

ISOLAMENTO DE *SALMONELLA*: COMPARAÇÃO DAS ETAPAS DE PRÉ-ENRIQUECIMENTO E ENRIQUECIMENTO DIRETO DE AMOSTRAS DE FEZES ARMAZENADAS POR 24 E 96 HORAS

J.B. de Paiva^{1*}, E.V. Sterzo¹, S.A. Ribeiro², E.A. Pereira¹, A. Berchieri Junior¹

¹Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Patologia Veterinária, Via de acesso Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14870-000, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: jackboldrin@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido para avaliar comparativamente o isolamento de *Salmonella* sorotipos Enteritidis (SE) e Typhimurium (STM) a partir do enriquecimento direto (ED) ou processamento com pré-enriquecimento (PE) de amostras de fezes de aves adultas, armazenadas em água peptonada tamponada a 1% (APT) por 24 ou 96h a 4° C. Utilizou-se os caldos de enriquecimento Rapaport-Vassiliadis novobiocina (RVN), tetracionato-novobiocina (TN) e selenito-novobiocina (SN) e os meios para plaqueamento ágar verde brilhante (VB), ágar de MacConkey (MC), ágar de Hektoen (HE), ágar *Salmonella-Shigella* (SS), ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e ágar xilose lisina tergitol 4 (XLT4). O procedimento bacteriológico incluiu as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento em caldo seletivo, plaqueamento, testes bioquímicos presuntivos e confirmação sorológica com utilização de soros polivalentes anti-antígenos somáticos e anti-antígenos flagelares de *Salmonella*. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para as amostras armazenadas por 24h submetidas tanto ao PE quanto ao ED. Entretanto, em armazenagem por 96h o número de isolamentos nas amostras submetidas ao PE foi estatisticamente superior às submetidas ao ED ($p < 0,05$). Quanto aos caldos enriquecedores, não houve diferença estatística de número de isolamentos ($p > 0,05$) entre os caldos SN e TN, mas o caldo RVN mostrou-se estatisticamente superior aos demais ($p < 0,05$). Para os meios de plaqueamento, o XLD destacou-se por promover maior número de recuperações, embora sem significado estatístico ($p > 0,05$) para as amostras estocadas por 24h. Entre os dois sorotipos de *Salmonella* (SE e STM) não houve diferença estatística no número de recuperações ($p > 0,05$).

PALAVRAS-CHAVE: Fezes de aves, enriquecimento seletivo, comparação de meios, procedimento bacteriológico.

ABSTRACT

ISOLATION OF *SALMONELLA* FROM POULTRY FECES: A COMPARISON OF PRE-ENRICHMENT AND DIRECT ENRICHMENT. This work was carried out to assess the pre-enrichment (PE) and enrichment (DE) steps for isolating *Salmonella* serotypes Enteritidis (SE) and Typhimurium (STM) from chicken feces kept at 4° C for 24 and 96h. The samples were artificially contaminated and kept in 1% peptone water at 4° C for 24 or 96h. After that, part of them was incubated at 37° C/24h and part was inoculated into enrichment broth, selenite broth plus novobiocin (SN) and tetrathionate broth plus novobiocin (TN) incubated at 37° C/24h. The PE culture was inoculated in SN, TN and Rapaport-Vassiliadis novobiocin (RVN), also incubated at 37° C/24h. The enrichment broth was plated on brilliant green agar (BGA), MacConkey agar (MCA), Hektoen agar (HEA), *Salmonella-Shigella* agar (SSA), xylose-lysine desoxicholate agar (XLDA) and xylose-lysine tergitol 4 (XLT4), which were incubated at 37° C/24h. *Salmonella*-like colonies were submitted to TSI agar and LIA agar, and incubated at 37° C/24h, as well as to slide agglutination tested with poly O and poly H *Salmonella* antiserum. When the samples were stored for 24h there was no difference between PE and DE ($p > 0.05$). However after 96h the PE was superior to DE ($p < 0.05$). For enrichment, better results were seen with RVN broth ($p < 0.05$). The XLD yielded

²Lanagro, Campinas, SP, Brasil.

*Bolsista IC Fapesp

more positive results although with no statistical significance. There was no statistical difference between serotypes SE and STM isolation.

KEY WORDS: *Salmonella* isolation, chicken feces, pre-enrichment, enrichment.

INTRODUÇÃO

O intenso crescimento e desenvolvimento do setor avícola, nas últimas décadas, tornou-o rentável, produtivo e competitivo. Contudo, o sistema intensivo de criação e abate precoce de frangos, favorece a presença de *Salmonella* no produto final (BERCHIERI JUNIOR *et al.*, 1987; BERCHIERI JUNIOR *et al.*, 1989). Entre os mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella*, alguns podem infectar as aves causando ou não o paratifo aviário e, através de produtos alimentícios de origem avícola, estarem envolvidos em toxinfecções alimentares em seres humanos (BERCHIERI JUNIOR, 2000; VAN IMMERSEEL *et al.* 2005). Segundo BARROW (2000), as salmonelas continuam sendo a maior causa de toxinfecção alimentar humana, e devido a sua habilidade de colonizar o trato entérico das galinhas, aumenta o risco de contaminação da carcaça e de ovos. Na década de 80, houve um aumento expressivo nos casos de toxinfecções alimentares associadas a salmonelas na Europa, América do Norte e do Sul (RODRIGUE *et al.*, 1990), fato que culminou com a intensificação de pesquisas sobre salmoneloses em animais e seres humanos (BARROW, 1993). No Brasil também houve um significativo aumento nos casos de contaminação de humanos, destacando-se a *Salmonella* Enteritidis entre os sorotipos mais isolados (FERNANDES *et al.*, 2003; TAVECHIO *et al.*, 1996) também em aves (BERCHIERI JUNIOR, 2000; KANASHIRO, 2005).

Tendo-se em vista a participação de aves no contágio de humanos, foi criado o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) pelo Ministério da Agricultura (Portaria nº 193), com adoção de normas (Portaria nº 8) para prevenir e controlar a presença de *Salmonella* em aves (BRASIL, 1994; BRASIL, 1995).

As etapas necessárias para o isolamento e identificação de espécimes do gênero *Salmonella* seguem uma seqüência que inclui as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento direto (seletivo), plaqueamento em meios semi-sólidos, análise bioquímica e tipificação sorológica (LITCHFIELD, 1973). O enriquecimento e o plaqueamento são as etapas com maior número de possibilidades de meios de cultivos (FLOWERS *et al.*, 1992; WRAY & DAVIES, 1994; WALTMAN & MALLINSON, 1995), pois estes devem auxiliar no desenvolvimento e recuperação da bactéria ao mesmo tempo em que devem impedir o desenvolvimento de microrganismos competidores. A falta de resultados conclusivos propicia ampla discussão e reformulação de meios consagrados, assim como surgimento de novos produtos.

O pré-enriquecimento (PE) é utilizado para análise de material desidratado para favorecer a recuperação de organismos deprimidos ou danificados. Dessa forma, a incubação inicial das amostras em meio não seletivo (PE) permite a recuperação de células debilitadas antes de sua inoculação em meios seletivos. A maioria dos protocolos indica que o tempo mínimo de incubação em meios de PE deve ser de 16 horas a 37° C (D' Aoust & MAISHMENT, 1997; MOHR *et al.*, 1974). Após a incubação, via de regra, 1 mL do caldo pré-enriquecedor é transferido para 10 mL de caldo seletivo, com exceção do caldo Rappaport-Vassiliadis, para o qual deve-se transferir 0,1 mL em 10 mL do caldo.

TATE *et al.* (1990) compararam o isolamento de *Salmonella* com e sem o PE em amostras de ambientes de granjas. Com enriquecimento direto em caldo tetratonato, 73% das amostras foram positivas para *Salmonella*, enquanto 77% das amostras foram positivas quando o PE era empregado antes do enriquecimento em caldo tetratonato.

WALTMAN (1998), cita 3 famílias de meios de enriquecimento seletivo: caldo selenito (EN), caldo tetratonato (TN) e caldo Rapaport-Vassiliadis (RV), acrescidos ou não de novobiocina. Segundo PESSOA & PEIXOTO (1971) a adição de novobiocina ao caldo selenito favorece o isolamento de *Salmonella* em ao maior número de tentativas para uma amostra.

O caldo de enriquecimento RV é um meio de alta seletividade, razão pela qual seu emprego é restrito a amostras submetidas primeiramente ao PE. Este meio foi inicialmente formulado para isolamento de *Salmonella* em fezes, mas estudos posteriores atestaram sua eficiência para isolar *Salmonella* a partir de outros tipos de materiais.

Assim como para os caldos de enriquecimento seletivo, diversas sugestões de conteúdo são feitas para os meios semi-sólidos. Alguns trabalhos ressaltam que não é possível estabelecer qual seria o meio de plaqueamento ideal (McCARTH, 1966; SHERROD *et al.*, 1995; YUNO *et al.*, 1995; PETERSEN, 1997). COX *et al.* (1972) e NASCIMENTO *et al.* (2000) indicaram o uso do ágar verde brilhante (VB) para o isolamento de *Salmonella* de fezes de aves e alimentos de origem avícola. HU & GIBBS (1995) evidenciaram a eficiência do ágar VB para o isolamento de *Salmonella* em amostras de fezes. Destacou-se o uso do ágar xilose-lisina desoxicolato (XLD) para isolamento de *Salmonella* a partir de amostras de carne (REISSBRODT *et al.*, 1996; ALVEIKE & SKEJERVE, 2000) e em fezes (HU & GIBBS, 1995). REISSBRODT *et al.* (1996), WIBERG & NORBERG (1996), HARA-KUDO *et al.*,

(2001) indicam o uso do ágar xilose-lisina tergitol 4 (XLT4) para o isolamento de *Salmonella* de fezes, segundo MILLER *et al.* (1991) e MILLER *et al.* (1994) este meio é exclusivo para *Salmonella*, conseguindo evitar a presença de competidores, especialmente *Proteus* sp.

Da mesma forma que para os caldos de enriquecimento seletivo, melhores resultados advêm da combinação de dois ou mais meios de plaqueamento, (FERNANDES *et al.*, 2003; TAYLOR & SILLIKER 1961; BERCHIERI JUNIOR. *et al.*, 1986; NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Geralmente, a pesquisa de *Salmonella* em amostras de fezes, inicia-se pelo enriquecimento seletivo ou até mesmo pelo plaqueamento direto em ágar seletivo. Contudo, o exame de amostras colhidas em granjas, nem sempre pode ser realizado em 24h. Assim sendo, o presente trabalho propõe-se a investigar o efeito da armazenagem de amostras de fezes de aves adultas, contaminadas experimentalmente com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, conservadas a 4° C em água peptonada tamponada a 1% (APT) por 24 e 96h e levadas a processo de enriquecimento direto em caldos seletivos comparativamente com o processamento a partir do pré-enriquecimento em APT, conforme estabelece o PNSA (BRASIL, 1995). O enriquecimento foi realizado com os caldos selenito-novobiocina (SN), tetracionato-novobiocina (TN) e Rapaport-Vassiliadis-novobiocina (RVN) e o plaqueamento, com meios de ágar verde brilhante (VB), MacConkey (MC), Hektoen (HE), *Salmonella-Shigella* (SS), ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e xilose lisina tergitol 4 (XLT4).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das amostras experimentalmente contaminadas por *Salmonella*

Para a realização do trabalho, utilizou-se fezes de aves adultas do aviário da FCAV-Unesp, Jaboticabal, SP, e de uma granja comercial localizada na região de Campinas, SP. As fezes provenientes da FCAV-Unesp foram processadas no laboratório de Ornitopologia da FCAV-Unesp, Jaboticabal, SP e da região de Campinas pelo LANAGRO – Campinas-SP, setor aviárias. As fezes foram contaminadas experimentalmente com cepas de *Salmonella*, sorotipos Enteritidis e Typhimurium.

As culturas foram preparadas em caldo nutriente, com incubação a 37° C/24h sob agitação constante. A seguir, procedeu-se a contagem de células viáveis de *Salmonella*, diluindo-as decimalmente em PBS pH 7,4. De cada diluição, transferiu-se 0,1 mL para placas contendo ágar verde brilhante, que foram incubadas a 37° C/24h, obtendo-se o número de unidades formadoras de colônia por mL. Com base nestes resultados,

utilizou-se 2 mL da cultura diluída em caldo nutriente, contendo 1,1 x 10⁵ UFC/mL, que foram adicionados a 20 g de fezes (1,1 x 10⁴ UFC/g de fezes). Os testes para cada sorotipo foram realizados separadamente.

A colheita das amostras experimentalmente contaminadas foi realizada com 30 suabes de algodão estéreis, que foram passados nas fezes e colocados, em grupos de 5 unidades, em frascos contendo água peptonada tamponada a 1% (APT), atuando como meio de transporte. Três frascos foram acondicionados a 4° C por 24h, e os outros três por 96h. Este procedimento foi repetido 2 vezes para cada sorotipo.

Procedimento microbiológico

De cada período de armazenagem, uma amostra foi pré-enriquecida em APT e incubada a 37° C/24h. As outras duas foram diretamente enriquecidas em caldo selenito-novobiocina (SN) e em caldo tetracionato-novobiocina (TN), que foram incubados a 37° C/24h. O pré-enriquecimento e o enriquecimento direto foram realizados respeitando a proporção de 1:10. Do crescimento em APT, transferiu-se 1mL para 10 mL de caldo SN, 1 mL para 10 mL de caldo TN e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis Novobiocina (RVN), que foram incubados a 37° C/24h. A partir dos caldos de enriquecimento, foram semeadas placas contendo os meios ágar verde brilhante, ágar de MacConkey, Hektoen, *Salmonella-Shigella*, ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Xilose Lisina Tergitol-4 (XLT-4). As placas foram incubadas a 37° C/24h. A confirmação da *Salmonella* foi realizada submetendo-se as colônias suspeitas a testes bioquímicos em tubos contendo ágar triplice açúcar ferro inclinado (TSI) e ágar lisina ferro inclinado (LIA), que foram incubados a 37° C/24h. Confirmando-se a suspeita do gênero, as colônias foram submetidas ao teste rápido de aglutinação em lâmina, com soro polivalente anti-antígeno somático O e soro polivalente anti antígeno flagelar H de *Salmonella*.

Análise de Resultados

Para análise estatística dos dados utilizou-se o teste não paramétrico Qui-Quadrado (X²) (THRUSFIELD, 1995).

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão dispostos os resultados do isolamento de *Salmonella* a partir dos caldos de enriquecimento utilizados, considerando-se o pré-enriquecimento (PE) e o enriquecimento direto (ED) das amostras armazenadas por 24 e 96h. Das 25 amostras armazenadas por 24h obteve-se isolamento em 13

delas com o ED contra 19 no processamento que utilizou PE. Estes dados não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Para as amostras armazenadas por 96h, das 25 amostras analisadas obteve-se isolamento positivo em 21 delas quando submetidas ao PE anteriormente ao enriquecimento, contra 11 no ED, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Nas amostras submetidas ao ED e armazenadas por 24 e 96h, o número de isolamentos no caldo TN e no caldo SN não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$) e, ainda, não se observou diferença estatisticamente significativa quando se comparou os resultados da associação de caldos com o uso do caldo TN ou do caldo SN isolados.

Nas amostras submetidas ao PE armazenadas por 24 e 96h, houve superioridade no número de isolamentos das amostras enriquecidas em caldo RVN quando comparadas aos caldos TN e SN ($p < 0,05$). Também se observou diferença estatisticamente sig-

nificativa ($p < 0,05$) ao se comparar os resultados da associação dos caldos com o uso do caldo SN e caldo TN isoladamente. A análise da associação de caldos com o uso isolado do caldo RVN não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

A Tabela 2 exhibe os resultados referentes ao isolamento de *Salmonella* em fezes de aves, segundo os meios de plaqueamento utilizados. Para as amostras processadas após 24h de estocagem, os resultados apresentados não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Notou-se superioridade numérica dos ágar XLD e SS em relação aos demais. Para as amostras processadas após 96 horas de estocagem, o ágar XLD apresentou-se estatisticamente superior aos demais ($p < 0,05$).

A Tabela 3 exhibe as comparações entre o número de isolamentos de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o número total de isolamentos dos dois sorotipos.

Tabela 1 - Isolamento de *Salmonella* de fezes de aves adultas contaminadas experimentalmente, considerando-se o pré-enriquecimento (PE) e o enriquecimento direto (ED) de amostras conservadas em água peptonada tamponada (APT) por 24 e 96h a 4° C.

PE	Enriquecimento	Nº de amostras armazenadas					
		24 horas			96 horas		
		Positivas	%	Total	Positivas	%	Total
APT	SN	5	20	25	6	24	25
APT	TN	9	36	25	6	24	25
APT	RVN	17	68	25	18	72	25
	SN	8	32	25	7	28	25
	TN	11	44	25	11	44	25
APT	SN,TN, RVN	19	76	25	21	84	25
	SN,TN	13	52	25	11	44	25

SN: caldo selenito-novobiocina, TN: caldo tetrionato-novobiocina, RVN, caldo rapapport-vasiliadis-novobiocina.

Tabela 2 - Isolamento de *Salmonella* de fezes de aves adultas contaminadas experimentalmente, considerando-se os meios para plaqueamento das amostras conservadas em água peptonada tamponada (APT) por 24 e 96h a 4° C.

Meios para plaqueamento em ágar	Nº de amostras armazenadas					
	24 horas			96 horas		
	Positivas	%	Total	Positivas	%	Total
VB	11	44	25	19	76	25
MC	11	44	25	8	32	25
HE	5	33	15	8	53	15
SS	6	60	10	7	70	10
XLD	7	70	10	9	90	10
XLT4	8	53	15	7	46	15

VB: ágar verde brilhante, MC: MacConkey, HE: Hektoen, SS: *Salmonella-Shigella*, XLD: xilose, lisina desoxicolato, XLT4: xilose lisina tergitol 4.

Tabela 3 - Isolamento de *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Typhimurium (STM) de fezes de aves adultas contaminadas experimentalmente, considerando-se o pré-enriquecimento (PE) e o enriquecimento direto (ED) de amostras conservadas em água peptonada tamponada (APT) por 24 e 96h a 4° C.

Início sequência	Serovar	Nº de amostras armazenadas					
		24 horas			96 horas		
		Positivas	%	Total	Positivas	%	Total
PE	SE	14	70	20	16	80	20
PE	STM	5	100	5	5	100	5
ED	SE	8	66	20	6	30	20
ED	STM	5	100	5	5	100	5
PE+ED	SE	14	70	20	19	95	20
PE+ED	STM	5	100	5	5	100	5

DISCUSSÃO

Os dados referentes ao isolamento de *Salmonella* em fezes de aves armazenadas por 24h não mostraram diferença ($p > 0,05$) entre as etapas de ED e PE, embora haja superioridade numérica de isolamento nas amostras submetidas ao PE. Para as amostras armazenadas por 96h, os valores obtidos diferiram entre si ($p < 0,05$), sendo o número de isolamentos superior quando o procedimento iniciou-se com o PE. Comparando-se o número de isolamentos positivos entre 24 e 96h, estes não diferiram entre si ($p < 0,05$) quando as amostras armazenadas por 96h foram submetidas à etapa de PE. Estes dados assemelham-se aos observados por TATE *et al.* (1990), que obtiveram 73% de isolamento com amostras submetidas ao ED contra 77% de positividade para as submetidas ao PE, com 75% de isolamentos sem estocagem das amostras e 86% de isolamentos quando as amostras foram armazenadas.

Os valores relativos ao desempenho dos caldos enriquecedores SN e TN para o isolamento de *Salmonella* de fezes mostrou que os desempenhos individuais foram muito próximos, não apresentando diferença estatística ($p > 0,05$). Estes resultados corroboram com aqueles descritos por TAYLOR & SILLIKER (1961), HUHTANEN & NAGSKI (1972) e NOGUEIRA & FRANCO (1995) os quais também não encontraram diferença estatística entre os isolamentos obtidos com os caldos. Sendo assim, não são condizentes aos resultados apresentados por FORWARD & RAINNIE (1997) e ALSEIKE & SKJERVE (2000) que consideraram o caldo selenito com rendimento superior na recuperação de *Salmonella* a partir de fezes. Quanto ao caldo RVN, este mostrou-se superior aos demais ($p < 0,05$), provavelmente por se tratar de um meio de alta seletividade com uso restrito a amostras submetidas ao PE.

Conforme relatos anteriores (TAYLOR & SILLIKER 1961; BERCHIERI JUNIOR *et al.*, 1986; WALTMAN, 1998; SMYSER & SNOYENBOS, 1969; FERNANDES *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2000), também foi evidente neste traba-

lho, que os melhores resultados advêm da combinação de caldos.

A análise dos resultados relativos aos meios de plaqueamento possibilitou evidenciar nas amostras armazenadas por 24h, a superioridade numérica sem significado estatístico do ágar XLD e do ágar SS, os quais permitiram o isolamento positivo em 70% e 60%, das amostras, respectivamente, à semelhança dos resultados encontrados por NASCIMENTO *et al.* (2000). Para as amostras armazenadas por 96 horas a superioridade do ágar XLD em relação aos demais foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Da mesma forma que para os caldos de enriquecimento, a utilização de vários meios de plaqueamento permitiu maior número de isolamentos, por aumentar a possibilidade de recuperação.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre a recuperação dos sorotipos (*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*) concordando com ARROYO & ARROYO (1995), os quais afirmam que o isolamento de *Salmonella* independe do sorotipo inoculado e do meio utilizado, e que este depende da concentração de *Salmonella* na amostra e da competição desta com outras bactérias.

Os resultados deste trabalho demonstram que a etapa de pré-enriquecimento de amostras de fezes estocadas por 96h favorecem o isolamento de *Salmonella*. Permitem ainda, vislumbrar a dificuldade em se definir qual o melhor caldo de enriquecimento e meio de plaqueamento para o isolamento de *Salmonella*, reforçando dessa forma a idéia de que o melhor a se proceder é a associação de dois ou mais caldos de enriquecimento e meios de plaqueamento.

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Antônio José dos Santos e Sra. Aparecida Rodrigues Baptista pelo auxílio técnico laboratorial e ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro e bolsas de IC.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, R.; ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I. Estudo comparativo de diferentes meios de cultura para o isolamento de salmonelas em matérias-primas e rações. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.37, n.1, 2000.
- ALSEIKE, O. & SKEJERVE, E. Probability of detection of *Salmonella* using different analytical procedures with emphasis on subspecies diarizone serovar 61:k:1,5 (7). *International Journal of Food Microbiology*, v.58, p.49-58, 2000.
- US. EPA. Sewage Sludge Regulations Part 503-Standard for the use or disposal of sewage sludge. USEPA, 1992.
- ARROYO, G.; ARROYO, J.A. Efficiency of different enrichment and isolation procedures for the detection of *Salmonella* serotypes in edible offal. *Journal of Applied Bacteriology*, v.79, n.4, p.360-367, 1995
- BARROW, P.A. *Salmonella*-present, past and future. *Avian Pathology*, v.22, p. 651-659, 1993.
- BARROW, P.A. The paratyphoid *Salmonellae*. *Review Science Technology*, v.19, p.351-375, 2000.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; IRINO, K. PAULILLO; 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.4, p.83-88, 1984.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; IRINO, K. PAULILLO, A.C.; NEME, S.N.; FERNANDES, S.A.; KRONKA, S.N.; PESSOA, G.V.A. Eficácia dos caldos selenito-novobiocina e tetracionato-novobiocina na pesquisa de *Salmonella* em farinha de carne. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.6, p.133-136, 1986.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; PAULILLO, A.C.; ROSSI JR, O.D.; IRINO, K. FERNANDES, S.A.; ÁVILA, F.A.; PESSOA, G.V.A.; CAZADA, C.T. *Salmonella* em abatedouro avícola. *Ars Veterinária*, v.3, p.81-87, 1987.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; ADACHI, S.Y.; CALZADA, C.T.; PAULILLO, A.C.; SCHOENK-ITURRINO, R.P.; TAVECHIO, A.T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.9, p.9-12, 1989.
- BERCHIERI JUNIOR, A. Enfermidade das aves. In: BERCHIERI JUNIOR, A. & MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.183-253.
- BLIVET, D.; SALVAT, G.; HUMBERT, F. COLIN, P. Evaluation of a new enrichment broth for isolation of *Salmonella* spp from poultry products. *International Journal of Food Microbiology*, v.38, p.211-216, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Programa Nacional de Sanidade avícola*: Atos Legais. Portaria nº 193 de 19 de setembro de 1994: Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola, no âmbito da DAS e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. Brasília, 1994. p.2-3
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Programa Nacional de Sanidade avícola*: Atos Legais. Portaria nº 8 de 23 de janeiro de 1995: Estabelece o Método Analítico de Carcaças de aves e Pesquisa de *Salmonella*. Brasília, 1995. p.60.
- CARRINGTON, E.G. *The isolation and identification of Salmonella spp. in sewage sludges: a comparison of methods and recommendations for a standard technique*. Cambridge: Water Resources Centre, 1980. (Technical Report, TR 129).
- COX, N.A.; DAVIS, B.H.; KENDALL, J.H., WATTS, A.B., COLMER, A.R. *Salmonella* in the laying hens. A comparison of various enrichment broths and plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry feces and poultry food products. *Poultry Science*, v.51, n.4, p.1312-1316, 1972.
- D'AOUST, J.Y. & MAISHMENT, C. Pre-enrichment conditions for effective recovery of *Salmonella* in foods and feed ingredients. *Journal of Food Protection*, v.42, p.153-157, 1997.
- FERNANDES, S.A.; GHILIARDI, A.C.; TAVECHIO, A.T.; MACHADO, A.M.; RGNATARI, A.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.45, n.2, p.54-63, 2003.
- 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*. 3.ed. Washington: APHA, 1992. p.371-421.
- 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 Infection Diseases*, v.29, p.215-217, 1997.
- HARA-KUDO, Y.; KUMAGAI, S.; MASUDA, T.; GOTO, K.; OHTSUDA, K.; MASAKI, H.; TANAKA, H.; TANNO, K.; MIYAHARA, M.; KONUMA, H. Detection of *Salmonella* Enteritidis in shell and liquid eggs using enrichment and plating. *International Journal of Food Microbiology*, v.64, p.395-399, 2001.
- HINSON, R.A. Improved selective procedure for detection of *Salmonella* from poultry and sausage products. *Journal Food Protect*, v.51, p.391-396, 1998.
- HU, J.C. & GIBBS, R.A. A comparison of culture methods for the detection of *Salmonella* in wastewater sludge. *Science and Technology*, v.31, p.303-306, 1995.
- 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, p.578-85, 1972.
- KANASHIRO, A.M.I. Serovars of *Salmonella* spp. Isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. *Brazilian Journal Poultry Science*, p.195-197, 2005.
- LITCHFIELD, J.H. *Salmonella* and the food industry: methods for isolation, identification and enumeration. *Critical Reviews in Food Technology*, v.3, p.415-456, 1973.
- MCCARTHY, M.D. The use of XLD agar as a medium for isolation of intestinal pathogens. *New Zealand Journal Medicine Laboratory Technology*, v.20, p.344-349, 1966.
- MILLER, R.G.; TATE, C.R.; MALLINSON, E.T.; SCHERRER, J.A. Xylose-Lisine-Tergitol 4: an improved agar medium for the isolation of *Salmonella*. *Poultry Science*, v.70, p.2429-2432, 1991.
- MILLER, R.G.; TATE, C.R.; MALLINSON, E.T. Improved XLT4 agar: small addition of peptone to the promote stronger production of hydrogen-sulfide by *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, v.57, p.854-858, 1994.
- MOHR, H.K.; TRENK H.L.; YETERIAN, M. Comparison of fluorescent-antibody methods and enrichment serology for detection of *Salmonella*. *Applied Microbiology*, v.20, p.273-275, 1974.

- NASCIMENTO, M.S.; BERCHIERI JUNIOR, A.; BARBOSA, M.D.; ZANCAN, F.T.; ALMEIDA, W.A.F. Comparison of different enrichment broth and plating media used to isolation *Salmonella* from chicken carcasses and poultry faeces samples. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.2, p.85-91, 2000.
- NOGUEIRA, B.T.C.P. & FRANCO, B.D.G.M. Recovery of acid *Salmonellae* from artificially contaminated mayonnaise. *Revista de Microbiologia*, v.26, p. 28-31, 1995.
- PESSOA, G.V.A. & PEIXOTO, E.S. Caldo selenito-novobiocina um meio de maior seletividade para o isolamento de *Salmonella* de fezes. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.31, p.1-3, 1971.
- PETERSEN, L. A comparison of EF-18 and modified brilliant green agar with lutensit for isolation *Salmonella* from poultry samples. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.38, p.79-85, 1997.
- REISSBRODT, R.; VIELITZ, E.; KORMANN, E.; RABSCH, W.; KUHN, H. Ferrioxamine E-supplemented pre-enrichment and enrichment media improve various isolation methods for *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, v.29, p.81-91, 1996.
- RODRIGUE, D.C.; TAUXE, R.V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella* Enteritidis phage type 4: a new pandemic? *Epidemiology and Infection*, v.105, p.21-27, 1990.
- SHERROD, P.S.; AMAGUANA, R.M.; ANDREWS, W.H.; JUNE, G.A.; HAMMACK, T.S. Relative effectiveness of selective plating agars for recovery of *Salmonella* sp. from selected high-moisture foods. *Journal of AOAC International*, v.78, p.670-690, 1995.
- SMYSER, C.F. & SNOYENBOS, G.H. Evaluation of several methods of isolating *Salmonellae* from poultry litter and animal feedstuffs. *Avian Diseases*, v.13, n.1, p.133-141, 1969.
- SMYSER, C.F. & SNOYENBOS, G.H. Enrichment serology compared with a direct-culture procedure for isolating *Salmonella* from rendered animal by-products. *Avian Diseases*, v.15, p.581-587, 1971.
- TATE, C.R.; MILLER, R.G.; MALLINSON, E.T.; DUGLASS, L.W. JOHNSTON, R.W. The isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples by several enrichment procedures using plating media with and without novobiocin. *Poultry Science*, v.69, n.5, p.721-726, 1990.
- TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DAS, A.M.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.38, n.5, p. 315-322, 1996.
- TAYLOR, W.I. & SILLIKER, J.H. Isolation of *Salmonella* from samples IV. Comparison of methods of enrichment. *Applied Microbiology*, v.9, p.484-486, 1961.
- THRUSFIELD, M. *Veterinary Epidemiology*. Cambridge: Blakwell Science, 1995. p.479.
- VAN IMMEERSEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, L.; NAGY, B.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N.; DUCATELLE, R.; BARROW, P.A. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiology and Infection*, p.1-20, 2005.
- WALTMAN, W.D.; MALLINSON E.T. Isolation of *Salmonella* from poultry tissue and environmental samples: a nationwide survey. *Avian Diseases*, v.39, 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.
- WILBERG, C. & NÖRBERG, G.P. Comparison between a cultural procedure using Rappaport-Vassiliadis broth and motility enrichments on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for *Salmonella* detection from food and feed. *Journal Food Microbiology*, v.29, p.353-360, 1996.
- WRAY, C.I.M. & DAVIES, R.H. Guidelines on detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks with particular reference of *S. Enteritidis*. *Bulletin of the World Health Organization*, v.173, p.1-48, 1994.
- YUNO, M.M.I.; TERZOLO, H.R.; FERNANDES, H.D.; MALENA, R.C.; AUTUNA, M.E. Evaluation of selective culture media for isolation of *Salmonella* from poultry. *Revista Argentina de Microbiologia*, v.18, p.57-69, 1995.

Recebido em 6/4/06

Aceito em 15/8/06