

## Estudo comparativo de diferentes meios de cultura para o isolamento de salmonelas em matérias-primas e rações

### Comparative study of different culture media for salmonella recovery in feedstuffs and feeds

CORRESPONDÊNCIA PARA:  
Ricardo de Albuquerque  
Departamento de Nutrição e Produção Animal  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP  
Av. Duque de Caxias Norte, 225  
Caixa Postal 23  
13630-970 – Pirassununga – SP  
e-mail: ricaibuq@usp.br

1-Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – SP  
2-Spave – Consultoria em Produção e Saúde Animal Ltda.

Ricardo de ALBUQUERQUE<sup>1</sup>; Nair Massako Katayama ITO<sup>2</sup>; Claudio Issamu MIYAJI<sup>2</sup>

#### RESUMO

A pesquisa foi conduzida com o objetivo de avaliar a eficiência de meios de isolamento de salmonelas. As matérias-primas e rações analisadas foram submetidas ao pré-enriquecimento em água peptonada tamponada, enriquecimento seletivo nos meios: Selenito cistina (SC), Tetrionato Hajna (TH) e Rappaport Vassiliadis (RV), e semeadura nos meios: Ágar Verde Brilhante (AVB) e Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). Verificou-se que os caldos TH e RV produziram mais isolamentos que SC, que foi inferior nas condições deste trabalho, sendo que TH incubado a 42°C produziu o maior número de resultados positivos, e os meios sólidos de plaqueamento AVB e XLD apresentaram eficiência semelhante.

**UNITERMOS:** Salmonella; Meios de cultura; Ração.

#### INTRODUÇÃO

Há uma constante busca por técnicas analíticas mais sensíveis e rápidas sobre métodos de isolamento de salmonelas. Isto tem trazido melhorias de especificidade, sensibilidade, simplicidade e rapidez de execução dos exames bacteriológicos. São muitas as variáveis consideradas importantes e que limitam a recuperação de salmonela, estas incluem tipos de meios, número de patógenos em relação aos competidores, sorovares de salmonelas, materiais examinados, duração e temperatura de incubação, entre outras.

Conforme Riemann<sup>9</sup>, as técnicas para recuperação de salmonela devem ser adaptadas para o tipo de material que esteja sendo examinado. Alguns meios podem funcionar melhor que outros em certos aspectos de recuperação de sorovares particulares de salmonela, conforme descrito por Al-Hindawi; Taha<sup>1</sup>. Mas nenhum dos relatos de literatura indica a existência de um meio funcionando maximamente para todos os sorovares.

Com base nos relatos de diferentes pesquisadores, é difícil avaliar comparativamente a eficiência dos diferentes procedimentos, pois não existe um padrão estabelecido para o exame de rações<sup>12</sup>. Não foi encontrado por Kafel; Bryan<sup>8</sup> um método universalmente aceito para isolar salmonelas.

Eles afirmam que isto seria desejável, porque a incidência de salmonela aparentemente tem aumentado. Estas considerações estimulam a comparação da efetividade de vários métodos de isolamento. O presente trabalho tem o objetivo de avaliar comparativamente a eficiência de alguns meios ou técnicas de isolamento de salmonelas a partir de rações e matérias-primas usadas na sua fabricação.

#### MATERIAL E MÉTODO

Foram examinadas para a presença de *Salmonella* spp. 136 amostras de matérias-primas e 43 de rações prontas. Estas amostras foram submetidas à recuperação de bactérias em Água Peptonada Tamponada (APT) na proporção de 25 gramas para 225 ml de APT. Após pré-cultivo, todos os materiais foram submetidos a enriquecimento, em 10 ml dos caldos seletivos: Selenito Cistina (SC), Tetrionato Hajna (TH) e Rappaport Vassiliadis (RV). Os 2 primeiros foram semeados com 1 ml, enquanto o caldo RV foi semeado com 0,1 ml. Os meios seletivos semeados TH e SC foram mantidos a 37°C por 24 horas, e os meios RV e TH (TH42) foram incubados a 42°C, sendo o meio de RV incubado por 48 horas (RV48). Cada material cultivado em APT foi semeado em 4 tubos de caldo seletivo. Os caldos SC e TH, após incubação em estufa, foram semeados em meio sólido,

enquanto o RV, após manutenção a 42°C por 48 horas e posterior semeadura, foi deixado à temperatura ambiente por 72 horas (RV5) e depois submetido a novo repique em meios sólidos. Foram usados os meios sólidos Ágar Verde Brilhante (AVB) e Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), os quais foram semeados com auxílio de uma alça bacteriológica de platina com haste circular de 5 mm de diâmetro. As placas de Petri contendo os meios sólidos foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após identificação de colônias típicas de *Salmonella* spp., foi coletada uma por placa. As colônias selecionadas foram inoculadas em tubos contendo o meio de Rugai<sup>10</sup>, e após incubação a 37°C por 18 horas foram pesquisadas as propriedades: fermentação da glicose, fermentação da sacarose, produção de gás, produção de H<sub>2</sub>S, produção de urease, produção de indol e produção de triptofano-desaminase. As bactérias, que foram bioquimicamente caracterizadas como *Salmonella* spp., foram submetidas à prova de detecção do antígeno somático (O) e flagelar (H), mediante uso de anti-soros específicos. As amostras que apresentavam antígenos O e H foram enviadas ao Instituto Oswaldo Cruz (RJ) para fins de caracterização do sorovar.

Todos os materiais examinados receberam com base na presença (+) ou ausência (-) de salmonela, respectivamente os valores um e zero, para fins de análise estatística. Os resultados foram analisados pelo teste do qui-quadrado.

## RESULTADOS

A análise do rendimento dos meios de cultivo apresentou resultados irregulares, como pode ser visto na Tab. 1. Verificou-se que dos 102 isolamentos, o maior número de positivos foi obtido com os caldos TH incubados a 42 e a 37°C, sucedidos por RV incubados por 48 horas (RV48) e mantidos por mais 3 dias à temperatura ambiente, após manutenção a 42°C por 48 horas (RV5). O caldo SC foi o que permitiu o menor número de isolamentos. Analisando o número de isolamentos versus tipo de matéria-prima, ainda notamos que o caldo TH foi o melhor meio seletivo. No entanto, particularmente para derivados de origem animal, o RV 48 apresentou eficiência equivalente ao TH 42. O teste do qui-quadrado demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os diferentes meios seletivos.

Conforme a Tab. 2, analisando-se a distribuição dos isolamentos em 179 amostras, foram obtidos 29 sucessos de isolamento. Observamos que o meio sólido XLD propiciou maior número de isolamentos de salmonelas que o AVB, embora com o uso do teste do qui-quadrado não tenha sido obtida diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Em todos os casos, independente do tipo de caldo seletivo (Tab. 3), o XLD foi superior ou igualmente eficiente ao AVB para isolar colônias de salmonelas exceto no caso de derivados vegetais. Podemos também depreender que a

eficiência do XLD está diretamente relacionada com o tipo de caldo seletivo utilizado. Desta forma, podemos notar que o caldo TH sucedido por plaqueamento em XLD forneceu o maior número de sucessos de isolamento.

Na sorotipagem foi possível identificar, conforme demonstrado na Tab. 4, seis sorogrupos de salmonelas: B, C1, C3, E1, E4 e K. O sorogrupo mais encontrado foi o E1 sucedido pelo C1. Foi possível reconhecer onze sorovares de *Salmonella* e oito amostras do grupo E não puderam ser classificadas. O sorovar mais encontrado foi *S. anatum*. Os diferentes sorovares foram encontrados nos diversos materiais, não havendo correlação entre o tipo de material examinado e o sorovar do microrganismo.

**Tabela 1**

Número de isolamentos de salmonelas para os diferentes materiais examinados, conforme os meios seletivos. (São Paulo, 1993)

Materiais	Meios seletivos					Total
	TH37 <sup>(a)</sup>	TH42 <sup>(b)</sup>	SC <sup>(c)</sup>	RV48 <sup>(d)</sup>	RV5 <sup>(e)</sup>	
Origem Animal	14	17	8	17	12	68
Derivados Lácteos	4	4	0	0	0	8
Derivados Vegetais	7	11	1	1	0	20
Ração Pronta	3	1	2	0	0	6
Total	28	33	11	18	22	102

(a) Tetratonato Hajna incubado a 37°C;

(b) Tetratonato Hajna incubado a 42°C;

(c) Selenito Cistina;

(d) Rappaport Vassiliadis incubado por 48 horas a 42°C;

(e) Rappaport Vassiliadis incubado por 48 horas a 42°C e mantido à temperatura ambiente por mais 72 horas.

**Tabela 2**

Eficiência dos meios sólidos Ágar Verde Brilhante e Xilose Lisina Desoxicolato para o isolamento de salmonelas. (São Paulo, 1993).

Material	Amostras positivas	Total de amostras	AVB <sup>(a)</sup>	XLD <sup>(b)</sup>
Origem animal	16	32	28	40
Derivados lácteos	3	40	4	4
Derivados vegetais	8	64	11	9
Ração pronta	2	43	2	4
Total	29	179	45	57

(a) Ágar Verde Brilhante;

(b) Xilose Lisina Desoxicolato.

## DISCUSSÃO

A escolha do procedimento laboratorial adequado é um pré-requisito essencial para o isolamento de qualquer microrganismo, pois é sabido que há diversos fatores que podem afetar os resultados de comparações de métodos de

**Tabela 3**

Caldos de enriquecimento seletivos, meios sólidos de plaqueamento e sucessos no isolamento de salmonelas. (São Paulo, 1993)

Tratamentos	Triglicérides	Colesterol	Plasmático	Colesterol
	(mg/dL)	Total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	na gema (mg/g de gema)
Controle	1643 <sup>a</sup>	107,2 <sup>a</sup>	4,5 <sup>a</sup>	12,3 <sup>a</sup>
0,5% óleo peixe	1778 <sup>a</sup>	103,9 <sup>a</sup>	4,9 <sup>a</sup>	12,7 <sup>a</sup>
1% óleo peixe	1311 <sup>a</sup>	88,4 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>	12,2 <sup>a</sup>
2% óleo peixe	1053 <sup>a</sup>	75,6 <sup>a</sup>	3,9 <sup>a</sup>	12,4 <sup>a</sup>
3% óleo peixe	1529 <sup>a</sup>	106,1 <sup>a</sup>	4,5 <sup>a</sup>	12,2 <sup>a</sup>
4% óleo peixe	1554 <sup>a</sup>	104,9 <sup>a</sup>	4,9 <sup>a</sup>	12,3 <sup>a</sup>

(a) Tetracionato Hajna incubado a 37°C;

(b) Tetracionato Hajna incubado a 42°C;

(c) Selenito Cistina;

(d) Rappaport Vassiliadis incubado por 48 horas a 42°C;

(e) Rappaport Vassiliadis incubado por 48 horas a 42°C e mantido à temperatura ambiente por mais 72 horas.

(f) Xilose Lisina Desoxicolato;

(g) Ágar Verde Brilhante.

**Tabela 4**

Sorotipagem de amostras de salmonelas isoladas de diferentes tipos de materiais utilizados para alimentação de aves e suínos. (São Paulo, 1993)

Sorotipos	Número de amostras	Sorovar
B	1	S. heidelberg (1)* S. infantis (2)
C1	5	S. montevideu (1) S. mbandaka (2)
C3	2	S. emek (2)
E1	13	S. newlands (2) S. anatum (9) S. mokola (1) S. muenster (1)
E4	3	S. senftenberg (3)
K	1	S. cerro (1)
Total	25	

\*: O número assinalado entre parênteses refere-se ao número de vezes em que o sorovar foi encontrado.

isolamento de salmonelas. Isto explicaria o porquê de não se conseguir recuperação em todas as amostras. Segundo Smyser; Snoeybos<sup>13</sup>, esse problema poderia ser minimizado por examinar um número grande de amostras, pois, conforme estes autores, quando salmonelas estão presentes em grande número, elas são facilmente recuperáveis por vários procedimentos, mas quando presentes em pequeno número, relativamente à microflora total, há certos métodos que podem ser particularmente efetivos. De acordo com esta opinião, Banton *et al.*<sup>2</sup> relataram que o sucesso em se encontrar salmonelas

pode ser reflexo do número de amostras examinadas.

Nesta pesquisa, o uso de amostras múltiplas aumentou o número de isolamentos do organismo teste. Este achado concorda com o relato de Smyser *et al.*<sup>12</sup>, que observaram aumento de recuperação com dois enriquecimentos diferentes. É bem reconhecido que o uso de mais de um caldo seletivo pode aumentar a recuperação de salmonelas, assim, como exemplo, TH incubado a 42°C produziu 33 isolamentos positivos, a maior taxa para uma condição isolada, provavelmente o decréscimo dos organismos competidores permitiu a salmoneja crescer em culturas relativamente puras e forneceu uma vantagem para o seu isolamento e identificação, conforme descrito por Edel; Kampelmacher<sup>5</sup>, que obtiveram resultados semelhantes.

A combinação dos resultados obtidos de TH a 42°C com cada uma das outras variáveis de enriquecimento aumentou a taxa de recuperação, sendo a maior o pareamento com TH a 37°C (28 positivos). Esta comparação é favorável com a recuperação combinada de todas as variáveis de enriquecimento (102 positivos).

A inabilidade de apenas um meio de enriquecimento recuperar todas as amostras positivas foi uma confirmação dos resultados obtidos por outros autores usando inúmeros materiais<sup>7,14,15</sup>. Quanto aos isolamentos associados com os diferentes caldos de enriquecimento, verificou-se que TH e RV produziram mais isolamentos que SC, que foi inferior sob as condições deste trabalho. Todavia, os resultados obtidos permitem algumas observações interessantes: só se obteve isolamento a partir de derivados lácteos com o uso de TH, sendo este, também, o caldo mais eficiente para os derivados vegetais, que apresentaram menor índice de recuperação com o uso de RV e SC, enquanto para as matérias-primas de origem animal os resultados foram mais uniformes entre os diferentes caldos. Para as rações prontas, o SC apresentou desempenho comparável ao TH, enquanto o RV foi ineficiente, não tendo sido conseguida a detecção da contaminação das rações através do seu uso. Estes achados confirmam que as técnicas de recuperação deveriam ser adaptadas para cada tipo de material que fosse examinado, conforme descrito por Riemann<sup>9</sup>.

Quanto ao número de isolamentos associados com os meios de plaqueamento, pode-se verificar que AVB produziu um menor número de isolamentos (45), sendo inferior ao XLD (57). O uso de dois meios aumentou o número de isolamentos, provavelmente isto não foi um indicativo da superioridade de um meio sobre o outro, mas meramente um aumento da probabilidade de sucesso, devido ao maior número de tentativas para uma dada amostra.

Uma vez obtido o isolamento, uma colônia de salmonela foi selecionada para identificação. Algumas amostras de ingredientes continham dois sorovares, e um grande número deles foi identificado usando-se este método. Em cinco das 29 amostras contendo salmonelas foram observadas associações de dois sorovares, sendo essas

associações comumente descritas na literatura<sup>3,7</sup>.

Foram isolados onze sorovares das amostras examinadas, sendo que o sorovar *S. anatum* foi o mais freqüentemente encontrado, o mesmo ocorreu nos trabalhos de Giorgi *et al.*<sup>6</sup> e Berchieri *et al.*<sup>3</sup>, que foram realizados no Brasil, o que vem confirmar a grande difusão deste sorovar em nosso meio.

Os sorovares encontrados pertenciam a 6 sorogrupos somáticos, sendo que o mais comum foi o do grupo E1, que representou 48% dos sorogrupos somáticos identificados, e foi seguido pelo grupo C1 (20%). O isolamento de sorotipos particulares pode ser favorecido pela técnica de isolamento, conforme descrito por Al-Hindawi; Taha<sup>1</sup>.

Embora não tenha sido possível estabelecer correspondência entre os sorovares isolados nos diferentes materiais examinados, a detecção da bactéria em matérias-

primas e rações prontas demonstra ser este um meio de transmissão, inclusive considerado de grande importância para a disseminação da bactéria, conforme relatos de Berchieri *et al.*<sup>4</sup> e Shane<sup>11</sup>, e também como observado neste trabalho com a detecção da bactéria nos produtos utilizados para fabricação de ração animal.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e para as condições da pesquisa realizada, é lícito concluir que para o isolamento de salmonelas, a partir de amostras naturalmente contaminadas, o caldo de enriquecimento TH se mostrou superior aos caldos SC e RV, sendo que sua incubação a 42°C é vantajosa em relação a 37°C, e os meios sólidos de plaqueamento AVB e XLD apresentaram eficiência semelhante.

## SUMMARY

This work was designed to evaluate the efficacy of culture media for salmonella recovery in feedstuffs and feeds. All experimental samples were processed for recovery of stressed bacteria in buffered peptone water and selective media: Selenite Cystine (SC), Rappaport Vassiliadis (RV) and Tetrathionate Hajna (TH), and solid media: Brilliant Green Agar (BGA) and Xylose Lysine Desoxycholate (XLD). Higher number of positive samples was observed from TH and RV as compared to SC. The TH incubated at 42°C produces the bigger number of positive results, whereas the solid media BGA and XLD were both effective.

**UNITERMS:** Salmonella; Culture media; Feed.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AL-HINDAWI, N.; TAHA, R.R. Salmonella species isolated from animal feed in Iraq. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.4, p.676-9, 1979.
- 2- BANTON, C.L.; PARKER, D.; DUNN, M. Chemical treatment of feed ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.35, p.637, 1984.
- 3- BERCHIERI Jr., A.; ÁVILA, F.A.; PAULILLO, A.C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MARQUES, M.A.S.; MATSUDA, H.J. Pesquisa de salmonelas em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. **Científica**, v.11, n.2, p.165-8, 1983.
- 4- BERCHIERI Jr., A.; IRINO, K.; NEME, S.N.; PAULILLO, A.C.; CALZADA, C.T.; FERREIRA, S.A.; PESSOA, G.V.A. Contaminação por salmonela em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de ração. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.4, n.3, p.83-8, 1984.
- 5- EDEL, W.; KAMPELMACHER, E.H. Salmonella isolation in nine european laboratories using a standardized technique. **Bulletin of the World Health Organization**, v.41, p.297-306, 1969.
- 6- GIORGI, W.; OHASHI, K.; ARAÚJO, W.P. Farinha de carne e farinha de peixe como fontes de salmonelas para animais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.38, n.2, p.59-62, 1971.
- 7- HUHTANEN, C.N.; NAGHSKI, J. Effect of type of enrichment and duration of incubation on Salmonella recovery from meat and bone meal. **Applied Microbiology**, v.23, n.3, p.578-85, 1972.
- 8- KAFEL, S.; BRYAN, F.L. Effects of enrichment media and incubation conditions on isolating Salmonellae from ground meat filtrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, n.3, p.285-91, 1977.
- 9- RIEMANN, H. Effect of water activity on the heat resistance of salmonella in dry materials. **Applied Microbiology**, v.16, n.10, p.1621-2, 1968.
- 10- RUGAI, E.; ARAÚJO, A. Meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos Gram-negativos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.28, p.79-83, 1968.
- 11- SHANE, S.M. England releases salmonella data. **Zootecnica Internacional**, v.16, n.12, p.20-5, 1993.
- 12- SMYSER, C.F.; BACHARZ, J.; VAN ROEKEL, H. Detection of *Salmonella typhimurium* from artificially contaminated poultry feed and animal byproducts. **Avian Diseases**, v.7, n.4, p.423-34, 1963.
- 13- SMYSER, C.F.; SNOEYENBOS, G.H. Evaluation of several methods of isolating salmonellae from poultry litter and animal feedstuffs. **Avian Diseases**, v.13, n.1, p.134-41, 1969.
- 14- STOKES, J.L.; OSBORNE, W.W. A selenite brilliant green medium for the isolation of salmonella. **Applied Microbiology**, v.3, p.217-20, 1955.
- 15- TAYLOR, W.I.; SILLIKER, J.H. Isolation of salmonellae from food samples. IV. Comparison of methods of enrichment. **Applied Microbiology**, v.9, p.484-6, 1962.

Recebido para publicação: 22/04/1997  
Aprovado para publicação: 05/08/1999