PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Influência da temperatura e nutrientes selecionados no isolamento de salmonela de espécies clínicas

Átilla Holanda de Albuquerque, Elisangela de Souza Lopes, Régis Siqueira de Castro Teixeira, Débora Nishi Machado, Ruben Horn Vasconcelos, Windleyanne Gonçalves Amorim Bezerra, Sanjay Veiga Mendonça, William Cardoso Maciel

Laboratório de Estudos Ornitológicos (LABEO), Faculdade de Medicina Veterinária, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Resumo

Objetivou-se realizar uma revisão sobre o uso de meios de enriquecimento para diferentes tipos de amostras microbiológicas, e entender qual o melhor meio de cultura e de temperatura no processamento para o isolamento de *Salmonella*. O isolamento inclui as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento, estudo bioquímico e sorotipificação. Os meios de enriquecimento mais comuns são os caldos Selenito Cistina (CS), Tetrationato (TT), Rappaport-Vassiliadis (RV) e seus derivados, acrescidos ou não de Novobiocina. O caldo TT apresenta boa eficiência em amostras de fezes de aves experimentalmente inoculadas, quando incubado entre 35 e 45°C, com exceção dos casos em que ocorra reduzida concentração de *Salmonella*. O caldo SC tem um bom desempenho para amostras de fezes e carcaças de frango cultivadas em temperatura variando entre 37 e 43°C, assim como, para

identificar amostras com baixas concentrações de células . O caldo RV em amostras de *swabs* retais de bovinos não apresenta boa eficácia, porém, quando usado em amostras de carcaças de frango, peru e análise em ovos, ou amostras que apresentem elevada carga microbiana, em temperatura de 42°C, apresentam ótimos resultados. A escolha do meio de enriquecimento mais adequado, bem como a temperatura de incubação do caldo para isolamento da *Salmonella* irá depender diretamente do tipo da amostra a ser processada, uma vez que cada meio irá apresentar a melhor acuidade em diferentes circunstâncias.

Palavras-chave: *Salmonella*, enriquecimento seletivo, amostras microbiológicas

Influence of the temperature and selected nutrients on the isolation of salmonela from clinical specimens

Abstract

This study aimed to review the use of enrichment media for different sample types and to clarify which is the best medium and temperature of incubation processing for the isolation of *Salmonella*. Isolation is divided in five steps: pre-enrichment, selective enrichment, plating, biochemical identification and serotyping. The most common enrichment media are Selenite Cystine (SC), Tetrathionate (TT), Rappaport - Vassiliadis (RV) broths, and their derivatives, with the addition or not of Novobiocin. TT broth presents a good efficiency in fecal samples of experimentally inoculated birds when incubated between 35 and 45°C, except when there is a low concentration of *Salmonella*. SC broth presents a good performance with fecal samples and chicken carcasses cultivated in a temperature varying between 37 and 43 °C, as well as to identify samples with low cell concentrations. The RV broth when used in samples of rectal swabs from cattle are not effective, however, when used with samples of chicken or turkey carcasses, and analysis on eggs, or with samples with elevated microbial load, at a temperature of 42°C, present great

results. The choice of the most suitable enrichment medium and the incubation temperature of the broth for isolation of *Salmonella* will directly depend on the type of sample to be processed, since each medium will provide better accuracy in different circumstances.

Keywords: *Salmonella*, selective enrichment, microbiological samples

INTRODUÇÃO

Historicamente, a necessidade de isolar *Salmonella* sp. surgiu no final dos anos de 1800, quando *Salmonella* Typhi foi caracterizada como o agente etiológico da febre tifóide, responsável por 22 milhões de novos casos em humanos por ano no mundo, 5% dos quais são fatais (CRUMP et al., 2004). Dessa forma, os meios e métodos de isolamento foram projetados cientificamente para o cultivo dessa espécime bacteriana. No início dos anos de 1900, tornou-se evidente que outros sorovares de *Salmonella* também causavam doenças clínicas, em muitos casos, por exemplo, as infecções eram de origem alimentar, e mesmo que estas salmonelas fossem caracteristicamente diferentes do agente da febre tifóide, os métodos utilizados para o isolamento foram os mesmos para *S. Typhi* (WALTMAN, 2000).

Os procedimentos de cultivo para existentes para o isolamento de *Salmonella* foram bastante aplicados em alimentos, tornando-se evidente que uma proporção significativa dos surtos de *Salmonella* eram oriundos de alimentos de origem animal, concluindo-se, portanto, a necessidade do monitoramento desses produtos (WALTMAN, 2000). Devido a *Salmonella* ser excretada através das fezes dos animais, favorecendo, desta forma, a disseminação do patógeno (SALLES et al., 2008), sendo, portanto, amostras fecais consideradas as melhores formas de monitorar o patógeno.

Existem muitos trabalhos na literatura científica sobre os meios de cultura e métodos para o isolamento de *Salmonella*, contudo, muitas vezes o confronto entre os diversos resultados apresentam-se dúbios e contraditórios,

devido à multiplicidade de propostas de utilização de meios e métodos que estão disponíveis. Edel & Kampelmacher (1968) relataram variações na metodologia utilizada para isolar *Salmonella* em laboratórios europeus. Uma pesquisa Nacional realizada nos Estados Unidos também demonstrou que diferentes laboratórios apresentaram diferentes propostas quanto às metodologias empregadas para isolamento de *Salmonella*, principalmente em relação ao estudo dos produtos e ambientes avícolas (WALTMAN & MALLINSON, 1995).

Algumas das variáveis quanto metodologia empregada que podem resultar em diferenças na recuperação de *Salmonella* sp. são o tipo, a quantidade e as fontes de amostras, sejam estas artificiais ou naturalmente contaminadas, o pré-enriquecimento utilizado no processamento das amostras, o tipo de formulação de enriquecimento seletivo utilizado, a temperatura e o período de incubação de enriquecimento, os meios para plaqueamento utilizados e o número de colônias selecionadas a partir dos meios seletivos. Dessa maneira, os meios e métodos eficazes para um determinado tipo de amostra pode não ser necessariamente ótimos para outras amostras (WALTMAN, 2000).

Portanto, esse trabalho irá discutir sobre os procedimentos de enriquecimento seletivo empregados para diferentes amostras, visando compreender os melhores meios de cultura utilizados para isolamento de *Salmonella*, uma vez que essa bactéria é responsável por inúmeros casos de toxi-infecções alimentares em humanos, apresenta complexa interação entre o meio ambiente e as diversas espécies de hospedeiros, tornando o seu diagnóstico microbiológico imprescindível para a saúde pública (LIU et al., 2011).

SALMONELA NA SAÚDE PÚBLICA

A salmonelose é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo (LOURENÇO et al., 2004). Esta patologia é causada por

bactérias do gênero *Salmonella* spp. e frequentemente tem sido apontada como um dos principais agentes envolvidos em surtos em vários países, tais como Inglaterra, Brasil (SILVA & DUARTE, 2002) e Estados Unidos (LÓPEZ-MOLINA et al., 1998; CDC, 2005), causando graves intoxicações alimentares no homem (MAIJALA et al., 2005; TESSARI et al., 2008) devido, principalmente, ao consumo de produtos e subprodutos avícolas (TÉO, 2002).

O crescente progresso da indústria avícola ao longo dos anos através de melhoramentos genéticos, excelente nutrição das aves e práticas de manejo sanitário, gerou um melhor desempenho e uma boa produtividade avícola (LORA et al., 2008), ofertando ao consumidor a disponibilidade de uma fonte rica de proteína a custo acessível, no entanto, ainda existem relatos de contaminações ocorrentes em aves na própria indústria avícola (ZANCAN et al., 2000; PERDONCINI et al., 2011). Contaminações de produtos e subprodutos avícolas disponibilizados ao consumo têm sido bastante relatadas, isso devido principalmente a falhas ocorrentes durante as etapas de abate, processamento, armazenamento, através do contato com superfícies contaminadas, pela mão dos manipuladores e por contaminação cruzada durante o preparo dos alimentos (NAGARAJA et al., 1991).

A porta de entrada de contaminação em animais na grande maioria dos casos, ocorre através da ingestão de alimentos e água contaminados por fezes ou hábito da coprofagia, manifestado por animais jovens. Em aves de produção é bastante citada a transmissão do patógeno pela via transovariana quando os folículos ovarianos estão infectados com a bactéria, logo os ovos em desenvolvimento infectam-se no oviduto (POPPE, 2000). Adicionalmente, de forma horizontal as aves jovens podem ser infectadas através das vias oral, nasal e conjuntival (COX et al., 1996; OKAMURA et al., 2001). Em animais domésticos são observadas também infecções através da via umbilical, geniturinária e transplacentária (GREENE, 2006; RADOSTITS et al., 2007). Tanto em animais domésticos como os de produção podem ser observadas ou

ALBUQUERQUE, A.H. et al. Influência da temperatura e nutrientes selecionados no isolamento de salmonela de espécies clínicas. **PUBVET**, Londrina, V. 8, N. 21, Ed. 270, Art. 1798, Novembro, 2014.

não manifestações clínicas entéricas e extra-intestinais (GREENE, 2006; RADOSTITS et al., 2007).

Embora existam novos métodos rápidos de diagnóstico de *Salmonella* como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) altamente sensível e específico (PERSING, 1991; SCHRANK, 2000) e técnicas de Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) (D'AOUST et al., 1992), a bacteriologia convencional continua sendo de grande importância para os estudos epidemiológicos das bactérias do gênero *Salmonella* (LAX et al., 1995) este método clássico de cultivo é recomendado pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM), American Public Health Association (APHA) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), desenvolvido com intuito de garantir a detecção *Salmonella* spp., em amostras com microbiota competidora muito maior que a população de *Salmonella* spp., ou em número muito reduzido assim como amostras com cepas injuriadas pela técnica de preservação, como a aplicação de calor, congelamento, secagem, salga, cura, entre outros (ECKNER et al., 1992).

PROCEDIMENTOS PARA ISOLAMENTO BACTERIANO

Os procedimentos microbiológicos para isolamento de *Salmonella* geralmente são constituídos pela recuperação das bactérias estressadas em solução tamponada (pré-enriquecimento), enriquecimento em caldo seletivo, plaqueamento em meios sólidos, estudo bioquímico e sorotipificação, como observado na tabela 1 (LITCHFIELD, 1973; NIELSEN & BAGGESEN, 1997). Os caldos de pré-enriquecimento são utilizados em cultura de amostras em que os micro-organismos encontram-se desidratados, para que se possam viabilizar culturas que estão secas como as provenientes de ração, ou quando o número de organismos é baixo (LISTER & BARROW, 2008), o período de incubação varia em torno de 20-24h, mas com relatos com períodos de 16h (BAGER & PETERSEN, 1991). As etapas de enriquecimento e plaqueamento têm como finalidade favorecer o maior número de possibilidades de isolamento da

bactéria (FLOWERS et al., 1992; WRAY & DAVIES, 1994). De modo que a inoculação de amostra suspeita nos meios de enriquecimento aumenta a porcentagem do seu isolamento (DIFCO, 1964).

Em relação à etapa de enriquecimento autores como Lister & Barrow (2008) afirmam que a maioria dos caldos dessa etapa são incubados a 41-42°C, pois a temperatura mais elevada inibe o crescimento de outras bactérias entéricas competidoras. Tais caldos são usados para culturas de amostras que são suscetíveis de estarem contaminadas com alto número de bactérias, como por exemplos as fezes, *swabs* cloacais, amostras ambientais e subcultura do pré-enriquecimento (FLOWERS et al., 1992; WRAY & DAVIES, 1994). O uso de meios sólidos auxiliam na recuperação e no desenvolvimento da bactéria de interesse e inibem o crescimento de outros micro-organismos (FERNANDES et al., 2004).

Na literatura especializada, as etapas de enriquecimento e plaqueamento, para o isolamento de *Salmonella*, apresentam várias indicações para o uso de meios de cultivo (FLOWERS et al., 1992; WRAY & DAVIES, 1994).

Os meios de enriquecimento mais comuns são os caldos Selenito Cistina (SC), Tetracionato (TT), Rappaport-Vassiliadis (RV) e seus derivados, acrescidos ou não de novobiocina (WALTMAN, 1998; NASCIMENTO et al., 2000). Quanto aos meios de plaqueamento, os mais comuns são Ágar Mac Conkey (MC), Ágar Citrato Desoxicolato (DCA), Ágar Verde Brilhante (VB) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (LISTER & BARROW, 2008). O caldo tetracionato e selenito são meios comumente utilizados para o isolamento de *Salmonella* Typhi e outros membros do grupo paratifoide podendo ser empregados em amostras de fezes, urina, águas residuais e materiais infectados como ovos e outros alimentos (DIFCO, 1964).

A falta de clareza para uso de uma melhor metodologia para isolamento de *Salmonella* de acordo com a amostra a ser processada propicia ampla discussão e constante reformulação de meios consagrados, bem como para o surgimento de novos meios.

Tabela01. Meios de cultura mais utilizados nas diferentes etapas do isolamento de *Salmonella* sp.

Etapas do cultivo	Meios de cultivo mais utilizados
1. Pré-enriquecimento não seletivo	Água peptonada tamponada Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI)
2. Enriquecimento em meio seletivo	Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) Caldo Selento Cistina Caldo Tetracionato
3. Plaqueamento sólido	Ágar Verde Brilhante Ágar Citrato Desoxicolato Ágar Xilose Lisina Terginol-4 Ágar Mac Conkey
4. Triagem em meios bioquímicos	Ágar Ferro Lisina Ágar Ferro Tríplice Açúcar Sistemas de testes de rápida identificação
5. Confirmação	Provas bioquímicas adicionais e sorotipagem

Fonte: Nielsen & Baggesen (1997)

CALDOS DE ENRIQUECIMENTO SELETIVO

O enriquecimento seletivo bacteriano tem como objetivo dar condições preferenciais de crescimento a bactérias, tais como as do gênero *Salmonella* spp. A seletividade decorre por meio da inibição da microbiota acompanhante presentes na amostra, que não seja *Salmonella* sp., geralmente devido a presença de compostos tóxicos, do pH, e da pressão osmótica, fatores que podem estar presentes de forma isolada ou combinada nos meios (BAGER & PETERSEN, 1991; ARROYO & ARROYO, 1995). A eficácia do meio de

cultivo pode ser influenciada também por fatores como volume do inóculo oriundo do pré-enriquecimento, o tempo e a temperatura de incubação (FAGERBERG & AVENS, 1976; PETERZ et al., 1989; BAGER & PETERSEN, 1991; CALDERON & FURLANETTO, 1991) e a própria microbiota presente na amostra (SHARMA & PARKER, 1969; VAN SHOTHRST et al., 1977; JUNE et al., 1995).

O meio ideal, portanto, deve ter como principal função permitir o crescimento da *Salmonella* sp., consentindo que esta se multiplique até nível detectável, e seja satisfatoriamente seletivo para evitar um grande crescimento da microbiota competitiva (BECKERS et al., 1987).

A seletividade do caldo Selenito é baseada na toxicidade do selenito e dos selenopolititanatos, compostos presentes no meio, que são geralmente absorvidos mais rapidamente pelas outras bactérias do que pelas *Salmonella* ssp. Estes compostos impedem a proliferação da microbiota bacteriana competidora por serem incorporados às suas proteínas celulares (BAGER & PETERSEN, 1991). Originalmente, nos princípios de sua formulação, o caldo selenito, por vezes, inibia o crescimento da *Salmonella*, porém, com o acréscimo de L-cistina e, a consequente diminuição da toxidade do meio, possibilitou seu melhor crescimento, surgindo, assim, o caldo Selenito Cistina (SC), com temperatura de incubação recomendada para este meio de 37°C (ROSE et al., 1971).

A ação do tetrionato formado pela reação entre o tiosulfato e a solução de iodo presente neste caldo de enriquecimento, torna-o seletivo para o isolamento de *Salmonella* sp., a adição de bile bovina e verde brilhante ao caldo tetrionato resultou no caldo denominado Tetrionato Müller-Kauffmann (TMK) com temperatura recomendada de incubação variando em torno de 41,5°C a 42°C, uma vez que, temperaturas elevadas de 43°C podem inibir alguns sorotipos de *Salmonella* sp. (MÜLLER, 1987; PETERZ et al., 1989).

O caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) resultou de várias modificações do caldo Rappaport, como acréscimo nas concentrações finais de verde malaquita,

apresentando uma grande eficiência na recuperação de *Salmonella* sp. e um alto nível de seletividade (BAGER& PETERSEN, 1991).Este caldo favorece a multiplicação das *Salmonella* sp. em pressões osmóticas relativamente elevadas (concentração final do cloreto de magnésio hexaidratado de 36 +/- 0,5 g/l de meio), pH relativamente baixo (5,2 +/- 0,2), em temperaturas de 43°C, e por estas bactérias apresentarem necessidades nutricionais modestas (Rappaport-Vassiliadis,1987). No entanto, 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 deve ser reduzida para 42°C para assim abranger todos os sorovares (PETERZ et al., 1989).

Diversos autores, objetivando isolar *Salmonella* sp.,vêm demonstrando que dependendo do tipo de amostra avaliada e da temperatura de incubação referentes ao caldo seletivo utilizado, pode favorecer ou não o isolamento do patógeno (CARRINGTON, 1980; BAILEY et al.,1981; BERCHIERI JR., 1984; BAILEY et al.,1988; CALDERON & FURLANETTO, 1991; HUMBERT et al., 1995; BLIVET et al., 1997; NASCIMENTO et al., 2000). Assim como a frequência de isolamento de diferentes sorotipos de *Salmonella* altera-se conforme os meios utilizados para enriquecimento e plaqueamento do material examinado (READ et al., 1994).

INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FATORES NO ISOLAMENTO DE *SALMONELLA*

Carrington (1980) relata que o caldo TT apresenta um fraco desempenho quando utilizado para isolamento de *Salmonella* a partir de fezes, porém quando se utilizam amostras de fezes de aves inoculadas parece ter boa eficiência. Nascimento et al. (2000) analisando 40 amostras de fezes de aves contaminadas com 8 sorotipos de *Salmonella* (Agona, Anatum, Enteritidis, Havana, Infantis, Otokam, Schwarzengrund e Typhimurium), utilizando os caldos de enriquecimento seletivo (TT, RVN, SCN) obtiveram positividade em 39 (97,5%), 20 (50,0%), 13 (32,5%) nas amostras, respectivamente. A

quantidade maior e menor de células viáveis de salmonelas nesses resultados reforça o conceito de que a presença de outras bactérias, principalmente enterobactérias, dificulta a ação dos caldos de enriquecimento sobre os microrganismos competidores (NASCIMENTO et al., 2000). Outra justificativa para tal controvérsia é que o caldo TT quando usado em fezes com baixa concentração de micro-organismos torna-se tóxico para a cepa (COX & MERCURI, 1978).

O caldo SC também é bastante recomendado para isolamento bacteriano (BERCHIERI JR. et al., 1984; ARMFELT & KORKEALA, 1991; BUSSE, 1995; WARD et al., 1995; BLIVET et al., 1997; FORWARD & RAINNIE, 1997; NASCIMENTO et al., 2000). Autores como Forward & Rainnie (1997), Alvseike & Skjerve (2000) relataram bons resultados com o uso deste caldo na recuperação de *Salmonella* em fezes. No entanto, existem relatos considerando-o ineficiente para a recuperação de *Salmonella* em amostras de produtos avícolas (BAILEY et al., 1981; BAILEY et al., 1988; HUMBERT et al., 1995). Discordando dos achados de autores como Berchieri Jr. et al. (1984) e Blivet et al. (1997) que em seus trabalhos afirmam que SC tem uma boa eficiência quando utilizado em amostras de farinha de origem animal e produtos avícolas.

Nascimento et al. (2000) pesquisando o patógeno em carcaças de frango, mostraram não existir diferenças entre os três caldos utilizados para o isolamento bacteriano (SC, TT e RV), embora o melhor resultado tenham sido associando aos caldos SC e TT acrescido com novobiocina. Tais resultados apresentaram similaridade aos encontrados por Rall et al. (2005), cuja pesquisa consistiu em isolar *Salmonella* em carcaça de aves, porém nesse estudo, foi observado que o SC obteve a maior eficácia nos achados.

Autores como Silva et al. (2008) ao utilizarem o caldo RV no isolamento microbiológico para recuperar *Salmonella* em swabs retais de bovino observaram que este caldo apresentou o pior desempenho (23%) comparado com o caldo SC e TMK com 100% e 69% de positividade das amostras testadas respectivamente. Ao trabalhar com amostras oriundas de swabs, Ávila

et al.(2012) mostraram que os caldos SC e TMK e RV não apresentaram diferença significativa diante da amostragem utilizada (15 amostras), porém o caldos SC e TMK apresentaram maior eficiência para o isolamento de *Salmonella* Typhimurium a partir de *swabs* retais de bezerro. Tais autores afirmaram ainda que as amostras submetidas ao caldo RV necessitam de pré-enriquecimento para melhorar o resultado do isolamento microbiológico.

Embora na literatura existam relatos de ineficiência do caldo RV para análise de *swab*, vários autores afirmam que este caldo é o mais efetivo para isolamento de *Salmonella* em amostras de carne, fezes de suínos, esgoto, vegetais, frango, pimenta e terra (VASSILIADIS, 1983; BUSSE, 1984; BECKERS et al., 1986; HAMMACK et al., 1999). Em seus trabalhos Vassiliadis (1983) confirmou a eficiência de RV ao testar 2.000 amostras de produtos de carne, fezes de suínos e de esgoto, observando que 17% foram positivas para *Salmonella* com TT, e 25% com RV. Resultados semelhantes foram observados por Busse (1984), que ao utilizar amostras de fezes, carne suína, pele de frango, observaram 48% e 92% de positividade com os caldos TT e RV, respectivamente. Beckers et al. (1986) testando 590 amostras de vegetais desidratados, ovos, frango, pimenta e terra, observaram que 63% foram positivas para *Salmonella* quando RV foi utilizado e 47% para TT. Assim como Blivet et al. (1997) que em seus resultados com amostras de frango, ovo e peru, encontraram *Salmonella* em 97,6% das amostras positivas utilizando RV, e com menos eficiência 42,2% o caldo TT. No entanto, tais autores observaram que o caldo SC foi capaz de detectar baixos números (10 a 50 UFC/ mL) de alguns sorotipos de *Salmonella*, como *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhi* e *S. Paratyphi*.

A influência de temperatura é outro fator que parece ser bastante importante durante a incubação dos meios de enriquecimento. Pesquisadores como June et al. (1995) e Hammack et al. (1999) verificaram que o RV e o TT a 42°C apresentam melhor desempenho do que SC e TT a 35° C para o isolamento de *Salmonella* a partir de carne fresca e produtos de origem avícola altamente contaminados. Ao testarem três procedimentos de enriquecimento

com RV em 42°C, TT a 35°C e 42°C e SC a 35°C, para avaliar a sua eficácia na recuperação de *Salmonella* em meios artificiais de ostras contaminadas, patas de rã, cogumelos e camarões, observaram que entre 1.125 amostras, a positividade para *Salmonella* foi de 36,3% com RV, 27,5% e 32,7% com TT a 35e 42°C, respectivamente, e 29,7% com SC.

O caldo RV, embora bastante seletivo (PAIVA et al., 2006), quando submetido a uma temperatura de incubação de 42°C pode ter sua eficiência reduzida. Isso pode ser confirmado pelos trabalhos de Silva et al. (2008), em que ao ser utilizado o caldo RV incubados em duas temperaturas distintas, 37°C e 42°C, para recuperar *Salmonella* em swabs retais de bovinos infectados com *Salmonella* Dublin, obtiveram 23% e 8% de isolamento respectivamente. Dessa forma, observou-se que há uma possibilidade de ocorrer uma diferença quantitativa influenciada pela temperatura de incubação do meio de cultivo quando utilizado uma maior temperatura, no caso de 42°C, havendo, assim, uma inibição do crescimento de *Salmonella* Dublin. Corroborando com os achados de Arroyo & Arroyo(1995) que usando a mesma temperatura para o caldo RV não obtiveram bons resultados comparados com o SC que apresentaram os melhores resultados, independentemente da incubação em duas temperaturas distintas (37°C e 43°C).

Pesquisas de *Salmonella* spp. em 50 carcaças de frango realizadas por Nascimento et al. (2000), os quais utilizaram três caldos de enriquecimento distintos acrescidos com novobiocina (SCN, TN e RVN) com temperatura de incubação de 43°C obtiveram resultados positivos em 75,8%, 69,7% e 50,8% respectivamente, entretanto, não apresentaram diferenças significativas entre si. No entanto, em termos absolutos, o caldo SCN foi superior aos demais caldos, sendo nítida em relação aos resultados do RVN. Os mesmos autores trabalhando com 40 amostras de fezes artificialmente contaminadas com cepas de *Salmonella* sp., empregando igual temperatura de incubação, obtiveram 97,5%, 50% e 32,5% nos respectivos caldos TN, RVN e SCN. Nesse caso, observaram diferença significativa entre os caldos de enriquecimento, sendo o caldo TN mais eficaz demais, mostrando que o tipo de amostra pode influenciar

nos resultados, mesmo mantendo uma temperatura padrão de 43°C de incubação dos caldos seletivos. Logo para *Salmonella* ser detectada de forma eficiente, faz-se necessário o uso de mais de um caldo de enriquecimento, assim como, utilizar diferentes temperaturas no procedimento microbiológico (RALLet al., 2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto pode-se dizer que o caldo TT parece apresentar baixa eficiência para análises com amostras oriundas de fezes com baixas concentrações de *Salmonella*, uma vez que o meio torna-se tóxico para a cepa, porém quando é realizada uma busca do patógeno em aves inoculadas, tal meio tem boa eficiência principalmente com uso de temperaturas de incubação entre 35 a 42°C. O caldo SC apresenta um ótimo desempenho para amostras oriundas de fezes e carcaças de frango e um bom desempenho para análise de produtos avícolas, com a capacidade de identificar baixas concentrações de colônias presentes na amostra, no entanto a temperatura de incubação entre 37 e 43°C parece não influenciar nos resultados. O uso do meio RV em amostras de *swabs* retais bovino não tem boa eficácia, no entanto quando usado em amostras de frango, ovo e peru é uma ótima escolha, principalmente com uma temperatura de incubação de 42°C assim como, em produtos altamente contaminados. Porém tal temperatura pode originar falsos negativos para algumas cepas de *Salmonella* como por exemplo a *Salmonella* Dublin. Dessa forma, verifica-se a dificuldade de se apontar determinado meio como a escolha ideal durante o estabelecimento do processo de enriquecimento seletivo no isolamento de *Salmonella*, visto que sua ação é intrinsecamente dependente de uma série de fatores. Concomitantemente, avalia-se, então, que mais estudos são exigidos para que se possa elucidar o mecanismo de atuação dos meios de enriquecimento seletivo, proporcionando uma maior segurança na seleção dos mesmos.

ALBUQUERQUE, A.H. et al. Influência da temperatura e nutrientes selecionados no isolamento de salmonela de espécies clínicas. **PUBVET**, Londrina, V. 8, N. 21, Ed. 270, Art. 1798, Novembro, 2014.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Laboratório de Estudos Ornitológicos (Labeo / FAVET / UECE) pelo seu apoio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVSEIKE, O.; SKJERVE, E. Probability of detection of Salmonella using different analytical procedures, with emphasis on subspecies diarizonae serovar 61:k:1,5,(7). *International Journal of Food Microbiology*, v.58, n.1-2, p.49-58, 2000.

ARMFELT, R.; KORKEALA, H. Comparison of Salmonella enrichment broths. *Suomen Eläinlääkäri-lehti* v.97, p.568-73. 1991.

ARROYO, G.; ARROYO, J. A. Efficiency of different enrichment and isolation procedures for the detection of Salmonella serotypes in edible offal. *Journal of Applied Microbiology*, v.79, n.4, p.360-367, 1995.

ÁVILA, L. G.; SILVA, D. G.; FAGLIARI, J. J. Comparação dos caldos selenito cistina, tetrationato Muller-Kauffmann e Rappaport-Vassiliadis no isolamento de *Salmonella* Typhimurium. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.3, p.773-775, 2012.

BAILEY, J. S.; COX, N. A.; THOMSON, J. E. Efficiency of selenite cysteine and TT enrichment broths for the detection of Salmonella. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.51, n.3, p.409-414, 1981.

BAILEY, J. S.; CHIU, J. Y.; COX, N. A.; JOHNSTON, R. A. Improved selective procedure for detection of *Salmonella* from poultry and sausage products. *Journal of Food Protection*, v.51, n.5, p.391-96, 1988.

BAGER, F.; PETERSEN, J. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.32, n.4, p.473-81, 1991.

BECKERS, H. J.; ROBERTS, D.; PRICE, O.; BEREMER, R. R.; PETER, R. Evaluation of reference material for the detection of Salmonella. *International Journal of Food Microbiology*, v.3, n.5, p.287-298, 1986.

BECKERS, H. J.; HEIDE, V. D. J.; FENIGSEN-NARUCKA, U.; PETERS, R. Fate of Salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Müller-Kauffmann's tetrathionate medium. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.62, n.2, p.97-104, 1987.

BERCHIERI JUNIOR, A.; IRINO, K. P.; NEME, S. N.; PAULILLO, A. C.; CALZADA, C. T.; FERNANDES, S. A.; PESSOA, G. V. A. Contaminação por Salmonella em farinha de origem animal utilizadas no preparo de rações. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.3, n.4, p.83-88, 1984.

BLIVET, D.; SALVAT, G.; HUMBERT, F.; COLIN, P. Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of *Salmonella* spp from poultry products. *International Journal of Food Microbiology*, v.38, n.2-3, p.211-216, 1997.

BUSSE, M. Media for *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, v.26, n.1, p.117-131, 1995.

BUSSE, M. Media for *Salmonella* *International Journal of Food Microbiology*, v.26, p.117-131, 1984.

CALDERON, D. F.; FURLANETTO, S. M. P. Isolamento de *Salmonella* em diferentes meios seletivos de enriquecimento, tempos e temperaturas de incubação. *Revista de Microbiologia*. v.22, p.127- 130, 1991.

CARRINGTON, E. G. The isolation and identification of *Salmonella* spp. In: *SEWAGE SLUDGES: A comparison of methods and recommendations for a standart technique*. Water Resources Centre, UK, Technical Report TR 129, 1980.

CDC. *Salmonella* Surveillance Summary, 2003, Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2005.

COX, N. A.; BAILEY, J. S.; BERRANG, M. E. Alternative routes for *Salmonella* intestinal tract colonization of chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, v.5, n.3, p.282-288, 1996.

COX, N. A.; MERCURI, A. J. Recovery of *Salmonella* from broiler carcasses by direct enrichment. *Journal of Food Protection*, n.41, p.521-524, 1978.

CRUMP, J. A.; LUBY, S. A. P.; MINTZ, E. D. The global burden of typhoid fever. *Bull Who*, v.82, n.5, p.346-53, 2004.

D'AOUST, J.Y.; SEWELL, A.; JEAN, A. Limited sensitivity of short (6h) selective enrichment for detection of foodborne *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, v.53, n.7, p.562-565, 1992.

DIFCO, Manual. 9a ed. Detroit. Difco Laboratories, 1964.

ECKNER, K.F.; MCIVER, R.; LEPPER, W.A.; FANNING, L.; CURIALE, M.S.; FLOWERS, R.S.; ROBISON, B. Use of an elevated temperature and novobiocin in a modified enzyme-linked immunosorbant assay of the improved recovery of *Salmonella* from foods. *Journal of Food Protection*, v.55, n.10, p.758-762, 1992.

EDEL, W.; KAMPELMACHER, E. H. Comparative studies on *Salmonella*-isolation in eight European laboratories. *Bull World Health Organ*, v.39, n.3, p.487-491, 1968.

FAGERBERG, D. J.; AVENS, J. S. Enrichment and plating methodology for *Salmonella* detection in food. A review. *Journal of Milk and Food Technology*, v.39, n.2, p.628- 646, 1976.

FERNANDES, A.C.; BERCHIERI JR., A.; OLIVEIRA, G. H.; PEREIRA, G. T. Avaliação de meios de cultivo para o isolamento de *Salmonella*. *Ars Veterinaria*, v.20, n.3, p.330-337, 2004.

FLOWERS, R. S.; D'AOUST, J. Y.; ANDREWS, W. H.; BAILEY, J. S. *Salmonella*. In: *American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. ed. Washington: APHA. 1992. p. 371-4223.

FORWARD, K. R.; RAINNIE, B. J. Use of selenite enrichment broth for the detection of *Salmonella* from stool: a report of one year experience at a provincial public health laboratory. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.29, n.4, p.215-217, 1997.

GREENE C. E. 2006. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Company, Philadelphia, p.355-360.

HAMMACK, T. S.; AMAGUANA, R. M.; JUNE, G. A.; SHERROD, P. S.; ANDREWS, W. H. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp from foods with a low microbial load. *Journal Food Protection*, v.62, n.1, p.16-21, 1999.

HARVEY, R. W. S.; PRICE, T. H. Comparison of selenite F, Muller-Kauffmann tetrathionate and Rappaport's medium for *Salmonella* isolation from chicken giblets after preenrichment in buffered peptone water. *Journal of Hygiene*, v.87, n.2, p.219-224, 1981.

HUMBERT, F.; MORVAN, H.; LALANDE, F.; COLIN, P. Comparaison de milieux de culture pour la recherche bactériologique de *Salmonella* dans la filière avicole. In: *Comptes rendus des journées de la recherche avicole*. Masson, Paris: Institute de D Elevage Paris, 1995. p. 222-224.

JUNE, G. A.; SHERROD, P. S.; HAMMACK, T. S.; AMAGUANA, R. M.; ANDREWS, W. H. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp from raw flesh highly contaminated food and poultry feed: collaborative study. *Journal AOAC International*, v.79, n.6, p.1307-1323, 1995.

LAX, A. J.; BARROW, P. A.; JONES, P. W.; WALLIS, T. S. Current perspectives in salmonellosis. *British Veterinary Journal*, v.151, n.4, p.351-377, 1995.

LISTER, S. A.; BARROW, P. *Enterobacteriaceae*. In: GORDON, B. *Poultry Diseases*, 608 p. Elsevier Limited, 2008. p. 109 – 145.

LITCHFIELD, J.H. *Salmonella* and the food industry: methods for isolation, identification and enumeration. *Critical Reviews in Food Technology*, v.3, n.4, p.415-456, 1973.

LIU, W.; ZHU, X. N.; YU, S.; SHI, X. M. Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing, *Food Microbiology*, v.28, n.6, p.1182-1189, 2011.

LOURENÇO, M. C .S.; REIS, E. F. M.; VALLS, R. *Salmonella enterica* subsp. *houthenae* sorogruppo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v.46, n.3, p.169-170, 2004.

LÓPEZ-MOLINA, N.; LACONCHA, I.; REMENTERIA, A.; AUDICANA, A.; REALES, I.; GARIZAR, J. Typing of *Salmonella enteritidis* of different phage types of PCR fingerprinting. *Journal of Applied Microbiology*, v.84, n.5, p.877-882, 1998.

LORA, A.; PENA, S.; ALBINO, L.F.T. LOPES, D. C.; ROSTAGNO, H. S. Redução da excreção de nutrientes pelo uso de diferentes estratégias nutricionais em aves e suínos. In: *SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS*, 5., 2008, Cascavel. Anais... Cascavel: Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Aves e Suínos, 2008. p.113-124.

MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA, E. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. *Food Control*, v.16, n.8, p.669-675, 2005.

MÜLLER, K. Tetrathionate broth. *International Journal of Food Microbiology*, v.5, p.237-239, 1987.

NASCIMENTO, M. S.; BERCHIERI JR., A.; BARBOSA, M. D.; ZANCAN, F. T.; ALMEIDA, W. A. F. Comparação de Meios de Enriquecimento e de Plaqueamento Utilizados na Pesquisa de *Salmonella* em Carcaças de Frango e Fezes de Aves. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.2, n.1, p.85-91, 2000.

NAGARAJA, K. V.; POMEROY, B. S.; WILLIAMS, J. E. Paratyphoid infections. In: Calnek et al. (eds.) *Diseases of Poultry*. 9 ed. Iowa State University Press, Ames, USA.. 1991. p. 99-130

NIELSEN B. & BAGGESEN D. L. Update on laboratory diagnosis of subclinical *Salmonella* infection in pigs, In: 2nd Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Copenhagen, Dinamarca, 1997. p. 19-25.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Diseases*, v.45, n.1, p.61-69, 2001.

PAIVA, J. B.; STERZO, E. V.; RIBEIRO, S. A.; PEREIRA, E. A.; BECHIERI JR, A. Isolamento de *Salmonella*: comparação das etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento direto de amostras de fezes armazenadas por 24 e 96 horas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.73, n.3, p. 263-269, 2006.

PERSING, D.H. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, n.7, p.1281-1285, 1991.

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. *Journal of Applied Bacteriology*, v.66, n.6, p.523-528, 1989.

PETERZ, M.; WIBERG, C.; NORBERG, P. The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in homemade and commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. *Journal of Applied Bacteriology*, v.66, n.6, p.523-528, 1989.

POPPE, C. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. p.107-132. In: WRAY, C. E WRAY, A. (eds.). *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing, New York, USA. 2000. 463p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. Diseases associated with *Salmonella* species, In: IBID.(Eds), *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 2007. p.896-921.

RALL, V. L. M.; RALL, R.; ARAGON, L. C.; SILVA, M. G. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, n.2, p.147-150, 2005.

RAPPAPORT-VASSILIADIS (RV) broth. *International Journal of Food Microbiology*, v.5, p. 254-255, 1987.

READ, S. C.; IRWIN, R. J.; POPPE, C.; HARRIS, J. A Comparison of two methods for isolation of *Salmonella* from poultry litter samples. *Poultry Science*, v.73, n.10, p.617-621, 1994.

ROSE, M. J.; ENRIKI, N. K.; ALFORD, J. A. Growth and survival of enterobacteria in selenite-cystine broth containing thiosulfate. *Journal of Food Science*. v.36, n.4, p.590-59, 1971.

SALLES, R. P. R.; CARDOSO, W. M.; TEIXEIRA, R. S. C.; SIQUEIRA, A. A.; SILVA, E. E.; CASTRO, S.B.; CARDOSO, W.M. Monitoramento bacteriológico para *Salmonella* sp. em poedeira comercial em diferentes fases de recria e produção de empresas avícolas da Região Metropolitana de Fortaleza. *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.2, p. 427-432, 2008.

SCHRANK, I. S. Aplicação de método baseado em PCR para a determinação de *Salmonella* em produtos de indústria avícola e em amostras clínicas. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Supl2, p.105, 2000.

SHARMA, R. M; PACKER, R. A. Evaluation of culture media for isolation of *Salmonella* from faeces. *Applied Microbiology*, v.18, n.4, p. 589-595, 1969.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.4, n.2, p.85-100, 2002.

SILVA, D. G.; FAGLIAR, J. J; GARCIA, T. B. Comparação da eficiência dos caldos de enriquecimento seletivo no isolamento de *Salmonella* Dublin. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.3, p.766-768, 2008.

TÉO, C. R. P. A. Avaliação epidemiológica dos surtos de salmonelose ocorridos no Paraná entre janeiro de 1999 e junho de 2001. Londrina - PR, 2002. 101p. (Dissertação de Mestrado) - Curso de Ciências de Alimentos - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2002.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z.; LUCIANO, R. L.; CASTRO, A. G. M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v.38, n.9, p.2557-2560, 2008.

WARD, J.; GRIFFIN, M.; EGAN, J. A comparison between two enrichment procedures for the isolation of *Salmonella* from poultry carcasses. *Irish Veterinary Journal*, v.48, n.6, p.222-223, 1995.

VAN SCHOTHORST, M.; VAN LEUSDEN, F. M.; JEUNINK, J.; DE DREU J. Studies on the multiplication of *Salmonella* in various media at different incubation temperatures. *Journal of applied bacteriology*, v.42, n.2, p.157-163, 1977.

VASSILIADIS, P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: an overview. *Journal of applied bacteriology*, v.54, n.1, p.69-76, 1983.

WALTMAN, W. D.; MALLINSON, E. T. Isolation of *Salmonella* from poultry tissue and environmental samples: a nationwide survey. *Avian Diseases*, v.39, n.1, p.45-54, 1995.

WALTMAN, W. D. Isolation of *Salmonella* from poultry environments. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD-BORNE SALMONELLA IN POULTRY, 1998, Baltimore, 1998, p. 133-153.

WALTMAN W.D. Methods for the Cultural Isolation of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (EDS), *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publish, New York, NY, 2000. p. 355-372

WRAY, C. I. M.; DAVIES, R. H. Guidelines on detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks with particular reference of *S. Enteritidis*. *Bull World Health Organ* v.73, p.1-48, 1994.