

AValiação DE DIFERENTES MEIOS DE ENRIQUECIMENTO PARA O ISOLAMENTO DE *SALMONELLA*, OCORRENTES EM ÁGUA DE ESGOTO¹

ERNESTO HOFER *

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

SUMÁRIO: Examinando-se 158 amostras de águas cloacais, provenientes de uma estação de tratamento e de uma elevatória de esgotos, localizadas na cidade do Rio de Janeiro, fêz-se uma avaliação da eficiência de quatro meios de enriquecimento para *Salmonella*.

Os meios empregados foram o caldo tetracionato, segundo Kauffmann, o meio de Rappaport e duas modificações deste meio, previamente descritas.

Os resultados encontrados, evidenciaram a superioridade de um dos meios modificados de Rappaport, em que se fez a substituição do verde malaquita por outro corante bacteriostático (Metachromgelb II RD) e com a inclusão de tetracionato, à fórmula original.

A maior eficiência assinalada para este meio se baseou nos resultados obtidos do enriquecimento dos diferentes grupos sorológicos e particularmente dos quinze sorotipos mais incidentes de *Salmonella enteritidis*, na presente investigação.

N O capítulo da evolução das técnicas aplicadas ao diagnóstico das enterobactérias não se poderá deixar de referir à contribuição dada pelo advento dos denominados meios de enriquecimento. Graças a este processo, ficou patenteada sua importância decisiva no maior número de isolamentos de determinadas bactérias enteropatogênicas, particularmente aquelas pertencentes ao gênero

Salmonella que na maioria das vezes, nos métodos de semeadura direta do material, em meios seletivos indicadores, não são capazes de serem evidenciadas.

Extraordinário impulso foi dado neste sentido, após as investigações de Muller (23, 24), demonstrando que a adição de tetracionato aos meios bileados, que já nessa época eram de uso rotineiro, possibilitava um cresci-

1 Recebido para publicação a 27 de junho de 1972.

* Departamento de Microbiologia e Imunologia. Laboratório de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, Guanabara.

mento sobrepujante do bacilo tífico, em decorrência da ação impediante destas substâncias sobre os colibacilos. Paulatinamente, descreveram-se várias outras modificações do caldo tetratioato de Muller, merecendo menção aquela introduzida por Kaufmann (17, 18), cujos resultados foram os mais satisfatórios, determinando a generalização do seu emprego, até os dias atuais.

As investigações de Guth (10), demonstrando a acentuada ação impediante dos sais de selênio para o crescimento de colibacilos, não apresentando, porém, o mesmo efeito para o cultivo do bacilo tífico, possibilitaram, a Leifson (20), elaborar um novo meio à base de selenito de sódio, no intuito do enriquecimento de *Salmonella* principalmente *S. typhi* e *S. paratyphi B*.

Embora se tenham inúmeras referências sobre outros meios de enriquecimento para este grupo das enterobactérias, ressaltam-se, no entanto, o destacado emprego do caldo tetratioato modificado por Kauffmann e do caldo selenito de Leifson, nos trabalhos rotineiros e nas investigações até então efetuadas.

Mais recentemente, Rappaport e cols. (26), analisando a influência de soluções hipertônicas de diferentes sais sobre o crescimento de diversos grupos de enterobactérias, reproduziram, em meio de cultura, o mesmo fenômeno anteriormente relatado por Dold e Ketterer (6) que observaram a maior resistência de alguns sorotipos de salmonelas, em comparação a outros grupos, ao processo de dessecação, em papel de filtro.

Dentre toda a numerosa gama de sais experimentados por estes autores,

revelou o cloreto de magnésio, os resultados mais auspiciosos para tal empreendimento e cuja associação com um corante bacteriostático (verde malaquita), veio a se constituir em novo meio de enriquecimento para a maioria dos sorotipos de *Salmonella*.

Várias observações sobre este novo meio foram realizadas (1, 3, 13, 14, 15), demonstrando, a maioria desses trabalhos, sua inequívoca superioridade, quando comparado com os achados de outros meios, excetuando-se, como já tinha sido assinalado por Rappaport, a sua ineficiência para o enriquecimento de *Salmonella typhi*.

No transcurso da investigação da ocorrência de salmonelas em águas residuais, provenientes de uma estação de tratamento e de uma elevatória de esgotos da cidade do Rio de Janeiro, nossas atenções foram encaminhadas no sentido de introduzir possíveis modificações, no meio descrito por Rappaport (5, 11), em razão do baixo rendimento apresentado pelos demais meios de enriquecimento, inicialmente empregados. A primeira tentativa, na qual se fez a adição de tetratioato à fórmula original, revelou-se extremamente satisfatória, pois aumentou consideravelmente a frequência de isolamentos desta enterobactéria. Todavia, mantinha-se ainda a extraordinária ação impeditiva para o enriquecimento de *S. typhi*, consignada nos ensaios laboratoriais, principalmente em consequência da presença de verde malaquita.

Em trabalho anterior, várias substâncias corantes foram analisadas com este intuito, demonstrando-se que o Metachromgelb II RD, foi capaz de substituir com vantagem o verde ma-

laquita, propiciando tal modificação, inclusive o enriquecimento de *S. typhi* (12).

A presente investigação foi empreendida no sentido de fazer uma avaliação da eficiência de diferentes meios de enriquecimento para salmonelas, utilizando, como fonte de estudo, material naturalmente contaminado, a fim de melhor retratar esta propriedade.

MATERIAL E MÉTODOS

Os meios de enriquecimento empregados, com suas respectivas fórmulas foram os seguintes:

1 — Caldo Tetrionato, modificado por Kauffmann

Caldo simples, com pH 7.0	90 ml
Carbonato de cálcio	5 g
Tiosulfato de sódio	5 g
Bile bovina	5 ml

Em balão, contendo caldo simples, carbonato de cálcio e bile, previamente esterilizados a 120°C durante 15 minutos, é adicionado tiosulfato de sódio, sob a forma de solução aquosa a 20% (esterilizada em vapor fluente por 30 minutos). Complementando o meio, foram juntados, 1 ml de uma solução a 0,1% de verde brilhante a 100 ml do meio e antes de se efetuar a semeadura do material, 0,2 ml da mistura iodo-iodetada (Iodo: 5 g; Iodeto de potássio: 8 g; Água destilada: 40 ml), para cada 10 ml do meio.

2 — Meio de Rappaport e cols.

Solução A

Bacto Tryptone	0,5 g
Cloreto de sódio	0,8 g
Fosfato de potássio mono- básico	0,16 g
Água bidestilada	100,0 ml

Solução B

Cloreto de magnésio (MgC12.6H20)	40 g
Água destilada	100,0 ml

Solução C — Verde mala-

quita (E. Gurr Ltd.)	0,4 g
Água destilada	100,0 ml.

Para cada 100 ml da solução A, com pH ajustado a 6.5 e esterilizada a 120°C durante 15 minutos, são adicionados 10 ml da solução B (esterilizada em vapor fluente por 30 minutos) e 3 ml da solução C, esterilizada pela mesma técnica anterior. Após a junção de todos os elementos constituintes, o meio foi distribuído assepticamente, em volumes de 5 ml por tubo.

3 — A primeira modificação do meio de Rappaport, consistiu em adicionar para cada 10 ml da fórmula original completa, 1 ml de uma solução a 20% de tiosulfato de sódio e 0,2 ml da mistura iodo-iodetada.

4 — A segunda modificação instituída no meio de Rappaport, se baseou na substituição do verde malaquita por Metachromgelb II RD (Gruebler ou G.T. Gurr) sob a forma de solução aquosa a 2%, acrescentando-se 4 ml para cada 100 ml de solução A, contendo 10 ml da solução B. Complementando o meio, após ser distribuído em volumes de 10 ml, em tubos, são adicionados, tiosulfato de sódio e a mistura iodo-iodetada, na mesma concentração assinalada na fórmula anterior. Convém chamar a atenção para o aparecimento de um precipitado neste meio, sem no entanto, apresentar contra-indicação para seu uso.

O material examinado esteve representado por 158 amostras de águas residuais, oriundas de afluentes e efluentes de uma estação de tratamento e de uma elevatória de esgotos, localizadas na Penha e Glória, logradouros suburbano e urbano da cidade do Rio de Janeiro, respectivamente.

As técnicas empregadas no isolamento e identificação foram relatadas em trabalhos já divulgados (5, 7, 13), adotando-se para representação das espécies do gênero *Salmonella*, o novo critério sistemático, preconizado por Ewing (9,18).

RESULTADOS

Na apreciação dos resultados, merece ser destacado inicialmente, que em todas as 158 amostras de águas

de esgoto examinadas, foram isolados representantes do grupo *Salmonella* e considerando sob este aspecto, a eficiência dos quatro meios de enriquecimento empregados, anotaram-se as seguintes frequências numéricas e percentuais de isolamentos, consignados na tabela I.

Verifica-se, portanto, que a segunda modificação do meio de Rappaport, ocupou destacadamente a condição de revelar maior número de exames com a presença de salmonelas. Entretanto, ressalta-se que a positividade absoluta só foi atingida com a associação dos resultados coligidos dos quatro meios de enriquecimento empregados.

Quando se estabelece um confronto entre os achados obtidos, dos diferentes meios, no que concerne ao número de amostras de salmonelas isoladas e ao número de sorótipos identificados, torna-se ainda mais evidente, nesta situação, a superioridade

registrada para a modificação do meio de Rappaport, contendo Metachromgelb. Tais resultados estão discriminados na tabela II.

TABELA I

NÚMERO E PERCENTUAL DE POSITIVIDADE DE *SALMONELLA*, NAS 158 AMOSTRAS DE ÁGUAS DE ESGOTO, EM RELAÇÃO AO MEIO EMPREGADO.

Meios de enriquecimento	Exames positivos	
	Nº	%
K	81	51,26
R	124	78,47
RT	146	92,40
RMCGT	152	96,20

K — Caldo tetrionato de Kauffmann;
R — Meio original de Rappaport e cols;
RT — Meio original de Rappaport acrescido de tetrionato;
RMCGT — Base do meio de Rappaport com cloreto de magnésio, Metachromgelb e tetrionato.

TABELA II

COMPORTAMENTO DOS MEIOS DE ENRIQUECIMENTO EM RELAÇÃO AOS NÚMEROS DE AMOSTRAS DE *SALMONELLA* ISOLADOS E SOROTIPOS IDENTIFICADOS

	MEIOS DE ENRIQUECIMENTO								Total
	K		R		RT		RMCGT		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Salmonelas isoladas	86	12,46	143	20,72	201	29,13	260	37,68	690
Sorotipos identificados	21	25,92	49	60,49	56	69,13	72	88,88	81

Na tabela III, verifica-se a distribuição das salmonelas isoladas e ca-

racterizadas segundo seus grupos sorológicos.

TABELA III
FREQUÊNCIA NUMÉRICA E PERCENTUAL DOS GRUPOS SOROLÓGICOS DAS
690 AMOSTRAS DE SALMONELAS

MEIOS	GRUPOS SOROLÓGICOS												TOTAL	
	B		C ₁		C ₂		D ₁		E ₁ — E ₄		Outros			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
K	22	3,18	21	3,04	8	1,15	9	1,30	16	2,31	10	1,44	86	12,46
R	29	4,20	31	4,49	24	3,47	13	1,88	33	4,78	13	1,88	143	20,72
RT	40	5,79	52	7,53	28	4,05	19	2,75	41	5,94	21	3,04	201	29,13
RMCGT	48	6,95	58	8,40	40	5,79	19	2,75	65	9,30	30	4,34	260	37,68
T o t a l	139	20,14	162	23,46	100	14,47	60	8,68	155	22,45	74	10,72	690	99,99

A análise dos dados apresentados revelaram que o mais elevado índice de isolamentos de *Salmonella* de todos os grupos sorológicos encontrados, relacionam-se com a segunda modificação do meio de Rappaport, e demonstrando, por conseguinte, o mais elevado grau de sensibilidade e especificidade, no mecanismo de enriquecimento destes microrganismos, em confronto com os outros meios estudados.

Quanto ao baixo rendimento do caldo tetracionato, deve-se salientar, em primeiro plano, a sua discreta ação impediante sobre microrganismos dos gêneros *Proteus* e *Pseudomonas*, que em geral se apresentam em grande número nas águas cloacais. Estas bactérias, com facilidade se desenvolvem neste meio, refletindo este fato, posteriormente, nos meios seletivos

indicadores, pela dificuldade ou impossibilidade de seleção de colônias suspeitas de *Salmonella*.

No que tange ao meio de Rappaport, tem-se a assinalar, como grave inconveniente, o enriquecimento do grupo *Enterobacter*, que também determina sérios incômodos para a visualização de colônias suspeitas de *Salmonella*. Em relação às duas modificações do meio de Rappaport, salienta-se o discreto enriquecimento de microrganismos dos gêneros *Proteus*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*.

Finalmente, na tabela IV, acham-se sumariados os dados referentes à avaliação da eficiência do enriquecimento dos quatro meios utilizados, tomando por base os quinze sorotipos de *Salmonella enteritidis*, mais incidentes na presente investigação.

TABELA IV

DISTRIBUIÇÃO NUMÉRICA DOS ISOLAMENTOS ENTRE OS QUINZE SOROTIPOS DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* MAIS INCIDENTES

SOROTIPOS	Grupo Sorológico	MEIOS DE ENRIQUECIMENTO				TOTAL
		K	R	RT	RMCQT	
Anatum	E 1	10	11	16	22	59
Newport	C 2	7	11	16	13	47
Typhimurium	B	7	11	12	15	45
Thompson	C 1	10	6	6	14	36
Muenster	E 1	4	11	9	7	31
Give	E 1	6	9	6	6	27
Oranienburg	C 1	2	5	8	10	25
Muenchen	C 2	1	12	6	4	23
Panama	D 1	4	3	6	9	22
Chester	B	9	3	2	7	21
Derby	B	5	7	4	5	21
Bredeney	B	—	2	11	5	18
Bareilly	C 1	6	3	1	8	18
Concord	C 1	—	4	—	13	17
Tennessee	C 1	4	8	3	2	17

Destacam-se nos resultados, pela maior eficiência demonstrada, o meio de Rappaport modificado, em que se fez a substituição do verde malaquita por Metachromgelb. Este meio, revelou superioridade no enriquecimento de sete dos quinze sorotipos de *Salmonella enteritidis*, respectivamente: *Anatum*, *Typhimurium*, *Thompson*, *Oranienburg*, *Panama*, *Bareilly* e *Concord*. O meio original de Rappaport, ocupou a segunda posição, evidenciando melhor enriquecimento para cinco sorotipos de *Salmonella enteritidis*, representados por *Muenster*, *Give*, *Muenchen*, *Derby* e *Tennessee*.

Embora a primeira modificação do meio de Rappaport tenha apresentado um bom rendimento quanto ao número de amostras isoladas e sorotipos identificados, curiosamente apenas apresentou um melhor enriquecimento em duas oportunidades, com os sorotipos *Newport* e *Bredeney*. para o meio de Kauffmann, tem-se a assinalar que este fenômeno somente foi verificado com a *Salmonella enteritidis*, sorotipo *Chester*.

DISCUSSÃO

Numerosas são as investigações que se detiveram em avaliar o comportamento de diferentes meios de enriquecimento para *Salmonella*, cuja revisão bibliográfica foi pormenorizadamente discutida por **Costa e cols.** (4). Todavia, estas análises tiveram suas atenções quase sempre concentradas no problema das coproculturas e reduzidos são os ensaios que utilizaram, como material de estudo, águas cloacais. É importante particularizar que muitos destes trabalhos firmaram-se apenas no objetivo de registrar a

ocorrência de salmonelas em um ou no máximo dois meios de enriquecimento recaindo, na maioria das vezes, a escolha para um esquema de diagnóstico baseado na utilização do caldo selenito ou em uma das variações instituídas no meio de Muller.

Observa-se que na revisão da literatura sobre o assunto, um dos primeiros trabalhos a este respeito coube a **Peso e cols.** (25), que analisaram a eficiência do meio de Kauffmann em comparação ao caldo desoxicolato-citrato, no isolamento de *Salmonella*, em águas coletadas no rio da Prata. Encontraram, como resultado, a nítida superioridade do primeiro meio, revelando este 97% de exames positivos, comparados aos 27,9% do segundo.

Moore e cols. (22) enfatizam, baseados nos seus experimentos, a importância da necessidade do emprego do caldo selenito, na pesquisa de *Salmonella*, em águas residuais, principalmente quando se visa detectar *S. typhi* e *S. paratyphi B*.

Ampliando estas averiguações, **McCoy** (21) recomenda, além do caldo selenito, a utilização do caldo tetratio-nato, nos exames bacteriológicos de esgotos. Destaca da mesma forma, este Autor, a maior eficiência do meio de selenito, para o isolamento de *S. typhi*.

É pertinente referir que, novo impulso foi dado para a finalidade do enriquecimento de *Salmonella*, como o advento do meio preconizado por **Rappaport**, merecendo de imediato algumas apreciações por vários Autores. A maioria dos resultados obtidos vieram ratificar a melhor eficiência do meio de Rappaport, quando esta-

belecida a comparação com os meios de Kauffmann e Leifson. Entretanto, cumpre realçar que todos aqueles que fizeram uso deste meio são unânimes em destacar sua ineficiência no enriquecimento de *S. typhi*.

No que respeita, no entanto, a avaliação do comportamento do meio de Rappaport no isolamento de *Salmonella* de águas residuais, tem-se somente a referir a investigação de Iveson e col. (16) que analisando 128 espécimes de água de esgoto, tiveram oportunidade de comprovar a superioridade desse meio sobre o caldo selenito.

Os resultados obtidos na presente investigação, confirmam ainda a melhor atuação para o enriquecimento de *Salmonella* a partir do caldo de Rappaport quando em confronto com o meio de Tetracionato de Kauffmann.

Considerando as duas modificações do meio de Rappaport, mais destacada ainda se torna a frequência de isolamentos de *Salmonella*, culminando principalmente com o meio, em cuja constituição se substituiu o verde malaquita pelo metachromgelb. Aliás, a ação impediante do corante original do meio de Rappaport sobre vários sorotipos de *Salmonella*, foi por nós verificada anteriormente, assim como relatado por Falcão e col., (9) embora estes assinalem, como fator principal da inibição desses microrganismos, a concentração excessiva de cloreto de magnésio.

Outrossim, é preciso frisar que nas experiências preliminares, analisando o comportamento de vários tipos de *Salmonella* em presença do meio básico contendo apenas concentrações crescentes de cloreto de magnésio, obtiveram-se resultados praticamente idên-

ticos àqueles narrados por Rappaport, excetuando-se para os sorotipos de *S. enteritidis*, *Chester* e *Pullorum*.

A adição de um novo elemento representado pelo tetracionato, ao meio contendo a concentração preconizada de cloreto de magnésio revelou, no entanto, uma ação inibitória sobre *S. paratyphi A* e *S. cholerae suis*, além dos dois sorotipos já supracitados. Seja dito de passagem que o problema da ação impediante do tetracionato sobre o crescimento de *S. paratyphi A* foi estudado detalhadamente por Banwart e Ayres (2) e Smith (27), no que tange a *S. cholerae suis*.

Quando na presença de todos os ingredientes da fórmula de Rappaport acrescentado de tetracionato obteve-se, como resultante, a ausência ou discreto crescimento de *S. typhi*, além dos outros sorotipos já assinalados. Este aspecto denota a franca ação inibitória do verde malaquita sobre o bacilo tífico e inclusive também revelando uma diminuição da intensidade de crescimento de *S. enteritidis* sorotipos *Paratyphi B*, *Derby*, *Typhimurium*, *Bareilly*, *Thompson* e *Give*.

Todavia, a substituição do verde malaquita por um dos vários corantes pesquisados (amarelo de metacromo) veio a sanar em parte esta precariedade no enriquecimento de alguns dos sorotipos de *S. enteritidis* analisados, como, por exemplo, *Typhimurium*, *Paratyphi B*, *Thompson* e *Bareilly*.

Muito provavelmente a maior eficiência nos isolamentos dos vários sorotipos de *Salmonella* em águas de esgoto, nas modificações propostas do meio de Rappaport, se deve a particularidade da maior ação impeditiva sobre a flora de associação, impossibilitando-a de avantajarse ao cresci-

mento da maioria das salmonelas, fato este que com relativa freqüência é observado quando da utilização do caldo tetrathionato ou do caldo selenito. Inference-se, do exposto, que individualmente nenhum meio de enriquecimento capacita o reconhecimento de todos os sorotipos de *Salmonella* possibilidade esta admissível somente pela associação de diferentes meios de enriquecimento.

Problema básico, que convém também assinalar de um modo geral, é a estreita dependência do valor relativo do enriquecimento e sua passagem nos diferentes meios seletivos indicadores. Para tal circunstância, foi verificado que os resultados mais satisfatórios, no que concerne ao caldo tetrathionato e ao meio de Rappaport, residiram nos meios Agar Verde Brilhante e Agar SS, respectivamente. No entanto, nas duas modificações do meio de Rappaport, em decorrência do elevado grau impeditivo apresentado por estes meios, sobre o crescimento da flora de associação, o meio de Agar Eosina — Azul de Metileno, caracterizado como pouco impedi-

exibiu os resultados mais convincentes, principalmente no aspecto de permitir o reconhecimento de mais de um sorotipo por exame.

SUMMARY

Four enrichment broths (Kaufmann's tetrathionate broth Rappaport's medium and two modifications introduced in original formula of Rappaport broth's previously described), were compared for efficiency of detection of *Salmonella* from 158 sewage samples, obtained from two treatment sewage stations.

In comparative trials, the modified Rappaport medium with tetrathionate and metachromgelb II RD, was highly effective for the recovery of a wide range of *Salmonella enteritidis* serotypes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Maria Dora Leão de Carvalho e aos Srs. José Caetano Alves, José da Silva e Sebastião Januário da Silva Filho, pela valiosa cooperação prestada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — ANDERSON, K. & KENNEDY, H. 1965. Comparison of selective media for the isolation of Salmonellae. *J. Clin. Path.*, 18: 747-749.
- 2 — BANWART, G.J. & AYRES, J.C. 1953. Effects of various enrichment broths and Selective agars upon the growth of several species of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.*, 1: 296-301.
- 3 — COLLARD, P. & UNWIN, M. 1958. A trial of Rappaport's medium. *J. Clin. Path.*, 11: 426-427.
- 4 — COSTA, G.A., SCORZELLI Jr., A., SUASSUNA, I. R., SUASSUNA, I. & GOES, P. 1957. Comparação de meios seletivo-indicadores e de enriquecimento usados no isolamento de enterobactérias patogênicas. *An. Microbiol.*, 5: 239-304.
- 5 — COSTA, G.A., HOFER, E., CARVALHO, M.D.L. & COSENDEY, E.A. 1967. Grupos de Salmonellas ocorrentes em esgotos sanitários do Rio de Janeiro. *IV Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária — Brasília — DF.*
- 6 — DOLD, H. & KETTERER, M. 1944. Untersuchungen über die Lebensdauer (Nachweisbarkeit) der Bakterien der T.P.E. — Gruppe (B. typhi, B. paratyphi B. Schottmüller,

- B. enteritidis Gärtner und Breslau) und die Bakterien der Ruhrgruppe in flüssigen und Filter — papier angetrockneten Stuhlmaterial. *Z. Hyg. Infekt. — Kr.*, 125: 444-456.
- 7 — EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. 1962. *Identification of Enterobacteriaceae*. 2nd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota 258 pag.
- 8 — EWING, W. H. 1963. An outline of nomenclature for the family Enterobacteriaceae. *Intern. Bull. Bacteriol. Nomen. Tax.*, 13:95-110.
- 9 — FALCÃO, D. P. & SUASSUNA, I. 1970. Crescimento e viabilidade de *Salmonella* em diversas variações do meio de Rappaport. *Rev. Microbiol.*, 1(1): 13-18.
- 10 — GUTH, F. 1916. Selennährboden für elektive Zuchtung von typhusbacillen. *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, 77: 487-496.
- 11 — HOFER, E. 1967. Estudos sobre uma modificação do meio de Rappaport. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, 10: 137.
- 12 — HOFER, E. 1969. Ensaio sobre uma modificação do meio de Rappaport. *Am. Microbiol.*, 16: 183.
- 13 — HOFER, E. 1969. Über Abänderungen des Rappaport-Nährbodens. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 210: 419-422.
- 14 — HOOPER, W. L. & JENKINS, H. R. 1965. An evaluation of Rappaport's magnesium chloride/malachite green medium in the routine examination of faeces. *J. Hyg.*, 63: 491-495.
- 15 — IVESON, J. B. & KOVACS, N. 1967. A comparative trial of Rappaport enrichment medium for the isolation of *Salmonellae* from faeces. *J. Clin. Path.*, 20: 290-293.
- 16 — IVESON, J. B. & MACKAY-SCOLLAY, E. M. 1969. Strontium chloride and Strontium Selenite enrichment broth media in the isolation of *Salmonella*. *J. Hyg. Camb.* 67: 457-464.
- 17 — KAUFFMANN, F. 1930-1931. Ein kombiniertes Anreicherungsverfahren für Typhus und Paratyphus bacillen. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 119: 148-152.
- 18 — KAUFFMANN, F. 1935-1936. Weitere Erfahrungen mit dem Kombiniertes Anreicherungsverfahren für *Salmonellabacillen*. *Z. Hyg. Infekt-Kr.*, 117: 26-32.
- 19 — KAUFFMANN, F. & EDWARDS, P. R. 1952. Classification and nomenclature of Enterobacteriaceae. *Intern. Bull. Bacteriol. Nomen-Tax.*, 2: 2-8.
- 20 — LEIFSON, E. 1936. New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) bacilli. *Am. J. Hyg.*, 24: 423-432.
- 21 — MC COY, J. H. 1962. The isolation of *Salmonellae*. *J. Appl. Bact.*, 25: 213.
- 22 — MOORE, B. PERRY, E. L. & CHARD, S. T. 1952. A survey by the sewage swab method of latent enteric infection in an urban area. *J. Hyg., Camb.* 50: 137-156.
- 23 — MULLER, L. 1923. Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques. *C. R. Soc. Biol.*, 89: 434-437.
- 24 — MULLER, L. 1925. Milieux pour la recherche des bactéries du groupe typhodysentérique. *C. R. Soc., Biol.* 93: 433-436.
- 25 — PESO, O. A., LEIGUARDA, R. H. & KEMPNY, J. C. 1949. Investigación des bacterias patogenas intestinales en el agua del rio de la Plata. *Rev. Obras Sanit. Nación*, 131: 101-117.
- 26 — RAPPAPORT, F., KONFORTI, N. & NAVON, B. 1956. A new enrichment medium for certain *Salmonellae*. *J. Clin. Path.*, 9: 261-266.
- 27 — SMITH, H. W. 1959. The isolation of *salmonellae* from the mesenteric lymph nodes and faeces of pigs, cattle, sheep, dogs, and cats and from other organs of poultry. *J. Hyg., Camb.* 57: 266-273.