

## COMPARAÇÃO DE CALDOS DE ENRIQUECIMENTO INCUBADOS EM DUAS DIFERENTES TEMPERATURAS E DE MEIOS DE CULTURA NA PESQUISA DE *SALMONELLA GALLINARUM*

A.L.S.P. Cardoso & E.N.C. Tessari

Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Instituto Biológico, Rua Bezerra Paes, 2278, CEP 13690-000, Descalvado, São Paulo, Brasil. E-mail: alspcardoso@terra.com.br

### RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de duas temperaturas de enriquecimento (37° e 42° C) e o desempenho de dois caldos de enriquecimento seletivo e 2 meios de cultura, utilizados para isolamento de *Salmonella Gallinarum* em aves. Alíquotas de cada amostra de órgãos das aves contaminadas experimentalmente com *S. Gallinarum* foram inoculadas em caldos Tetrionato-Novobiocina e Rappaport-Vassiliadis. Os ágar Verde Brilhante e Hektoen foram usados para o isolamento de salmonela. Os resultados mostraram que o caldo Tetrionato-Novobiocina a 42° C associado com ágar Hektoen proporcionou a maior eficiência de isolamento de *S. Gallinarum*.

PALAVRAS-CHAVE: Aves, enriquecimento seletivo, *Salmonella Gallinarum*.

### ABSTRACT

COMPARISON OF ENRICHMENT BROTHS INCUBATED IN TWO DIFFERENT TEMPERATURES AND OF CULTURE MEDIUMS USED IN *SALMONELLA GALLINARUM* RESEARCH. The present study was aimed to evaluate the effect of two enrichment temperatures (37° and 42° C) and the action of two selective enrichment broths and two culture agars, used for isolation of *Salmonella Gallinarum* in poultry. Aliquots of each sample of organs of the poultry experimentally infected with *S. Gallinarum* were inoculated in Tetrionato-Novobiocina and Rappaport-Vassiliadis broths. Brilliant Green and Hektoen agar were used for isolation of salmonella. The results showed that the Tetrionato-Novobiocina broth at 42° C associated with Hektoen agar provided the greatest efficiency of isolation of *S. Gallinarum*.

KEY WORDS: Poultry, selective enrichment, *Salmonella Gallinarum*.

### INTRODUÇÃO

As salmoneloses aviárias são enfermidades provocadas por bactérias do gênero *Salmonella*. Infectam aves e podem causar o tifo aviário, cujo agente etiológico é a *Salmonella enterica* sorovar *Gallinarum* (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Este sorotipo, conhecido por ser hospedeiro-adaptado, produz uma doença sistêmica bastante severa em galinhas, que causa perdas econômicas na avicultura mundial, pois provoca alta morbidade e mortalidade, queda na produção de ovos e pintinhos de baixa qualidade (BERCHIERI JÚNIOR, 2001).

A *S. Gallinarum* pode ser identificada por meio de reações bioquímicas, é uma bactéria Gram negativa, imóvel, e sua configuração antigênica é semelhante à de *S. Pullorum*. Pertence ao grupo D, apresentando os antígenos somáticos (O) 1, 9 e 12 (POMEROY & NAGARAJA, 1991). Sua virulência está relacionada com a compo-

sição do lipopolissacarídeo (antígenos somáticos) e com presença de plasmídeos (BERCHIERI JÚNIOR, 2000). O isolamento e identificação desta bactéria é demorado devido ao tempo necessário para obtenção dos resultados. É necessário um dia para a etapa de enriquecimento seletivo, além de 2 a 3 dias para as etapas de isolamento em ágar seletivo, identificação bioquímica e confirmação com testes sorológicos. As colônias da *S. Gallinarum* são pequenas em relação às das salmonelas paratíficas, apresentando diâmetro entre 1 a 4 micra (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

Para FAGERBERG & AVENS (1976) os resultados das análises de *Salmonella* dependem da técnica e dos meios de cultura utilizados.

Apesar de sua morosidade e labor, o método tradicional para detectar presença das salmonelas incluídas no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) é amplamente utilizado em laboratórios credenciados pelo Ministério de Agricultura,

sen do este, o método oficial recomendado pela legislação brasileira.

Muito embora, o tifo aviário seja uma doença erradicada (SILVA, 1984; POMEROY & NAGARAJA, 1991), no Brasil, tem sido diagnosticada em áreas de exploração de aves de postura comercial, mas também pode ocorrer em aves reprodutoras (para corte e postura) (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

A *S. Gallinarum* é altamente patogênica para as aves em qualquer idade e embora sua ocorrência seja mais comum em aves adultas (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Quando a enfermidade acomete aves jovens, o quadro é diferenciado somente após o isolamento e identificação do agente (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

O diagnóstico do tifo aviário baseia-se nos achados: clínico, anatomopatológico e exames laboratoriais. Provas sorológicas, como soroaglutinação rápida e soroaglutinação lenta, detectam os anticorpos anti-*S. Gallinarum*. Os órgãos de eleição para pesquisa do agente etiológico em questão são: coração, fígado e baço (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

ANDREWS (1986) destaca que a temperatura de incubação, a composição do meio de cultura, a reação do meio com a amostra e o pH são fatores importantes para a reabilitação fisiológica das células de salmonela. O enriquecimento em caldo seletivo, objetiva inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella*. Nesta etapa recomenda-se a utilização de 2 meios de enriquecimento, porque a resistência de *Salmonella* aos agentes seletivos varia de cepa para cepa. O plaqueamento seletivo diferencial, objetiva promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella*, com características típicas que as distingam dos competidores. Recomenda-se que o plaqueamento diferencial seja feito em mais de um tipo de meio de cultura (SILVA *et al.*, 1997).

A temperatura ideal para multiplicação de *Salmonella* é 35-37° C, sendo a mínima de 5° C e a máxima 47° C. Vários estudos indicam, no entanto, que valores máximo e mínimo dependem do sorotipo (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Diante do acima exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de duas temperaturas de enriquecimento (37° e 42° C) no isolamento de *S. Gallinarum* em órgãos de aves inoculadas experimentalmente com esta bactéria e verificar o desempenho de dois caldos de enriquecimento seletivo e dois ágar de isolamento, em relação às temperaturas de enriquecimento testadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Setenta e cinco pintainhos de corte (machos e fêmeas) de um dia de idade, com peso médio de 48

gramas, da linhagem Cobb, procedentes de matrizes de corte com idade de 42 semanas, foram aleatoriamente selecionados e enviados ao laboratório. Cinco deles foram submetidos a exames sorológico e microbiológico, certificando de serem livres de *S. Gallinarum*. O restante foi aleatoriamente distribuído em 2 grupos: controle e experimental, contendo 36 aves cada e alojados em biotérios em condições semelhantes ao campo. Foram tratados "ad libitum" com água clorada e ração comercial.

O inóculo foi preparado com cepa de *Salmonella Gallinarum* proveniente de lote de matriz de postura, tipificado no Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola/IB e no Instituto Fio Cruz. A cepa bacteriana foi mantida em ágar nutriente (Difco) com glicerina tamponada e estocada a 4° C. A cultura foi preparada a partir de uma alçada da cultura pura em 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Broth) e incubada a 37° C, durante 24 horas. A cultura continha aproximadamente 1,2 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. No 20º dia de vida, foram administrados 0,4 mL de cultura de *S. Gallinarum* (concentração bacteriana de 10<sup>8</sup> UFC) em cada uma das 36 aves do grupo experimental, via esofágica.

Aos 31 dias de idade das aves, após 11 dias da inoculação, 30 aves de cada grupo foram sacrificadas e retiradas amostras dos órgãos: fígado, coração e baço para avaliação microbiológica, fazendo-se um "pool" desses órgãos que foram macerados em gral e pistilo.

O "pool" de órgãos macerados de cada ave foi transferido para dois diferentes caldos de enriquecimento seletivo: Tetrationato-Novobiocina (Difco) e Rappaport-Vassiliadis (Difco), na proporção de 1 g e 0,1 g em 10 mL, respectivamente, incubados à 37 e 42° C em estufa bacteriológica durante 24 horas. A partir dos caldos, cada amostra foi semeada com alça bacteriológica em placas de Petri, contendo ágar Verde Brillante (Difco) e ágar Hektoen (Difco) e foram incubadas a 37° C, durante 24 horas. As colônias obtidas nas placas com características típicas do gênero *Salmonella* foram confirmadas por meio de provas bioquímicas e sorológicas. Foi realizada uma identificação bioquímica presuntiva, onde 3 a 5 colônias foram inoculadas com agulha bacteriológica, em tubos contendo o ágar Tríplice Açúcar Ferro (Difco) inclinado, tubos, contendo ágar Lisina (Difco), tubos com Caldo Uréia (Difco), tubo com o meio SIM (Difco) para visualização de indol, H<sub>2</sub>S e motilidade e em tubo, contendo ágar Nutriente (Difco) e foram incubados a 37° C durante 24 horas. As colônias que apresentaram perfil bioquímico com o gênero *Salmonella* foram submetidas à identificação sorológica para detecção de antígenos somáticos (O) e flagelares (H), mediante o uso de soros polivalentes anti-antígenos "O" (Sanofi

Pasteur) e anti-antígenos "H" (Sanofi Pasteur) de *Salmonella*. A prova de detecção destes antígenos foi realizada mediante colheita do crescimento bacteriano em ágar Nutriente, com auxílio de alça bacteriológica e ressuspensão em solução fisiológica a 0,85% esterelizada, depositada em uma lâmina de vidro e adição de igual volume de anti-soro. Após a homogeneização, a prova foi considerada positiva, quando se evidenciou a presença de aglutinação. Cepas imóveis que apresentaram resultados positivos frente ao soro anti-somático "O" polivalente de *Salmonella* foram caracterizadas antigenicamente com soro-anti somático "D" (09). As cepas que apresentaram resultados compatíveis com *Salmonella* foram prosseguidas com testes bioquímicos complementares: meio de Clark e Lubs para realização das provas do Vermelho de Metila e de Voges-Proskauer, ágar Citrato de Simons, ágar Fenilalanina, caldo malonato, caldo para descarboxilação de Lisina e Ornitina, caldo para desidrolação de Arginina, caldo para a fermentação de: Glicose, Manitol, Lactose, Sacarose, Dulcitol e Maltose. As cepas foram então identificadas sorológica e bioquimicamente como *S. Gallinarum*.

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste t de Student (FONSECA & MARTINS, 1996) ao nível de significância 5%, para comparação das médias de duas temperaturas distintas e a eficiência dos caldos de enriquecimento seletivo e dos ágaros utilizados para o isolamento de *Salmonella* Gallinarum.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, onde comparou-se duas diferentes temperaturas, dois diferentes caldos de enriquecimento e dois diferentes ágaros para isolamento de *S. Gallinarum* com os respectivos números positivos de isolamento e percentagens, encontram-se na Tabela 1. Independente das temperaturas que os caldos de enriquecimento foram incubados, observa-se que o caldo Tetratio-

Novobiocina apresentou as melhores percentagens de isolamento de *S. Gallinarum*. O ágar Hektoen apresentou as maiores percentagens de isolamento de *S. Gallinarum* quando comparado com o ágar Verde Brilhante.

Calculando-se as médias dos números de isolamentos de *S. Gallinarum* nas temperaturas utilizadas e os resultados dos isolamentos, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre as duas temperaturas (37° e 42° C), conforme demonstra Tabela 2.

Calculando-se as médias dos números de isolamentos de *S. Gallinarum* dos caldos de enriquecimento seletivo, Tetratio-Novobiocina e Rappaport-Vassiliadis, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os caldos, mostrando que o caldo Tetratio-Novobiocina é mais eficiente para o isolamento da *S. Gallinarum*, conforme demonstrado na Tabela 3.

Calculando-se as médias dos números de isolamentos de *S. Gallinarum* dos meios de cultura, ágar Hektoen e ágar Verde Brilhante, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os meios, conforme mostra a Tabela 4.

BERCHIERI *et al.* (1993) em um estudo realizado com amostras de ração para isolamento de *Salmonella*, observaram diferenças estatísticas significativas nas temperaturas de pré-enriquecimento realizadas a 43° C, em relação à 37° C.

Em estudo de GIOMBELLI & SILVA (2002) os resultados mostraram que o maior índice de resultados positivos para detecção de *Salmonella* em carnes "in natura", foi obtido com pré-enriquecimento a 42° C. O caldo Rappaport-Vassiliadis apresentou menor número de isolamento de salmonela nas duas temperaturas testadas. Entretanto, SILVA *et al.* (1997) ressalta que o caldo Rappaport-Vassiliadis vem ganhando cada vez mais aceitação, tendo sido recentemente aprovado pelo ISO (International Organization for Standardization), como alternativa para o caldo Tetratio-

Tabela 1 - Desempenho dos caldos de enriquecimento seletivo incubados a 37° C e 42° C, dos meios de cultura e percentagens do número de amostras positivas para *S. Gallinarum*.

Caldos de enriquecimento seletivo/Temperatura (°C)	Ágaros de isolamento	Número de isolamentos de <i>S. Gallinarum</i>	Percentagem (%) de isolamentos de <i>S. Gallinarum</i>
Tetratio-Novobiocina/42	Hektoen	30	100
	Verde Brilhante	25	88,3
Tetratio-Novobiocina/37	Hektoen	26	86,7
	Verde Brilhante	20	66,7
Rapaport-Vassiliadis/42	Hektoen	21	70
	Verde Brilhante	17	56,7
Rapaport-Vassiliadis/37	Hektoen	19	63,3
	Verde Brilhante	15	50

Tabela 2 - Comparação das temperaturas a 42° C e 37° C utilizadas para o isolamento de *S. Gallinarum* e o número de isolamentos positivos.

Caldos/Ágares	Nº de isolamento de <i>S. Gallinarum</i> a 42° C	Nº de isolamento de <i>S. Gallinarum</i> a 37° C
Tetrationato-Novobiocina/Hektoen	30	26
Tetrationato-Novobiocina/Verde Brilhante	25	20
Rappaport-Vassiliadis/Hektoen	21	19
Rappaport-Vassiliadis/Verde Brilhante	17	15
$\mu$	23,25 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
S	30,9	20,7

Médias seguidas pela mesma letra, não difere estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.

$\mu$  - média aritmética do número de isolamento das diferentes temperaturas.

S - desvio padrão do número de isolamento com as diferentes temperaturas.

Tabela 3 - Desempenho dos diferentes caldos de enriquecimento seletivo a 37° C e 42° C para o isolamento de *S. Gallinarum*.

Ágares/Temperatura (°C)	Nº de isolamento de <i>S. Gallinarum</i> do Tetrationato-Novobiocina	Nº de isolamento de <i>S. Gallinarum</i> do Rappaport-Vassiliadis
Hektoen/42	30	21
Hektoen/37	25	17
Verde Brilhante/42	26	19
Verde Brilhante/37	20	15
$\mu$	25,25 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup>
S	16,92	6,7

Médias seguidas pelas mesmas letras distintas, diferem estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade.

$\mu$  - média aritmética do número de isolamento dos diferentes caldos.

S - desvio padrão do número de isolamento com diferentes caldos de enriquecimento.

Tabela 4 - Desempenho dos diferentes meios de cultura seletivo, ágar Hektoen e ágar Verde Brilhante para o isolamento de *S. Gallinarum*.

Caldos/Temperatura (°C)	Nº de isolamento de <i>S. Gallinarum</i> em ágar Hektoen	Nº de isolamento de <i>S. Gallinarum</i> em ágar Verde Brilhante
Tetrationato-Novobiocina/42	30	25
Tetrationato-Novobiocina/37	26	20
Rappaport-Vassiliadis/42	21	17
Rappaport-Vassiliadis/37	19	15
$\mu$	24 <sup>a</sup>	19,25 <sup>a</sup>
S	24,66	18,75

Médias seguidas pela mesma letra, não difere estatisticamente pelo teste t a 5% de probabilidade

$\mu$  - média aritmética do número de isolamento dos diferentes ágares

S - desvio padrão do número de isolamento com os diferentes meios de cultura

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que 100% das amostras de SG foram isoladas pela combinação do caldo Tetrationato-Novobiocina incubado à temperatura de 42° C associado ao ágar Hektoen.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, W.H. Resuscitation of injured *Salmonella* spp. and coliforms from foods. *J. Food Prot.*, v.49, n.1, p.62-75, 1986.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; FERNANDES, S.A.; IRINO, K.; QUINTANA, J.L.; SANTOS, A.J. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. *Rev. Microbiol.*, v.24, n.1, p.22-25, 1993.

- BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.185-195.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; MURPHY, C.K.; MARSTON, K.; BARROW, P.A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathol.*, v.30, p.221-231, 2001.
- FARGERBERG, D.J. & AVENS, J.S. Enrichment and plating methodology for *Salmonella* detection in food: A review. *J. Milk Food Technol.*, v.39, p.628-646, 1976.
- FONSECA, J.S. & MARTINS, G.A. *Curso de estatística*. 6.ed. São Paulo: Atlas, 1996. 320p.
- FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.
- GIOMBELLI, A. & SILVA N.L. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carne in natura. *Rev. Hig. Alim.*, v.16, n.95, p.88-91, 2002.
- OLIVEIRA, G.H.; FERNANDES, A.C.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Estudo sobre a epidemiologia de *Salmonella* Gallinarum em aves de postura comercial. *Rev. Bras. Ciênc. Avic.*, Campinas: FACTA. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Prêmio José Maria Lamas da Silva, supl.3, p.89, 2001.
- POMEROY, B.S. & NAGARAJA, K.V. Fowl typhoid. In: CALNAK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; YODER, H.W. (Eds.). *Diseases of poultry*. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p.87-99.
- SILVA N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 1997. 295p.
- SILVA, E.N. The *Salmonella* Gallinarum problem in Central and South America. In: SNOEYENBOS, G.H. (Ed.). *Proceedings of the International Symposium on Salmonella*, New Orleans, Louisiana. Philadelphia: American Association of Avian Pathologists, 1984. p.150-156.
- UNITED STATES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Bacteriological Analytical Manual*. 8.ed. 1998.

Recebido em 20/2/04  
Aceito em 10/3/04