

EFICÁCIA DOS CALDOS SELENITO-NOVOBIOCINA E TETRATIONATO-NOVOBIOCINA NA PESQUISA DE *Salmonella* EM FARINHA DE CARNE¹

A. BERCHIERI JR.², K. IRINO³, A. C. PAULILLO², S. N. NEME³, S. A. FERNANDES³,
S. N. KRONKA¹ e G. V. A. PESSÔA⁵

ABSTRACT. - Berchieri Jr. A., Irino K., Paulillo A.C., Neme S.N., Fernandes S.A., Kronka S.N. & Pessôa G.V.A. 1986. [Efficacy of selenite-novobiocin and tetrathionate-novobiocin broths in survey of *Salmonella* from meat meal.] Eficácia dos caldos selenito-novobiocina e tetrathionato-novobiocina na pesquisa de *Salmonella* em farinha de carne. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 6(4):133-136. Depto Patologia Veterinária, Fac. Ciênc. Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Rod. Carlos Tonnani, km 5, Jaboticabal, SP 14870, Brazil.

Selenite-novobiocin (SN) and tetrathionate-novobiocin (TN) broths were compared for the isolation of *Salmonella* from meat meal. It was also investigated the correlation between the occurrence of the indicator organisms and of *Salmonella*. SN and TN were equally effective. It was verified that none of these indicator groups (total coliforms and fecal coliforms) are reliable as an index for *Salmonella* contamination in meat meals. There was no correlation between *Salmonella* counts and the number of isolated *Salmonella* colonies.

INDEX TERMS: *Salmonella*, coliforms, selenite-novobiocin, broth, tetrathionate-novobiocin broth.

SINOPSE. - Os caldos selenito-novobiocina (SN) e tetrathionato-novobiocina (TN) foram comparados durante o isolamento de *Salmonella* de amostras de farinha de carne utilizadas para fabricação de ração animal. Também, foram realizadas contagens de *Salmonella* e de coliformes (total e fecal) para verificar se é possível estabelecer alguma correlação entre a presença de coliformes e a presença e o isolamento de *Salmonella*. De acordo com os resultados obtidos, o caldo SN e o caldo TN demonstraram rendimento semelhante. As contagens de coliformes (total e fecal), segundo a análise estatística, não apresentaram correlação alguma (positiva ou negativa) com a contagem de *Salmonella* e com o número de cepas isoladas através dos caldos SN e TN. Também não foi constatada correlação entre a contagem de *Salmonella* e o número de cepas isoladas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Salmonella*, coliformes, caldo selenito-novobiocina, caldo tetrathionato-novobiocina.

INTRODUÇÃO

O isolamento de *Salmonella* de fezes ou de alimentos, onde também estão presentes outras bactérias, inclusive em número

mais elevado, requer a utilização de meios seletivos ou de enriquecimento. Os caldos selenito e tetrathionato têm sido os mais utilizados (Taylor & Silliker 1961, Carlson et al. 1967, Harvey & Price 1968, Smyser & Snoeyenbos 1969, Smyser et al. 1970, Smyser & Snoeyenbos 1971, Huhtanen & Naghski 1972, Edel & Kampelmacher 1973, Carlson & Snoeyenbos 1974, Van Schothorst & Van Leusden 1975, Carvalho & Costa 1979, Sveum & Kraft 1981, Berchieri Jr. et al. 1984, Yde & Ghysels 1984). Segundo Gerichter & Sechter (1966), o caldo selenito pode ser aproveitado quando o número de coliformes presente no material a ser examinado for baixo, enquanto que nos casos deste número ser elevado, melhores resultados podem ser conseguidos empregando-se o caldo tetrathionato. Para Bailey et al. (1981) o material investigado também interfere na ação do caldo seletivo.

Segundo Carlson & Snoeyenbos (1974), o isolamento de *Salmonella* é dificultado pela presença, geralmente em número mais acentuado, de outras enterobactérias. Estudos sobre a concentração de *Salmonella* e de outros microrganismos também têm sido realizados por diversos autores (Thatcher & Montford 1962, Loken et al. 1968, Malhotra et al. 1968, Figueiredo 1970, Tompkin & Kueper 1973, Silliker & Gabis 1976, Mercuri et al. 1978, Smeltzer et al. 1980, Thomas et al. 1981, Tamminga et al. 1982) com o propósito de avaliar a relação entre as contagens de microrganismos e a presença de *Salmonella*.

O presente estudo foi elaborado para comparar a eficiência dos caldos selenito-novobiocina e tetrathionato-novobiocina no isolamento de *Salmonella* de amostras de farinha de carne utilizadas na ração animal. A determinação quantitativa de colifor-

¹ Aceito para publicação em 25 de julho de 1986.

² Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal (FCAVJ)-Unesp, Rodovia Carlos Tonnani, km 5, Jaboticabal, SP 14870.

³ Seção de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, Caixa Postal 7027, São Paulo, SP 01000.

⁴ Departamento de Ciências Exatas, FCAVJ -Unesp.

⁵ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP, Caixa Postal 4365, São Paulo, SP 01000.

mes (total e fecal) e de *Salmonella*, visou avaliar a correspondência entre contagens de coliformes e de *Salmonella* e entre essas contagens com o isolamento de *Salmonella*.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo comparativo dos caldos selenito-novobiocina e tetrationato-novobiocina

Foram utilizadas 30 amostras de farinha de carne naturalmente contaminadas oriundas de uma fábrica de ração.

A metodologia empregada seguiu as recomendações do Bacteriological Analytical Manual (Andrews et al. 1978) com algumas modificações conforme Berchieri Junior et al. (1986). De cada amostra, retirava-se uma alíquota de 25 gramas que era inoculada em frasco contendo 225 ml de solução de Ringer 1/4. Após homogeneização, a mistura permanecia 6 horas à temperatura ambiente e em seguida por mais 18 horas a 43°C. Posteriormente, alíquotas de 2 ml da suspensão foram transferidas para os caldos (tubos contendo 20 ml) tetrationato-novobiocina (TN) e selenito-novobiocina (SN), os quais eram incubados durante 24 a 120 horas a 43°C. O crescimento foi semeado em ágar verde brilhante e ágar MacConkey, incubados a 37°C por 24 horas. As colônias suspeitas de *Salmonella* eram semeadas no meio presuntivo denominado Instituto Adolfo Lutz (IAL) e a seguir incubadas a 37°C por 24 horas. A identificação dos sorotipos foi realizada pelo Setor de Enterobactérias do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, SP. Para análise estatística empregou-se o teste do qui-quadrado (X^2), segundo Gomes (1970).

Número mais provável (NMP) de Salmonella de coliformes (total e fecal)

a) *Contagem de Salmonella*. Foi efetuada segundo North Junior (1961) com diluições decimais em séries de três tubos, sendo o caldo selenito acrescido de novobiocina, o plaqueamento em ágar Mac Conkey e ágar verde brilhante e a identificação presuntiva no meio IAL. A correção dos valores obtidos com a leitura dos tubos para organismos por grama foi efetuada conforme tabela contida no Bacteriological Analytical Manual (Andrews et al. 1978).

b) *Contagens de coliformes (total e fecal)*. Foram realizadas segundo a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1978) com diluições decimais em séries de três tubos. A correção dos valores obtidos através da leitura da prova em tubo, para organismo por grama, foi efetuada conforme tabela contida no Bacteriological Analytical Manual (Andrews et al. 1978).

c) *Análise estatística*. Os resultados alcançados durante a comparação dos caldos enriquecedores e as contagens de coliformes e de *Salmonella* foram confrontados através do teste de correlação linear, segundo Gomes (1970).

RESULTADOS

De acordo com os resultados experimentais obtidos neste ensaio, comparando-se os caldos SN e TN, observou-se igualdade de rendimento. Ambos propiciaram o isolamento de *Salmonella* em 17 das 30 amostras de farinha de carne analisadas. A somatória dos resultados positivos pelos dois métodos culminou na defecção de *Salmonella* em 19 amostras. Ou seja, duas amostras foram positivas apenas pelo caldo SN e outras duas apenas pelo caldo TN. Os resultados referentes à comparação dos caldos SN e TN estão no Quadro 1. No Quadro 2 estão as 19 salmonelas detectadas. Desses, quatro foram isolados apenas com o caldo SN e outros quatro, apenas com o caldo TN.

No Quadro 3 estão os dados do NMP de *Salmonella* e de coliformes (total e fecal). Também estão inseridos os números de

cepas de *Salmonella*, isoladas através do caldo SN, do caldo TN e pelos dois em conjunto. Esses resultados foram confrontados pelo teste de correlação linear. Analisou-se, o NMP de coliformes totais e de fecais com o número de colônias de *Salmonella* isoladas através de cada caldo, SN e TN e com o NMP de *Salmonella*. O NMP de *Salmonella* também foi confrontado com o número de colônias isoladas pelos dois caldos, SN e TN. Todos os resultados foram não significativos, demonstrando não haver correlação entre os parâmetros confrontados.

A despeito do NMP de coliformes, geralmente, ocorreu isolamento de maior número de colônias de *Salmonella*, por amostra estudada, em placas semeadas a partir do caldo SN em relação ao caldo TN (Quadro 3).

Quadro 1. *Comparação dos resultados obtidos com os caldos SN e TN no isolamento de Salmonella das amostras de farinha analisadas*

Procedimento	Amostras positivas n°
Através dos caldos SN e TN	15
Somente através do caldo SN	2
Somente através do caldo TN	2
Total de amostras positivas através dos dois caldos	19

Quadro 2. *Salmonelas isoladas durante o estudo comparativo dos caldos SN e TN*

Salmonelas
Isoladas através dos dois caldos: <i>S. agona</i> , <i>S. binza</i> , <i>S. bredeney</i> , <i>S. cerro</i> , <i>S. cubana</i> , <i>S. eimsbuettel</i> , <i>S. grumpensis</i> , <i>S. havana</i> , <i>S. manila</i> , <i>S. infantis</i> 014+ e <i>S. mbandaka</i>
Isoladas apenas através do caldo SN: <i>S. abaetetuba</i> , <i>S. cubana</i> dt - , <i>S. kentucky</i> e <i>S. senftenberg</i>
Isoladas apenas através do caldo TN: <i>S. anatum</i> , <i>S. bredeney</i> 027+, <i>S. montevideo</i> e <i>S. morehead</i>

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A literatura especializada apresenta relatos enfatizando o uso do caldo selenito (Carlson et al. 1967, Harvey & Price 1968, Smyser & Snoeyenbos 1969, Carvalho & Costa 1979, Sveum & Kraft 1981, Berchieri Junior et al. 1984) ou o uso do caldo tetrationato (Smyser & Snoeyenbos 1971, Edel & Kampelmacher 1973, Carlson & Snoeyenbos 1974, Van Schothorst & Van Leusden 1975, Thomas et al. 1981). Outros autores porém, como Taylor & Silliker (1961), Smyser et al. (1970), Huhtanen & Naghski (1972), Bailey et al. (1981) e Yde & Ghysels (1984), consideram-nos igualmente eficazes. Analisando estatisticamente os valores contidos no Quadro 1, verifica-se que nas condições em que foi efetuada a presente pesquisa, com amostras de farinha de carne, os caldos SN e TN apresentaram resultados equivalentes. A utilização de ambos elevou o número de

Quadro 3. Valores das contagens de *Salmonella* e de coliformes e número de colônias de *Salmonella* isoladas por amostra e por meio de enriquecimento e, pelos dois caldos em conjunto

Dados agrupados	Amostras																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
NMP <i>Salmonella</i> /100g	23	200	9	11	9	<3(a)	<3	9	2400	9	21	<3	<3	<3	4	460	<3	43	15	<3	15	9	75	9	23	9	4	<3	<3	<3
NMP coliforme total/100g	9	23	7	23	15	<3	7	46	460	<3	<3	1500	4	750	4600	<3	9	43	23	93	23	1100	2400	150	200	460	9	<3	<3	23
NMP coliforme fecal/100g	4	9	<3	23	4	<3	7	23	93	<3	<3	1500	<3	390	2400	<3	<3	23	<3	93	4	3	23	<3	30	4	<3	<3	4	4
Colônias de <i>Salmonella</i> isoladas através do caldo SN	1	3	-	4	8	-	4	3	-	9	-	-	-	1	7	1	7	5	-	3	-	5	-	8	3	-	-	-	-	2
Colônias de <i>Salmonella</i> isoladas através do caldo TN	12	8	10	13	12	-	10	-	-	12	-	-	-	13	5	-	12	10	-	12	10	12	10	12	12	12	12	-	-	11
Total de colônias de <i>Salmonella</i> isolados por ambos, SN e TN	13	11	10	17	20	-	14	3	-	21	-	-	-	14	12	1	19	15	-	15	10	17	10	17	20	15	-	-	13	

(a) Esse valores foram considerados iguais a zero para efeito da análise estatística.

amostras positivas (Quadro 1) de 17 para 19. Margem essa muito pequena para sugerir o emprego simultâneo dos caldos SN e TN, conforme propuseram Taylor & Silliker (1961), embora a utilização de ambos tenha permitido a detecção de mais salmonelas (Quadro 2).

Discorrendo sobre a interferência de coliformes no isolamento de *Salmonella* Gerichter & Sechter (1966), Carlson & Snoeyenbos (1974) e Carvalho & Costa (1979), consideraram o caldo tetrionato melhor controlador desses competidores do que o caldo selenito. Segundo Sveum & Kraft (1981) a quantidade de coliformes em produtos alimentícios secos é pequena, não dificultando o isolamento de *Salmonella*, razão pela qual o caldo selenito poderia ser utilizado. Na presente pesquisa, independente do número de coliformes, conforme pode ser constatado no Quadro 3, o número de cepas isoladas das amostras de farinha de carne após passagem pelo caldo SN, excederam em quase todas as amostras positivas pelos dois caldos, à passagem pelo caldo TN.

No Quadro 3 constam os valores, por amostra, das contagens de coliformes e de *Salmonella* e ainda, o número de cepas de *Salmonella* isoladas por intermédio de cada meio enriquecedor e por ambos. Os valores inseridos nesse quadro foram confrontados pelo teste de correlação linear. Confrontou-se o NMP de coliforme total com o NMP de *Salmonella*, com o número de colônias isoladas pelo caldo SN e com o número de colônias isoladas pelo caldo TN. Da mesma forma, confrontou-se o NMP de coliforme fecal. Essas análises visavam avaliar a interferência do número de coliformes quanto ao isolamento de *Salmonella* através de cada caldo enriquecedor e também se havia correspondência entre a presença de coliformes e a presença de *Salmonella*. Outra correlação estudada foi o NMP e o número de colônias de *Salmonella*, objetivando traçar um paralelo entre contagem e isolamento da bactéria. Considerando o material em estudo, estatisticamente, não houve indicação de que a determinação do número de coliformes (total e fecal) possa servir para esclarecer a presença ou a dificuldade de isolamento de salmonelas. Esses achados estão compatíveis com vários relatos, descritos na literatura especializada analisando diferentes produtos, apresentados por Thatcher & Montford (1962), Loken et al. (1968), Silliker & Gabis (1976), Mercuri et al. (1978), Smeltzer et al. (1980) e Tamminga et al. (1982), estudando respectivamente, produtos a base de ovos, subprodutos de abatedouro, produtos alimentícios desidratados, carcaça de aves e carne de hamburger. Mesmo o trabalho de Tompkin & Kueper (1973), que deixa entrever a possibilidade de correlação entre contagens de microrganismos e a presença de *Salmonella*, apresenta objeções. No concernente ao NMP de *Salmonella* e ao número de cepas isoladas, a análise estatística indicou ausência de correspondência, fato esse já comprovado anteriormente por Thomas et al. (1981) em amostras de ração animal e experimentalmente demonstrado por Malhotra et al. (1968) que, procedendo à contagem da bactéria em amostras de rações e de seus ingredientes, contendo número conhecido de *Salmonella*, notaram falta de concordância entre esses valores e aqueles detectados.

Entre as causas que dificultam a contagem de microrganismos em alimentos secos de origem animal, está a forma de con-

taminação destes que, geralmente é superficial e desuniforme. Conforme sugeriu Figueiredo (1970), o que parece mais adequado, considerando os resultados alcançados na presente pesquisa é a investigação direcionada ao microrganismo patogênico ao invés de contagens.

REFERÊNCIAS

- Andrews W.H., Poelma P.L., Wilson G.R. & Romero A. 1978. VI. Isolation and identification of *Salmonella*, p. 1-29. In: Bacteriological Analytical Manual. 5th ed. Department of Education and Welfare, Washington.
- Bailey J.S., Cox N.A. & Thomson J.E. 1981. Efficiency of selenite-cystine and TT enrichment broths for the detection of *Salmonella*. J. Appl. Bacteriol. 51: 409-414.
- Berchieri Jr. A., Irino K., Neme S.N., Paulillo A.C., Calzada C.T., Fernandes S.A. & Pessôa G.V.A. 1984. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. Pesq. Vet. Bras. 4(3): 83-88.
- Berchieri Jr. A., Irino K., Paulillo A.C., Neme S.N., Fernandes S.A., Kronka S.N. & Pessôa G.V.A. 1986. *Salmonella* em amostras de farinha de carne. I. Avaliação do pré-enriquecimento e do enriquecimento direto. Pesq. Vet. Bras. 6(3): 93-97.
- Carlson V.L. & Snoeyenbos G.H. 1974. Comparative efficacies of selenite and tetrathionate enrichment broths for the isolation of *Salmonella* serotypes. Am. J. Vet. Res. 35(5): 711-718.
- Carlson V.L., Snoeyenbos G.H., McKie B.A. & Smyser C.F. 1967. A comparison of incubation time and temperature for the isolation of *Salmonella*. Avian Dis. 11(2): 217-225.
- Carvalho E.P. & Costa L.C.G. 1979. Diferentes temperaturas e meios de cultura para o isolamento de *Salmonella sp.* e outras bactérias em rações iniciais para frangos de corte. Revta Microbiol., S. Paulo, 10(1): 10-13.
- Edel W. & Kampelmacher E.H. 1973. Comparative studies on the isolation of sublethally injured salmonellae in nine european laboratories. Bull. Wld Hlth Org. 48: 167-174.
- Figueiredo M.P. 1970. Aspects of food quality: Usefulness and limitations of microbial indices for quality assurance. Food Technol. 24: 157-161.
- Gerichter C.B. & Sechter I. 1966. Comparison of methods for the isolation of *Salmonella* from bone meal. Appl. Microbiol. 14(5): 711-715.
- Gomes F.P. 1970. Curso de estatística experimental. 4ª ed. ESALQ, Piracicaba, 430 p.
- Harvey R.W.S. & Price T.H. 1968. Elevated temperature incubation of enrichment media for the isolation of salmonellas from heavily contaminated materials. J. Hyg., Camb., 66: 377-381.
- Huhtanen C.N. & Naghski J. 1972. Effect of type of enrichment and duration of incubation on *Salmonella* recovery from meat-and-bone meal. Appl. Microbiol. 23(3): 578-585.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1978. Micro-organisms in foods. 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd ed. University of Toronto, Toronto.
- Loken K.I., Culbert K.H., Solee R.E. & Pomeroy B.S. 1968. Microbiological quality of protein feed supplements produced by rendering plants. Appl. Microbiol. 16(7): 1002-1005.
- Malhotra F.C., Henderson W. & Tiffany L.W. 1968. Quantitative determination of *Salmonella* organisms from poultry feedstuffs. Avian Dis. 12(1): 29-36.
- Mercuri A.J., Cox N.A., Carson M.O. & Tanner D.A. 1978. Relation of Enterobacteriaceae counts to *Salmonella* contamination of market broilers. J. Food Protection 41(16): 472-478.
- North Junior W.R. 1961. Lactose pre-enrichment method for isolation of *Salmonella* from dried egg. Its use in a survey of commercially produced albumen. Appl. Microbiol. 9: 188-195.
- Silliker J.A. & Gabis D.A. 1976. ICMSF methods studies. VII. Indicator tests as substitutes for direct testing of dried foods and feeds for *Salmonella*. Can. J. Microbiol. 22: 971-974.
- Smeltzer T., Thomas R., Tranter G. & Klemm J. 1980. Microbiological quality of Queensland stockfeeds with especial reference to *Salmonella*. Aust. Vet. J. 56(7): 335-338.
- Smyser C.F. & Snoeyenbos G.H. 1969. Evaluation of several methods of isolating salmonellae from poultry litter and animal feedstuffs. Avian Dis. 13(1): 134-141.
- Smyser C.F. & Snoeyenbos G.H. 1971. Enrichment serology compared with a direct-culture procedure for isolating salmonellae from rendered animal by-products. Avian Dis. 15(3): 581-587.
- Smyser C.F., Snoeyenbos G.H. & McKie B. 1970. Isolation of salmonellae from rendered by-products and poultry litter cultured in enrichment media incubated at elevated temperatures. Avian Dis. 14(2): 248-254.
- Sveum W.H. & Kraft A.A. 1981. Recovery of salmonellae from foods using a combined enrichment technique. J. Food Sci. 46: 94-99.
- Tammimga S.K., Beumer R.R. & Kampelmacher E.H. 1982. Microbiological studies on hamburgers. J. Hyg., Camb., 88:125-142.
- Taylor W.I. & Silliker J.H. 1961. Isolation of salmonellae from samples. IV. Comparison of methods of enrichment. Appl. Microbiol. 9: 484-486.
- Thatcher F.S. & Montford J. 1962. Egg-products a source of salmonellae in processed foods. Can. J. Publ. Hlth 53(2): 61-69.
- Thomas R.J., Smeltzer T.I. & Tranter G. 1981. Examination of stockfeeds for *Salmonella*. Aust. Vet. J. 57: 69-71.
- Tompkin R.B. & Kueper T.V. 1973. Factors influencing detection of salmonellae in rendered animal by-products. Appl. Microbiol. 25(4): 485-487.
- Van Schothorst M. & Van Leusden F.M. 1975. Comparison of several methods for the isolation of salmonellae from egg products. Can. J. Microbiol. 21:1041-1045.
- Yde M. & Ghysels G. 1984. Performance of several enrichment media in the isolation of salmonellae from egg products. J. Food Protection 47(3):217-219.