</sup> Adicionado na forma de um suplemento, 4,6 ml para 1000 ml de meio base de XLT4.

Fonte: Rambach, 1990; Sherrod, et al., 1995; RAMBACH...,1996.

## ANEXO 6. Caldo ONPG

## Solução A - Solução do reativo ONPG

2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranoside (ONPG, $C_{12}H_{15}NO_8$ ) .....	6,0g
Fosfato de sódio tamponado pH7,5 ( $Na_2PO_4$ - 0,01M) .....	1000ml

Modo de preparo: dissolver o ONPG na solução de fosfato de sódio tamponado e esterilizar por filtração.

## Solução B - Água Peptonada a 1%

Peptona de carne .....	10g
Cloreto de sódio (NaCl) .....	5,0g
Água destilada .....	1000ml

Modo de preparo: dissolver a peptona de carne e o NaCl na água destilada e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Modo de preparo do caldo ONPG: misturar assepticamente em frasco estéril 250ml solução A e 750ml da solução B.

## ANEXO 7. Cloreto férrico a 10%

Cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) .....	10,0g
Água destilada q.s.p. ....	100,0ml

Modo de preparo: dissolver o  $\text{FeCl}_3$  na água destilada.

## ANEXO 8. Reativo de Ehrlich

4-dimetilaminobenzaldeído ( $C_9H_{11}NO$ ) .....	2,0g
Álcool etílico absoluto ( $C_2H_5OH$ ) .....	190,0ml
Ácido clorídrico concentrado (HCl) .....	40ml

Modo de preparo: dissolver o 4-dimetilaminobenzaldeído na mistura de álcool etílico e ácido clorídrico.

ANEXO 9. Resultados obtidos, na fase de contaminação artificial das amostras, na primeira coleta.

A. Resultados obtidos no isolamento de *Salmonella* Enteritidis, em amostras de fezes artificialmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos a partir de quatro etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Inóculo de <i>S. Enteritidis</i> (UFC <sup>c</sup> /g)	Enriquecimento seletivo		Nº de colônias confirmadas como <i>Salmonella</i> / nº de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i>			
	Caldo	Tubo	XLT4	RA	VB	
1	RV	A	3/3	0	1/3	
		B	3/3	0	1/3	
		C	0	0	0/3	
	TMK42	A	3/3	3/3	3/3	0/2
		B	3/3	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3	3/3
	SC	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
	TMK37	A	3/3	0	0	0/3
		B	3/3	0	0	0/3
		C	3/3	0	0	0/3
2	RV	A	3/3	0	3/3	
		B	3/3	0	3/3	
		C	3/3	0	3/3	
	TMK42	A	3/3	3/3	3/3	3/3
		B	3/3	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3	3/3
	SC	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
	TMK37	A	3/3	0	0	0/3
		B	3/3	0	0	1/3
		C	3/3	0	0	0/3

<sup>a</sup> RA, Rambach; XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>c</sup> Unidade Formadora de Colônia.

B. Resultados obtidos no isolamento de *Salmonella* Typhimurium, em amostras de fezes de suínos artificialmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos, a partir de quatro etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Inóculo de <i>S. Typhimurium</i> (UFC <sup>c</sup> /g)	Enriquecimento seletivo		Nº de colônias confirmadas como <i>Salmonella</i> / nº de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i>		
	Caldo	Tubo	XLT4	RA	VB
1	RV	A	3/3	3/3	3/3
		B	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3
	TMK42	A	3/3	0	3/3
		B	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3
	SC	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK37	A	3/3	3/3	0/3
		B	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3
2	RV	A	3/3	3/3	3/3
		B	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3
	TMK42	A	3/3	3/3	3/3
		B	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3
	SC	A	0	0	0/3
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK37	A	3/3	0	3/3
		B	3/3	0	2/3
		C	3/3	0	3/3

<sup>a</sup> RA, Rambach; XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brillante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>c</sup> Unidade Formadora de Colônia.

C. Resultados obtidos no isolamento de um "Pool" de sorotipos de *Salmonella* (*S. Derby*, *S. Bredeney*; *Salmonella* sp.), em amostras de fezes de suínos artificialmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos a partir de quatro etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Inóculo do "Pool" (UFC <sup>c</sup> /g)	Enriquecimento seletivo		Nº de colônias confirmadas como <i>Salmonella</i> / nº de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i>			
	Caldo	Tubo	XLT4	RA	VB	
1	RV	A	3/3	3/3	3/3	
		B	3/3	3/3	3/3	
		C	3/3	3/3	3/3	
	TMK42	A	3/3	3/3	3/3	3/3
		B	3/3	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3	3/3
	SC	A	3/3	0	0	0
		B	1/1	0	0	0
		C	0	0	0	0
	TMK37	A	3/3	3/3	3/3	0/3
		B	3/3	3/3	3/3	0/3
		C	3/3	3/3	3/3	0
2	RV	A	3/3	3/3	3/3	
		B	3/3	3/3	3/3	
		C	3/3	3/3	3/3	
	TMK42	A	3/3	3/3	3/3	1/1
		B	3/3	3/3	3/3	1/3
		C	3/3	3/3	3/3	3/3
	SC	A	1/1	0	0	0
		B	1/1	0	0	0
		C	1/1	0	0	0
	TMK37	A	3/3	3/3	3/3	0/3
		B	3/3	3/3	3/3	0
		C	3/3	3/3	3/3	1/3

<sup>a</sup> RA, Rambach; XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>c</sup> Unidade Formadora de Colônia.

ANEXO 10. Resultados obtidos, na fase de contaminação artificial das amostras, na segunda coleta.

A. Resultados obtidos no isolamento de *Salmonella* Enteritidis, em amostras de fezes artificialmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos, a partir de quatro etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Inóculo de <i>S. Enteritidis</i> (UFC <sup>c</sup> /g)	Enriquecimento seletivo		Nº de colônias confirmadas como <i>Salmonella</i> / nº de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i>		
	Caldo	Tubo	XLT4	RA	VB
1	RV	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK42	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	SC	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK37	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
2	RV	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK42	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	SC	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK37	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0

<sup>a</sup> RA, Rambach; XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>c</sup> Unidade Formadora de Colônia.

B. Resultados obtidos no isolamento de *Salmonella* Typhimurium, em amostras de fezes artificialmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos, a partir de quatro etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Inóculo de <i>S. Typhimurium</i> (UFC <sup>c</sup> /g)	Enriquecimento seletivo		Nº de colônias confirmadas como <i>Salmonella</i> / nº de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i>		
	Caldo	Tubo	XLT4	RA	VB
1	RV	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK42	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	SC	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK37	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
2	RV	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK42	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	SC	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK37	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0

<sup>a</sup> RA, Rambach; XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>c</sup> Unidade Formadora de Colônia.

C. Resultados obtidos no isolamento de um "Pool" de sorotipos de *Salmonella* (*S. Derby*, *S. Bredeney*; *Salmonella* sp.), em amostras de fezes de suínos artificialmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos, a partir de quatro etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Inóculo do "Pool" (UFC <sup>c</sup> /g)	Enriquecimento seletivo		N° de colônias confirmadas como <i>Salmonella</i> / n° de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i>		
	Caldo	Tubo	XLT4	RA	VB
1	RV	A	0	0	0
		B	3/3	3/3	3/3
		C	0	0	0
	TMK42	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	SC	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK37	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
2	RV	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	3/3	3/3	3/3
	TMK42	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	SC	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0
	TMK37	A	0	0	0
		B	0	0	0
		C	0	0	0

<sup>a</sup> RA, Rambach; XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>c</sup> Unidade Formadora de Colônia.

ANEXO 11. Resultados obtidos na fase de contaminação artificial das amostras, na terceira coleta

A. Resultados obtidos no isolamento de *Salmonella* Enteritidis, em amostras de fezes artificialmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos, a partir de quatro etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Inóculo de <i>S. Enteritidis</i> (UFC <sup>c</sup> /g)	Enriquecimento seletivo		Nº de colônias confirmadas como <i>Salmonella</i> / nº de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i>			
	Caldo	Tubo	XLT4	RA	VB	
1	RV	A	0	0	0	
		B	0	0	0	
		C	0	0	0	
	TMK42	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0/2
	SC	A	0	0	0	0
		B	1/1	0	0	0
		C	0	0	0	0
	TMK37	A	1/1	0	0	0
		B	0	0	0	1/1
		C	1/1	0	0	0
2	RV	A	0	0	0	
		B	0	0	0	
		C	0	0	1/1	
	TMK42	A	0	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0
	SC	A	0	0	0	0
		B	1/1	0	0	0
		C	0	0	0	0
	TMK37	A	1/1	0	0	0
		B	0	0	0	0
		C	0	0	0	0

<sup>a</sup> RA, Rambach; XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>c</sup> Unidade Formadora de Colônia.

B. Resultados obtidos no isolamento de *Salmonella* Typhimurium, em amostras de fezes artificialmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos, a partir de quatro etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Inóculo de <i>S. Typhimurium</i> (UFC/g)	Enriquecimento seletivo		Nº de colônias confirmadas como <i>Salmonella</i> / nº de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i>			
	Caldo	Tubo	XLT4	RA	VB	
1	RV	A	3/3	3/3	3/3	
		B	3/3	3/3	3/3	
		C	2/2	3/3	1/1	
	TMK42	A	3/3	3/3	3/3	0
		B	3/3	3/3	3/3	3/3
		C	2/2	3/3	3/3	3/3
	SC	A	2/2	3/3	3/3	1/1
		B	3/3	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3	3/3
	TMK37	A	3/3	3/3	3/3	1/1
		B	3/3	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3	0
2	RV	A	3/3	3/3	3/3	
		B	3/3	3/3	3/3	
		C	3/3	3/3	0	
	TMK42	A	3/3	3/3	3/3	2/2
		B	3/3	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3	3/3
	SC	A	3/3	3/3	3/3	3/3
		B	3/3	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3	3/3
	TMK37	A	3/3	3/3	3/3	3/3
		B	3/3	3/3	3/3	1/1
		C	3/3	3/3	3/3	3/3

<sup>a</sup> RA, Rambach; XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>c</sup> Unidade Formadora de Colônia.

C. Resultados obtidos no isolamento de um "Pool" de sorotipos de *Salmonella* (*S. Derby*, *S. Bredeney*; *Salmonella* sp.), em amostras de fezes de suínos artificialmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos, a partir de quatro etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Inóculo do "Pool" (UFC/g)	Enriquecimento seletivo		Nº de colônias confirmadas como <i>Salmonella</i> / nº de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i>			
	Caldo	Tubo	XLT-4	RA	VB	
1	RV	A	2/2	3/3	3/3	
		B	3/3	3/3	3/3	
		C	3/3	3/3	3/3	
	TMK42	A	3/3	3/3	3/3	3/3
		B	3/3	3/3	3/3	2/3
		C	3/3	3/3	3/3	3/3
	SC	A	2/2	0	0	0
		B	3/3	0	0	2/2
		C	2/2	0	0	2/2
	TMK37	A	3/3	3/3	3/3	2/3
		B	3/3	3/3	3/3	2/2
		C	3/3	3/3	3/3	3/3
2	RV	A	3/3	3/3	3/3	
		B	3/3	3/3	3/3	
		C	3/3	3/3	3/3	
	TMK42	A	3/3	3/3	3/3	3/3
		B	3/3	3/3	3/3	3/3
		C	3/3	3/3	3/3	3/3
	SC	A	3/3	0	0	0
		B	0	0	0	2/2
		C	1/1	0	0	0/3
	TMK37	A	3/3	3/3	3/3	3/3
		B	3/3	3/3	2/3	1/2
		C	3/3	3/3	3/3	3/3

<sup>a</sup> RA, Rambach; XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C; SC, Selenito Cistina.

<sup>c</sup> Unidade Formadora de Colônia.

ANEXO 12. Resultados obtidos, a partir de amostras naturalmente contaminadas, na primeira coleta

A. Resultados obtidos no isolamento de *Salmonella* sp. a partir da ração, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos, através de três etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Amostra	XLT4			VB		
	RV	TMK42	TMK37	RV	TMK42	TMK37
Ração	3/3 <sup>c</sup>	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3

<sup>a</sup> XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C.

<sup>c</sup> N° de colônias confirmadas como *Salmonella*/ n° de colônias suspeitas de *Salmonella* /.

B. Resultados obtidos no isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de fezes de suínos naturalmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>a</sup> seletivos, através de três etapas de enriquecimento seletivo<sup>b</sup>.

Baia	Amostra <sup>c</sup>	XLT4			VB		
		RV	TMK42	TMK37	RV	TMK42	TMK37
1	A	0	0/1	0	0	0	0/3
	B	0	0	0	0	0	0/3
	C	0	3/3	0/2	0	2/2	0
	D	3/3 <sup>d</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	3/3	0	0	3/3	0
2	A	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	0
	E	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	LT	3/3	3/3	0	3/3	0	0
3	A	3/3	3/3	3/3	0	3/3	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	3/3	0	0	1/1	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	3/3	0	0	3/3	0
	LT	0	0/1	3/3	0	0	0
4	A	3/3	3/3	0	3/3	3/3	0
	B	3/3	0	0	3/3	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	3/3	0	0	3/3	0
	LT	0	0	0	0	0	0
5	A	0	0	0	0	0	0
	B	3/3	2/2	0	0	0	0
	C	3/3	3/3	2/2	0	3/3	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	3/3	0	0	0	0

Baia	Amostra	XLT4			VB		
		RV	TMK42	TMK37	RV	TMK42	TMK37
6	A	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	3/3	2/2	0	0	0
	E	3/3	0	3/3	3/3	0	0
	LT	0	0	0	0	0	0
7	A	0	0	0	0	1/1	0
	B	0	0	0		0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	3/3	0	0	0	0
	E	3/3	1/1	0	3/3	1/1	0
	LT	1/1	3/3	2/2	0	1/1	0
8	A	0	0	0	0	0	0
	B	3/3	3/3	0	3/3	3/3	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	3/3	3/3	0	3/3	1/1
	E	0	1/1	0	0	0	0
	LT	0	2/2	0	0	3/3	0
9	A	3/3	3/3	3/3	2/2	3/3	2/2
	B	0	3/3	0	0	3/3	0
	C	0	3/3	0	0	0/3	0
	D	0	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	E	0	0	1/1	0	0	0
	LT	0	0	3/3	0	0	3/3
10	A	0	3/3	0	0	3/3	0
	B	3/3	3/3	1/1	3/3	3/3	0
	C	0	3/3	0	0	3/3	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	3/3	1/1	0	3/3	0
11	A	0	0	0	0	0/3	0
	B	0	3/3	0/3	0	3/3	0
	C	0	0	0	0	0/3	0
	D	0	0	0	0	0/3	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	0	0	0	0	0
12	A	3/3	3/3	0	3/3	3/3	0
	B	0	3/3	0	0	3/3	0
	C	0	0	0	0	0/3	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	3/3	0	0	3/3	1/1
	LT	0	0	0	0	0	0
13	A	0	0	0	0	0	0
	B	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0
	C	0	3/3	0	0	3/3	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	3/3	3/3	0	3/3	3/3	0

Baia	Amostra	XLT4			VB		
		RV	TMK42	TMK37	RV	TMK42	TMK37
14	A	0	3/3	3/3	0	3/3	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	3/3	3/3	0	3/3	2/2
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	0	0	0	0	0
15	A	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3
	B	0	0	0	0	0/2	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	3/3	2/2	2/3	3/3	2/2	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	0	0	0	0	0
16	A	0	3/3	2/3	0	3/3	2/2
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	3/3	0	0	3/3	0/2
	LT	3/3	3/3	0	3/3	3/3	0
17	A	0	3/3	1/1	0	3/3	0
	B	0	2/2	0	0	0	0
	C	0	3/3	0	0	1/1	0
	D	3/3	3/3	1/1	3/3	3/3	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	3/3	0	0	3/3	0
18	A	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	3/3	0	0	3/3	0
	D	0	3/3	0	0	2/2	0
	E	0	3/3	0	0	3/3	0
	LT	0	3/3	0	0	3/3	0
19	A	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	2/2	0	0	0	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	3/3	3/3	0	3/3	3/3	0
20	A	0	3/3	2/2	0	3/3	0/3
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0/3	0/2
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0/1	0
	LT	0	0	0	0	0	0

Baia	Amostra	XLT4			VB		
		RV	TMK42	TMK37	RV	TMK42	TMK37
21	A	3/3	3/3	0	3/3	3/3	0
	B	0	2/2	0	0	3/3	0
	C	0	2/2	0	0	3/3	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	3/3	0	0	3/3	1/1
	LT	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

<sup>a</sup> XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>b</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetracionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C.

<sup>c</sup> Letras de A até E indicam coleta de fezes individuais e letras LT, coleta de fezes de lote.

<sup>d</sup> N° de colônias confirmadas como *Salmonella* / n° de colônias suspeitas de *Salmonella*.

ANEXO 13. Resultados obtidos, a partir de amostras naturalmente contaminadas, na segunda coleta

A. Resultados<sup>a</sup> obtidos no isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de fezes de suínos naturalmente contaminadas, nos diferentes meios sólidos<sup>b</sup> seletivos, através de três etapas de enriquecimento seletivo<sup>c</sup>.

Baia	Amostra <sup>a</sup>	XLT4			VB		
		RV	TMK42	TMK37	RV	TMK42	TMK37
3	A	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	3/3 <sup>e</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3
	LT	0	0	0	0	0	0
4	A	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	0	0	0/1	0	0/1
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	0	0	0	0	0
8	A	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	3/3	0	0	3/3	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	0	0	0	0	0
11	A	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	D	0	0	0	0	0	0
	E	3/3	0	0	3/3	0	0
	LT	0	0	0	0	0	0
14	A	0	3/3	0	0	2/3	0/3
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	0	0	0	0	0
16	A	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	3/3	3/3	3/3	3/3	1/1	2/2
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	0	0	0	0	0
17	A	0	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	0	0	0	0/1	0

Baia	Amostra	XLT4			VB		
		RV	TMK42	TMK37	RV	TMK42	TMK37
18	A	0	0	0	0	0	0
	B	1/1	3/3	0	3/3	3/3	0
	C	0	0	0	0	0	0
	D	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0
	LT	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Somente são mostradas as baias que foram positivas ou apresentaram falso-positivo, em pelo menos alguma das amostra.

<sup>b</sup> XLT4, Xilose Lisina Tergitol 4; VB, Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose.

<sup>c</sup> RV, Rappaport-Vassiliadis; TMK42, Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 42°C; TMK37 Tetrionato Müller-Kauffmann incubado a 37°C.

<sup>d</sup> Letras de A até E indicam coleta de fezes individuais e letras LT, coleta de fezes de lote.

<sup>e</sup> N° de colônias confirmadas como *Salmonella* / n° de colônias suspeitas de *Salmonella*.

### *Curriculum Vitae*

Geovana Brenner Michael, filha de Harriet Brenner Michael e Waldir Michael, nasceu em 12 de março de 1973, sendo natural de Ijuí, Rio Grande do Sul.

Graduou-se em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 1995, e com ênfase em Análises Clínicas em 1996. Foi Professora Substituta de Microbiologia, no Departamento de Microbiologia do Instituto da Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de agosto a novembro de 1997.

Ingressou no Mestrado no curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 1998.

