PESQUISA DE *Salmonella* spp.
EM LEITE CRU, LEITE
PASTEURIZADO TIPO C E QUEIJO
"MINAS FRESCAL"
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO
DE PIRACICABA - SP

CÉLIA REGINA DE ÁVILA
Nutricionista

Orientador: Prof. Dr. CLAUDIO ROSA GALLO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Setembro - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLB/USP

A958p Avila, Celia Regina de
Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite
pasteurizado tipo C e queijo "minas frescal"
comercializados no Município de Piracicaba - SP
Piracicaba, 1994.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria patogênica 2. Laticínio - Microbio-
gia 3. Salmonela em alimento I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 637.1277
615.954

**PESQUISA DE *Salmonella* spp.
EM LEITE CRU, LEITE
PASTEURIZADO TIPO C E QUEIJO
"MINAS FRESCAL"
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO
DE PIRACICABA - SP**

CÉLIA REGINA DE ÁVILA

Aprovada em: 10/11/1994

Comissão julgadora:

Prof. Dr. CLAUDIO ROSA GALLO - ESALQ/USP

Prof. Dr. JOÃO GUSTAVO BRASIL CARUSO - ESALQ/USP

Prof^a. Dr^a. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER - ESALQ/USP

Prof. Dr. CLAUDIO ROSA GALLO
Orientador

Aos meus pais, *Jorge* e
Ondina, por acreditarem em
mim

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, por ter me concedido a vida.
- Ao Prof. Dr. Claudio Rosa Gallo, pela orientação, estímulo e amizade.
- Ao Prof. Dr. Rodolpho de Camargo ("in memoriam"), pelo apoio e colaboração.
- Aos meus pais (Jorge e Ondina) e meus irmãos (Jorge, Luiz e Carlos), pelo amor e incentivo.
- Ao Júlio, pelo amor, apoio e companheirismo.
- A todo o pessoal do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, com especial atenção ao Prof. Joaquim, Prof. Paulo César, Denise, Rosalina, Cecília, Hilcias e Cléo.
- À Rodicler, Heliana e Vânia, pela amizade, companheirismo e apoio.
- À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a execução deste trabalho e a CAPES, pela concessão da Bolsa de Estudo.
- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em especial ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pela oportunidade da realização do Curso.
- À todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	pág.
RESUMO	iii
SUMMARY	v
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1. Fontes de infecção e epidemiologia	05
3.2. Comentários taxonômicos	08
3.3. Características da bactéria	12
3.4. Etapas do isolamento de <i>Salmonella</i> spp.	18
3.4.1. Fases de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo	18
3.4.2. Meios seletivos de isolamento	21
3.5. Patogenicidade/Sintomatologia	26
3.6. Leite e queijo como fontes de contaminação por bactérias do gênero <i>Salmonella</i>	33
3.7. Inter-relações entre o gênero <i>Salmonella</i> e membros da Família <i>Enterobacteriaceae</i>	39

4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Material	41
4.2. Métodos	44
4.2.1. Obtenção das amostras	44
4.2.2. Preparo das amostras	45
4.2.3. Detecção, isolamento e identificação	45
4.2.4. Manutenção das culturas identificadas	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM LEITE CRU, LEITE PASTEURIZADO TIPO C E QUEIJO "MINAS FRESCAL", COMERCIALIZADOS EM PIRACICABA - SP

Autora: CÉLIA REGINA DE ÁVILA

Orientador: PROF. DR. CLAUDIO ROSA GALLO

RESUMO

Este trabalho foi conduzido afim de se verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", segundo a metodologia desenvolvida por ANDREWS (1978).

Analizou-se 19 amostras de cada produto de diferentes marcas comerciais, adquiridos em diversos estabelecimentos comerciais em Piracicaba, SP.

Segundo o padrão de amostragem e métodos adotados, não foi detectada a presença de *Salmonella* spp., nas amostras analisadas dos referidos produtos. No entanto, foi observada a presença de coliformes totais (*Enterobacter* spp. e *Citrobacter* sp.), coliformes fecais (*Escherichia coli*), além de *Hafnia alvei* e *Pseudomonas* spp.

Durante este trabalho, foi possível observar que os 3 meios de isolamento utilizados: agar verde brilhante, agar bismuto sulfito e agar *Salmonella-Shigella*, apresentaram baixa seletividade, uma vez que permitiram o crescimento de bactérias não pertencentes ao gênero *Salmonella*. O mesmo ocorreu com os caldos de enriquecimento seletivo: o tetracionato e o selenito-cistina.

Tornou-se evidente a necessidade de um método mais eficiente para detecção e isolamento de *Salmonella* spp., a partir daqueles alimentos.

Também tornou-se evidente a necessidade de testes sorológicos para a perfeita caracterização de *Salmonella*, pois bactérias isoladas no presente trabalho, com características morfológicas e bioquímicas semelhantes à *Salmonella*, quando submetidas a outros testes para identificação, mostraram pertencer a outros gêneros.

SURVEY OF *Salmonella* spp. IN RAW MILK, PASTEURIZED MILK TYPE C
AND "MINAS FRESCAL" CHEESE, COMMERCIALIZED IN PIRACICABA - SP

Author: CÉLIA REGINA DE ÁVILA

Adviser: PROF. DR. CLAUDIO ROSA GALLO

SUMMARY

This work was carried out to detect the occurrence of *Salmonella* spp. in raw milk, pasteurized milk type C and "Minas Frescal" cheese, using a method developed by ANDREWS (1978).

A total of 19 samples of each product of different commercial brands, acquired at various retail stores in Piracicaba, SP, was analyzed.

According to the pattern of sampling and methodology adopted, none of samples of the aforesaid products was positive for *Salmonella*. However, the presence of total coliforms (*Enterobacter* spp. and *Citrobacter* sp.), fecal coliforms (*Escherichia coli*), besides *Hafnia alvei* and *Pseudomonas* spp., was observed.

During this work, it was possible to observe that the 3 isolation media utilized: brilliant green agar, bismuth sulfite agar and *Salmonella-Shigella* agar, presented low selectivity, since allowed the growth of the non *Salmonella* organisms. The same

occurred with the selective enrichment: tetrathionate broth base and selenite-cystine broth.

It was evident the necessity of the more suitable method for the detection and isolation of *Salmonella* spp. from those foods.

It was also evident the necessity of serological tests for the perfect characterization of *Salmonella*, since bacteria isolated in this work, with similar morphological and biochemical characteristics of *Salmonella*, when submitted to the other tests for the identification, seemed to belong to other genera.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos têm participação bastante conhecida na epidemiologia de doenças transmissíveis, onde agentes patogênicos de origem humana ou animal, desempenham papel importantíssimo na cadeia do processo toxinfecioso.

Dentre os alimentos considerados de alto valor biológico, o leite ocupa um lugar de destaque. Sua riqueza em constituintes nutritivos e energéticos, em estado facilmente assimilável, torna-o recomendável na dieta para todas as faixas etárias, sendo o alimento mais indicado no combate à subnutrição protéica de lactentes, principal responsável pelo elevado índice de mortalidade infantil na Ásia, África e América Latina (FERREIRA, 1977).

Entretanto, as mesmas propriedades que o tornam um alimento importante, favorecem o crescimento de microrganismos, tanto saprófitas deterioradores como patogênicos potenciais, a exemplo das bactérias do gênero *Salmonella*. Os primeiros, além de promoverem prejuízos econômicos às indústrias, utilizando a matéria-prima, reduzem a qualidade de seus derivados, enquanto que os últimos põem em risco a saúde do consumidor (MARTH, 1969).

Surtos de salmonelose veiculados pela ingestão de leite são comuns naquelas regiões do mundo onde se tem o hábito de ingerir leite cru (SILLIKER, 1982;

BRYAN, 1983; ALMEIDA et al., 1994). Como esses microrganismos são facilmente destruídos pela pasteurização, sua ocorrência em produtos lácteos pasteurizados é atribuída à pós-contaminação ou à falhas durante o processo de pasteurização (BRYAN, 1983).

De acordo com o artigo PRODUÇÃO de queijo (1974), as proteínas do leite dão origem ao queijo, primeiro derivado do leite produzido no Brasil. Segundo dados da FAO (1992), a produção de queijos no Brasil entre 1979 e 1981 era por volta de 57.000 toneladas, aumentando para cerca de 60.000 toneladas em 1991.

Com o desenvolvimento da sua produção, surgiram muitas variedades que diferem quanto ao sabor, matéria-seca e durabilidade. Hoje são conhecidas numerosas variedades de queijos, a maioria delas com significado apenas local, como é o caso específico do queijo "Minas Frescal", que é típico do Estado de Minas Gerais e conhecido desde os tempos da corrida do ouro nas serras mineiras (SILVA, 1994).

É ainda prática comum, a elaboração artesanal de queijos a partir de leite cru, principalmente do tipo "Minas Frescal", sem os necessários cuidados sanitários, em estabelecimentos clandestinos onde as condições higiênicas são precárias (WENDPAP & ROSA, 1993; SILVA, 1994), o que aumenta o risco de contaminação desse alimento por microrganismos potencialmente patogênicos, a exemplo do gênero *Salmonella*. A prevenção dessa infecção pode ser conseguida através da obtenção higiênica e pasteurização do leite, bem como de cuidados higiênicos durante o transporte, armazenamento e comercialização, o que pode ser obtido por meio de uma fiscalização

sanitária efetiva, além, é claro, de uma conscientização dos indivíduos que trabalham neste setor.

A contaminação do leite e derivados por diversas espécies de *Salmonella* constitui importante problema de saúde pública; por isso tem havido crescente interesse em pesquisas nestes produtos, uma vez que estas bactérias causam enfermidades, manifestadas, principalmente como gastroenterite aguda, febres entéricas e, até mesmo, septicemias.

Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais freqüentemente encontrados em surtos de toxinfecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento (D'AOUST, 1989). Nos países em desenvolvimento, as diarréias agudas causadas por água ou alimentos contaminados, constituem a principal síndrome das febres tifóide, paratifóide e das salmoneloses, as quais têm sido responsáveis por elevada taxa de mortalidade e morbidade infantil. Entretanto, na quase totalidade dos países em desenvolvimento, a falta de notificação epidemiológica tem tornado difícil avaliar a situação real das salmoneloses (SANCHEZ, 1988).

2. OBJETIVOS

O presente estudo foi desenvolvido com a finalidade de verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", comercializados em Piracicaba, bem como avaliar os procedimentos de isolamento de *Salmonella* utilizados no decorrer da pesquisa.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Fontes de infecção e epidemiologia

A infecção por *Salmonella* spp. é uma zoonose (exceto a febre tifóide e paratifóide), sendo o principal reservatório da bactéria, o trato intestinal do homem e animais; por isso, as salmonelas são transmitidas principalmente pela via fecal-oral (BRYAN, 1968; FAGERBERG & AVENS, 1976).

As salmonelas estão disseminadas no ambiente e aparecem numa grande variedade de alimentos e ingredientes, representando um grande problema para a indústria de alimentos. A partir de seu reservatório natural, as salmonelas difundem-se pelo ambiente, alimentos, rações, solo e água, a partir de onde podem invadir outros hospedeiros (IDZIAK & CROSSLEY, 1973; FAGERBERG & AVENS, 1976).

Poucas espécies de *Salmonella* têm hospedeiros específicos: *S. typhi* causa febre tifóide no homem, *S. gallinarum* causa tifo aviário e *S. pullorum* causa pulorose em aves. Muitos sorotipos mostram pouca especificidade pelo hospedeiro e podem causar salmonelose quando ingeridas pelo homem (FAGERBERG & AVENS, 1976).

Sua ocorrência é bastante freqüente em aves, particularmente perus e galinhas (BRYAN, 1968; FAGERBERG & AVENS, 1976; SILLIKER, 1980; SILLIKER, 1982; BEAN & GRIFFIN, 1990; TAUXE, 1991). No entanto, a bactéria é também muito comum em suínos, bovinos e eqüinos, bem como em animais silvestres, caso de roedores, anfíbios e répteis (BRYAN, 1968; CARPENTER et al., 1973; McCOY & SEIDLER, 1973; FAGERBERG & AVENS, 1976; BARTLETT et al., 1977; SILLIKER, 1980; SILLIKER, 1982; BEAN & GRIFFIN, 1990; TAUXE, 1991). Também os insetos, principalmente moscas e baratas, são importantes veículos na disseminação das salmonelas (ROITMAM et al., 1988).

Alimentos como ovos, produtos de padaria, chocolates, presuntos, carne moída, salsichas, lingüiças, camarões, mariscos, peixes, bolos e cereais também já foram implicados em surtos de infecção por *Salmonella* spp. (GIORGI, 1972; FAGERBERG & AVENS, 1976; SILLIKER, 1980; SILLIKER, 1982; FRAZIER & WESTHOFF, 1985; HOCKIN et al., 1989; BEAN & GRIFFIN, 1990; TAUXE, 1991).

Segundo WILSON & ANDREWS (1976), numerosos isolamentos de *Salmonella* já foram obtidos de uma grande variedade de especiarias, como o orégano, a páprica, a sálvia, o tomilho e a pimenta verde desidratada.

Os produtos de laticínios são ainda um dos mais importantes veículos de transmissão de *Salmonella* spp. (D'AOUST, 1977; SILLIKER, 1980; SILLIKER, 1982; FRAZIER & WESTHOFF, 1985; ROITMAM et al., 1988; HOCKIN et al., 1989; BEAN & GRIFFIN, 1990; TAUXE, 1991; FRANCO & ALMEIDA, 1992; PICCOLO et al., 1992).

A presença de *Salmonella* em alimentos continua sendo um grande problema mundial. Segundo BRYAN (1983), durante o período entre a virada do século até 1940, a febre tifóide foi a doença de origem láctea que ocorreu com maior frequência nos Estados Unidos. A porcentagem de salmonelose de origem láctea relatada por década desde o início do século foi a seguinte: 1% (1910-1919), 3% (1920-1929), 2% (1930-1939), 7% (1940-1949), 21% (1950-1959), 28% (1960-1969), 41% (1970-1979), 50% (1980-1982).

Em 1980, 30.000 isolados de *Salmonella* foram relatados nos Estados Unidos. Provavelmente, esta seja apenas uma pequena fração do número total de casos que não são diagnosticados nem relatados, passando despercebidos pelas autoridades estatísticas (MATTINGLY et al., 1985).

No período entre 1973-1987, 7.458 surtos de toxinfecção foram relatados, envolvendo 237.545 casos. *Salmonella* spp. foi responsável por 42% dos surtos; particularmente surtos devido à *S. enteritidis* aumentaram bastante (de 12 em 1973-1975 para 68 em 1985-1987) (BEAN & GRIFFIN, 1990).

Segundo TAUXE (1991), a epidemiologia das infecções por *Salmonella* pode ser dividida em 3 períodos. Durante o primeiro período, de 1800 a 1949, a febre tifóide causada por *S. typhi* foi a que predominou nas infecções por *Salmonella* em humanos nos Estados Unidos. No segundo período, de 1950 a 1969, estas infecções tornaram-se relativamente raras, uma vez que a febre tifóide foi praticamente eliminada em muitos países industrializados, dando lugar para o surgimento de infecções não-tifóides, as quais começaram a ser identificadas e relatadas mais frequentemente como

causa de gastroenterite em humanos, com sintomas de diarreia, febre e dores abdominais. O período mais recente, desde 1970, tem sido caracterizado por um aumento de infecções não tifóides no homem, onde os alimentos de origem animal são a causa do grande número de salmonelose existente, a qual assemelha-se à uma gastroenterite.

TAUXE (1991), ainda comenta que entre 1979 e 1980, 45% das pessoas relatadas com salmonelose foram hospitalizadas e 1,3% delas morreram. Entre 1973 e 1987, 790 surtos de salmonelose foram relatados, porém o número de infecções que passa despercebido pelas autoridades estatísticas pode ser estimado em 100 vezes mais do que os números de infecções relatados.

3.2. Comentários taxonômicos

Vários esquemas de classificação são correntemente utilizados para esclarecer as diversidades bioquímica e sorológica dentro do gênero *Salmonella* (D'AOUST, 1989). A classificação das espécies, através da utilização de provas bioquímicas, revelou-se insatisfatória, uma vez que as salmonelas apresentam muitas características comuns entre si e mesmo com outros microrganismos, como por exemplo o *Citrobacter* (TAUNAY, 1968). O esquema antigênico Kauffmann-White constitui o principal instrumento diagnóstico para a identificação de mais de 2.300 sorotipos de *Salmonella* (D'AOUST, 1989; DOYLE & CLIVER, 1990). A identificação é baseada em perfis antigênicos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi), derivados de

reações de aglutinação com antissoros homólogos (FRAZIER & WESTHOFF, 1985; VASCONCELOS, 1987; D'AOUST, 1989). Segundo LE MINOR & RHODE (1974), o antígeno capsular (Vi) está presente somente nas *S. typhi*, *S. hirschfeldii* e *S. dublin*. Por outro lado, algumas vezes, um mesmo sorotipo dessa bactéria apresenta reações bioquímicas variáveis, sendo então classificado em biótipo e conforme a lise específica apresentada frente aos bacteriófagos, em fagócito (LEITÃO, 1979).

BORMAN et al. (1944), propuseram a subdivisão do gênero *Salmonella* em três espécies, *S. choleraesuis*, *S. typhosa* (*S. typhi*) e *S. kauffmannii*. KAUFFMANN & EDWARDS (1952), fizeram uma proposta similar, onde incluíram *S. enterica*. EWING (1972), reconheceu outra espécie, a *S. enteritidis* e considerou *Arizona* spp. como um gênero distinto de *Salmonella* spp.

Com base na taxonomia numérica e estudos relacionados com o DNA, e partindo do princípio que os organismos com homologia de DNA $\geq 70\%$ são membros da mesma espécie (CROSA et al., 1973), LE MINOR (1984), propôs que o gênero *Salmonella* é formado por uma única espécie, composta de 5 "subgêneros". Esta única espécie, *S. choleraesuis*, por sua vez, é subdividida em 6 subespécies: (a) a subespécie *choleraesuis* que corresponde ao "subgênero" I. Neste subgênero está incluída a maioria das espécies de *Salmonella* como *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. newport* e *S. enteritidis*; (b) a subespécie *salamae* (que corresponde ao "subgênero" II); (c) a subespécie *arizonae* (que corresponde ao "subgênero" III); (d) a subespécie *diarizonae* (que também forma o "subgênero" III); (e) a subespécie *houtenae* (que forma o "subgênero" IV), e (f) a subespécie *bongori* (que forma o "subgênero" V, composto por linhagens que produzem

reações positivas para a fermentação do dulcitol, para o crescimento em KCN e que produzem β -galactosidase). Já D'AOUST (1989), propõe ainda que além das 6 subespécies existentes, a subespécie *indica* também faça parte da subdivisão da *S. choleraesuis*.

Os 5 "subgêneros" do gênero *Salmonella* são baseados em características bioquímicas (LE MINOR, 1984; D'AOUST, 1989), e vêm agrupados a seguir na Tabela 1.

Tabela 1. Características diferenciais dos "subgêneros" do gênero *Salmonella* ^a.

	"Subgênero"				
	I	II	III	IV	V
β -galactosidase (teste ONPG)	-	- ou x	+	-	+
Produção de ácidos a partir de:					
Lactose	-	-	- ou x	-	-
Dulcitol	+	+	-	-	+
Mucato	+	+	d	-	+
Galacturonato	-	+	d	+	+
Utilização de:					
Malonato	-	+	+	-	-
d-Tartarato	+	- ou x	- ou x	- ou x	-
Hidrólise da gelatina	-	+	+	+	-
Crescimento na presen- ça de KCN	-	-	-	+	+
Habitat da maioria da linhagens:					
Animais de sangue quente	+	-	-	-	-
Animais de sangue frio e ambiente	-	+	+	+	+

^a Símbolos: (+) = positivo, para 90% ou mais das linhagens em 1-2 dias; (d) = positivo para 11-89% das linhagens em 1-2 dias; (-) = positivo para 0-10% das linhagens em 1-2 dias; (x) = tardio e irregularmente positivo (3-7 dias). A temperatura para todas as reações é 37°C.

Fonte: LE MINOR (1984).

Membros do "subgênero" I estão principalmente associados com animais de sangue quente e mostram uma maior frequência de isolamento. Somente membros do "subgênero" III são capazes de fermentar a lactose, mesmo que tardiamente.

3.3. Características da bactéria

O gênero *Salmonella*, descrito por Lignières em 1900, em homenagem ao bacteriologista, americano D.E. Salmon que, juntamente com Theobald Smith em 1894 isolaram a *Salmonella choleraesuis*, pertence à família *Enterobacteriaceae* (LE MINOR, 1984).

As salmonelas têm a forma de bastonetes curtos, medindo de 0,7 - 1,5 x 2,0 - 5,0 micra. São bactérias Gram-negativas; não esporuladas; móveis por meio de flagelos peritríquios (exceto *S. gallinarium* e *S. pullorum*); anaeróbias facultativas, mas que podem crescer em meio comum na presença de oxigênio livre; produzem catalase; utilizam o citrato como fonte de carbono (exceto *S. typhi* e *S. paratyphi* A); reduzem o nitrato a nitrito; produzem ácido e gás a partir da glicose; geralmente produzem sulfeto de hidrogênio em Agar Tríplice Açúcar-Ferro; fermentam o dulcitol, porém não fermentam a sacarose, a salicina, o inositol, a rafinose, a amidalina e a lactose (PELCZAR et al., 1981; LE MINOR, 1984; OLIVEIRA, 1984). Deve-se destacar aqui um estudo realizado por TOLEDO et al. (1979), que descreveram uma variante de *S. typhimurium* que fermenta lactose entre 2 a 6 dias, além de ser resistente à maioria dos antibióticos, inclusive a gentamicina.

As bactérias desse gênero usualmente descarboxilam a lisina (exceto a *S. paratyphi* A), a arginina e a ornitina (exceto a *S. typhi* e *S. gallinarum*); não desaminam a fenilalanina nem o triptofano; não elaboram oxidase, urease, lipase, nem desoxirribonuclease; apresentam reações negativas para beta-galactosidase e para fermentação butanodióica (Voges-Proskauer); não crescem em meios contendo cianeto de potássio (exceto aquelas pertencentes ao "subgênero" IV e V), não liquefazem a gelatina, não produzem indol e, geralmente, não utilizam o malonato (exceto a *S. arizonae*) (LE MINOR & RHODE, 1974; PELCZAR et al., 1981; LE MINOR, 1984).

Segundo ROITMAM et al. (1988), o comportamento das salmonelas frente aos fatores intrínsecos e extrínsecos é de extrema importância nos aspectos tecnológico e de saúde pública. Assim, em relação à temperatura, as salmonelas são organismos mesófilos, com ótimo de crescimento no intervalo de 35 a 37°C, evidenciando certo crescimento na faixa de 5 a 47°C, embora a velocidade do mesmo seja sensivelmente reduzida abaixo de 10°C (ROITMAM et al., 1988; D'AOUST, 1989; DOYLE & CLIVER, 1990). FRAZIER & WESTHOFF (1985), referem as temperaturas de 6,7 a 7,8°C como mínimas de crescimento e temperatura máxima ao redor de 45,6°C. Já uma pesquisa com queijo Cheddar mostrou que *S. infantis* sobreviveu por mais de 9 meses de estocagem a 4,5°C (WHITE & CUSTER, 1976).

Em estudos conduzidos por MATCHES & LISTON (1968), pôde-se observar que a temperatura mínima de crescimento das salmonelas é geralmente maior em caldo do que em meio sólido, pois foi detectado crescimento de sete linhagens da bactéria em Trypticase Soy Agar (TSA) numa faixa de temperatura que variou de 1,1°C

a 12,3°C, ao passo que foi observado crescimento de *S. heidelberg* e *S. typhimurium* após 12 e 25 dias, respectivamente, à temperatura mínima de incubação de 5,9°C no mesmo meio, porém líquido.

Em alimentos congelados pode haver uma redução de 10 a 100 vezes da população inicial, embora muitas células sobrevivam ao armazenamento prolongado sob congelamento (ROITMAM et al., 1988).

A exemplo de outras formas vegetativas de bactérias, a resistência das salmonelas ao calor é baixa. Numa pesquisa, onde foram analisados diferentes alimentos, observou-se crescimento da bactéria em nata e frango quando submetidos à uma temperatura máxima de 45,6°C, mas não foi detectado crescimento da bactéria em salada de presunto armazenada a 44,4°C. Estes resultados sugerem que a exposição de alimentos à temperaturas acima de 60°C, promove uma grande margem de segurança, pois inibe o crescimento de *Salmonella* (D'AOUST, 1989). Os números da bactéria são sensivelmente reduzidos após aquecimento a 60°C durante 1 a 5 minutos, e o aquecimento de suspensões de células a 65,5°C durante 0,02 a 0,25 minutos reduz em 90% a população viável da maioria das salmonelas (ROITMAM et al., 1988). Por outro lado, OLIVEIRA (1984), afirma que as salmonelas podem ser resistentes ao calor, podendo ser destruídas a 55°C por 60 min ou a 60°C durante 15 a 20 min.

Geralmente, as salmonelas são bastante sensíveis à temperaturas acima do intervalo de crescimento e os diferentes sorotipos não variam muito na resistência ao calor, com exceção da *S. senftenberg* linhagem 775, a qual é 10 a 20 vezes mais resistente que as outras salmonelas (RIEMANN, 1972).

No que diz respeito à atividade de água (Aa) limitante para o crescimento das salmonelas, pesquisas relatadas por TROLLER (1973), mencionam valores entre 0,94 e 0,95. Segundo FRAZIER & WESTHOFF (1985), a Aa mínima para o crescimento da bactéria varia com o tipo de alimento, mas que em geral, é da ordem de 0,93 a 0,95. Foi relatado crescimento de *S. newport* e *S. oranienburg*, mas não de *S. choleraesuis*, em meio líquido, onde a Aa limitante era 0,946. Com valor de Aa de 0,942, nenhuma das três espécies cresceu (D'AOUST, 1989). De acordo com DOYLE & CLIVER (1990), para a multiplicação das salmonelas, a Aa deve ser maior à medida que o pH diminui. Estes autores concordam que muitas espécies crescem em alimentos com Aa na faixa de 0,945 a 0,999.

Valores de Aa abaixo de 0,93 propiciam a morte gradual das células das salmonelas; no entanto, é importante observar que na faixa de Aa entre 0,20 e 0,90, a razão de destruição aumenta à medida em que há acréscimo de Aa. Esta constatação evidencia que, em alimentos desidratados, é grande a capacidade e o período de sobrevivência das salmonelas, sendo que em valores de Aa abaixo de 0,20 elas permanecem viáveis durante longos períodos, mesmo sob condições adversas de acidez e temperatura (ROITMAM et al., 1988; HOCKIN et al., 1989).

Outro parâmetro de fundamental importância a se considerar é o pH. Geralmente, as salmonelas crescem no intervalo de 4,5 a 9,0, com ótimo na faixa de 6,5 a 7,5. O pH mínimo para o desenvolvimento varia com o sorotipo, temperatura de incubação, tipo de ácido, composição do substrato e tensão de oxigênio, mas, de modo geral, em valores de pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0, as salmonelas são lentamente

destruídas (ROITMAN et al., 1988; ~~DA~~ AUST, 1989; DOYLE & CLIVER, 1990). Segundo FRAZIER & WESTHOFF (1985), a faixa de pH compreendida entre 5,5 e 5,7 é bastante desfavorável ao crescimento da bactéria. Entretanto, BRYAN (1968), cita que estes organismos sobrevivem, pelo menos, 24 horas em pH de 3,95 a 4,56.

Em estudos conduzidos por BANWART & AYRES (1957), foi possível observar que o crescimento de *S. pullorum*, *S. oranienburg* e *S. senftenberg*, em albumem líquido, diminuiu progressivamente quando o pH aumentou para 8,0, sendo que nenhum crescimento foi observado a $\text{pH} \geq 9,0$. Embora a acidez seja determinante para o crescimento da *Salmonella*, a natureza do ácido é de igual importância. O pH mínimo para crescimento da bactéria em meio líquido com ácido clorídrico, ácido cítrico, ácido láctico e ácido acético foi 4,05, 4,05, 4,40 e 5,40, respectivamente. Em outras palavras, o acético foi o mais tóxico dos quatro ácidos testados (CHUNG & GOEPFERT, 1970).

O crescimento em meio sólido ou líquido exerce diferentes efeitos na tolerância do organismo ao pH. Pesquisas realizadas por MATCHES & LISTON (1972), revelaram que o crescimento da bactéria é mais abundante em meio sólido do que em meio líquido, pois *S. heidelberg* cresceu em TSA e em caldo numa faixa de pH entre 5,0 e 9,0 e entre 6,0 e 8,0, respectivamente. A temperatura também contribui para o pH mínimo de crescimento. Num estudo observou-se que *S. anatum* cresceu em meio líquido com pH 4,0, quando incubada a 25°C e 32°C, mas não cresceu quando a temperatura foi diminuída para 16°C ou aumentada para 37°C ou 43°C (MATCHES & LISTON, 1972).

A concentração salina é outro fator que exerce influência, tanto na sobrevivência quanto na multiplicação das salmonelas em alimentos. Pesquisas desenvolvidas por ALFORD & PALUMBO (1969), revelaram que o crescimento de *Salmonella* é geralmente inibido na presença de 3 a 4 % de cloreto de sódio e que a quantidade de sal requerida para inibir a bactéria diminui com a diminuição da temperatura. Segundo CERQUEIRA-CAMPOS (1980), o cloreto de sódio, em concentrações superiores a 9%, exerce efeito bactericida sobre as salmonelas. Entretanto, BRYAN (1968), menciona que *Salmonella* tem seu crescimento interrompido em concentrações salinas de 8%, embora células viáveis possam ser constatadas após a permanência durante 30 dias em salmoura a 12%. Por outro lado, revelou que em concentração deste sal a 30%, as salmonelas eram destruídas em uma semana a 20° C.

O potencial de oxirredução é outro importante fator. Embora as salmonelas possam crescer tanto sob condições aeróbias quanto em condições anaeróbias, o crescimento pode ser inibido pelo potencial de oxirredução abaixo de 30 mV (D'AOUST, 1989).

Com relação à resistência a antimicrobianos, as salmonelas têm se mostrado resistentes aos seguintes antibióticos: tetraciclina, ampicilina, estreptomicina, cloranfenicol, gentamicina, ácido nalidíxico e trimetoprim (LE MINOR, 1984; OLIVEIRA, 1984; TAUXE, 1991). Este aumento da resistência da bactéria é uma consequência do uso difundido dos antibióticos tanto na medicina como na agricultura (VANDERPOST & BELL, 1977). Embora muitas infecções por *Salmonella* spp. sejam limitadas ao trato gastrointestinal e não requeiram terapia com antibióticos,

ocasionalmente infecções se estendem à corrente sanguínea, e apropriados antimicrobianos se fazem necessários para a perfeita recuperação do organismo (TAUXE, 1991).

No que diz respeito à radiação, D'AOUST (1977), comenta que doses de 500 a 750 Krad, que são consideradas doses intermediárias de radiação, são suficientes para destruir *Salmonella* spp.

3.4. Etapas do isolamento de *Salmonella* spp.

3.4.1. Fases de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo

A fase do pré-enriquecimento tem um papel muito importante na recuperação das salmonelas, uma vez que facilita o reparo e crescimento de células injuriadas por tratamento térmico, congelamento, descongelamento, choque osmótico, etc, além de servir como fonte de nutrientes para a proliferação das células, especialmente quando pequenos números estão presentes (D'AOUST, 1984; ANDREWS, 1985; FRICKER, 1987; D'AOUST, 1989; DOYLE & CLIVER, 1990).

Há vários meios de cultivo utilizados para a recuperação de salmonelas dos alimentos, como por exemplo, o caldo lactosado, a água peptonada tamponada, o caldo nutriente e a água verde brilhante. O caldo lactosado tem se mostrado bastante eficiente na recuperação de células injuriadas. RAY et al. (1972), puderam mostrar a

superioridade do caldo lactosado sobre a água verde brilhante, na recuperação de salmonelas a partir de produtos lácteos.

Cabe ressaltar que devido ao fato do caldo de pré-enriquecimento não ser seletivo para outras enterobactérias, estas últimas podem crescer, suprimindo o desenvolvimento das salmonelas.

A fase do enriquecimento seletivo constitui um importante passo para o isolamento de *Salmonella* spp., pois ela reprime o crescimento de grandes populações da microflora competidora presente nas culturas de pré-enriquecimento, enquanto facilita o crescimento de células restauradas das salmonelas. O processo de seletividade é conseguido através do sinergismo entre agentes inibidores presentes no meio e temperaturas de incubação (TAUNAY, 1968; FAGERBERG & AVENS, 1976; ANDREWS, 1985; FRICKER, 1987; D'AOUST, 1989; DOYLE & CLIVER, 1990).

Embora numerosos meios de enriquecimento seletivo tenham sido desenvolvidos para o isolamento das salmonelas, o caldo tetrionato e o selenito-cistina são os mais largamente utilizados. Muitos estudos revelam a eficiência destes dois meios (D'AOUST, 1977; LE MINOR, 1984; ANDREWS, 1985; FLOWERS et al., 1987; D'AOUST, 1989; DOYLE & CLIVER, 1990), embora outros caldos também têm revelado boa eficácia, como o caldo Rappaport-Vassiliadis, caldo Gram-negativo, caldo selenito-F, caldo tetrionato verde-brilhante, caldo selenito verde-brilhante e caldo selenito verde-brilhante sulfa (FAGERBERG & AVENS, 1976). É oportuno salientar que algumas linhagens de *Citrobacter* e de *Pseudomonas* não foram afetadas pela

composição do caldo selenito-cistina, durante o isolamento das salmonelas (D'AOUST, 1985).

A incubação desses meios de cultivo em temperatura elevada tem sido recomendada por aumentar a recuperação de salmonelas de alimentos com alta umidade (ANDREWS, 1985). FAGERBERG & AVENS (1976) E RATNAM & MARCH (1986), comentam que a incubação do caldo de enriquecimento a 43 °C recuperou mais células do que a incubação a 35 °C. Já McCOY (1962), relatou que o caldo selenito-cistina incubado a 43 °C recuperou menos células do que a 35 °C. A metodologia utilizada no presente estudo recomenda que o caldo selenito-cistina seja incubado a 35 °C e o caldo tetracionato a 42 °C. WEISS et al. (1965) e D'AOUST (1989), quando do isolamento de outros organismos que não *Salmonella* spp., verificaram que os caldos de enriquecimento falharam no que se refere a serem inibidores ao crescimento da microflora competidora, pois tanto coliformes fecais e totais, como *Pseudomonas* spp. e *H. alvei* estiveram presentes nas amostras analisadas.

FLOWERS (1985), vai mais além, dizendo que os resultados positivos obtidos por métodos de cultura requerem que duas condições estejam presentes. Primeiro, que um número suficiente de salmonelas deve estar presente em, pelo menos, um dos enriquecimentos seletivos, para assegurar uma ou mais células de *Salmonella* em alíquotas que serão estriadas sobre os meios de isolamento seletivo; segundo, a obtenção de, pelo menos, uma colônia da bactéria, independente do número de colônias de outros microrganismos que se desenvolvam no meio de isolamento, uma vez que este não é seletivo às salmonelas.

3.4.2. Meios seletivos de isolamento

Os meios de plaqueamento utilizados no isolamento das salmonelas devem exercer uma inibição mínima a este organismo, bem como uma ação bacteriostática máxima aos organismos competidores. Sua composição química se baseia na adição de substâncias que inibem o crescimento de microrganismos competidores indesejáveis e num sistema indicador que revela a cor característica das colônias das salmonelas. A diferenciação das salmonelas se faz, geralmente, pelo uso de uma ou duas características, a produção de sulfeto de hidrogênio ou a habilidade em fermentar certos carboidratos como a lactose ou a sacarose.

O meio BGA é composto basicamente de peptona, extrato de levedura e corante verde brilhante, que suprime organismos Gram-positivos e coliformes.

A seletividade e o sistema diferencial são dependentes da fermentação de dois carboidratos, a lactose e a sacarose, e de um sistema indicador ácido que utiliza o vermelho fenol. As salmonelas não fermentam esses açúcares e seu metabolismo da peptona resulta em produtos finais alcalinos. Como o vermelho fenol produz cor vermelha em estado alcalino, as colônias da bactéria são rosa tendendo a vermelho (FAGERBERG & AVENS, 1976).

O meio SSA é composto de peptona e extrato de carne. Vários compostos são incorporados ao meio: a lactose; os sais biliares, que inibem o crescimento de organismos Gram-positivos e coliformes; o verde brilhante, que exerce

ação inibidora contra vários organismos, exceto para bacilos patogênicos Gram-negativos (FAGERBERG & AVENS, 1976).

O meio BSA é o único meio de plaqueamento para *Salmonella* spp. que não é baseado na fermentação de lactose, contendo apenas a glicose, e por isso, é o único que pode detectar os 1% das salmonelas que são lactose-positivas (BAILEY et al., 1983). Muitas salmonelas apresentam colônias negras devido à produção de sulfeto de hidrogênio, no entanto, o meio BSA é recomendado para uso em conjunto com o meio BGA (baseado na fermentação da sacarose e da lactose), pois há espécies de *Salmonella* que fermentam a lactose e não produzem H₂S (FAGERBERG & AVENS, 1976).

Vários pesquisadores fizeram diferentes considerações a respeito da seletividade dos meios BSA, SSA e BGA.

WELLS et al. (1958), relataram que o BSA foi mais inibidor do que o BGA para outros organismos Gram-negativos que não salmonelas.

De acordo com TAUNAY (1968), o meio SSA, que contém em sua composição sais biliares como inibidor dos saprófitos, mostrou-se bastante seletivo no isolamento de salmonelas.

GOO et al. (1973), comentaram que um meio seletivo ideal para o isolamento de *Salmonella* spp. deveria ser inibidor, tanto para os coliformes que fermentam a lactose rapidamente, como para aquelas bactérias que não fermentam a lactose, como *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Citrobacter* spp. e que acabam confundindo o pesquisador no momento da escolha da colônia suspeita. Os autores verificaram a grande eficácia do BGA no isolamento de salmonelas.

TOMPKIN & KUEPER (1973), constataram a superioridade do meio SSA sobre o BGA, utilizando-se o caldo selenito-cistina na etapa de enriquecimento, quando do isolamento de salmonelas a partir de produtos de origem animal.

FAGERBERG & AVENS (1976), consideraram o meio SSA como sendo moderadamente seletivo e diferencial e os meios BSA e BGA altamente seletivos e diferenciais no isolamento da bactéria, pois inibem o crescimento de muitos organismos Gram-negativos que estão freqüentemente presentes e que não são suficientemente suprimidos em meios menos seletivos.

Comparando a eficácia dos meios de isolamento BGA, BSA e SSA, LITTELL (1977), pôde comprovar a superioridade do BSA sobre os demais.

Pesquisando o crescimento de 4 sorotipos de *Salmonella* spp. em 10 meios seletivos, KRONINGER & BANWART (1978), verificaram que o SSA recuperou mais isolados do que o BSA e o BGA.

MEDINA et al. (1982), comparando os meios BSA, SSA, BGA e o XLDA (agar xilose-lisina-desoxicolato), afim de testar a capacidade de recuperação de células de *Salmonella* spp. do queijo Manchego, não encontraram nenhuma diferença aparente na performance dos 3 primeiros meios e o XLDA permitiu a mais baixa recuperação de células.

D'AOUST (1984), estudando a eficácia dos meios de isolamento para salmonelas, constatou que o meio BSA é altamente seletivo, quando comparado ao BGA, uma vez que inibiu a microflora competidora, o que facilitou a identificação de *Salmonella*.

LE MINOR (1984), elegeu os meios SSA e BGA como sendo os mais seletivos no isolamento das salmonelas.

FRICKER (1987), comparando os meios SSA, BGA e BSA com outros meios existentes (agar entérico Hektoen, agar xilose-lisina-desoxicolato e agar MacConkey), relatou que os três primeiros são mais seletivos por inibirem a microflora competidora existente.

Segundo D'AOUST (1989), os meios BSA e BGA são superiores ao SSA, no tocante à seletividade.

De acordo com alguns pesquisadores, outros meios utilizados no isolamento seletivo das salmonelas, como o agar MacConkey, o agar xilose-lisina-desoxicolato (XLDA) e o agar entérico Hektoen (HEA), são mais eficientes do que os utilizados no presente estudo (GOO et al., 1973 e RESTAINO et al., 1977), embora HOBEN et al. (1973), RICHARD (1984), SAKAZAKI (1984 b) e FRICKER (1987) tenham considerado os meios utilizados no presente trabalho similares ou superiores aos meios anteriormente citados, em sua habilidade de isolar *Salmonella* spp., principalmente pelo fato do HEA também permitir o crescimento de outros organismos como *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp. e *Hafnia* sp., que podem ser facilmente confundidos com *Salmonella* spp.

É importante ressaltar que a maioria das linhagens de *Citrobacter freundii*, *C. diversus* e *C. amalonaticus* cresce nos mesmos meios de isolamento que são utilizados na detecção do gênero *Salmonella*, como o SSA, o BGA e o BSA, inclusive com colônias semelhantes às salmonelas (SAKAZAKI, 1984 a). O mesmo acontece com

a maioria das linhagens de *Hafnia* (inclusive a *H. alvei*), que crescem no meio SSA e que também apresentam colônias morfológicamente idênticas às das salmonelas (SAKAZAKI, 1984b).

Como já foi dito anteriormente, a maioria dos meios seletivos utilizados para o isolamento das salmonelas, tem a seletividade baseada na fermentação de açúcares e na produção de H_2S , em combinação com várias concentrações de inibidores. Os meios que exploram essas características têm várias limitações. O uso de altas concentrações de inibidores não é desejável para a máxima recuperação de bactérias contaminantes. A detecção da produção de H_2S é variável, pois depende da taxa de produção de sulfeto da bactéria, da concentração de oxigênio da colônia, do pH e da concentração de ferro do meio. A produção de H_2S em combinação com testes para a produção de ácidos a partir da lactose parecem ser inadequadas para a diferenciação das cepas de *Salmonella* spp. das bactérias comensais. Em particular, espécies de *Proteus* que são lactose negativas e H_2S positivas não podem ser diferenciadas das salmonelas, pelo uso dos meios atualmente disponíveis (RAMBACH, 1990).

Além disso, segundo RAMBACH (1990), muitos dos meios não produzem colorações distintas, facilmente identificáveis para salmonelas. Esta falta de coloração distinta requer uma cuidadosa investigação e conhecimento da morfologia das colônias, para que se escolham as colônias certas.

Reconhecendo os limites das características fenotípicas utilizadas correntemente, parece ser desejável o desenvolvimento de um meio que facilite a

identificação presuntiva das salmonelas e que claramente diferencie suas colônias das de outros membros da família *Enterobacteriaceae*.

3.5. Patogenicidade/Sintomatologia

As salmonelas são potencialmente patogênicas para os seres humanos e para os animais domésticos (PROST & RIEMANN, 1967; BRYAN, 1968; FAGERBERG & AVENS, 1976; LE MINOR, 1984; OLIVEIRA, 1984), e podem ser divididas em dois grupos principais, segundo sua patogenicidade e epidemiologia: sorotipos adaptados a hospedeiros específicos e sorotipos ubiqüitários (encontrados em grande número de espécies de animais) (LE MINOR, 1984). Entre os sorotipos adaptados ao homem, estão os agentes etiológicos das febres tifóide e paratífóide, *S. typhi* e *S. paratyphi* A e B. Outros sorotipos estão adaptados à uma determinada espécie de animal, como é o caso da *S. abortusovis*, que causa aborto em ovelhas; da *S. typhisuis*, que é específica para suínos e a *S. gallinarum* que causa graves infecções em aves domésticas (FAGERBERG & AVENS, 1976; LE MINOR, 1984). Os sorotipos ubiqüitários (*S. typhimurium*, por exemplo), na sua grande maioria, não apresentam um hospedeiro específico, infectando indistintamente o homem e os animais (LE MINOR, 1984).

A possibilidade de infecção pelo consumo de alimentos contendo *Salmonella* depende da resistência do indivíduo, da capacidade de infecção da linhagem envolvida (*S. agona* e *S. dublin* são altamente virulentas) e do número de células

ingeridas (FRAZIER & WESTHOFF, 1985; D'AOUST, 1989; DOYLE & CLIVER, 1990).

As crianças são mais susceptíveis à infecção por *Salmonella* que os adultos, assim como subnutridos, idosos ou convalescentes (principalmente com cirrose hepática, câncer e anemia) (TAUNAY, 1968; LE MINOR, 1984; ICMSF, 1985; D'AOUST, 1989; DOYLE & CLIVER, 1990).

A dose de infecção pode estar ligada à composição química do alimento, uma vez que o mesmo pode proteger o organismo durante a passagem do estômago até o trato intestinal (SILLIKER, 1980). Segundo LE MINOR (1984), é necessário ingerir um número suficientemente elevado da bactéria (10^8 a 10^9), para expressar sintomas clínicos. Por outro lado, DOYLE & CLIVER (1990), revelam que cerca de 50 células de *S. napolí* produziram doença em indivíduos que ingeriram chocolate no Reino Unido. Já ROITMAM et al. (1988), mencionam que a dose mínima de infecção é variável, dependendo principalmente, da espécie da bactéria, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Doses de infecção para vários sorotipos de *Salmonella*.

Bactéria	Dose de infecção (UFC)*
<i>S. typhi</i>	10^4
<i>S. anatum</i>	$10^5 - 10^7$
<i>S. derby</i>	10^7
<i>S. pullorum</i>	10^9

* Unidades Formadoras de Colônias
Fonte: ROITMAM et al. (1988).

Dentre as salmonelas, mais de 2300 sorotipos são conhecidos e dentre estes, cerca de 150 podem provocar doenças no homem, sendo que com maior frequência, encontram-se as espécies *S. typhimurium*, *S. newport* e *S. enteritidis*. (DOYLE & CLIVER, 1990). Geralmente, estas bactérias são transmitidas através de alimentos via oral e, quando atingem o trato gastrointestinal, penetram nas células do tecido epitelial do intestino delgado, penetração esta favorecida pela ação de fragmentos de lipopolissacarídeos da parede celular do organismo, processo este, essencial para o aparecimento da sintomatologia característica desta síndrome (GALLO, 1990).

As salmoneloses mais frequentes descritas no homem são (TAUNAY, 1968; MARTH, 1969; FRAZIER & WESTHOFF, 1985; ICMSF, 1985; DOYLE & CLIVER, 1990; GALLO, 1990):

a) Febre tifóide e paratifóide (entérica): a febre tifóide é o exemplo clássico entre as febres entéricas. É provocada, principalmente, por *S. typhi* e *S. paratyphi* A,B (agora denominada *S. schottmuelleri*) e C (agora denominada *S. hirschfeldii*). Tanto a febre tifóide quanto a paratifóide são transmitidas através de água e alimentos contaminados (como leite cru, saladas cruas, ovos e mariscos).

Os sintomas da febre tifóide são bastante severos. Eles incluem septicemia, febre alta, cefaléia, constipação, mal estar, tosse, anorexia, náuseas, vômito, abdômem distendido e dolorido, diarreia, baço aumentado, hemorragia intestinal e nasal, manchas no peito e tronco, transpiração, calafrios, delírios, fraqueza. O período de incubação é longo, entre 8 a 15 dias e a doença pode durar de 1 a 8 semanas.

Estas bactérias, altamente invasivas, passam pela membrana intestinal, são englobadas por macrófagos, os quais são drenados nos nódulos linfáticos mesentéricos, através do ducto torácico, atingindo a corrente sangüínea e disseminando-se rapidamente, levando a um quadro de septicemia. As células bacterianas vão sendo liberadas dos macrófagos, sendo novamente englobadas por células do retículo endotelial, novamente liberadas e assim sucessivamente, razão do aparecimento de febres intermitentes, a cada liberação. Além da proteção dada às bactérias contra a ação dos mecanismos humorais de defesa, o habitáculo intracelular nos macrófagos torna mais difícil a erradicação das salmonelas pelos antimicrobianos (PELCZAR et al., 1981; DOYLE & CLIVER, 1990).

Nesta infecção pode haver a ocorrência de portadores assintomáticos, o que é sério quando se tratam de manipuladores de alimentos.

Os sintomas da febre paratifóide são bastante similares àqueles ocasionados pela febre tifóide, no entanto, são menos severos. Geralmente há septicemia, febre, cefaléia e dor abdominal. A doença pode durar de 1 a 3 semanas, ou ser tão breve como uma intoxicação alimentar.

Segundo MARTH (1969), tanto na febre tifóide como na paratifóide, as bactérias podem ser isoladas a partir do sangue e da urina.

O número de células necessário ao desenvolvimento da doença é da ordem de 10^6 (RIEMANN, 1972). De acordo com PELCZAR et al. (1981), um ataque confere imunidade duradoura, sendo rara uma segunda infecção no mesmo indivíduo.

b) Septicemia: causada por *S. choleraesuis*, onde a bactéria se dissemina através da corrente sangüínea a vários órgãos, provocando quadros bastante sérios e freqüentemente fatais, como abscessos nas regiões perianal e pélvica, abscessos no fígado, colecistite, endocardite, pericardite, meningite, artrite, pneumonia ou lesões supurativas. O envolvimento intestinal está geralmente ausente em adultos, porém, em crianças, a septicemia pode ocorrer devido à uma complicação de gastroenterite ou, até mesmo, por penetração direta do microrganismo na corrente sangüínea através da faringe.

c) Gastroenterite: é o tipo de salmonelose mais comum. É, na maioria das vezes, restrita ao trato gastrointestinal, onde as salmonelas são invasivas e as espécies mais importantes envolvidas são *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. Nesta enfermidade mais benígna que os outros tipos, o comprometimento do organismo afetado é bem menor, pois não há invasão na corrente sangüínea nem nas veias linfáticas, não havendo, portanto, migração do agente a outros órgãos. Assim, a ação é restrita à uma inflamação e irritação das mucosas intestinais.

O período de incubação pode variar de 1 a 168 horas, sendo mais freqüente a faixa de 6 a 48 horas (ROITMAM et al., 1988). Segundo REIMANN (1972), os sintomas começam após um período de incubação de 8 a 48 horas, entretanto DOYLE & CLIVER (1990), mencionam períodos de 5 a 72 horas, com média de 12 a 36 horas.

Os sintomas dessa salmonelose incluem cefaléia, calafrios, dor abdominal, seguido de náuseas, vômito, desidratação, diarréia mucosa por vezes com

sangue, tenesmos, prostração e febre de 38° C a 39° C. Estes sintomas persistem durante 2 a 5 dias, embora o isolamento da bactéria a partir das fezes possa prolongar-se por algum tempo. O índice de mortalidade é baixo, podendo haver seqüelas de complicações em crianças e pessoas idosas.

Existe uma polêmica muito grande a respeito do mecanismo de patogenicidade das salmonelas, de modo que o mesmo não está ainda totalmente elucidado. Inicialmente, atribuiu-se à uma endotoxina, porém, quando administrada diretamente no hospedeiro não produziu a doença. Pensa-se, então, que existe uma exotoxina, pois há um pouco de destruição da parede intestinal, antes da colonização. Ocorre ativação da enzima adenilciclase, que transforma o ATP em AMP cíclico, causando um desbalanço eletrolítico (Cl^- , CO_3^- , Na^+) e hídrico no lúmen intestinal, levando à diarreia devido à falta de reabsorção (GALLO, 1990). As conseqüências da diarreia não são limitadas somente ao desconforto intestinal e à evacuação freqüente, mas podem levar à sérias deficiências nutricionais (de íons inorgânicos e aminoácidos), como um resultado da má absorção, fazendo com que os componentes-chave do sistema imunológico sejam afetados, aumentando a susceptibilidade para contrair infecções secundárias (D'AOUST, 1989).

A Tabela 3 resume o quadro clínico das principais salmoneloses.

Tabela 3. Infecções provocadas pelas principais espécies de *Salmonella*.**A. Febre entérica (*S. typhi* e *S. paratyphi*)**

Período de incubação	: 7 - 20 dias (média 14 dias)
Início	: insidioso
Febre	: gradual com platô
Duração da doença	: semanas
Sintomas gastrointestinais	: constipação inicial, diarreia com sangue
Cultura	: sangue: positiva na 1 ^a e 2 ^a semanas fezes: positiva a partir da 3 ^a semana (circulação pelo organismo e volta ao intestino).

B. Septicemia (*S. choleraesuis*)

Período de incubação	: variável
Início	: abrupto
Febre	: ascensão rápida
Duração da doença	: variável
Sintomas gastrointestinais	: nenhum
Cultura	: sangue: positiva no período febril fezes: negativa (geralmente)

C. Gastroenterite (*S. typhimurium*, *S. enteritidis* e *S. newport*)

Período de incubação	: 8 - 48 horas
Início	: abrupto
Febre	: não ou baixa
Duração da doença	: 2 - 5 dias
Sintomas gastrointestinais	: náuseas, vômitos, diarreia
Cultura	: sangue: negativa fezes: positiva

Fonte: RIEMANN (1972).

3.6. Leite e queijo como fontes de contaminação por bactérias do gênero *Salmonella*.

A *Salmonella*, aparentemente pode atingir grandes números no alimento sem causar alterações detectáveis na aparência, odor e mesmo sabor. Naturalmente, quanto maior o número de patógenos no alimento, maiores serão as chances de infecção e menores os tempos de incubação (FRAZIER & WESTHOFF, 1985).

Considerando o grande consumo de leite e queijo em todo o mundo, o número de surtos de salmonelose atribuído a esses produtos é pequeno, talvez porque nem todos os casos chegam ao conhecimento médico, passando despercebidos pelas autoridades estatísticas. No entanto, a ocorrência da bactéria em produtos lácteos tem sido investigada por vários pesquisadores e, segundo FAGERBERG & AVENS (1976), SILLIKER (1980) e MARTIN & KATZ (1991), os produtos de laticínios são ainda um dos mais importantes veículos de transmissão das salmonelas.

MARTH (1969), relata vários surtos de salmonelose devido ao consumo de leite cru. De 4.091 surtos ocorridos na Inglaterra em 1965, 6 deles resultaram do consumo de leite cru contaminado com *S. typhimurium*. Nos Estados Unidos em 1966 e 1967, 11 e 40 pessoas, respectivamente, sofreram de gastroenterite devido à presença de *S. typhimurium* em leite cru.

Inúmeros sorotipos de *Salmonella*, associados a surtos de infecção devido ao consumo de leite cru, têm sido isolados em diversos países, a saber: *S. dublin*, *S.*

thompson, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. newport* e *S. enteritidis* (MARTH, 1969; WRAY & SOJKA, 1977).

Leite cru contaminado com *S. dublin* acometeu 74 pessoas nos Estados Unidos. Destas pessoas, 75% foram hospitalizadas e 20% morreram (KAMEI et al., 1974). Outros 2 surtos que ocorreram na Califórnia, um em 1958 e outro em 1964, também foram devidos à contaminação por *S. dublin* em leite cru, provenientes do mesmo laticínio (KAMEI et al., 1974).

Outros surtos de salmonelose, também veiculados pelo leite cru, ocorreram na Inglaterra e País de Gales (de 1969 a 1976 e 1984), na Escócia (entre 1970 e 1984), no Sul da Austrália, no Canadá (1982), na Alemanha (1983 a 1985) e no Iraque (leite de búfalo e de ovelha). O sorotipo mais freqüentemente isolado nestes surtos foi *S. typhimurium* (SEGLENIEKS & DIXON, 1977; BRYAN, 1983; AL-RAJAB, et al., 1986; D'AOUST, 1989).

Segundo BRYAN (1983), muitos surtos de salmonelose nos Estados Unidos desde 1965 até 1981 têm sido sumarizados tanto por pesquisadores quanto por relatos da vigilância oficial, os quais estão compilados na Tabela 4.

Tabela 4. Surtos de salmonelose de origem láctea nos Estados Unidos, de 1965 a 1981.

ANO	PRODUTO	ESTADO	Nº DE CASOS	SOROTIPO
1965	Leite cru	Washington	2	<i>typhimurium</i>
1965-1966	Leite em pó	Nationwide	29	<i>newbrunswick</i>
1967	Leite cru	Washington	40	<i>typhimurium</i>
1971	Leite humano	Illinois	1	<i>kottbus</i>
1971-1975	Leite cru "certificado" ^a	Califórnia	44	<i>dublin</i>
1975	Leite pasteurizado	Louisiana	43	<i>newport</i>
1977	Leite cru	Kentucky	3	<i>typhimurium</i>
1977	Leite humano	Maine	7	<i>kottbus</i>
1977-1978	Leite cru "certificado" ^a	Califórnia	5	<i>dublin</i>
1978	Leite pasteurizado	Arizona	23	<i>typhimurium</i>
1979	Leite em pó	Oregon	1	<i>agona</i> <i>typhimurium</i>
1980	Queijo Cheddar	Colorado	339	<i>heidelberg</i>
1980-1981	Leite cru	Washington	125	<i>dublin</i>
1981	Leite cru "certificado" ^a	Califórnia	1	<i>saint paul</i>
1981	Leite cru	Montana	59	<i>typhimurium</i>
1981	Leite cru	Washington	14	<i>dublin</i>

^a Leite "certificado" é o leite cru produzido sob condições rigorosas de higiene, que obedecem a critérios de sanitização adotados pela American Association of Medical Milk Commissions.

Fonte: BRYAN (1983).

De 1987 para cá, a bacteremia devida à *S. typhimurium*, *S. dublin* e *S. enteritidis* parece ser comum em pacientes aidéticos norte-americanos, os quais consomem leite cru freqüentemente (TAUXE, 1991).

Embora o tratamento térmico utilizado para a pasteurização do leite seja adequado para destruir as salmonelas, o leite pasteurizado tem-se contaminado ou devido à falhas durante o processo ou devido à pós-contaminação, o que o tem associado a um grande número de surtos de salmonelose (BRYAN, 1983; HOCKIN, et al., 1989).

MARTH (1969), faz várias menções sobre a ocorrência de surtos de salmonelose, devidos à ingestão de leite pasteurizado. *S. typhimurium*, *S. dublin* e *S. paratyphi*, foram os sorotipos mais isolados nos surtos ocorridos.

De acordo com o artigo CONSEQUÊNCIAS da precária proteção dos alimentos (1982), o leite pasteurizado contaminado com *Salmonella* spp. acometeu centenas de pessoas no Canadá.

Nos Estados Unidos, no período entre 1970 e 1979, *Salmonella* spp. foi responsável por 2 surtos de infecção devidos ao consumo de leite pasteurizado, 2 devidos à ingestão de leite em pó, 2 ocasionados por leite humano, 1 por queijo e 2 por leite "certificado" (BRYAN, 1983).

Em Trinidad, aproximadamente 3000 pessoas foram acometidas por gastroenterite, após a ingestão de leite em pó contaminado por *S. derby* (BRYAN, 1983).

Segundo LECOS (1986) e BEAN & GRIFFIN (1990), um surto ocasionado por *S. typhimurium* associado com leite pasteurizado de maneira imprópria,

foi referido como sendo o pior incidente de toxinfecção alimentar na história dos Estados Unidos, onde mais de 16000 pessoas foram acometidas.

De acordo com TAUXE (1991), a grande maioria dos veículos identificados em infecções no período entre 1983 e 1987, foram alimentos de origem animal, onde os produtos de laticínios, principalmente o leite pasteurizado, foram responsáveis por 47 casos e 6 surtos de salmonelose.

Há relatos em vários países envolvendo toxinfecções provindas do consumo de sorvetes, em locais onde as condições higiênico-sanitárias são precárias, além do não emprego de qualquer processo de destruição de microrganismos no processo final de fabricação (NÓBREGA, 1991). TAUNAY (1968), refere o recebimento de 26 cepas de salmonelas isoladas durante um surto entre os funcionários de uma indústria de mineração do Território do Amapá - Brasil. Todas as cepas foram identificadas como *S. hirschfeldii*, sendo 25 isoladas de pessoas doentes e 1 do leite em pó utilizado no preparo de sorvete consumido por esses indivíduos, comprovando, dessa forma, a origem do surto. FALCÃO et al. (1983), também relatam a ocorrência de um surto de salmonelose no Amapá. Neste caso, a doença foi devida ao consumo de sorvete contaminado com *S. paratyphi* C.

Vários surtos de salmonelose têm sido associados com o consumo de diferentes queijos. Antigamente, estes surtos estavam sempre relacionados com a febre tifóide, porém, com o decorrer dos anos, constatou-se que outras espécies de salmonelas também estavam envolvidas nesses surtos (MARTH, 1969; MEDINA et al., 1982; HOCKIN et al., 1989).

MARTH (1969), relata algumas epidemias de febre tifóide devidas ao consumo de queijo Cheddar. Uma que ocorreu no Canadá em 1941, acometeu 40 pessoas e resultou em 6 mortes e outra que aconteceu no mesmo país em 1944; além de surtos que ocorreram entre 1936 a 1944 em Alberta, onde 111 pessoas estavam envolvidas. Em todos esses casos, o queijo foi obtido a partir de leite cru.

Uma epidemia de febre tifóide ocorreu na Índia em 1944, com aproximadamente 250 casos envolvidos e 13 mortes. *S. typhimurium* foi responsável por 384 casos de gastroenterite em Kentucky, Estados Unidos da América. Em ambos os casos, o queijo Colby foi o responsável pelos surtos (MARTH, 1969).

Uma séria epidemia ocasionada por *S. heidelberg* devida ao consumo de queijo Cheddar pasteurizado foi relatada em 1976, no Colorado (D'AOUST, 1989).

O queijo Manchego, proveniente de leite de ovelha doméstica, também já foi incriminado como sendo o responsável por surto de gastroenterite na Espanha em 1976, por estar contaminado com *S. enteritidis* (MEDINA et al., 1982).

Segundo RATNAM & MARCH (1986), um dos maiores surtos de gastroenterite devido à presença de *S. typhimurium* em queijo Cheddar, ocorreu no Canadá durante o período de março a julho de 1974, onde cerca de 10.000 pessoas foram envolvidas.

3.7. Inter-relações entre o gênero *Salmonella* e membros da Família *Enterobacteriaceae*.

Outros microrganismos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, tais como, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., além de *Pseudomonas* spp. (Família *Pseudomonadaceae*) podem ser erroneamente identificados como sendo pertencentes ao gênero *Salmonella*, devido não só às suas similaridades bioquímicas, como por algumas vezes, apresentarem colônias suspeitas semelhantes às de *Salmonella* spp. em diferentes meios de isolamento seletivo (HOBEN et al., 1973; BARLETT, et al., 1977; LITTELL, 1977; RESTAINO et al., 1977).

Muitas linhagens de *Salmonella arizonae* produzem ácidos a partir da lactose, podendo ser facilmente confundidas com microrganismos fermentadores da lactose, como a *Escherichia coli*; no entanto, não produzem ácido a partir do dulcitol, o que acontece com a maioria das espécies de *Salmonella*. Esta característica, por sua vez, pode corroborar para que algumas bactérias Gram-negativas, principalmente aquelas produtoras de H₂S e que não utilizam o dulcitol, como certas espécies de *Hafnia*, *Proteus*, *Citrobacter* e *Pseudomonas* sejam também confundidas com *S. arizonae* (LITTELL, 1977; ANDREWS et al., 1978, LE MINOR, 1984).

Com exceção da *S. typhi* e *S. paratyphi* A, as outras espécies do gênero utilizam o citrato como fonte de carbono, o que também ocorre entre algumas espécies de *Citrobacter* e *Enterobacter* e, até mesmo, com algumas linhagens de *E. coli* e *Hafnia*

alvei. Além disso, outros fatores podem contribuir para uma interpretação duvidosa na caracterização do gênero *Salmonella*, a saber: o crescimento em KCN tanto de salmonelas pertencentes ao "subgênero" IV e V, como de *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* e de algumas espécies de *Enterobacter* (*E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. sakazakii* e *E. intermedium*), a utilização do malonato tanto por *S. arizonae* como também por algumas espécies de *Enterobacter* e por algumas linhagens de *Hafnia alvei*, *Citrobacter diversus* e *C. freundii*; a reação positiva para a fermentação ácido mista (prova do Vermelho de Metila) e butanodióica (Voges-Proskauer) por espécies de *Salmonella* e *Citrobacter*, além das reações negativas para a produção do indol e urease tanto para *Salmonella* spp. como para *Enterobacter* spp. (LE MINOR, 1984; ORSKOV, 1984; RICHARD, 1984; SAKAZAKI, 1984 a; SAKAZAKI, 1984b).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

- Amostras

- leite bovino cru (1000 ml) embalado por 6 produtores cooperados;
- leite bovino pasteurizado tipo C (1000 ml) produzido por 5 laticínios distintos e
- queijo "Minas Frescal" (500 g) produzido por 6 diferentes laticínios.

- Meios de cultivo

- Caldo lactosado (DIFCO);
- Caldo selenito-cistina (DIFCO);
- Caldo tetracionato (DIFCO);
- Agar *Salmonella-Shigella* (DIFCO);
- Agar bismuto-sulfito (DIFCO);
- Agar verde brilhante (DIFCO);

- Agar tríplice açúcar ferro (TSIA-DIFCO);
- Caldo triptonado (DIFCO) para produção de indol;
- Caldo MR-VP (DIFCO);
- Agar citrato de Simmon's (DIFCO);
- Agar uréia de Christensen;
- Caldo malonato (DIFCO);
- Caldo cianeto de potássio (DIFCO);
- Agar lisina ferro (LIA-DIFCO) e
- Caldo básico de púrpura de bromocresol (DIFCO) adicionado de 1,0% de sacarose, 1,0% de lactose, 1,0% de dulcitol e 0,5% de salicina, respectivamente, para as provas de fermentações dos referidos carboidratos.

- Soluções

- Água peptonada a 0,1% (THATCHER & CLARK, 1972);
- Solução de vermelho de metila (SMIEBERT & KRIEG, 1981);
- Soluções de alfa-naftol e de hidróxido de potássio para a prova de Voges-Proskauer (SMIEBERT & KRIEG, 1981);
- Reativo de Kovacs (SMIEBERT & KRIEG, 1981);
- Solução aquosa de uréia a 20%;
- Solução de cristal violeta para coloração de Gram;
- Solução de lugol a 20% para coloração de Gram;

- Solução de safranina para coloração de Gram e
- Solução crioprotetora para liofilização dos isolados (sacarose 8% e peptona 2%).

- Equipamentos

- Balança MICRONAL B600;
- Estufa incubadora FANEM mod. 002;
- Estufa para esterilização FANEM mod. 315-SE;
- Autoclave FABBE mod. 103;
- Autoclave LUFERCO mod. 39.211;
- Microscópio BAUSH & LOMB;
- Lupa SPENCER;
- Iluminador FISHER SCIENTIFIC e
- Liofilizador VIRTIS (Division of Cenco Medical/Health Supply Corp.)

- Outros

- Equipamentos e vidrarias de uso corrente em microbiologia;
- Cultura padrão de *Salmonella typhimurium* (CCT 0626) da coleção de culturas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" de Campinas.

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção das amostras

As amostras utilizadas no presente estudo foram de leite bovino cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", coletadas quinzenalmente no município de Piracicaba - SP, durante o período de novembro de 1991 a março de 1992.

Procurou-se adotar um padrão exequível tanto para o número e marcas comerciais das amostras analisadas, como para o número, categorias de estabelecimentos e produtores amostrados. Dessa forma, durante o período de execução das análises, foram realizadas 7 coletas, nas quais foram analisadas 18 amostras de cada um dos produtos e mais 1 amostra de cada produto, como ensaio preliminar, obtendo-se de 3 a 4 repetições das análises ao longo do período.

As amostras de leite cru provenientes de 6 produtores distintos foram obtidas junto à Cooperativa Agropecuária de Piracicaba em sacos plásticos de 1000 ml, embaladas pelo próprio produtor, enquanto que as 5 marcas comerciais diferentes de leite pasteurizado tipo C, bem como as 5 marcas comerciais diferentes de queijo "Minas Frescal" (excluindo as amostras do mesmo produto que não tinham marca comercial nem registro no S.I.F.), foram adquiridas em suas embalagens originais a partir de estabelecimentos comerciais de grande, médio e pequeno porte.

As amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", foram acondicionadas em recipientes isotérmicos contendo gelo picado e

transportadas imediatamente, num período de 2 horas, para o laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", afim de se proceder as análises.

4.2.2. Preparo das amostras

No laboratório, as amostras de leite a serem analisadas foram inicialmente homogeneizadas nas próprias embalagens em que foram coletadas. As embalagens foram então desinfectadas com álcool, para se proceder a tomada de 25 ml do produto com o auxílio de uma pipeta, os quais foram transferidos para um erlenmeyer de 500 ml contendo 225 ml de caldo lactosado.

Com relação às amostras de queijo, pesou-se assepticamente 25 g do produto, que também foram transferidos para um erlenmeyer de 500 ml que continha 225 ml de caldo lactosado e pérolas de vidro, as quais auxiliavam na homogeneização.

O preparo de ambos os tipos das amostras (leite e queijo), foi realizado de acordo com a técnica recomendada por ANDREWS et al. (1978).

4.2.3. Detecção, isolamento e identificação

Para a detecção, isolamento e identificação de *Salmonella* spp. nos produtos lácteos já citados anteriormente, foi utilizada a metodologia sugerida pela

"Food and Drug Administration" (FDA), descrita na 5ª edição do Bacteriological Analytical Manual por ANDREWS et al. (1978).

Alíquotas de 25 g ou 25 ml das amostras de leite bovino cru e pasteurizado tipo C e de queijo "Minas Frescal", foram adicionadas à 225 ml do caldo de pré-enriquecimento (lactosado), com inubação a 35° C. Após 24 horas de incubação, alíquotas de 1 ml foram transferidas do caldo lactosado para 10ml do caldo de enriquecimento seletivo (tetracionato e selenito-cistina), os quais foram incubados por 24 horas a 42° C e a 35° C, respectivamente. Após o período de incubação dos mesmos, foram feitas estrias, com o auxílio de alça níquel-cromo nos meios seletivos agar bismuto sulfito (BSA), agar verde brilhante de fenol (BGA) e agar *Salmonella* - *Shigella* (SSA), até diluição de 10⁻¹, sendo as placas dos respectivos meios, incubadas a 35° C.

Após 48 horas de incubação, as placas de BSA, BGA e SSA foram observadas para a presença de colônias típicas de bactérias não fermentadoras de lactose. As colônias de *Salmonella* spp. sobre BGA devem apresentar-se de cor rosa claro a escuro, opacas ou translúcidas e as de forma atípica, descoloridas. Sobre BSA, as colônias devem apresentar-se de marrom escuras à negras e, algumas vezes, verdes e com brilho metálico. Já em SSA, a maioria das colônias típicas apresentam-se como incolores ou pouco amareladas, com ou sem centros negros; no caso específico de *S. arizonae*, as colônias aparecem rosadas ou alaranjadas.

Colônias suspeitas de serem pertencentes ao gênero *Salmonella* foram selecionadas de cada placa em número de até 5 e semeadas em tubos de agar tríplice-açúcar-ferro (TSIA) que, por sua vez, foram incubados a 35° C por 24 horas. As

culturas dos tubos revelando um comportamento bioquímico suspeito de *Salmonella* spp., caracterizado por produção ou não de gás sulfídrico (enegrecimento do agar), pela fermentação da glicose (fundo do tubo ácido, amarelo), acompanhada da produção de gás (bolhas e/ou ruptura do agar) e não utilização da lactose e sacarose (superfície do tubo alcalina, vermelha), foram submetidas à uma série de testes bioquímicos de identificação, a saber: coloração de Gram; descarboxilação da lisina (LIA); produção de urease; produção de indol; produção de ácidos a partir da sacarose, da salicina, da lactose e do dulcitol; prova do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP); utilização do citrato de sódio e do malonato de sódio; além da prova de tolerância ao cianeto de potássio.

Nesta etapa, comparou-se os resultados dos testes bioquímicos aplicados aos isolados bacterianos obtidos, com as respostas para os mesmos testes aplicados à cultura padrão de *Salmonella typhimurium* (CCT 0626), a saber: bastonete Gram-negativo; fermentação da glicose e não fermentação da lactose e/ou sacarose em TSIA; produção de gás e de H₂S em TSIA; descarboxilação da lisina (LIA); urease negativa; indol negativa; não produção de ácidos a partir da sacarose, da salicina e da lactose; produção de ácido a partir do dulcitol; fermentação ácido-mista positiva (VM); fermentação butanodióxica negativa (VP); utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono; não utilização do malonato de sódio e tolerância ao cianeto de potássio.

Após a identificação bioquímica, os isolados foram submetidos à caracterização sorológica do gênero *Salmonella* relativa aos soros poli "O", "H" e "Vi", no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo.

A Figura 1 mostra um fluxograma das etapas realizadas para detecção, isolamento e identificação de *Salmonella* spp. de acordo com ANDREWS et al. (1978).

4.2.4. Manutenção das culturas identificadas

Após a identificação das culturas bacterianas, os isolados obtidos foram submetidos ao processo de liofilização, para a sua manutenção.

Figura 1. Detecção, isolamento e identificação de *Salmonella* spp. (ANDREWS et al., 1978).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi possível, segundo o método adotado, detectar a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras das 3 categorias de produtos lácteos, de diferentes procedências e marcas comerciais.

Foram analisadas e submetidas às provas bioquímicas 145 culturas, das quais 30 exibiram resultados semelhantes, ou muito próximos, à *Salmonella* spp., sendo enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para confirmação do gênero *Salmonella* através de testes sorológicos, o que não aconteceu, e foram lá identificadas como pertencentes aos gêneros e espécies constantes na Tabela 5.

Tabela 5. Frequência de isolamento de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* a partir de leite pasteurizado tipo C, leite cru e queijo "Minas Frescal".

BACTÉRIAS IDENTIFICADAS	Nº DE ISOLADOS IDENTIFICADOS	PRODUTO / % DE CONTAMINAÇÃO
<i>Escherichia coli</i>	4	Queijo "Minas Frescal" - 6,67
		Leite Pasteurizado Tipo C - 3,33
		Leite cru - 3,33
<i>Enterobacter</i> spp.	14	Queijo "Minas Frescal" - 33,34
		Leite Pasteurizado Tipo C - 6,67
		Leite cru - 6,67
<i>Citrobacter</i> sp.	1	Queijo "Minas Frescal" - 3,33
<i>Hafnia alvei</i>	1	Leite cru - 3,33
<i>Pseudomonas</i> spp.	10	Queijo "Minas Frescal" - 10,00
		Leite Pasteurizado Tipo C - 10,00
		Leite cru - 13,33

A bactéria mais freqüente entre os 30 isolados identificados pertenceu ao gênero *Enterobacter* (46,68%), seguida por *Pseudomonas* (33,33%). A espécie bacteriana *E. coli* esteve presente em 13,33% dos isolados identificados. Apenas 1 isolado identificado pertenceu ao gênero *Citrobacter* e apenas 1 bactéria foi identificada como *Hafnia alvei*.

A caracterização bioquímica dos isolados identificados está sumarizada na Tabela 6.

Tabela 6. Identificação bioquímica dos isolados obtidos.

Características	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
VM	+	-	+	+	-
VP	-	+	-	-	-
Reações em TSIA:					
Produção de H ₂ S	-	-	+	-	-
Fundo ácido	+	+	+	+	+
Superfície alcalina	+	+	+	+	+
Produção de gás	+	+	+	+	-
Produção de ácidos a partir de:					
Salicina	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-
Lactose	+	-	-	-	-
Dulcitol	+	-	+	-	-
Descarboxilação da lisina	+	+	+	+	+
Produção de indol	+	-	-	-	-
Produção de urease	-	-	-	-	-
Crescimento em KCN	+	+	+	+	+
Utilização do citrato	-	+	+	+	+
Utilização do malonato	+	+	+	+	+

Pode-se observar que nenhum dos isolados, com exceção de *Citrobacter* sp., produziu sulfeto de hidrogênio em TSIA e todos fermentaram a glicose e não utilizaram a lactose e a sacarose em TSIA, no entanto, somente *Pseudomonas* spp. não

produziu gás neste meio. Todos não produziram urease nem ácidos a partir da salicina e da sacarose. Exceto a *E. coli*, todos os demais apresentaram reações negativas para a produção de indol e de ácidos a partir da lactose. Todos os isolados descarboxilaram a lisina, utilizaram o malonato e cresceram em meios contendo cianeto de potássio. Somente *E. coli* não utilizou o citrato e somente o gênero *Enterobacter* apresentou reação positiva para a fermentação butanodióxica.

Todos os isolados citados apresentaram grande similaridade bioquímica ao gênero *Salmonella*. O gênero *Citrobacter* apresentou características bioquímicas idênticas às das salmonelas, mesmo crescendo em meio contendo cianeto de potássio, uma vez que salmonelas pertencentes ao "subgênero" IV e V também crescem nessas condições, e mesmo utilizando o malonato, pois *S. arizonae* também o utiliza (LE MINOR, 1984).

Com relação à procedência das 145 culturas obtidas, no que diz respeito ao meio de isolamento, 70 foram obtidas a partir do SSA, 55 do BSA e 20 do BGA. Já em relação aos 30 isolados que foram submetidos à sorologia, 15 foram obtidos a partir do SSA, 10 do BGA e somente 5 do BSA. O gênero *Citrobacter* sp. foi isolado a partir do SSA e *H. alvei* a partir do BGA. Tanto *E.coli*, como *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. foram isolados a partir dos 3 meios de isolamento seletivo sugeridos por ANDREWS et al. (1978).

Isso mostra claramente que mesmo se utilizando a metodologia padrão e mais indicada para o isolamento de *Salmonella*, proposta pelo FDA, não se pode excluir a caracterização sorológica, posto que não dispomos de um meio de cultivo

seletivo ideal para o isolamento de *Salmonella*, o qual deveria ser inibidor para outros gêneros, uma vez que nos meios de isolamento seletivo recomendados, certos coliformes fermentadores de lactose como a *E. coli*, além de outras bactérias não fermentadoras de lactose, como *Pseudomonas*, *Citrobacter* e *Hafnia*, que neles apresentam colônias suspeitas semelhantes às exibidas por *Salmonella*, podem crescer e, muitas vezes, até suprimir o seu crescimento (GOO et al., 1973; HOBEN et al., 1973; LITTELL, 1977; SAKAZAKI, 1984 a e b).

No que se refere às análises das amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo c e queijo "Minas Frescal", foi possível observar que as placas de agar *Salmonella* - *Shigella* (SSA), na maioria das vezes, apresentaram um crescimento intenso de colônias de colorações variadas (rosas, incolores, amareladas, por vezes com centros negros e brilhantes). Sobre o agar bismuto sulfito (BSA), observou-se, de modo geral, um crescimento intenso, onde as colônias apresentaram colorações bege, marrom escura, verde e negra, por vezes com brilho metálico. Muitas vezes, foram observados 3 a 4 tipos diferentes de colônias numa única placa no tocante ao aspecto coloração, tanto para o SSA como para o BSA.

As colônias de colorações diversas supracitadas, obtidas a partir das amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal", sobre os meios SSA e BSA, ao longo do período de análises, apresentaram similaridade bioquímica às das salmonelas, através da realização de testes de identificação a nível de gênero, a saber: descarboxilação da lisina; produção de ácidos em TSIA; produção de urease; produção de indol; produção de ácidos a partir de sacarose, da salicina, da lactose e do

dulcitol; prova do vermelho de metila e Voges-Proskauer; utilização do citrato e do malonato; crescimento em meios contendo cianeto de potássio. No entanto, quando esses isolados foram submetidos à caracterização sorológica, nenhum deles foi identificado como pertencente ao gênero *Salmonella*. Isso demonstra a grande facilidade de se selecionar erroneamente colônias suspeitas de *Salmonella* spp. sobre esses meios de isolamento.

Com relação ao agar verde brilhante (BGA), nas análises dos três produtos lácteos, pôde-se observar placas com crescimento de incipiente a nulo, com colônias descoloridas, rosas, amarelas e verdes. Este menor desenvolvimento de colônias no meio BGA pode indicar uma maior seletividade do mesmo para os microrganismos competidores presentes nas amostras analisadas. As colônias rosas e descoloridas suspeitas de serem pertencentes ao gênero *Salmonella*, quando submetidas aos testes de identificação anteriormente citados, também apresentaram similaridade bioquímica às salmonelas, porém, quando as mesmas foram submetidas às provas sorológicas, não foram confirmadas como tal.

No que diz respeito à seletividade dos meios de isolamento BGA, SSA e BSA que foram utilizados nesse estudo, foi possível constatar que os 3 meios são pobres em seletividade. O BGA permitiu o crescimento de uma variedade de colônias, inclusive com colorações que não são características para o gênero *Salmonella*, o que não aconteceu com o BSA nem com o SSA. Além disso, em alguns casos, não se observou crescimento nas placas de BGA, não sendo possível, portanto, o isolamento de colônias a partir desse meio. Nos meios BSA e SSA observou-se crescimento intenso de colônias

de diferentes colorações, porém todas elas se enquadravam como suspeitas, pois tinham colorações características das colônias de salmonelas. Por outro lado, também é importante ressaltar, que esse crescimento intenso nos meios BSA e SSA, talvez tenha propiciado uma seleção de colônias suspeitas negativas para *Salmonella* spp.

De acordo com TOMPKIN & KUEPER (1973) e FAGERBERG & AVENS (1976), a frequência de ocorrência de todos os sorotipos de *Salmonella* pode ser dependente de alguns fatores como, a metodologia utilizada para o isolamento, a qual pode inibir certas espécies; o número de células do patógeno presentes no alimento versus o número de células dos organismos competidores; o padrão de amostragem, além dos sorotipos existentes. Esses fatores são bastante importantes no sentido de auxiliar no entendimento a respeito da baixa frequência de isolamento da bactéria a partir de produtos lácteos, principalmente devido à presença de diversificada e grande população de organismos competidores, que podem sobrepujar o crescimento das salmonelas, nos meios de enriquecimento e isolamento disponíveis. Tal fato pode ter ocorrido no presente estudo, onde *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* sp., *Hafnia alvei* e *Pseudomonas* spp. foram identificados como contaminantes presentes. Diante de tal situação, torna-se clara a necessidade de uma metodologia mais adequada, que permita uma fácil, rápida e segura detecção e isolamento do patógeno a partir de alimentos, considerando que o mesmo pode se apresentar em números muito baixos.

Alguns trabalhos sobre a ocorrência de *Salmonella* spp. em alimentos vêm sendo realizados por pesquisadores de localidades diversas, dada a importância desse patógeno para os órgãos de saúde pública. No entanto, torna-se difícil comparar

os resultados obtidos no presente estudo com os demais realizados, devido à variedade de metodologias e padrões de amostragem utilizados, ou mesmo devido ao número reduzido de trabalhos que pesquisaram a bactéria em produtos lácteos, principalmente no queijo "Minas Frescal", que é um produto tipicamente brasileiro.

Mesmo assim, considerando as diferenças existentes entre os diversos trabalhos, com relação à análise das amostras de leite pasteurizado tipo C, os resultados obtidos neste estudo, que apontaram a ausência de positividade para *Salmonella* spp., concordam com os resultados obtidos por SILVEIRA et al. (1989), que obtiveram negatividade em 165 amostras, e NASCIMENTO et al. (1991), que pesquisaram a presença do patógeno em 30 amostras, comercializadas no município de Piracicaba, São Paulo.

No que diz respeito às amostras de queijo "Minas Frescal", a ausência de positividade para *Salmonella* spp. observada neste estudo, também concorda com os resultados obtidos por FURLANETTO et al. (1983), que pesquisaram o patógeno em 30 amostras de queijo "Minas Frescal", as quais foram obtidas em supermercados no município de São Paulo.

Com relação às amostras de leite cru analisadas no presente trabalho, onde também obteve-se ausência de *Salmonella* spp., os resultados estão de acordo com os obtidos por SCOTT & MINETT (1947). No entanto, a ausência de positividade obtida para essas amostras é conflitante com os resultados obtidos por alguns pesquisadores que, embora com baixa incidência, conseguiram isolar o patógeno. Assim, podem ser destacados os trabalhos de McMANUS & LARNIER (1987), que obtiveram

4,1% de positividade para *Salmonella* spp.; HUMPHREY & HART (1988), com 0,2% de positividade; McEWEN et al. (1988), com 0 a 1,23% e REA et al. (1992), com 0,16%.

A ausência de positividade para *Salmonella* spp. nos produtos analisados não significa que os mesmos estejam próprios para o consumo, uma vez que outras enterobactérias foram encontradas, como *H. alvei*, coliformes totais (*Enterobacter* spp., *Citrobacter* sp.) e fecais (*Escherichia coli*). Mesmo que a presença de coliformes totais não possa ser considerada como indicativa de contaminação fecal recente ou de bactérias enteropatogênicas, a sua grande incidência entre os isolados identificados, indica seguramente a ocorrência de falhas higiênicas ao longo da obtenção, processamento e armazenamento dos produtos. Já com relação à presença de *E. coli*, a sua constatação nos produtos em questão indica que as condições sanitárias durante a obtenção do leite cru, obtenção e processamento no caso do leite pasteurizado tipo C e do queijo "Minas Frescal" foram precárias, uma vez que tais indicadores de contaminação fecal estavam presentes. O leite cru e o queijo "Minas Frescal" merecem considerada atenção neste aspecto, uma vez que o primeiro é amplamente vendido à domicílio no município de Piracicaba, sem tratamento algum e o segundo, o qual é, muitas vezes, feito a partir de leite cru e vendido em feiras e pequenos mercados, vem substituindo gradativamente os queijos curados, principalmente devido à redução do poder aquisitivo da população.

Cabe lembrar que as 57 amostras analisadas foram obtidas a partir de produtores e categorias de estabelecimentos comerciais diversos, ou seja, de grande,

médio e pequeno porte, com o intuito de obter uma rastreabilidade dos locais mais procurados pelas diferentes camadas sociais da população.

O porte dos estabelecimentos não influenciou na procedência das amostras contaminadas, pois as 23 amostras contaminadas procederam das diversas categorias de estabelecimentos, onde 9 amostras procederam de estabelecimentos de médio porte, 8 de pequeno porte e 6 de grande porte; o que realça a idéia da ocorrência de falhas higiênicas ao longo da obtenção, processamento e armazenamento dos produtos analisados.

É óbvio que um estabelecimento de grande porte tenha muito mais estrutura para promover o armazenamento correto de produtos perecíveis, do que o de médio e pequeno porte, mas isto não o isenta de estar estocando esses produtos sob condições precárias, com oscilações de temperatura, principalmente com o intuito de economizar energia elétrica e, com isso, comprometendo a qualidade dos mesmos.

A presença de indicadores de contaminação fecal, além de dar uma idéia quanto ao aspecto higiênico-sanitário dos referidos produtos, também representa um risco, tanto pela possibilidade da presença de outros enteropatógenos, como pela importância de algumas linhagens de *E. coli* serem patógenos entéricos potenciais que, segundo KORNACKI & MARTH (1982), são indistinguíveis morfológica e bioquimicamente das linhagens não patogênicas. Tais linhagens patogênicas disseminadas através dos produtos lácteos, já estiveram envolvidas em casos de surtos de gastroenterite humana. Devido à grande probabilidade de má sanitização durante o processamento dos

produtos, essa doença diarreica é mais comum em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos (KORNACKI & MARTH, 1982).

Existem vários trabalhos que relatam o envolvimento de *E. coli* em casos de contaminação e de ocorrência de surtos de diarreia em produtos lácteos.

A bactéria já foi incriminada como sendo contaminante de leite pasteurizado em diversos locais por diversas vezes (PAPAVASSILIOU, 1957; NASCIMENTO, 1982; VESSONI-PENNA et al., 1986; SILVEIRA et al., 1989; NASCIMENTO et al., 1991).

Com relação ao leite cru, *E. coli* mostrou-se um contaminante bastante freqüente (GLATZ & BRUDVIG, 1980; NASCIMENTO, 1982; REA et al., 1992).

Os queijos também têm sido incriminados como sendo fontes de infecção por *E. coli*. FRANK & MARTH (1978) e GLATZ & BRUDVIG (1980), relataram a incidência da bactéria em queijos macios, com alta umidade. CARVALHO et al. (1981), NASCIMENTO et al. (1985) e GUERRERO & BARRENO (1992), encontraram a bactéria contaminando queijos frescos.

Além de *E. coli*, as outras enterobactérias detectadas neste estudo também têm-se mostrado contaminantes nos produtos de laticínios. RUTZINSKI & MARTH (1980) e RICHARD (1984), comentam que *Enterobacter* spp. já foi isolado de produtos lácteos. SAKAZAKI (1984 a), sugere que algumas linhagens de *Citrobacter* sp. causam diarreia em humanos e já foram detectadas em produtos de laticínios. A ausência de *H. alvei* nos produtos lácteos é desejável e necessária, uma vez que a bactéria tem

sido relatada como um possível agente causal de gastroenterite humana e isolada com frequência destes produtos (SAKAZAKI, 1984b).

Cabe lembrar que *Pseudomonas* spp. também foi detectada nas amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal" no presente trabalho. Este fato é bastante importante, uma vez que algumas bactérias pertencentes a este gênero produziram uma toxina e já foram implicadas como agentes etiológicos de uma enterite causada pela ingestão de leite pasteurizado, envolvendo 409 casos e com morte de 9 bebês (BRYAN, 1983).

Pelo que foi exposto, pode-se deduzir que as amostras dos alimentos analisados, mesmo não acusando a presença de *Salmonella* spp., representam um risco à população consumidora por estarem sendo expostas à contaminações por microrganismos altamente indesejáveis.

Os resultados obtidos indicam que o leite cru, não só não deve ser comercializado neste estado, como também não deve ser utilizado para a produção de queijo "Minas Frescal", pois não apresenta qualidade satisfatória no aspecto higiênico-sanitário, podendo ser veículo de contaminação se não for adequadamente pasteurizado. O mesmo serve para o leite pasteurizado que mostrou-se contaminado por enterobactérias, indicando negligência em suas etapas de processamento e/ou armazenamento. Por isso, é muito importante canalizar esforços e recursos disponíveis, afim de conscientizar os produtores, no sentido de adotar um rigoroso sistema de boas práticas de higiene durante todo o processamento, para melhorar a qualidade dos

mesmos; além é claro, de merecer a atenção das autoridades de saúde pública, já que tais alimentos são amplamente consumidos pela população.

6. CONCLUSÕES

Segundo os resultados obtidos no presente estudo e de acordo com a discussão desenvolvida, espera-se ter contribuído com algumas informações, a respeito das condições bacteriológicas das amostras analisadas, assim como do comportamento dos meios de isolamento para *Salmonella*. Tais informações podem ser sintetizadas nas seguintes conclusões.

(a) - Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp., segundo a metodologia e padrão de amostragem utilizados, nas amostras de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal".

(b) - Os resultados obtidos concordam com a literatura, no sentido de que *Salmonella* spp. apresenta-se ausente ou em números muito baixos nos alimentos.

(c) - Foi detectada a presença de coliformes totais (*Enterobacter* spp. e *Citrobacter* sp.), coliformes fecais (*Escherichia coli*), além de *Hafnia alvei* e *Pseudomonas* spp. nas amostras analisadas.

(d) - Os caldos de enriquecimento utilizados, tetrationato e selenito-cistina, não foram totalmente inibidores ao crescimento da microflora competidora.

(e) - O meio SSA foi o que mais isolou colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Salmonella*.

(f) - Os 3 meios de isolamento utilizados, o BGA, o BSA e o SSA não se mostraram eficientes em seletividade, pois permitiram o crescimento de colônias suspeitas negativas para *Salmonella* spp.

(g) - O porte dos estabelecimentos não influenciou na procedência das amostras contaminadas, pois as 23 amostras contaminadas procederam tanto de estabelecimentos de grande, como de médio e pequeno porte.

(h) - A presença de coliformes totais e fecais e de *H. alvei* e *Pseudomonas* spp. em algumas das amostras analisadas neste trabalho, indica a necessidade de atenção especial por parte dos órgãos de saúde pública e dos produtores dos referidos alimentos, pois simplesmente a ausência de positividade para *Salmonella* spp. não implica na segurança dos produtos analisados, e pelas demais bactérias identificadas em algumas amostras, fica claro que os mesmos podem estar sendo expostos à contaminações por microrganismos indesejáveis, inclusive patogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFORD, J.A. & PALUMBO, S.A. Interaction of salt, pH, and temperature on the growth and survival of *Salmonellae* in ground pork. **Applied Microbiology**, Washington, 17(4): 528-32, Apr. 1969.

ALMEIDA, R.C.C.; ALMEIDA, P.F.; KUAYE, A.Y. Pontos críticos em serviços de alimentação. **Higiene Alimentar**, São Paulo, 8(30): 17-20, abr. 1994.

AL-RAJAB, W.J.; AL-DABBAGH, W.Y.; AL-ZAHAWI, S.M. Occurrence of *Salmonella* in Iraqi milk products. **Journal of Food Protection**, Ames, 49(4): 282-4, Apr. 1986.

ANDREWS, W.H. A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of *Salmonella* in foods. **Food Technology**, Champaign, 39(3): 77-82, Mar. 1985.

ANDREWS, W.H.; POELMA, P.L.; WILSON, C.R.; ROMERO, A. Isolation and identification of *Salmonella*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 5. ed. Arlington, AOAC, 1978. cap.6. p.1-29.

BAILEY, J.S.; COX, N.A.; THOMSON, J.E. Rapid procedure for biochemical characterization and serological confirmation of suspect *Salmonella* isolates. **Journal of Food Protection**, Ames, 46(9): 764-6, Sept. 1983.

BANWART, G.J. & AYRES, J.C. The effect of pH on the growth of *Salmonella* and functional properties of liquid egg white. **Food Technology**, Chicago, 11(1): 244-6, Jan./June 1957.

BARTLETT, K.H.; TRUST, T.J.; LIOR, H. Small pet aquarium frogs as a source of *Salmonella*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 33(5): 1026-9, May 1977.

BEAN, N.H. & GRIFFIN, P.M. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973 - 1987. Pathogens, vehicles and trends. **Journal of Food Protection**, Ames, 53(9): 804-17, Sept. 1990.

BORMAN, E.K.; STUART, C.A.; WHEELER, K. Taxonomy of the family *Enterobacteriaceae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, 48: 351-67, 1944.

BRYAN, F.L. What the sanitarian should know about *Staphylococci* and *Salmonellae* in nondairy products. II. *Salmonellae*. **Journal of Milk Technology**, Shelbyville, 31: 131-40, 1968.

BRYAN, F.L. Epidemiology of milk-borne diseases. **Journal of Food Protection**, Ames, 46(7): 637-49, July 1983.

CARPENTER, J.A.; ELLIOT, J.G.; REYNOLDS, A.E. Isolation of *Salmonella* from pork carcasses. **Applied Microbiology**, Washington, 25(5): 731-4, May 1973.

CARVALHO, E.P.; GÓMES, R.C.; COSTA, L.C.G. Condições microbiológicas de queijo "Minas-frescal" comercializados em Lavras, M.G. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 5, Viçosa, 1981. p.147.

CERQUEIRA-CAMPOS, M.L. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e bactérias do gênero *Salmonella* em carne moída vendida no município de São Paulo (1976 - 1977). São Paulo, 1980, 117 p. (Doutoramento - Instituto de Ciências Biomédicas/USP).

CHUNG, K.C. & GOEPFERT, J.M. Growth of *Salmonella* at low pH. **Journal of Food Science**, Chicago, 35(3): 326-8, May/June 1970.

CONSEQUÊNCIAS da precária proteção dos alimentos. **Leite & Derivados**, São Paulo, 6(5): 98, set./out. 1982.

CROSA, J.H.; BRENNER, D.J.; EWING, W.H.; FALKOW, S. Molecular relationships among the *Salmonellae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, 115(1): 307-15, July 1973.

D'AOUST, J.-Y. *Salmonella* and the chocolate industry. A review. **Journal of Food Protection**, Ames, 40(10): 718-27, Oct. 1977.

D'AOUST, J.-Y. Effective enrichment-plating conditions for detection of *Salmonella* in foods. **Journal of Food Protection**, Ames, 47(8): 588-90, Aug. 1984.

D'AOUST, J.-Y. *Salmonella*. In: DOYLE, M.P. ed. **Foodborne bacterial pathogens**. New York, Marcel Dekker, 1989. p. 327-445.

DOYLE, M.P. & CLIVER, D.O. *Salmonella*. In: CLIVER, D.O. ed. **Foodborne diseases**. San Diego, Academic Press, 1990. cap.11. p. 185-204.

EWING, W.H. The nomenclature of *Salmonella*, its usage, and definitions for the three species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, 18(11): 1629-37, Nov. 1972.

FAGERBERG, D.J. & AVENS, J.S. Enrichment and plating methodology for *Salmonella* detection in food. A review. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, 39(9): 628-46, Sept. 1976.

FALCÃO, D.P.; SALGADO FILHO, G.; NISHIDA, N.K.; BORGES, S.R. Exame microbiológico de sorvetes não pasteurizados. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, 17(1): 2-8, fev. 1983.

FAO PRODUCTION YEARBOOK - 1991, Rome, 45:223, 1992.

FERREIRA, A.C. A importância do leite e seus produtos. **Indústria Alimentar**, São Paulo, 8: 46-50, mar./abr. 1977.

FLOWERS, R.S. Comparison of rapid *Salmonella* screening methods and the conventional culture method. **Food Technology**, Champaign, 39(3): 103-8, Mar. 1985.

- FLOWERS, R.S.; CHEN, K.-H.; ROBISON, B.J.; MATTINGLY, J.A.; GABIS, D.A.; SILLIKER, J.H. Comparison of *S. bio-enzabead*TM immunoassay method and conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in crustaceans. **Journal of Food Protection**, Ames, 50(5): 386-9, May 1987.
- FRANCO, R.M. & ALMEIDA, L.E.F.A. Avaliação microbiológica de queijo ralado tipo parmesão, comercializado em Niterói, R.J. **Higiene Alimentar**, São Paulo, 6(21): 33-6, mar. 1992.
- FRANK, J.F. & MARTH, E.H. Survey of soft and semisoft cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of Enteropathogenic *E. coli*. **Journal of Food Protection**, Ames, 41(3): 198-200, Mar. 1978.
- FRAZIER, W.C. & WESTHOFF, D.C. **Microbiologia de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza, Acribia, 1985, 522 p.
- FRICKER, C.R. A review. The isolation of salmonellas and campylobacters. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, 63(2): 99-116, Aug. 1987.

FURLANETTO, S.M.P.; CERQUEIRA-CAMPOS, M.L.; IARIA, S.T. (Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo, SP). Pesquisa de *S. aureus*, *B. cereus*, *C. perfringens* e *Salmonella* em queijo fresco, vendido em supermercado do município de São Paulo. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 12, São Paulo, 1983. **Programa e Resumos**. São Paulo, **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, 1983. p. 124 A.

GALLO, C.R. **Microbiologia de alimentos**. Piracicaba, ESALQ/LCT, 1990. 2v. (Mimeografado).

GIORGI, W. Animais domésticos como portadores de salmonelas: significado epidemiológico e sua relação com a saúde pública. São Paulo, 1972, 55 p. (Doutoramento - Instituto de Ciências Biomédicas/ USP).

GLATZ, B.A. & BRUDVIG, S.A. Survey of commercially available cheese for enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Ames, 43(5): 395-8, May 1980.

GOO, V.Y.L.; CHING, G.Q.L.; GOOCH, J.M. Comparison of Brilliant Green Agar and Hektoen Enteric Agar media in the isolation of *Salmonellae* from food products. **Applied Microbiology**, Washington, 26(3): 288-92, Sept. 1973.

GUERRERO, C.E.B. & BARRENO, V.Q. Detección de *Escherichia coli* enteropatógeno em queso fresco. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS, 3, Montevideo, 1992. Resumos. Montevideo, Subcomité Latinoamericano de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos, 1992. p. 144.

HOBEN, D.A.; ASHTON, D.H.; PETERSON, A.C. Some observations on the incorporation of novobiocin into Hektoen Enteric Agar for improved *Salmonellae* isolation. *Applied Microbiology*, Washington, 26(1): 126-7, July 1973.

HOCKIN, J.C.; D'AOUST, J.-Y.; BOWERING, D.; JESSOP, J.H.; KHANA, B.; LIOR, H.; MILLING, M.E. An international outbreak of *Salmonella nima* from imported chocolate. *Journal of Food Protection*, Ames, 52(1): 51-4, Jan. 1989.

HUMPHREY, T.J. & HART, R.J.C. *Compylobacter* and *Salmonella* contamination of unpasteurized cows milk on sale to the public. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 65(6): 463-7, Dec. 1988.

IDZIAK, E.S. & CROSSLEY, K. Growth and virulence of *Salmonella typhimurium* grown in different foods. *Applied Microbiology*, Washington, 26(4): 629-30, Oct. 1973.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS

FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos**. v. 1. Zaragoza, Acribia, 1985. 431 p.

KAMEI, I.; MAHONEY, L.; SACHS, R.R.; AARON, E.; WERNER, S.B.; HUMPHREY, G.L. Human *Salmonella dublin* infections associated with consumption of certified raw milk - California (U.S.). **Morbidity and Mortality Weekly Reports**, Washington, 23(1): 175, Jan. 1974.

KAUFFMANN, F. & EDWARDS, P.R. Classification and nomenclature of *Enterobacteriaceae*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature Taxonomy**, Washington, 2: 2-8, 1952.

KORNACKI, J.L. & MARTH, E.H. Foodborne illness caused by *Escherichia coli*: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, 45(11): 1051-67, Nov. 1982.

KRONINGER, D.L. & BANWART, G.J. Effect of various selective agars on the growth of rare and common *Salmonellae*. **Journal of Food Science**, Chicago 43(4): 1328-9, July/Aug., 1978.

LECOS, C. Of microbes and milk: probing America's worst *Salmonella* outbreak. **Dairy and Food Sanitation**, Ames, 6(4): 136-40, Apr. 1986.

LEITÃO, M.F.F. *Salmonelas em águas fluviais e em alimentos não processados e industrializados de origem vegetal no Estado de São Paulo*. São Paulo, 1979 (Doutoramento - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP).

LE MINOR, L. Facultatively anaerobic Gram-negative rods: Genus III. *Salmonella*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. v.1., p. 408-600.

LE MINOR, L. & RHODE, R. Gram-negative facultatively anaerobic rods : Genus IV. *Salmonella*. In: BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. ed. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8^a ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974. p. 298-318.

LITTELL, A.M. Plating medium for differentiating *Salmonella arizonae* from other *Salmonellae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 33(2): 485-7, Feb. 1977.

MARTH, E.H. *Salmonellae* and salmonellosis associated with milk and milk products. A review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, 52(3): 283-315, Mar. 1969.

MARTIN, A. & KATZ, S.E. A resuscitation/selection system for rapid determination of *Salmonella* in foods. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, 74(3): 522-5, Mar. 1991.

MATCHES, J.R. & LISTON, J. Low temperature growth of *Salmonella*. **Journal of Food Science**, Chicago, 33(6): 641-5, Nov./Dec., 1968.

MATCHES, J.R. & LISTON, J. Effect of pH on low temperature growth of *Salmonella*. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, 35(1): 49-52, Jan. 1972.

MATTINGLY, J.A.; ROBISON, B.J.; BOEHM, A.; GEHLE, W.D. Use of monoclonal antibodies for the detection of *Salmonella* in foods. **Food Technology**, Champaign, 39(3): 90-4, Mar. 1985.

McCOY, J.H. The isolation of *Salmonellae*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, 25(2): 213-24, Oct. 1962.

McCOY, R.H. & SEIDLER, R.J. Potential pathogens in the environment: isolation, enumeration and identification of seven genera of intestinal bacteria associated with small green pet turtles. **Applied Microbiology**, Washington, 25(4): 534-8, Apr. 1973.

MCEWEN, S.A.; MARTIN, S.W.; CLARKE, R.C.; TAMBLYN, S.E. A prevalence survey of *Salmonella* in raw milk in Ontario, 1986-87. **Journal of Food Protection**, Ames, 51(12): 963 - 5, Dec. 1988.

McMANUS, C. & LARNIER, J.M. *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* in raw milk. **Journal of Food Protection**, Ames, 50(1): 51-5, Jan. 1987.

MEDINA, M.; GAYA, P.; NUNEZ, M. Behavior of *Salmonellae* during manufacture and ripening of Manchego cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, 45(12): 1091-5, Oct. 1982.

NASCIMENTO, D. Contribuição ao conhecimento das condições bacteriológicas de amostras de leite tipo C, antes e após a pasteurização, vendido na cidade de João Pessoa, PB, 1977/78. São Paulo, 1982, 88 p. (Doutoramento - Universidade de São Paulo).

NASCIMENTO, D.; SABIONI, J.G.; PIMENTA, N.; XANDÓ, S.R. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas-frescal da cidade de Ouro Preto (MG). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 19(2): 120-9, abr./jun. 1985.

NASCIMENTO, G.G.F.; FIGUEIREDO, S.H.M.; UBISSES, D.M.; ANTONELLI, E.M. Condições microbiológicas do leite pasteurizado comercializado em Piracicaba, S.P. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 25(1): 13-21, jan./jun. 1991.

NÓBREGA, I.C.C. Condição microbiológica e higiênico-sanitária de sorvetes produzidos em pequenas fábricas de João Pessoa, PB. **Higiene Alimentar**, São Paulo, 5(18): 28-32, jun. 1991.

OLIVEIRA, S.J. *Salmonella*. In: GUERREIRO, M.G.; OLIVEIRA, S.J.; SARAIVA, D.; WIEST, J.M.; LIEBERNECHT, F.; POESTER, F.P.; ATHAIDE DIAS, J.C.; FERNANDES, J.C.T.; LANGELOH, A.; BAPTISTA, J.H.P. **Bacteriologia especial com interesse em saúde animal e saúde pública**. Porto Alegre, Sulina, 1984. cap.14. p.162-77.

ORSKOV, F. *Escherichia*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, v.1., p. 420-3.

PAPAVASSILIOU, J. Coli-aerogenes bacteria of pasteurized milks, with special reference to pathogenic serotypes of *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, 20(1): 91-4, 1957.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo, Mc Graw-Hill, 1981. v.2, 494 p.

PICCOLO, R.C.; PIMENTEL, E.P.; FÁVERO, L.M.; RIZZO, M.A.; PASCHER, D.M. Surto de salmonelose ocorrido em cantina escolar, no município de São Paulo, em 1991. **Higiene Alimentar**, São Paulo, 6(23): 28-30, set. 1992.

PRODUÇÃO de queijo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, 29(173): 26-43, maio/jun. 1974.

PROST, D. & RIEMANN, H. Foodborne salmonellosis. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, 21: 495-528, 1967.

RAMBACH, A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 56(1): 301-3, Jan. 1990.

RATNAM, S. & MARCH, S.B. Laboratory studies on salmonella - contaminated cheese involved in a major outbreak of gastroenteritis. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, 61(1): 51-6, July 1986.

- RAY, B.; JEZESK, J.J.; BUSTA, F.F. Isolation of *Salmonellae* from naturally contaminated dried milk products III. Influence of pre-enrichment conditions. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, 35(10): 607-14, Oct. 1972.
- REA, M.C.; COGAN, T.M. TOBIN, S. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, 73(4): 331-6, Oct. 1992.
- RESTAINO, L.; GRAUMAN, G.S.; McCALL, W.A.; HILL, W.M. Effects of varying concentration of novobiocin incorporated into two *Salmonella* plating media on the recovery of four *Enterobacteriaceae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 33(3): 585-9, Mar. 1977.
- RICHARD, C. *Enterobacter*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, v.1., p.465-9.
- RIEMANN, H. **Curso de intoxicação e infecção alimentar**. Campinas, Faculdade de Tecnologia de Alimentos, UNICAMP, 1972, 216 p.
- ROITMAM, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L. **Tratado de microbiologia**. v.1. São Paulo, Manole, 1988. 186 p.

RUTZINSKI, J.L. & MARTH, E.H. Behavior of *Enterobacter species* and *Hafnia* species in skimmilk during fermentation by lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Ames, 43(9): 720-8, Sept. 1980.

SAKAZAKI, R. *Citrobacter*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 9. ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 1984a., v.1., p.458-61.

SAKAZAKI, R. *Hafnia*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 1984b. v. 1., p.484-6.

SANCHEZ, P.S. Sorotipos de *Salmonella* em águas de esgoto e perfil de resistência a santimicrobianos. São Paulo, 1988, 229 p. (Doutoramento - Instituto de Ciências Biomédicas/ USP).

SCOTT, W.M. & MINETT, F.C. Experiments on infection of cows with typhoid bacilli. **Journal of Hygiene**, Cambridge, 45: 159, 1947.

SEGLENIIEKS, Z. & DIXON, S. Outbreak of milk-borne *Salmonella* gastroenterites - South Australia (U.S.). **Morbidity and Mortality Weekly Reports**, Washington, 26(1): 127, Jan. 1977.

SILLIKER, J.H. Status of *Salmonella* - ten years later. **Journal of Food Protection**, Ames **43**(4): 307-13, Apr. 1980.

SILLIKER, J.H. *Salmonella* problem: current status and future direction. **Journal of Food Protection**, Ames, **45**(7): 661-6, May 1982.

SILVA, G. Delícias de Minas. **Globo Rural**, Rio de Janeiro, 100: 26-31, fev. 1994.

SILVEIRA, N.V.V.; SAKUMA, H.; DUARTE, M.; RODAS, M.A.B.; SARUWTARI, J.H.; CHICOUREL, E.L. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, **49**(1): 19-25, jun. 1989.

SMIEBERT, R.M. & KRIEG, N.R. General characterization. In: GERHARDT, P. ed. **Manual of methods for general bacteriology**. American Society for Microbiology, Washington, 1981, cap.20, p. 409-49.

TAUNAY, A.E. Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e frequência no município de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, **28**: 43-69, 1968.

TAUXE, R.V. *Salmonella* : a postmodern pathogen. **Journal of Food Protection**, Ames, 54(7): 563-8, July 1991.

THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. **Analysis microbiologico de los alimentos**. Zaragoza, Acribia, 1972. 271p.

TOLEDO, M.R.F.; REIS, M.H.L.; MURAHOVSKI, J.; CURY, R.; RAMOS, S.R.T.S.; FIORE, E.S.; SCHUSSEL, E.Y.; TRABULSI, L.R. Ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* que fermenta lactose tardiamente. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, 10(3): 103-5, jul./set. 1979.

TOMPKIN, R.B. & KUEPER, T.V. Factors influencing detection of *Salmonellae* in rendered animal by-products. **Applied Microbiology**, Washington, 25(4): 485-7, Apr. 1973.

TROLLER, J.A. The water relations of foodborne bacterial pathogens. A review. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, 36(5): 276-88, May 1973.

VANDERPOST, J.M. & BELL, J.B. Bacteriological investigation of Alberta meat-packing plant wastes with emphasis on *Salmonella* isolation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 33(3): 538-45, Mar. 1977.

VASCONCELOS, J.C. Microrganismos indicadores, *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* A e *Salmonella* spp. em linguiça fresca comercializada em feiras livres no município de São Paulo, SP. São Paulo, 1987, 165 p. (Doutoramento - Instituto de Ciências Biomédicas/USP).

VESSONI-PENNA, T.C.; BARUFALDI, R.; COLOMBO, A.J. Estudo das condições higiênico-sanitárias e das características físico-químicas do leite pasteurizado teor de gordura 3,2% m/v, vendido na cidade de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 6(1): 57-74, jan./jun. 1986.

WEISS, K.F.; AYRES, J.C.; KRAFT, A.A. Inhibitory action of selenite on *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. thompson*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, 90: 857-62, 1965.

WELLS, F.; BERGQUIST, D.; FORSYTHE, R.H. A comparison of selective media for the isolation of *Salmonella* from commercial egg white solids. **Applied Microbiology**, Washington, 6(3): 198-200, May 1958.

WENDPAP, L.L. & ROSA, O.O. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijo minas consumido no município de Cuiabá - MT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, 7(27): 23-9, ago., 1993.

WHITE, C.H. & CUSTER, E.W. Survival of *Salmonella* in Cheddar cheese. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, 39(5): 328-31, May 1976.

WILSON, C.R. & ANDREWS, W.H. Sulfite compounds as neutralizers of spice toxicity for *Salmonella*. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, 39(7): 464-6, July 1976.

WRAY, C. & SOJKA, W.J. Reviews of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, 44(2): 383-425, June 1977.