E R R A T A

<u>Localização</u>	<u>Onde se lê</u>	<u>Leia-se</u>
Pág. 4 3º§ 5ª linha	<u>S. bredney</u>	<u>S. bredeney</u>
Pág. 5 3º§ 5ª linha	<u>S. bredney</u> <u>S. oraniemburg</u>	<u>S. bredeney</u> <u>S. oranienburg</u>
Pág. 6 1º§ 5ª linha	Tzera's	Tzora's
Pág. 6 4º§ 6ª linha	obteve	obtiveram
Pág. 7 1º§ 6ª linha	<u>S. carran</u> <u>S. muenchem</u>	<u>S. carrau</u> <u>S. muenchen</u>
Pág. 7 1º§ 8ª linha	<u>S. mulado</u>	<u>S. molade</u>
Pág. 7 1º§ 10ª linha	<u>S. carran</u>	<u>S. carrau</u>
Pág. 8 3ª linha	bacteria	bactéria
Pág. 9 3º§ 5ª linha	desta fazenda	destas fazendas
Pág. 10 3º§ 7ª linha	3 isolamentos	4 isolamentos
Pág. 18 3ª linha	Bovinos 3292	Bovinos 3232
Pág. 25 última linha	MARTINS ¹⁸	MARTINS ⁵⁹
Pág. 28 5º§ 2ª linha	Hoskins	Hoskins ¹⁷
Pág. 57 3º§ 5ª linha	<u>S. bredney</u>	<u>S. bredeney</u>
Pág. 57 11ª linha 3º§	<u>S. bredney</u>	<u>S. bredeney</u>
Pág. 68 Referência Bibliográfica 30	a 1980., <u>14</u> (1/4):13, 1980	a 1982., <u>16</u> (1/4) 74, 1982
Anexo 2	Caldo Lisina ⁵⁸	Caldo Lisina ³¹

ES
LUIZ CARLOS DE SOUZA

SALMONELAS E COLIFORMES DE ORIGEM
FECAL EM AMOSTRAS DE ÁGUAS USADAS
NA DESSEDENTAÇÃO DE ANIMAIS DO
MUNICÍPIO DE BOTUCATU, SÃO PAULO.

Tese apresentada ao Departamento de
Prática de Saúde Pública da Faculdade
de Saúde Pública da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título
de «Doutor em Saúde Pública».

Orientador: Prof. Dr. Gil Vianna Palm

SÃO PAULO
1984

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a meus pais, *CARLOS* e *JANDYRA*, por toda dedicação e compreensão ao longo dos anos.

AGRADECIMENTOS

Respeitosamente deixamos registrado nossa gratidão àqueles que possibilitaram a execução deste trabalho:

- Ao Prof. Dr. *Gil Vianna Paím* por sua dedicação e orientação.
- Ao Prof. Dr. *Sebastião Timo Iaria* pelas seguras sugestões.
- Ao Prof. Dr. *Carlos Alberto Magalhães Lopes*, por haver permitido utilizar as instalações do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBBMA, UNESP, "Campus" de Botucatu, possibilitando a execução prática deste trabalho, bem como por sugestões quando solicitadas.
- Às Profa. Dra. *Regina Decarlis* e *Terue Sadatsune*, pela dissipação de dúvidas na parte prática.

- Ao Prof. Dr. *Paulo Roberto Cury*, pelo auxílio prestado na parte estatística do trabalho.
- Ao CNPq, por auxílio financeiro na compra de equipamentos sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.
- À Seção de Bacteriologia da CETESB, através de seu corpo de técnicos, que foram de extrema valia nos passos iniciais deste trabalho.
- À Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, na pessoa do Prof. Dr. *Gil Vital Alves Pessoa* e sua equipe técnica, pela execução da sorotipagem de amostras de salmonelas.
- À Delegacia Agrícola de Botucatu, na pessoa do Dr. *Antonio Carlos Figueiredo*, por haver permitido utilizar mapas da região rural de Botucatu.
- Aos técnicos da Disciplina de Microbiologia do IBBMA, UNESP, "Campus" de Botucatu, com especial referência aos Srs. *Antonio Correa*, *Benedito Antonio Placidelli* e *Lourival Antonio Michelin*, pelo valioso apoio na execução da parte prática.
- À acadêmica do Curso de Medicina Veterinária do "Campus" de Botucatu, *Akiko Neusa Murata*, pelo auxílio prestado na colheita de amostras.

- À família do Sr. *Fujio Murata*, pela valiosa colaboração prestada na conclusão deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. *José Alberto de Souza Freitas*, do HPRLLP, USP, pelo pronto apoio prestado na confecção final deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. *Donald Wilson*, do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública, USP, pela colaboração na elaboração do resumo em inglês.
- À funcionária da Disciplina de Epidemiologia Veterinária da FMVZ, UNESP, "Campus" de Botucatu, *Terezinha Aparecida Pereira de Lima*, na execução de algumas atividades práticas.
- Às bibliotecárias *Daisy Pires Noronha* e *Glaura Maria Oliveira Barbosa de Almeida*, pelo auxílio na revisão bibliográfica.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

Í N D I C E

	PÁGINA
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	20
3 - MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 - ÁREA DE ESTUDO	23
3.2 - AMOSTRAGEM	23
3.3 - COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA	24
3.3.1 - PARA DETERMINAÇÃO DO pH	24
3.3.2 - PARA PESQUISA DE SALMONELAS	24
3.3.3 - PARA DETERMINAÇÃO DO NMP/100 ml DE COLIFORMES FECAIS	25
3.4 - ANÁLISES REALIZADAS	25
3.4.1 - DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA	25
3.4.2 - DETERMINAÇÃO DO pH	25
3.4.3 - PESQUISA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Salmonella</i>	25
3.4.4 - DETERMINAÇÃO DO NMP/100 ml DE BACTÉRIAS COLIFORMES FECAIS	28
3.4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	29

4 - RESULTADOS	32
5 - DISCUSSÃO	50
6 - CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	78
ANEXO 1	79
ANEXO 2	83

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGINA
1 - Propriedades visitadas cujas amostras de água revelaram-se positivas ou negativas para bactérias do gênero <i>Salmonella</i>	30
2 - Positividade para salmonelas segundo os tipos de bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.	44
3 - NMP/100 ml de coliformes fecais em água de dessedentação de animais, segundo os tipos de bebedouros. Botucatu, S.P., 1982.	45
4 - Bebedouro do Tipo 1 utilizado para a dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.	46
5 - Bebedouro do Tipo 2 utilizado para a dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.	46
6 - Bebedouro do Tipo 3 utilizado para a dessedentação	

	PÁGINA
de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.	47
7 - Bebedouro do Tipo 4 utilizado para a dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.	47
8 - Bebedouro do Tipo 4 utilizado para a dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.	48
9 - Bebedouro do Tipo 5 utilizado para a dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.	48
10 - Bebedouro do Tipo 6 utilizado para a dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982	49

INDICE DE TABELAS

	PÁGINA
1 - Tipos de bebedouros utilizados pelos animais para dessedentação. Botucatu, S.P., 1982.	31
2 - Isolamento de bactérias do gênero <i>Salmonella</i> em amostras de água de dessedentação animal. Botucatu, S.P., 1982.	34
3 - Coliformes fecais (NMP/100 ml) em amostras de água de dessedentação animal. Botucatu, S.P., 1982. ..	35
4 - Isolamento de bactérias do gênero <i>Salmonella</i> e NMP/100 ml de coliformes fecais em amostras de água de dessedentação animal. Botucatu, S.P., 1982.	36
5 - Isolamento de bactérias do gênero <i>Salmonella</i> segundo os tipos de bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.....	37
6 - Isolamento de bactérias do gênero <i>Salmonella</i> se-	

gundo a temperatura da água dos bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.	38
7 - Isolamento de bactérias do gênero <i>Salmonella</i> segundo o pH da água dos bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982..	39
8 - Sorotipos de salmonelas isolados da água de bebedouros usados para a dessedentação de animais, localizados em 12 propriedades. Botucatu, S.P., 1982.	40
9 - NMP/100 ml de coliformes fecais segundo os tipos de bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.	41
10 - NMP/100 ml de coliformes fecais segundo a temperatura da água dos bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.	42
11 - NMP/100 ml de coliformes fecais segundo o pH da água dos bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.	43

RESUMO EM PORTUGUÊS

De um total de 402 propriedades rurais do Município de Botucatu, S.P., que tinham entre suas atividades a exploração pecuária, foram sorteadas 60 (15%) pelo processo de amostragem probabilística simples.

Nestas 60 propriedades localizou-se 113 bebedouros que eram os mais utilizados pelos animais para sua desidratação. Foram colhidas amostras de água destes bebedouros visando a pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella*, a determinação do Número Mais Provável (NMP) de bactérias coliformes fecais e a verificação do pH. Antes da coleta das amostras procedia-se a medida da temperatura da água.

Obteve-se isolamento positivo para salmonelas nas amostras de água de 15 (13,27%) bebedouros correspondentes a 12 (20%) das 60 propriedades visitadas, identificando-se os seguintes sorotipos: *S. dublin*, *S. newport*, *S. maderia*, *S. IV 43:g,z57:-*, *S. saphra*, *S. glostrup*, *S. IV ochsenzool* e *S. I 9,12:i:-*.

Das 113 amostras de água analisadas, 14 (12,39%)

apresentaram-se com NMP/100 ml de coliformes fecais acima de 4000. Não foi constatada associação entre o isolamento positivo de salmonelas e NMP/100 ml de coliformes fecais acima de 4000.

A positividade maior para o isolamento de salmonelas e o NMP/100 ml de coliformes fecais acima de 4000 deu-se em temperaturas superiores a 18°C. Quanto ao pH, em ambas as situações a positividade maior ocorreu entre 6,0 e 7,0.

RESUMO EM INGLÊS

Sixty small farms from the Municipality of Botucatu*, that are dedicated to cattle breeding were studied. These farms represent 15% of the 402 farms that exist in the Municipality. The sample was drawn by simple probabilistic technique.

On the farms one hundred and thirteen drinking places were localized. Samples of water were taken from these drinking places and examined for bacteria of the genus *Salmonella*, for the determination of Most Probable Number (MPN) of fecal coliform bacteria as well as determination of the water's pH. Temperature of water was measured before collection.

Samples of 15 drinking places (13.27%) were positive for *Salmonella*. The drinking places belonged to 12 of the sixty farms studied (20%). The following serotypes were identified: *S. dublin*, *S. newport*, *S. maderia*, *S. IV 43: g,z57:-*, *S. saphra*, *S. glostrup*, *S. IV ochsenzool* e *S.19,12:i:-*.

* São Paulo, Brazil.

Of the 113 samples studied 14 (12.39%) presented MPN/100 ml of fecal coliforms above 4000. There was no relationship between MPN/100 ml of fecal coliforms above 4000 and positivity for *Salmonella*.

Highest positivity for *Salmonella* and MPN/100 ml of fecal coliforms over 4000 both occurred at temperatures that were higher than 18°C. Regarding pH, both situations occurred at pH between 6.0 and 7.0.

1. INTRODUÇÃO

Os mais variados sorotipos do genero *Salmonella* são capazes de serem detectados nos mais distintos e variados ambientes, sendo que a água contaminada constitui uma das principais fontes de infecção para os animais. Estes, de uma forma geral, tendem mitigar a sede em charcos ou em qualquer lugar onde se acumula água. Por outro lado, sabe-se que microorganismos causadores de muitas enfermidades dos animais podem viver na água durante algum tempo e serem por ela transmitidos, como é o caso da salmonelose ³³.

Dependendo do tipo de exploração agropecuária realizado, bem como de outros fatores, nos defrontamos com grandes possibilidades de que o animal venha a ingerir salmonelas ⁸⁸. Observando-se o fornecimento de água de dessedentação para os animais em nosso meio, principalmente o rural, pode-se constatar que nem sempre suas condições são satisfatórias. Isto, muitas vezes, é devido ao custo financeiro, às próprias características naturais da propriedade, ou ainda pelo pouco conhecimento que os proprietários têm sobre o assunto. A dessedentação dos animais, feita em lagos, ribeirões,

açudes, reservatórios ou mananciais que têm contato estreito com a própria pastagem pode constituir-se num risco de contaminação para os animais. Estes locais, frequentemente, apresentam o inconveniente de terem contato ou serem poluídos com excretas humanos e ou animais e, apenas um pequeno número de proprietários esclarecidos é que procura minimizar os efeitos nocivos desta miscigenação: pastagem - água de bebida - excretas.

A capacidade das salmonelas em sobreviver fora do hospedeiro, por períodos relativamente longos, proporciona outro dado importante ao se considerar a cadeia epidemiológica das salmoneloses ^{23, 89}. MORSE & DUNCAN ⁶⁵ (1974) referem que essas bactérias podem sobreviver por 87 dias em águas de abastecimento público, 115 dias em reservatórios de água, 120 dias em pastagens, 280 dias em jardins, acima de 30 meses em estêrco seco de bovino e 28 meses em fezes de aves naturalmente infectadas. Por outro lado, WRAY & SOJKA ⁹² (1977) comentam que a *S. dublin* pode sobreviver durante 115 dias em água de açude em fazendas. Estes mesmos autores referem também, que em água fresca as salmonelas, provavelmente, não sobrevivem por mais de 3 semanas e em água do mar podem se manter viáveis por somente 3 dias.

Especificamente em relação ao isolamento de salmonelas a partir de águas de dessedentação, verifica-se na literatura a existência de pequeno número de trabalhos de pesquisa realizados, inclusive em nosso meio. A este respeito em um excelente trabalho de revisão, WRAY ⁹¹ (1975) citando vários autores, refere a ocorrência de diversos corpos hídricos contaminados com salmonelas, acarretando problemas

econômicos e de saúde em criações de animais.

Em nosso meio, LEITÃO⁵⁵ (1979) e MARTINS⁵⁹ (1979) assinalaram a presença de bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* em amostras obtidas em diferentes corpos hídricos.

Em alguns países como, por exemplo, a Inglaterra, observou-se quanto à *S. dublin* que existem certas áreas onde a pastagem se localiza em solos acidentados e o gado bebe água de riachos e diques, havendo vários relatos de isolamento de salmonelas a partir de amostras de águas obtidas dessas localidades⁹².

No Condado de North Yorkshire no período de 1975-1976, segundo HARBOURNE⁴⁴ (1977) foram isolados de animais de criação, com salmonelose adquirida por via hídrica, cepas de *Salmonella* pertencentes aos sorotipos *S. typhimurium*, *S. agona*, *S. senftenberg* e *S. bredney*.

Num período de 22 anos (1950-1971) o Departamento de Microbiologia Veterinária da Universidade de Cornell do Estado de Nova Iorque, EUA, de um total de 3945 cepas identificadas como sendo de *Salmonella*, 67 foram isoladas a partir de amostras de água¹². Segundo MORSE⁶⁴ (1978), de 1973 a 1976, no Estado de Indiana, foram isoladas a partir de amostras de água do rio Wabash, em Lafayette, 833 cepas de salmonelas; o autor comenta que, provavelmente, a maioria dessas cepas era de origem humana, visto que as mesmas foram isoladas de amostras de água obtida em local próximo à estação de tratamento de esgotos.

COOK e col.²⁰ (1974) do Lago Sidney Lanier, Estado da Georgia, que serve de fonte de água para área metropo

litana de Atlanta, isolaram 21 sorotipos diferentes de salmonelas, não tendo sido obtido o isolamento destas bactérias das amostras colhidas no centro do referido lago. Em 1977, DONDERO e col.³² realizaram a coleta de amostras de água de seis riachos tributários do Lago Cayuga, sul do Estado Central de Nova Iorque empregando a técnica do chumaço de gase. De um total de 322 amostras examinadas, 39% revelaram-se positivas para salmonelas, sendo isolados 25 sorotipos diferentes e um biotipo de *S. typhimurium* H₂S negativo.

Segundo MILLER⁶² (1977), a carência de água para a dessedentação de animais às vezes contribui para o surgimento de casos de salmonelose, ao estudar, em West Virginia, EUA, as causas que levaram à morte 7 bovinos adultos e um bezerro recém-nascido.

GOYAL e col.⁴¹ (1977) em um trabalho efetuado em construções residenciais em canais na linha costeira do Texas, EUA, concluíram que os sedimentos, nestes canais, atuavam como fontes de bactérias entéricas, incluindo salmonelas, as quais podiam ser resuspensas dependendo de vários fatores ambientais e atividades recreacionais.

No Chile, CORDANO & VIRGILIO²² (1976) de uma corrente fluvial, da qual obtinha-se água para irrigação, em uma zona hortícola vizinha à cidade de Santiago, isolaram 15 diferentes sorotipos de salmonelas, sendo alguns deles, *S. agona*, *S. bredney*, *S. livingstone*, *S. oranienburg* e *S. infantis*, isolados pela primeira vez naquele país.

Na Província de Florença, Itália, no período de 1979-1980, foram isoladas de águas de superfície e águas ser-

vidas, 35 sorotipos de *Salmonella*, sendo os mais frequentes os *S. derby*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. paratyphi* B. *S. stanleyville* e *S. panama*¹⁴.

Em Israel, TELTSCH e col.⁸⁴ (1980) isolaram cepas de *S. ohio* de amostras do ar durante a operação de aspersão de água para irrigação e de *S. anatum* de amostras de águas residuárias, em um campo irrigado próximo ao Kibbutz Tzera's.

No Rio de Janeiro, BOTELHO e col.⁹ (1979) detectaram a presença de salmonelas em amostras em águas marinhas de recreação que apresentavam contagens de coliformes fecais em níveis inaceitáveis.

No ambiente rural podem ser encontradas variadas situações, sendo uma delas a presença de animais silvestres. A este respeito é importante salientar que o controle destes animais, praticamente inexistente e, em estudos realizados, neles tem sido constatada a presença de bactérias do gênero *Salmonella*^{1,5,6,12,23,54,55,60,67,76,78,89}.

Nos EUA, SCHNURRENBERGER e col.⁷⁶ (1968), no período compreendido entre novembro de 1964 e junho de 1967, analisando amostras de fezes e porção posterior do intestino grosso de 976 animais domésticos, 325 pássaros e 253 mamíferos selvagens e 217 amostras de alimentos peletizados colhidas em 7 fazendas de 6 condados de Illinois, obteve o isolamento de 8 sorotipos em 26 ocasiões, das quais, em 16, o sorotipo predominante foi a *S. give*.

No Condado de Virginia, MARX⁶⁰ (1969) de 101 raposas, doninhas e gambás capturados vivos obteve, a partir

da cultura de fezes, isolamentos de cepas pertencentes a sete sorotipos diferentes, sendo a taxa de infecção de 13%. Dois anos após, em outro estudo num condado adjacente, obteve de 217 raposas, doninhas e gambás e de 199 gralhas, gato do mato e guaximim, o isolamento de apenas 2 sorotipos, sendo encontrada uma taxa de infecção de 0,06%. Cumpre salientar que, nesse estudo, somente as raposas, gambás e gato do mato revelaram-se positivos para essas bactérias.

No Departamento de Agricultura do Estado da Flórida⁶, no período de novembro de 1969 a setembro de 1971 e de junho a setembro de 1973 foram analisados material de intestino delgado de 168 gambás capturados. Dos materiais examinados procedentes de 28 animais foram isoladas cepas pertencentes a sorotipos de salmonelas, a saber: *S. carran*, *S. muenchem*, *S. anatum*, *S. java*, *S. mississippi*, *S. typhimurium* (var. *copenhagen*), *S. bareilly*, *S. miami*, *S. mulado*, *S. saint-paul*, *S. newport*, *S. pensacola*, *S. hartford* e *S. tallahassee*, sendo os mais frequentes *S. carran* e *S. muenchen*, com 6 a 4 isolamentos, respectivamente. Convém ressaltar que estes mesmos sorotipos haviam sido previamente isolados de pessoas residentes naquele Estado.

Nos EUA, a salmonelose associada com tartarugas de estimação, vivendo no ambiente domiciliar, atingiu entre 1970 e 1971 um elevado número de 200 000 casos, envolvendo, principalmente, crianças¹⁰; representando até 1974 um grave problema de saúde pública³⁷.

No município de Botucatu, Estado de São Paulo, MORENO e col.⁶³ (1973), de 250 espécimens de lagartos capturados isolaram seis sorotipos diferentes de salmonelas, com pre

domínio de *S. nchanga* (43,2%). Os isolamentos foram efetuados a partir de ovos, tanto obtidos dos ninhos como da cavidade peritonal, sugerindo ser a perpetuação da bactéria por via transovariana.

É importante, também, ser ressaltado o papel que representam os pássaros na transmissão das salmoneloses. A este respeito, pode ser citada uma investigação realizada em matadouros de eqüinos na cidade de Buenos Aires, Argentina, na qual, QUEVEDO e col.⁶⁹ (1973) isolaram cepas de salmonelas a partir das fezes de aves que frequentavam aquele ambiente, permitindo configurar desta forma uma possível contaminação de alimentos e água.

Muitas vezes no ambiente urbano, os animais de hábito domiciliar como cães, gatos, pássaros e tartarugas, podem estar infectados com salmonelas e representam um grande potencial de infecção para o homem^{29,77}.

Em quatro grandes unidades de criação de bezerros na Inglaterra, das quais 3 propriedades situadas em Somerset e 1 em Berkshire, num período de 3 anos, 1969 a 1972, foram realizados repetidos exames de fezes de cada bezerro, observando-se que a incidência de salmonelose era maior onde os bezerros permaneciam agrupados, sendo o sorotipo dominante a *S. dublin*⁵⁶.

Em Idaho, EUA, no período de 1978 a 1980 foram relatados 88 casos de salmonelose em bezerros, sendo que 40% eram devidos a *S. dublin*¹³.

ZECHA e col.⁹⁴ (1977) realizaram um estudo epidemiológico com o objetivo de estudar casos de infecção por

Salmonella ocorrendo naturalmente em dois grupos de perus e a sua relação com o meio ambiente. Neste estudo verificou-se que várias gerações destas aves, criadas num rancho da Califórnia durante um período de 3 1/2 anos eram livres de infecção por salmonelas. Porém, nesses animais surgiram casos de salmonelose dos quais foram isolados oito sorotipos de salmonelas, tendo sido excluídos tanto os ovos quanto uma prévia contaminação das instalações do mecanismo de transmissão. Os autores concluíram que, essas bactérias foram introduzidas na criação, provavelmente, com a entrada de alimentos, também de pessoal e ou equipamentos.

Em 21 gatos jovens internados para tratamento médico e cirúrgico, em um hospital veterinário nos EUA, ocorreu um surto de gastroenterite e septicemia por *S. typhimurium* sendo a morbidade de 32% e a letalidade de 61%. Este surto foi estudado por TIMONEY e col.⁸⁶ (1978), os quais concluíram que a difusão da enfermidade ocorreu, provavelmente, através da água de bebida e alimentos.

No Japão, TAKESUE e col.⁸¹ (1979) constataram, no período de dezembro de 1975 a outubro de 1977, um surto de salmonelose atingindo 4 fazendas de criação de bezerros, e aventaram a possibilidade de transmissão da doença, entre 2 fazendas, ter sido realizada através de caminhões de transporte de gado.

No distrito de Hidaka, em Hokkaido, Japão, KIKUCHI e col.⁵⁰ (1982) pesquisaram um surto de salmonelose em potros com 3 a 6 meses de idade, em 2 propriedades, no período de julho a setembro de 1981, após uma forte chuva. De 22 potros desta fazenda, 11 sofreram a enfermidade, dos quais, 4 morre-

ram. Na pesquisa bacteriológica, foram isoladas cepas de *S. typhimurium* das fezes de 8 dos 11 enfermos e de vários órgãos, incluindo o intestino de 1 dos que morreram. Este sorotipo foi também isolado de espécimens de rato do mato capturados em um estábulo onde os potros afetados tinham sido criados, demonstrando que a *S. typhimurium* devia estar amplamente disseminada entre os equinos e o meio ambiente daquele distrito.

Na Escócia, de acordo com o Serviço de Investigação Veterinária, os incidentes de salmonelose vem diminuindo, havendo, no entanto, um aumento dos casos de isolamento de *S. dublin* a partir de bezerros⁷³.

Na Itália, na Província de Novara em um levantamento realizado por BIELLI e col.⁵ (1982), de 618 animais compreendendo répteis, peixes e anfíbios, 127 foram positivos para diversos sorotipos de salmonelas.

Em Cagliari, Itália, de 268 animais sadios enviados ao abate, submetidos a controle bacteriológico para salmonelose, através do exame de fezes, 28 (10,4%) foram considerados portadores, sendo 8 equinos e 20 suínos. Neste estudo, os sorotipos de *Salmonella* mais comumente isolados foram *S. anatum*, *S. heidelberg* e *S. derby* compreendendo 13,3 e 3 isolamentos, respectivamente (LAURO e col.⁵², 1983).

Na Província de Brescia, Itália, no biênio 1980-1981, foram isoladas 183 cepas de *Salmonella* de animais, 106 de alimentos e 90 do meio ambiente, sendo a *S. typhimurium*, *S. panama*, *S. anatum*, *S. heidelberg* e *S. enteritidis* os sorotipos mais frequentemente isolados (ZAVANELLA e col.⁹³, 1983).

CORBION & GLEDEL²¹ (1980) num estudo realizado

na França, entre 1976 e 1978, isolaram de bovinos, 1270 cepas de salmonelas, classificados em 31 sorotipos sendo *S. typhimurium* e *S. dublin* os predominantes. Nesta investigação, as 1270 cepas representaram 25,6% do total de isolamentos obtidos a partir das diferentes espécies animais examinadas.

BAKER e col.³ (1983) na Unidade de Pesquisa de Pesca, em Alabama, EUA, realizaram um estudo em lagos fertilizados com dejetos frescos de suínos e contendo culturas de *Tilapia aurea*. Estes lagos foram inoculados com cepas de *S. typhimurium* sendo que este sorotipo foi isolado das vísceras e da superfície do corpo dos peixes, 16 dias após a inoculação, mas não em 32 dias. Também não foi possível isolar salmonelas da carne dos peixes e não notou-se evidência de infecção septicêmica.

Num estudo realizado na região rural de Botucatu, Estado de São Paulo, CORREA & MORENO²⁴ (1973) obtiveram o isolamento de *S. typhi* a partir de fígado de aves mortas, as quais tinham como antecedente o fato de beberem água de valleta de drenagem de casas, que não contavam com um sistema adequado em relação ao destino de suas águas residuárias.

Deve ser destacado o trabalho desenvolvido por GIORGI⁴⁰ (1982) no qual, de 3020 amostras de fezes, de nove diferentes espécies de animais domésticos, obteve 217 positivas (7,2%), sendo os principais portadores os suínos, equinos e aves examinados. Nesta pesquisa verificou-se que os bovinos, cães, gatos e coelhos apresentaram baixos índices de contaminação.

Uma outra pesquisa envolvendo animais como por-

tadores de salmonelas foi desenvolvida no período de julho de 1978 a abril de 1981, por SANTOS e col.⁷⁴ (1983). Estes autores em materiais de necrópsia (fígado, baço, pulmão, rim, fezes, sangue de coração, osso metacarpiano e cérebro) de 269 bezerros constataram a presença de *Salmonella* em 68 (25,28%), dos quais 3 (4,4%) apresentaram manifestações meningo-encefálicas da infecção.

Nos municípios de Itaguaí e Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro, LANGENEGGER & LANGENEGGER⁵¹ (1975), de duas criações de suínos, isolaram pela primeira vez *S. typhisuis*, aventando-se a hipótese de que sua introdução no país tenha sido feita através de suínos importados, e aparentemente sadios.

Um outro modo pelo qual os animais adquirem salmonelose relaciona-se ao arraçamento, principalmente de bovinos e suínos, com cama de aviários. Num interessante trabalho, DE AVILA e col.²⁷ (1972), comprovaram esta possibilidade de contaminação, ao examinarem 60 amostras de cama de aviários localizados na periferia da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, encontrando uma taxa de infecção por *Salmonella* de, aproximadamente, 6,7%.

Segundo FOX³⁷ (1974) é possível que o sorotipo *S. agona* tenha sido introduzido nos EUA e outros países como a Grã Bretanha, Israel, Suécia e Holanda, através de farinha de peixe proveniente do Peru e tornando-se sequencialmente disseminada em animais domésticos e populações humanas.

Nos EUA, ERWIN³⁵ (1955) analisando 206 amostras de rações para aves, coletadas de fábricas e armazéns no centro e nordeste do Estado de Kansas, isolou 3 cepas de *S.*

oranienburg acreditando-se ser este, o primeiro relato de isolamento de *Salmonella* desse tipo de produto industrializado.

Salienta-se, que desde então, isolamentos de variados sorotipos de salmonelas foram realizados a partir de rações fornecidas a criações de aves^{26,42,43}. Em determinados países, como por exemplo a Inglaterra, um dos grandes problemas relativamente à fonte de infecção de salmonelas em criações animais continuam sendo os alimentos importados de origem animal⁷².

Recentemente, BERCHIERI e col.⁴ (1983) na cidade de Jaboticabal, Estado de São Paulo, analisaram 204 amostras de farinha de origem animal empregadas na elaboração de rações, sendo 158 de farinha de carne, 25 de farinha de penas, 16 de farinha de penas e vísceras, 3 de farinha de vísceras e 2 de farinha de ossos. Estes autores encontraram 77 amostras com 1 a 6 sorotipos diferentes de salmonelas. O percentual de positividade foi de 39% para farinha de carne, 16% para farinha de penas, 63% para farinha de penas e vísceras, 33% para farinha de vísceras e 50% para farinha de ossos; os sorotipos mais frequentemente isolados foram *S. cerro* e *S. havana*, compreendendo 19 e 17 cepas, respectivamente.

Um fato a ser assinalado na disseminação desta bactéria no meio ambiente, mais particularmente no aquático, é o despejo das águas servidas de matadouros em cursos d'água, principalmente, daqueles estabelecimentos que não possuem um sistema adequado de tratamento de seus dejetos. Isto, obviamente, propiciará contaminações, especialmente dos animais que se utilizam das águas rio abaixo para sua dessedentação.

É sabido que em muitas propriedades rurais utilizam-se águas servidas de instalações animais como fonte de nutrientes para as pastagens. Com isto têm surgido problemas relativos à contaminação de pastagens e muitas vezes de mananciais e cursos d'água adjacentes^{2,7,11,46,47,48,49,61,68,70,71,84,90,92}.

Por outro lado, em países em desenvolvimento, têm ocorrido problemas relativos à contaminação de corpos d'água pelo lançamento de águas residuárias domésticas e esgotos, as quais contêm diferentes tipos de microrganismos, prejudicando, assim, em muito, a qualidade da água, solo e alimentos⁶⁶. Isto se faz sentir tanto no ambiente urbano, pelas estações de tratamento de água, como no rural pela falta de destinação adequada de dejetos das instalações de criações animais.

Na maioria dos países como, República Federal da Alemanha, Austria, Dinamarca, Escócia, França, Israel, Itália, Países Baixos e Rumânia, onde tanto as águas residuárias como as de superfície são objeto de análise sistemática, ambos os tipos de água constituem valiosos indicadores dos sorotipos de *Salmonella* prevalentes no homem. Em alguns países tem-se encontrado sorotipos associados a diversas espécies animais e produtos alimentícios, como por exemplo, na Rumânia, onde em 1972, cepas de *S. london* foram isoladas de bovinos, suínos, da carne destes animais e da água⁸⁷.

O tratamento biológico do esgoto não elimina por completo as bactérias patogênicas e, assim sendo, o lançamento de efluentes tem ocasionado a poluição de cursos de água, os quais em muitos casos serão utilizados na dessedentação de animais de criação. Isto ocorreu na Holanda, Suécia e País

de Gales, ocasionando surtos de salmonelose em animais domésticos⁹².

Na Holanda, KAMPELMACHER⁴⁸ (1977) numa pesquisa efetuada em águas de superfície, verificou que a concentração de salmonelas era maior nas circunvizinhanças das descargas de efluentes de esgotos e que a uma distância de 3 Km do ponto de despejo essas bactérias não eram detectadas. Mas, com instalações de maior porte, lançando despejos seguidamente, foi possível isolar salmonelas a grandes distâncias.

Desta forma os animais que se destinam à exploração pecuária, podem contaminar-se ao se alimentarem com pastagens contaminadas, ou se forem alimentados com forragens provenientes destas localidades⁴⁷.

Experimento foi realizado por TAYLOR & BURROWS⁸³ (1971) em Newburry, Inglaterra, onde aplicou *S. dublin* cepa 51 e *E. coli* em pastagens em crescimento. Foi encontrado que sob condições do teste *E. coli* sobreviveu acima de 7 ou 8 dias enquanto que *S. dublin* persistiu por 18 dias nos níveis mais baixos do capim e acima de 12 semanas no solo. Quando a contaminação da pastagem por *S. dublin* foi de 10^6 /ml, os bezerros aí instalados infectaram-se, mas não houve nenhum caso quando a contaminação foi reduzida para 10^3 /ml.

Em outra ocasião, TAYLOR⁸² (1973) contaminou pastagens com *S. dublin* cepa 51, colocando nestes pastos 12 bezerros de 4 meses de idade, conhecidos estarem livres de *Salmonella*. Embora isolamentos de *S. dublin* fossem feitos diariamente da pastagem durante o experimento de 5 semanas, e mesmo depois, a bactéria foi isolada de somente um bezerro em

uma ocasião, concluindo-se que, para a saúde destes animais, o risco não era elevado.

Em Zagreb, Iugoslávia⁵⁷, relativamente aos portadores humanos de *Salmonella*, no período de 1964 a 1973, foram pesquisadas pessoas empregadas em instalações de processamento alimentar e serviços de suprimento de água de bebida. Nesta pesquisa, dos portadores detectados, foram isolados 49 sorotipos de salmonelas.

Na Inglaterra, o Centro Liverpool relatou um surto de salmonelose por *S. typhimurium* em granjas leiteiras, associando este surto ao derramamento de dejetos humanos na pastagem. O Centro de Weybridge relatou um surto em uma unidade de criação de bezerros, onde de 138 bezerros, 49 morreram num período de 3 semanas⁷⁰.

Segundo WALTON⁸⁸ (1982), da Universidade de Liverpool, o elevado grau de contaminação do meio ambiente por salmonelas é, em grande parte, responsabilidade da população humana, sendo que isto está muito relacionado com os métodos de disposição de detritos e refugos caseiros, não só nas cidades como, também, no meio rural.

LEITÃO⁵³ (1979) assinala muito bem que os problemas econômicos oriundos desta enfermidade podem atingir cifras consideráveis; refere também, que nos países onde os serviços de investigação epidemiológica têm um desenvolvimento acentuado, há possibilidade de melhor contabilização das perdas são poucas as pesquisas referentes a este assunto em nosso meio.

Na Inglaterra¹⁹ as perdas econômicas advindas

da salmonelose constitui um problema sério, não só para os criadores como também para os produtores de alimentos. A este respeito, nesse país, no período de 1968 - 1974, de 23.609 casos de salmonelose animal, 86% ocorreu em gado, 7% em aves, 3% em ovinos e 2% em suínos.

Em nosso meio, há dificuldades quanto ao conhecimento de dados sobre ocorrência de salmonelose em animais. Um dos problemas com que nos defrontamos é o fato do país ter uma dimensão continental, e em certas regiões haver insuficiência de meios de transporte e precárias condições de tráfego em estradas no meio rural.

Deve-se levar em conta, também, a falta de técnicos para um atendimento adequado e consequente computação de dados; a escassez de laboratórios para confirmação do agente; o desconhecimento da problemática por parte dos proprietários - que, muitas vezes, tentam curar os animais com administração de antibióticos de largo espectro, com o intuito de resolver de imediato o que está afligindo o animal; ou, ainda, pela inexistência de controle de seu plantel, como é o caso de propriedades com extensões de terra de grandes dimensões e com rebanhos criados extensivamente e sem rigoroso controle. Tem-se então, que os dados conhecidos talvez não reflitam a realidade, embora forneçam uma visão geral da dimensão do problema.

Em relação a aves, bovinos e suínos, pode ser referida a seguinte casuística apresentada pela Secretaria de Defesa Sanitária Animal, do Ministério da Agricultura^{8,30} quanto a ocorrência de focos de salmonelose:

PERÍODO DE 1964 a 1973

Aves	397
Bovinos	3292
Suínos	529

PERÍODO DE 1974 a 1982

Aves	3426
Bovinos	29041
Suínos	8533

Outros dados relativos à ocorrência de salmonelose animal podem ser obtidos de um número reduzido de investigações publicadas em periódicos.

Relativamente à presença de bactérias do gênero *Salmonella* em corpos hídricos e a sua relação com bactérias coliformes de origem fecal, podem ser destacados os estudos desenvolvidos por GELDREICH³⁸ (1970) e³⁹ (1972) no Controle de Administração Ambiental dos EUA. Nestes estudos constatou-se em águas puras e águas de estuários poluídos, um acentuado aumento quanto à detecção de salmonelas, quando as densidades de coliformes fecais revelavam-se superiores a 200 organismos/100 ml; quando as densidades de coliformes atingiam números acima de 2000/100 ml, obtinha-se o isolamento de salmonelas em, aproximadamente, 100% dos casos.

COOK e col.²⁰ (1974), em pesquisa realizada no Lago Sidney Lanier, ao norte de Atlanta, Georgia, EUA, e que recebia águas residuárias de matadouros avícolas, verificaram altas densidades de coliformes fecais (mais de 5000/ml) em amostras que se revelaram positivas a grande variedade de so-

rotipos de salmonelas; deve ser salientado também que apenas de um local situado abaixo da estação de tratamento de esgoto as amostras de água foram positivas para *Salmonella*, e negativas para coliformes fecais.

Em nosso meio, SOUZA e col.⁸⁰ (1983) realizaram na região de Botucatu, Estado de São Paulo, no período de julho de 1974 a fevereiro de 1975, a determinação do NMP/100 ml de coliformes de origem fecal em águas de bebedouros de animais. Aplicando-se os limites estabelecidos pela legislação vigente²⁸, de um total de 61 amostras analisadas, somente 6 (9,8%) revelaram-se insatisfatórias para dessedentação animal.

SOUZA & MEIRA⁷⁹ (1982) realizaram um estudo para verificar as condições sanitárias de águas de bebida fornecida aos animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu, São Paulo. Os autores verificaram que de um total de 28 análises efetuadas em amostras de água de 7 bebedouros, somente em um, e em uma única vez, foi constatada a presença de coliformes fecais em número acima dos permitidos pelos padrões vigentes²⁸, ou seja, acima de 4000 por 100 ml.

HOOD e col.⁴⁵ (1983), no Estado da Florida, EUA, em mariscos coletados das Baías de Apalachicola e Tampa, no período de abril de 1980 a agosto de 1981, relacionaram o número de coliformes fecais ao isolamento de *Salmonella* sp. Estes autores concluíram que baixos níveis de coliformes fecais em mariscos frescos e armazenados, são bons indicadores de ausência de *Salmonella* sp, mas que altos níveis são um tanto limitados para prognosticar a possível presença destas bactérias.

2. OBJETIVOS

Dada a grande importância que as bactérias do gênero *Salmonella* desempenham nas criações animais, por implicações econômicas e de saúde pública e saúde animal, planejou-se a realização da presente investigação, a qual tem por finalidade atingir os seguintes objetivos:

- Verificar a presença de bactérias do gênero *Salmonella* em águas de bebida fornecida a animais de criação no Município de Botucatu.
- Verificar a relação entre o tipo de bebedouro utilizado e a presença de salmonelas.
- Verificar nas amostras de água analisadas, relação entre os NMP/100 ml de coliformes fecais e a presença de salmonelas.
- Relacionar a temperatura e o pH das amostras de água estudadas, com o número de coliformes fecais e com a presença de salmonelas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ÁREA DE ESTUDO

Como área de estudo elegeu-se o Município de Botucatu, Estado de São Paulo.

Contactada a Casa de Agricultura local, constatou-se em seus arquivos o registro de 402 propriedades rurais que tinham entre suas atividades a exploração pecuária.

3.2 - AMOSTRAGEM

Das 402 propriedades, foram sorteadas 60 (15%), pelo processo de amostragem probabilística simples, o que se considerou ser uma amostra significativa dos estabelecimentos de criação existentes na região em estudo.

Das 60 propriedades sorteadas, cujas localizações são mostradas na Figura 1, de cada um dos 113 bebedouros mais usados (Tabela 1), foram colhidas três amostras de água, sendo uma para a pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella*,

outra para determinação do Número Mais Provável (NMP) de bactérias coliformes fecais e outra para verificação do pH. Assim sendo, foram obtidas 339 amostras de água. O tempo decorrido entre a colheita das amostras e o início dos exames laboratoriais, nunca ultrapassou de 4 horas.

3.3 - COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

Chegando-se a cada propriedade e identificados os bebedouros mais utilizados pelos animais para a sua dessedentação, procedia-se a coleta das amostras de água.

3.3.1 - PARA DETERMINAÇÃO DO pH

As amostras para determinação do pH eram coletadas em frascos estéreis, com capacidade de 100 ml, de boca larga e tampa esmerilhada. Após a coleta, as amostras eram transportadas ao laboratório em temperatura ambiente.

3.3.2 - PARA PESQUISA DE SALMONELAS

De cada bebedouro procedia-se a coleta de, aproximadamente, 5 litros de água, os quais eram distribuídos em 2 frascos de boca larga, estéreis, com capacidade para 3 litros. Após a coleta da amostra feita com todos os cuidados de assepsia, os frascos eram colocados em caixas de "isopor" contendo gelo triturado em seu interior, mantendo-se, desta forma, as amostras refrigeradas até o início da análise.

3.3.3 - PARA DETERMINAÇÃO DO NMP/100 ml DE COLIFORMES FECAIS

De cada bebedouro realizava-se, com os devidos cuidados de assepsia, a colheita de 100 ml de água, em frascos estéreis, com capacidade de 250 ml, de boca larga e tampa esmerilhada. Logo após a coleta, das amostras de água, os frascos eram transportados da mesma maneira como citado em 3.3.2.

3.4 - ANÁLISES REALIZADAS

3.4.1 - DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA

Momentos antes da colheita da amostra, com auxílio de um termômetro comum com graduação até 100°C, era verificada a temperatura, mergulhando-se o bulbo do termômetro no corpo d'água a ser analisado e esperando-se 10 minutos para a realização da leitura.

3.4.2 - DETERMINAÇÃO DO pH

Nas amostras de água colhidas de acordo com o item 3.3.1 procedia-se a verificação do pH, utilizando-se para isso, um potenciômetro modelo B 221, marca Micronal, previamente calibrado com soluções tampões, padrões, pH 4,0, pH 7,0 e pH 9,0.

3.4.3 - PESQUISA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Salmonella*

Empregou-se a técnica utilizada por MARTINS

(1979). Assim, no laboratório, cada amostra era homogeneizada e vertida com todo cuidado em um vasilhame de pressão (Millipore), com capacidade de 5 litros, previamente esterilizado a 115°C por 20 minutos, e conectado a uma bomba de pressão e vácuo.

Fechava-se o vasilhame, ligava-se a bomba e procedia-se à filtração a uma pressão de 1 Kgf/cm^2 , através de uma membrana filtrante estéril, com diâmetro de 142 mm e porosidade de 0,45 μm , colocada no porta filtro (Millipore). Finalizada a operação, desligava-se a bomba, abria-se a válvula de segurança do vasilhame de pressão e do porta filtro.

Retirava-se cuidadosamente a parte superior do porta filtro e, com ajuda de uma pinça e uma tesoura, estereis, dobrava-se duas vezes a membrana filtrante, sendo esta, posteriormente, cortada em duas partes iguais.

Em seguida, as duas metades da membrana eram colocadas, respectivamente, em 2 erlenmeyers com capacidade de 500 ml, contendo um, 200 ml de meio de Rappaport modificado por Hoffer¹⁸ e o outro com 200 ml de caldo selenito com novobiocina¹⁸. O primeiro era incubado em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C por 48 horas e o segundo em banho-maria à temperatura de $42,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

Apos o periodo de incubação, a partir dos cultivos com ambos os meios de enriquecimento, eram feitas, com o auxílio de alça de inoculação de níquel-cromo, passagens em placas contendo Agar MacConkey (Difco), Agar Sulfito de Bismuto (Difco), Agar Verde Brilhante (Difco) e Agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (Difco). As placas semeadas eram incubadas, em

estufa bacteriológica, à temperatura de 37°C por 24 horas.

Em seguida, procedia-se o isolamento de colônias com as características das de *Salmonella*, as quais eram inoculadas por picada em profundidade e por estria na superfície de agar triplice açúcar-ferro o qual era posteriormente incubado a 37°C por 24 horas. Após a incubação as cepas que se mostravam com comportamento semelhante ao de salmonelas, eram submetidas a provas bioquímicas de identificação, segundo EDWARDS & EWING³⁴ (1972). Para isto era feita a verificação da utilização da glicose e lactose, desaminação da fenilalanina, descarboxilação da lisina, produção de urease e indol, aproveitamento do citrato e também a realização das provas de vermelho de metila, Voges-Proskauer e de motilidade.

As cepas confirmadas bioquimicamente eram submetidas à identificação sorológica. As cepas eram inoculadas em agar simples inclinado, e após incubação a 37°C por 24 horas, preparava-se uma suspensão espessa, usando-se como diluente, solução de cloreto de sódio a 0,85%. A partir desta suspensão realizava-se a prova de aglutinação em lâmina, empregando-se soros polivalentes somático (O) e flagelar (H), preparados no Instituto Adolfo Lutz. Se as cepas testadas, comportavam-se sorologicamente como sendo de *Salmonella*, as culturas eram enviadas àquele Instituto e por gentileza do Prof. Dr. Gil Vital Alvares Pessoa e sua equipe técnica, as mesmas eram submetidas a provas sorológicas para tipificação.

Observação: As soluções e meios de cultura utilizados encontram-se no Anexo 2.

3.4.4 - DETERMINAÇÃO DO NMP/100 ml DE BACTÉRIAS COLIFORMES FECALIS

A determinação do NMP de bactérias coliformes fecais por 100 ml da amostra, foi feita de acordo com os métodos padrão da American Public Health Association (APHA), sendo selecionada a técnica dos tubos múltiplos¹⁷.

Na prova presuntiva foram inoculados 10 ml e 1 ml de água bruta, respectivamente, em 5 tubos de caldo lactosado (Difco) com tubo de Durham em seu interior. A seguir foram feitas diluições da amostra, de 10^{-1} a 10^{-4} , sendo o diluente água fosfatada, pH 7,2, esterilizado, e foram também inoculados, com 1 ml cada, respectivamente, 5 tubos de caldo lactosado, com tubo de Durham.

Todos os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As leituras foram realizadas após 24 e 48 horas ± 2 horas e, a partir dos tubos com produção de gás, procedia-se a prova de confirmação para coliformes fecais, através de semeadura, em caldo EC (Difco), usando-se alça de níquel-cromo, com 3 mm de diâmetro.

Os tubos eram incubados em banho-maria a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas ± 2 horas. Consideravam-se como positivos para coliformes fecais, os tubos de caldo EC que revelavam produção de gás, nos tubos de Durham, após a incubação.

A partir das porções positivas e empregando-se a Tabela dos Números Mais Prováveis, de Hoskins, determinava-se o NMP de coliformes fecais por 100 ml da amostra.

Observação: As soluções e meios de cultura encontram-se no Anexo 2.

3.4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A apresentação dos resultados fez-se na forma de tabelas contendo o número, a porcentagem de positividade e o total de cada classe.

A análise entre os fatores envolvidos efetuou-se calculando-se a estatística χ^2 para o teste de:

Ho: não existe associação entre os fatores

A significância estatística verificou-se para $\alpha = 0,05$ e Ho foi rejeitada quando χ^2 calculado $\geq \chi^2$ crítico.

A análise descrita efetuou-se nos casos em que as frequências esperadas sob Ho não resultaram menores que 5 para mais de 20% delas (FLEISS³⁶, 1973).

Abaixo de cada tabela, sempre que foi possível a realização do teste, colocou-se o valor da estatística χ^2 calculada e de seu correspondente valor crítico, bem como um comentário a respeito do resultado da análise.

MUNICIPIO DE BOTUCATU

30

TABELA 1 - Tipos de bebedouros utilizados pelos animais para dessedentação. Botucatu, S.P., 1982.

Tipos de Bebedouros	Nº	%
Caixa de cimento	39	34,51
Caixa de zinco (Tipo 1)	1	0,88
Banheira	18	15,93
Tambor metálico (Tipo 2)	1	0,88
Córrego	11	9,73
Riacho (Tipo 3)	15	13,27
Calha	2	1,77
Bico de mamadeira (Tipo 4)	1	0,88
Represamento	8	7,08
Açude (Tipo 5)	10	8,85
Charco (Tipo 6)	7	6,19
T O T A L	113	100,00

4. RESULTADOS

Os resultados encontram-se resumidos nas Tabelas com numeração de 2 a 11

No Anexo 1 encontra-se uma relação completa dos resultados obtidos em cada propriedade, segundo a data de coleta da amostra e os tipos de bebedouros. Os bebedouros foram divididos em 6 tipos para uma melhor compreensão dos resultados obtidos (Figuras 4 a 10).

As Figuras 2 e 3 servem para ilustrar os resultados obtidos nas Tabelas 5 e 9.

TABELA 2 - Isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* em amostras de água de dessedentação animal. Botucatu. S.P.. 1982.

Isolamento de Salmonelas	A m o s t r a s	
	Nº	%
Positivo	15	13,27
Negativo	98	86,73
T O T A L	113	100,00

TABELA 3 - Coliformes fecais (NMP/100 ml)* em amostras de água de dessedentação animal. Botucatu, S.P., 1982.

Coliformes fecais NMP/100 ml	A m o s t r a s	
	Nº	%
≤ 4000	99	87,61
> 4000	14	12,39
T O T A L	113	100,00

* NMP/100 ml = Número Mais Provável em 100 ml da amostra.

TABELA 4 - Isolamento de bactérias do genero *Salmonella* e NMP/100 ml de Coliformes fecais em amostras de água de dessedentação animal. Botucatu, S.P.,1982.

Isolamento de Salmonelas	Coliformes fecais com NMP/100 ml acima de 4000		Total de amostras examinadas
	Nº	%	
Positivo	1	0,88	15
Negativo	13	11,50	98
T O T A L	14	12,39	113

χ^2 calculado = 0,003

χ^2 crítico = 3,84

Comentário: não foi constatada associação entre salmonelas e coliformes fecais.

TABELA 5 - Isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* segundo os tipos de bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.

Tipos de Bebedouros	Amostras positivas para salmonelas		Total de amostras examinadas
	Nº	%	
Caixa de cimento Caixa de zinco (Tipo 1)	4	10,00	40
Banheira Tambor metálico (Tipo 2)	3	15,79	19
Córrego Riacho (Tipo 3)	3	11,54	26
Calha Bico mamadeira (Tipo 4)	-	-	3
Represamento Açude (Tipo 5)	4	22,22	18
Charco (Tipo 6)	1	14,29	7
T O T A L	15	13,27	113

Observação: Não se pode calcular o χ^2 pois os valores esperados são muito baixos (menores que 5).

TABELA 6 - Isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* segundo a temperatura da água dos bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.

Temperatura da água dos bebedouros (°C)	Amostras positivas para salmonelas		Total de amostras examina- das
	Nº	%	
12 — 14	-	-	2
14 — 16	3	2,65	21
16 — 18	1	0,88	13
18 — 20	6	5,31	35
20 — 22	2	1,77	31
22 —	3	2,65	11
T O T A L	15	13,27	113

Observação: Não se pode calcular o χ^2 pois os valores esperados são muito baixos (menores que 5).

TABELA 7 - Isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* segundo o pH da água dos bebedouros usados para a desse_udentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.

pH da água dos bebedouros	Amostras positivas para salmonelas		Total de amostras examina- das
	Nº	%	
5,0 — 6,0	1	0,88	6
6,0 — 7,0	10	8,85	65
7,0 — 8,0	4	3,54	32
8,0 —	-	-	10
T O T A L	15	13,27	113

Observação: Não se pode calcular o χ^2 pois os valores esperados são muito baixos (menores que 5).

TABELA 8 - Sorotipos de salmonelas isolados da água de bebedouros usados para a dessedentação de animais, localizados em 12 propriedades. Botucatu, S.P., 1982.

Sorotipos isolados	Bebedouros positivos	
	Nº	%
<i>S. dublin</i>	3	20,00
<i>S. newport</i>	2	13,33
<i>S. maderia</i>	2	13,33
<i>S. IV 43:g,z57:-</i>	2	13,33
<i>Salmonella</i> sp	2	13,33
<i>S. saphra</i>	1	6,67
<i>S. glostrup</i>	1	6,67
<i>S. IV ochsenzool</i>	1	6,67
<i>S. I 9.12:i:-</i>	1	6,67
T O T A L	15	100,00

TABELA 9 - NMP/100 ml* de Coliformes fecais segundo os tipos de bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.

Tipos de Bebedouros	Coliformes fecais com NMP/100 ml acima de 4000		Total de amostras examinadas
	Nº	%	
Caixa de cimento Caixa de zinco (Tipo 1)	3	7,50	40
Banheira Tambor metálico (Tipo 2)	6	31,58	19
Córrego Riacho (Tipo 3)	-	-	26
Calha Bico mamadeira (Tipo 4)	-	-	3
Represamento Açude (Tipo 5)	4	22,22	18
Charco (Tipo 6)	1	14,29	7
T O T A L	14	12,39	113

* NMP/100 ml = Número Mais Provável por 100 ml de amostra de água.

Observação: Não se pode calcular o χ^2 pois os valores esperados são muito baixos (menores que 5).

TABELA 10 - NMP/100 ml de Coliformes fecais segundo a temperatura da água dos bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.

Temperatura da água dos bebedouros (°C)	Coliformes fecais com NMP/100 ml acima de 4000		Total de amostras examina- das
	Nº	%	
12 — 14	1	0,88	2
14 — 16	2	1,77	21
16 — 18	3	2,65	13
18 — 20	-	-	35
20 — 22	7	6,19	31
22 —	1	0,88	11
T O T A L	14	12,39	113

Observação: Não se pode calcular χ^2 pois os valores esperados são muito baixos (menores que 5).

TABELA 11 - NMP/100 ml de Coliformes fecais segundo o pH da água dos bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.

pH da água. dos bebedouros	Coliformes fecais com NMP/100 ml acima de 4000		Total de amostras examina- das
	Nº		
5,0 — 6,0	-	-	6
6,0 — 7,0	12	10,62	65
7,0 — 8,0	2	1,77	32
8,0 —	-	-	10
T O T A L	14	12,39	113

Observação: Não se pode calcular o χ^2 pois os valores esperados são muito baixos (menores que 5).

FIGURA 2 - Positividade para salmonelas segundo os tipos de bebedouros usados para a dessedentação de animais. Botucatu, S.P., 1982.

FIGURA 3 - NMP/100 ml de Coliformes fecais em águas de dessedentação de animais, segundo os tipos de bebedouros. Botucatu, S.P., 1982.

FIGURA 4 - Bebedouro do Tipo 1 utilizado para dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.

FIGURA 5 - Bebedouro do Tipo 2 utilizado para dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.

FIGURA 6 - Bebedouro do Tipo 3 utilizado para dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.

FIGURA 7 - Bebedouro do Tipo 4 utilizado para dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.

FIGURA 8 - Bebedouro do Tipo 4 utilizado para dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.

FIGURA 9 - Bebedouro do Tipo 5 utilizado para dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.

FIGURA 10 - Bebedouro do Tipo 6 utilizado para dessedentação de animais de criação. Botucatu, S.P., 1982.

5. DISCUSSÃO

No capítulo de Introdução foi salientada a importância que representam os bebedouros empregados no fornecimento de água a animais para sua dessedentação. Estes locais, podem se constituir em importantes fontes de contaminação, considerando-se não só os hábitos dos animais durante o ato de beber água, como também as próprias características dos bebedouros que podem ser de diferentes tipos.

Os bebedouros, provavelmente, têm contribuído para o aumento da incidência de salmonelose, em criações intensivas de animais, podendo isto, porém, ocorrer também em casos de criações extensivas.

O controle dessa enfermidade, nessas circunstâncias, é difícil devido a existência de animais portadores de salmonelas, que eliminam constantemente estas bactérias, com as fezes, poluindo o meio ambiente^{11,89}.

Assim sendo, o hábito dos animais ao beberem água em bebedouros como caixas de cimento, de zinco, banheiras em desuso e outros, podem contaminar esses locais com sal

monelas e outros microrganismos, que são eliminados pelas fezes e que podem ser encontrados também na sua pele e na região próxima a boca. Por outro lado, em bebedouros naturais, além desta forma de contaminação, deve ser considerado que salmonelas e outros microrganismos podem ser veiculados a água através das patas ou mesmo da superfície do corpo poluídos por fezes dos animais.

Relativamente à região de Botucatu, S.P., analisando-se a Tabela 1, pode-se verificar que dos 113 bebedouros estudados, 51 (45,13%) eram naturais, sendo 26 (23%) constituídos por córregos e riachos (tipo 3), 18 (15,93%) por represamentos e açudes (tipo 5) e 7 (6,19%) por charcos. Nestes tipos de bebedouros (Figuras 6, 9 e 10) os animais quase sempre têm contato com a água, através de suas patas, podendo inclusive nesta ocasião, defecar no local utilizado para sua desidratação. A este respeito, na Figura 10 verifica-se a presença de marcas que podem ser devidas ao pisoteamento de animais no solo encharcado.

Os demais tipos de bebedouros (Tabela 1 e Figuras 4, 5, 7 e 8), sendo 40 (35,39%) constituídos por caixas de cimento e zinco (tipo 1), 19 (16,81%) por banheiras e tambor metálico (tipo 2) e 3 (2,65%) por calhas e bico de mamadeira (tipo 4), apesar de poderem contaminar-se com salmonelas e outros microrganismos, que podem estar presentes próximo a boca dos animais e através de outras vias, devem representar menor risco.

É evidente que a água, obtida de diferentes fontes como rios, riachos, córregos e poços deve ser de boa qualidade e os bebedouros limpos de forma adequada e periódica.

Em nosso meio, LEITÃO⁵³ (1979) analisando 116 amostras de águas fluviais das regiões de Campinas e Vale do Paraíba, obteve uma elevada positividade para salmonelas, ou seja, de 79,3%. Esse autor atribue a origem das salmonelas detectadas nas águas analisadas, à ocorrência de poluição fecal oriunda de animais domésticos e/ou selvagens existentes nessas regiões.

MARTINS⁵⁹ (1979) examinou 214 amostras de água bruta dos sistemas produtores que abastecem parte da Grande São Paulo e constatou que 58 (27,1%) eram positivas para bactérias do gênero *Salmonella*.

Outros autores, em estudos bacteriológicos realizados em amostras de água obtidas de córregos e riachos constataram, muitas vezes, a presença de números elevados de coliformes e coliformes fecais, representando a presença de graus apreciáveis de poluição fecal (CHRISTOVÃO e col.¹⁶, 1967; COSTA e col.²⁵, 1972; SATAKE e col.⁷⁵, 1976). Assim, embora estes autores não tenham realizado a pesquisa de salmonelas, verificaram, pelos seus resultados, que as águas analisadas representavam risco, quanto a transmissão de agentes intestinais patogênicos.

No presente trabalho, analisando-se a Tabela 2, pode-se constatar que das 113 amostras de águas usadas na dessedentação de animais da região de Botucatu, 15 (13,27%), revelaram-se positivas para salmonelas. Neste levantamento, que é o primeiro desta natureza realizado nessa região, embora a positividade encontrada possa ser considerada não elevada, reveste-se de significado epidemiológico, dado que, um número variável de animais utilizavam tais águas para a sua desseden

tação expondo-se, portanto, ao risco de contraírem infecções, com ou sem sintomas, por diferentes sorotipos de *Salmonella*.

De acordo com o Decreto 8468 de 08 de setembro de 1976²⁸, que classifica as águas interiores do Estado de São Paulo, podem ser utilizadas, na dessedentação de animais, as águas pertencentes até a classe 3. Para ser enquadrada nesta classe, 80% de pelo menos 5 amostras de água colhidas num período de até 5 semanas consecutivas, deve revelar-se com NMP de bactérias coliformes fecais de no máximo 4000 por 100 ml.

Na presente investigação, apesar de ter sido analisada apenas uma amostra de cada bebedouro, as que se mostraram com NMP de coliformes fecais por 100 ml, superior a 4000, foram por nós consideradas como estando fora do padrão vigente²⁸.

Assim, segundo a Tabela 3, das 113 amostras analisadas, 14 (12,39%) mostraram-se com NMP de coliformes fecais acima do limite tolerado, podendo representar risco potencial ou eminente de saúde aos animais que delas se utilizavam para a sua dessedentação.

A este respeito, analisando-se a Tabela 4, pode-se constatar que das 15 amostras positivas para salmonelas, apenas uma (0,88%) revelou-se com NMP de coliformes fecais por 100 ml superior a 4000 e, portanto, fora do padrão. É importante salientar que nas 14 amostras restantes, positivas para salmonelas, estas bactérias foram isoladas de águas de bebedouros, com NMP de coliformes fecais inferiores a 4000 por 100 ml. Face a estes resultados não se verificou associação entre o NMP de coliformes fecais superior a esse limite e o

isolamento positivo para salmonelas. Depreende-se assim, que o encontro de números altos de coliformes fecais, nem sempre está relacionado à presença de salmonelas. Esta observação está de acordo com os resultados obtidos por vários pesquisadores entre eles, CHERRY e col.¹⁵, 1972 e LEITÃO⁵³, 1979.

Procurou-se relacionar a presença de salmonelas ao tipo de bebedouro, assim como ao pH e temperatura da água, resultados que podem ser mostrados nas Tabelas 5 a 7.

Analisando-se a Tabela 5, ilustrada pela Figura 2, pode-se constatar que a maior positividade para salmonelas foi obtida com relação as amostras de água colhidas de bebedouros do tipo 5 - represamentos e açudes (22,22%), seguido do tipo 2 - banheiras e tambor (15,79%), tipo 6 - charco (14,29%), tipo 3 - córregos e riachos (11,54%) e do tipo 1 - caixa de cimento e zinco (10%). Das três amostras colhidas em calhas e bico de mamadeira (tipo 4), não se obteve o isolamento de bactérias do gênero *Salmonella*.

Nesta mesma Tabela, verifica-se que para o conjunto de 44 amostras de água colhidas de bebedouros constituídos por represamentos e açudes, banheiras e tambor (sem bôia) e charco, obteve-se o isolamento de salmonelas de 8 (18,18%). Por outro lado, para o grupo de 69 amostras obtidas de córregos e riachos, caixas de cimento e de zinco (nas quais a totalidade com bôia) e de calhas e bico de mamadeira, constatou-se positividade de 10,14%. É provável que a maior positividade para salmonelas observada no 1º grupo seja devida ao fato de que a água naqueles tipos de bebedouros se comportava como água com pouca movimentação. Com relação ao 2º grupo, as águas de córregos e riachos, assim como as de calhas e bico

de mamadeira e de caixas de cimento e zinco (com bóia), a menor positividade poderia ser atribuída a uma maior movimentação e, portanto, maior renovação da água.

Quanto a positividade para salmonelas e sua relação com a temperatura e o pH das amostras de água estudadas, analisando-se as Tabelas 6 e 7 constata-se positividade, aparentemente maior para salmonelas quando o pH se encontra entre 6,0 e 7,0 exclusive e temperatura superior a 18°C. Entretanto, novas pesquisas deverão ser realizadas a respeito, a fim de ser confirmada ou não tais observações.

Das amostras de água de 15 bebedouros (13,27%) localizados em 12 propriedades (20%), foram isolados 8 sorotipos classificados como *S. dublin*, *S. newport*, *S. maderia*, *S. IV 43:g,z57:-*, *S. saphra*, *S. glostrup*, *S. IV ochsenzool* e *S. I 9,12:i:-*, e mais duas cepas de salmonelas para as quais não foi possível determinar o sorotipo correspondente e, por esta razão, são mencionadas com *Salmonella* sp (Tabela 8). Nesta mesma tabela pode-se constatar que não foi observada predominância acentuada de um ou mais sorotipos, porém o mais frequente, aparentemente, foi a *S. dublin* isolada de 20% dos bebedouros cujas águas revelaram-se positivas para salmonelas.

Em nosso meio não têm sido realizados estudos sobre a presença de salmonelas em águas usadas na dessedentação de animais. Porém, MARTINS⁵⁹ (1979) analisando amostras de água bruta em estações de tratamento de águas da Grande São Paulo, determinou a presença de sorotipos de salmonelas e refere o isolamento, principalmente de *S. quiniela*, *S. anatum*, *S. agona*, *S. infantis*, *S. typhimurium*, *S. infantis* 0:14+, *S. newport*, *S. panama*, *S. pomona*, *S. typhimurium* var. 0:5-, *S.*

glostrup, *S. minnesota*, *S. sandiego* e *S. claibornei*.

Em outra investigação, a partir de águas flu-
viais, LEITÃO⁵³ (1979) verificou a presença de salmonelas, sen-
do os sorotipos predominantes os *S. typhimurium*, *S. anatum*, *S.*
derby, *S. stanley*, *S. newport*, *S. mendoza*, *S. poona*, *S. panama*,
e *S. oranienburg*.

Cumpre salientar que dos sorotipos detectados por
estes autores, apenas o *S. newport* e *S. glostrup* foram isola-
dos das amostras de água de bebedouros por nós analisados.

Em estudos realizados em outros países, alguns
podem ser destacados. Na Inglaterra, HARBOURNE⁴⁴ (1977) assi-
nalou em seu estudo, como contaminantes de criações animais
por via hídrica os sorotipos *S. typhimurium*, *S. agona*, *S.*
senftenberg e *S. bredney*. Na Itália, na província de Floren-
ça entre 1979-1980, BURRINI e col.¹⁴ (1983), a partir de águas
de superfície e águas servidas, isolaram 35 sorotipos sendo
os mais frequentes os *S. derby*, *S. typhimurium*, *S. infantis*,
S. paratyphi B, *S. stanleyville* e *S. panama*. CORDANO &
VIRGILIO²² (1976), no Chile, de uma corrente fluvial, isolaram
15 diferentes sorotipos sendo os *S. agona*, *S. bredney*, *S.*
livingstone, *S. oranienburg* e *S. infantis*, isolados pela pri-
meira vez naquele país.

Durante a realização da presente pesquisa ocor-
reram alguns casos de salmonelose em eqüinos jovens de uma
propriedade. Estes animais consumiam água fornecida por um
represamento e que se revelou positiva para *S. newport*. Fren-
te ao problema, nesta propriedade foi construído um poço arte-
ziano cuja água passou a ser utilizada na dessedentação dos

equinos da criação, não ocorrendo posteriormente outros casos daquela doença.

Isto vem confirmar quanto é importante a qualidade da água a ser ministrada a animais, pois isto é de valor não só na profilaxia da salmonelose animal, mas também da humana. Para isto deve ser estimulada a realização de análises laboratoriais, microbiológicas, a fim de conhecer os níveis de poluição existentes.

No presente trabalho, analisando-se a Tabela 9, ilustrada pela Figura 3, constata-se que os bebedouros constituídos de banheiras e tambor metálico (tipo 2), represamentos e açudes (tipo 5) e charco (tipo 6), foram os que se revelaram com águas altamente poluídas, pois, em 31,58%, 22,22% e 14,29%, respectivamente, os NMP de coliformes fecais atingiram valores superiores a 4000 por 100 ml, e portanto, não deveriam ser utilizados na dessedentação de animais, de acordo com o padrão vigente²⁸.

Apesar de não ter sido verificada relação entre o NMP de coliformes fecais e isolamento de salmonelas o fato de não ter sido constatada a presença destas bactérias na água de muitos bebedouros com alto grau de poluição fecal, não significa que as mesmas não poderiam estar presentes.

Deve ser salientado de outra parte, que do total de amostras analisadas, as que se revelaram com NMP de coliformes fecais acima do limite tolerado pela legislação vigente, a sua temperatura estava compreendida entre 20°C e 22°C (6,19%) e o pH entre 6,0 e 7,0 (10,62%), fato que pode ser observado, analisando-se as Tabelas 10 e 11.

Do exposto, depreende-se que é de suma importância a qualidade sanitária da água a ser ministrada aos animais já que das 60 propriedades visitadas, isolou-se salmonelas de amostras de águas obtidas em 12 (20%). Como medida auxiliar no controle sanitário seria de valor o estabelecimento de padrões legais para os bebedouros.

Assim sendo, faz-se necessário o desenvolvimento de um trabalho mais efetivo por parte das autoridades sanitárias competentes e dos profissionais que assistem as propriedades de criações de animais. Neste trabalho deve ser salientada a educação sanitária dos que criam e manejam animais e também a inspeção, no que se refere a qualidade da água e as condições sanitárias destes locais.

6. CONCLUSÕES

- A presença de bactérias do gênero *Salmonella* foi detectada em 15 (13,27%) locais utilizados para a dessedentação de animais de criação da região de Botucatu, S.P. correspondentes a 12 (20%) das propriedades visitadas.
- Dos 15 locais utilizados pelos animais para sua dessedentação foram isolados 8 sorotipos de bactérias do gênero *Salmonella* classificados como *S. dublin*, *S. newport*, *S. maderia*, *S. IV 43:g,z 57:-*, *S. saphra*, *S. glostrup*, *S. IV ochsenzool* e *S. I 9,12:i:-*, não havendo predominância acentuada de um ou mais sorotipos.
- O isolamento positivo para salmonelas deu-se nos bebedouros dos seguintes tipos: represamentos e açudes (22,22%), banheiras e tambor metálico - (15,79%), charcos (14,29%), córregos e riachos (11,54%) e caixas de cimento e zinco (10%).

- O NMP/100 ml de coliformes fecais acima de 4000 apresentou-se com maior positividade em 14 (12,39%) amostras.
- As águas que se apresentaram com NMP/100 ml de coliformes fecais acima de 4000 provinham dos seguintes tipos de bebedouros: banheiras e tambor metálico (31,58%), represamentos e açudes (22,22%), charcos (14,29%) e caixas de cimento e zinco (7,50%).
- Estatisticamente não houve associação entre os NMP/100 ml de coliformes fecais e a presença de salmonelas; isto significa que o encontro de números altos de coliformes fecais nem sempre está relacionado à presença de salmonelas.
- A positividade maior para o isolamento de salmo nelas situou-se em temperaturas superiores a 18°C e em pH entre 6,0 e 7,0.
- Do mesmo modo, com relação ao NMP/100 ml de coliformes fecais acima de 4000, a maior positivi dade obteve-se em temperaturas entre 20°C e 22°C e em pH entre 6,0 e 7,0.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHA, P.N. & SZYFRES, B. - Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. Washington, D.C., Organizacion Panamericana de la Salud, 1977. p.86-93. (OPAS-Publ. cient., 354).
2. ANDREWES, C.H. & WALTON, J.R. - Animal and human health; viral and bacterial zoonoses. London, Baillière Tindal, 1977. p.117-23.
3. BAKER, D.A. et alii - Longevity of *Salmonella typhimurium* in *Tilapia aurea* and water from pools fertilized with swine waste. Appl. environm. Microbiol., 45(5):1548-54, 1983.
4. BERCHIERI JR., A. et alii - Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de ração. In: ENCONTRO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS, 8º, Jaboticabal, SP, 1983. Resumos. Jaboticabal, 1983. p.94.

5. BIELLI, E. et alii - Biosierotipi di *Salmonella* isolati da ammalati, da portatori e da alcune specie di animali nel biennio 1978-1979. G. Mal. infett. parassit., 34 (8):982-5, 1982.
6. BIGLER, W.J. et alii - *Salmonella* infections in Florida raccoons, *Procyon lotor*. Arch. environm. Hlth, 28(5): 261-2, 1974.
7. BLOOD, D.C. et alii - Clínica veterinária. 5ª ed. São Paulo, Guanabara Koogan, 1983. p.463-5.
8. BOLETIM ZOOSSANITÁRIO. Brasília, Ministério da Agricultura. Divisão da Vigilância Zoonositária, 1964/73.
9. BOTELHO, L.F. et alii - Isolation of *Salmonella* and *Pseudomonas aeruginosa* from seawater with different levels of pollution in Rio de Janeiro. An. Microbiol., 24:46-54, 1979.
10. BOYD, R.F. & HOERL, B.G. - The gram-negative Enteric Baccili and related organism. In: Basic medical microbiology, 2.ed. Boston, Little & Brown, 1981. p.393-5.
11. BRITISH ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE. *Salmonella*; the food poisoner. London, 1977.
12. BRUNER, D.W. - *Salmonella* cultures typed during the years 1950-1971 for the Service Laboratories of the New York

State Veterinary College at Cornell University.

Cornell Vet., 63(1):138-43, 1973.

13. BULGIN, M.S. - *Salmonella dublin*: what veterinarian should know. J. Amer. vet. med. Ass., 182(2):116-8, 1983.
14. BURRINI, D. et alii - Salmonelle isolate nelle acque superficiali e di scarico della provincia di Firenze negli anni 1979-1980. G. Mal. infett. parassit., 35(8): 902-4, 1983.
15. CHERRY, W.B. et alii - *Salmonellae* as an index of pollution of surface waters. Appl. Microbiol., 24: 334-40, 1972.
16. CHRISTOVÃO, D. de A. et alii - Condições sanitárias das águas de irrigação de hortas do Município de São Paulo. I. Determinação da intensidade de poluição fecal através do NMP de coliformes e de *E. coli*. Rev. Saúde públ., S.Paulo, 1:3-11, 1967.
17. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Determinação do número mais provável de coliformes totais e fecais pela técnica de tubos múltiplos. São Paulo, 1978. (L5.202).
18. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Método semi-quantitativo para isolamento e identificação de *Salmonella* em água e esgoto. São Paulo, 1978. (L5-218).

19. CONTROL of Salmonellosis in poultry and cattle. Brit. med. J., 2(6088):652-3, 1977.
20. COOK, W.L. et alii - Isolation of *Salmonella enteritidis* serotype *agona* from eutrophic regions of a fresh water lake. Appl. Microbiol., 28(4):723-5, 1974.
21. CORBION, B. & GLEDEL, J. - *Salmonella* et pathologie bovine: étude des souches isolées en France (1976 a 1978). Rev. Méd. vét., 131(1):63-73, 1980.
22. CORDANO, A.M. & VIRGILIO, R. - Relaciones ecologicas de *Salmonella* en Chile. Bol. Ofic. sanit. panamer., 81(1):44-9, 1976.
23. CORREA, W.M. & CORREA, C.N.M. - Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. São Paulo, J.M. Varela, 1979. p.171.
24. CORREA, W.M. & MORENO, G. - *Salmonella typhi* causando en fermidade natural em galinhas em Botucatu, São Paulo, Brasil. Arq. Inst. biol., S. Paulo, 40(2):129-30, 1973.
25. COSTA, A. et alii - Estudo da poluição fecal em córregos de Ribeirão Preto, S. Paulo, através da determinação do NMP de coliformes e de *Escherichia coli*. In: JORNADA FARMACEUTICA, 4^a, Ribeirão Preto, 1972. Resumos. Ribeirão Preto, 1972. p.29-30.
26. COX, N.A. et alii - *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*

- found in commercial poultry feed. Poultry Sci., 62 (11):2169-75, 1983.
27. DE AVILA, F.A. et alii - Isolamento e identificação de *Salmonella* em cama de aviário nos arredores de Belo Horizonte. Arq. Esc. Vet. UFMG., 24(3):227-9, 1972.
28. DECRETO nº 8.468 de 8 de setembro de 1976: Classificação das águas interiores situadas no território do Estado de São Paulo. Diário Oficial, São Paulo, 9 set. 1976. p.4-18.
29. DELON, P.J. Vigilancia de la salmonelosis en 1973. Cron. Org. mund. Salud., 30:260-2, 1976.
30. DEMONSTRATIVO epidemiológico de focos das principais doenças registradas no Brasil, durante o período de 1971 a 1980. Bol. Def. sanit. anim., 14(1/4):13, 1980.
31. DIFCO supplementary literature. Detroit, Difco Laboratories, 1972.
32. DONDERO, N.C. et alii - *Salmonella* in surface waters of Central New York State. Appl. environm. Microbiol., 33(4):791-801, 1977.
33. DYKSTRA, R.R. - Higiene animal y prevención de enfermedades. Barcelona, Editorial Labor, 1970. p.63-4.
34. EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. - Identification of entero -

bacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972. p.146-258.

35. ERWIN, L.E. - Examination of prepared poultry feeds for the presence of *Salmonella* and other enteric organisms. Poultry Sci., 34(1):215-6, 1955.
36. FLEISS, J.L. - Statistical methods for rates and proportions. New York, John Wiley & Sons, 1973.
37. FOX, M.D. - Recent trends in salmonellosis epidemiology. J. Amer. vet. med. Ass., 165(11):990-3, 1974. C
38. GELDREICH, E.E. - Applying bacteriological parameters to recreational water quality. J. Amer. Wat. Wks Ass., 62(2):113-20, 1970.
39. GELDREICH, E.E. - Buffalo lake recreational water quality: a study in bacteriological data interpretation. Wat. Res., 6:913-24, 1972.
40. GIORGI, W. - Animais domésticos como portadores de salmonelas: significado epidemiológico e sua relação com a saúde pública. Hig. Alim., 1(3/4):177-93, 1982.
41. GOYAL, S.M. et alii - Occurrence and distribution of bacterial indicators and pathogens in canal communities along the Texas coast. Appl. environm. Microbiol., 34(2):139-49, 1977.

42. HACKING, W.C. et alii - Sources of *Salmonellae* in broiler chickens in Ontario. Canad. J. comp. Med., 42(4):392-9, 1978.
43. HACKING, W.C. et alii - *Salmonella* investigation in an Ontario feed mill. Canad. J. comp. Med., 42(4):400-6, 1978.
44. HARBOURNE, J.F. - Intestinal infections of animals and man - *Salmonellae* in waterways in North Yorkshire associated with human and animal effluent. Roy. Soc. Hlth J., 87(3):106-14, 1977.
45. HOOD, M.A. et alii - Relationship among fecal coliformes, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp in shelfish. Appl. environm. Microbiol., 45(1):122-6, 1983.
46. HOOPER, R.S. - The recovery of *Salmonella dublin* from rivers in Anglesey. Vet. Rec., 87:583-6, 1970.
47. HUTYRA, F. et alii - Patologia y terapeutica especiales de los animales domesticos. 2.ed. Barcelona, Editorial Labor, 1968. v.1, p.108.
48. KAMPELMACHER, E.H. - The spread and significance of salmonellae in surface waters in the Netherlands. In: HOADLEY, A.W. & DUTKA, B.J., eds. Bacterial indicators health hazards associated with water. Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1977. p.148-58, (ASTM STP, 635).

49. KATZENELSON, E. & TELTCH, B. - Dispersion of enteric bacteria by spray irrigation. J. Wat. Pollut. control Fed., 48(4):710-6, 1976.
50. KIKUCHI, N. et alii - The isolation of *Salmonella typhimurium* from foals with piroplasmidosis and diarrhea. Bull. Equine Res. Inst., 19:43-50, 1982.
51. LANGENEGGER, C.H. & LANGENEGGER, J. - Surtos de salmonelose, por *Salmonella typhimurium*, em suínos no Estado do Rio de Janeiro. Pesq. agropec. bras., Sér. Vet., 10:111-4, 1975.
52. LAURO, M.G. et alii - Ricerca di portatori sani di salmonelle tra gli animali macellati nel mattatoio di Cagliari. G. Mal. infett. parassit., 35(8):932-3, 1983.
53. LEITÃO, M.F. de F. - Salmonelas em águas fluviais e em alimentos não processados e industrializados de origem animal e vegetal no Estado de São Paulo. São Paulo, 1979. (Tese - Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
54. LINS, Z.C. - Ocorrência do gênero *Salmonella* em animais silvestres capturados na floresta amazônica. An. Microbiol., 12:19-29, 1964.
55. LINS, Z.C. - Studies on enteric bacterias in the lower amazon region: II. *Salmonella* types isolated from

- wild reptiles in Pará State, Brazil. Rev. Microbiol., 2(4):165-9, 1971.
56. LINTON, A.H. et alii - Epidemiology of *Salmonella* infection in calves (1). Its relation to their husbandry and management. Vet. Rec., 94(25):581-5, 1974.
57. MADJARIC, D. & ERCEG, J. - Some major characteristics of infections intestinal disease carriage in persons engaged in food handling and drinking-water supply in Zagreb from 1964 to 1973. Acta med. iugosl., 31(4):389-400, 1977.
58. MANUAL de bacteriologia; recopilación de tecnicas. Madrid, Laboratorios Difco, 1978.
59. MARTINS, M.T. - Salmonelas no ambiente aquático: significado sanitário. São Paulo, 1979. (Tese - Doutoramento - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
60. MARX, M.B. - Two surveys of *Salmonella* infection among certain species of wildlife in Northern Virginia(1963 and 1965-1966). Amer. J. vet. Res., 30(11):2003-6, 1969.
61. MERCK veterinary manual. 5.ed. Rahway, Merck, 1979. p.300.
62. MILLER, S. - An outbreak of salmonellosis among Angus

- cows in West Virginia. Vet. med. smal Anim. clin., 72(9):1488-91, 1977.
63. MORENO, G. et alii - Ocorrência de *Salmonella* em lagartos. Arq. Inst. biol., S.Paulo, 40(1):63-6, 1973.
64. MORSE, E.V. - *Salmonella* serotypes isolated from the aquatic environment (Wabash River, Indiana, 1973-1976). Amer. J. vet. Res., 39(4):717-9; 1978.
65. MORSE, E.V. & DUNCAN, M.A. - Salmonellosis; an environmental health problem. J. Amer. vet. med. Ass., 165(11):1015-9, 1974.
66. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Comité de Expertos en Planificación y Administración de los Programas Nacionales para la Lucha Contra los Efectos Nocivos de los Contaminantes, Ginebra, 1973. Aspectos sanitarios de la lucha contra la contaminación del medio: informe. Ginebra, 1974. (OMS - Ser. inf. técn., 554).
67. PLANT, C.W. - Salmonellosis in wild birds feeding at sewage treatment works. J. Hyg., Cambrige, 81(1):43-8, 1978.
68. QUESADA, A. - I portatori di *Salmonelle* in medicina veterinaria. Ann. Inst. sup. Sanità., 13:721-6, 1977.
69. QUEVEDO, F. et alli - Contaminación de carne equina con Salmonelas; un Estudio Ecológico. II - *Salmonella* en

Gorriones capturados en corrales de caballos de Abasto. Gac. vet., 35(280):474-8, 1973.

70. SALMONELLA notes. Vet. Rec., 103(5):82, 1978.

71. SALMONELLOSIS and sewage; news and reports. Vet. Rec., 111(14)312, 1982.

72. SALMONELLOSIS: some good news, some bad. Vet. Rec., 111(16):355, 1982.

73. SALMONELLOSIS incidents wane; news and reports. Vet. Rec., 110(9):191, 1982.

74. SANTOS, J.A. dos et alii - Meningite e meningoencefalite causadas por *Salmonella* em bezerros. Pesq. agropec. bras., Brasília, 18(1):59-65, 1983.

75. SATAKE, T. et alii - Estudo das condições sanitarias das águas de irrigação de hortaliças do Município de Ribeirão Preto, São Paulo, por meio da determinação do número mais provável do grupo coliforme, e de *E.coli*. Rev. Fac. Farm. Odont. Ribeirão Preto, 13(1):11-22, 1976.

76. SCHNURRENBERGER, P.R. et alii - Prevalence of *Salmonella* spp in domestic animals and wildlife on selected Illinois farms. J. Amer. vet. med. Ass., 153(4):442-5, 1968.

77. SHIMI, A. & BARIN, A. - *Salmonella* in cats. J. comp. Path., 87(2):315-8, 1977.
78. SOJKA, W.J. et alii - Incidence of *Salmonella* infection in animals in England and Wales, 1968-1974. J. Hyg., Cambridge, 78:43-56, 1977.
79. SOUZA, L.C. & MEIRA, D.R. - Levantamento das condições sanitárias de águas de bebida fornecidas a animais pertencentes ao Campus de Botucatu. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18, Balneário Camboriú, SC, 1982. Resumos. Balneário Camboriú, SC, 1982. p.456.
80. SOUZA, L.C. et alii - Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais. Rev. Saúde públ., S.Paulo, 17:112-22, 1983
81. TAKESUE, K. et alii - Outbreaks of *Salmonella naestved* infection in rearing calves. Nat. Inst. anim. Hlth Quart., Tokyo, 19:74-5, 1979.
82. TAYLOR, R.J. A further assessment of the potential hazard for calves allowed to graze pasture contaminated with *Salmonella dublin* in slurry. Brit. vet. J., 129(4): 354-8, 1973.
83. TAYLOR, R.J. & BURROWS, M.R. - The survival of *Escherichia coli* and *Salmonella dublin* in slurry on pasture and the infectivity of *S. dublin* for grazing calves. Brit. vet. J., 127(11):536-43, 1971.

84. TELTSCH, B. et alii - Isolation and identification of pathogenic microorganism at wastewater - irrigated fields: Ratios in air and wastewater. Appl. environm. Microbiol., 39(6):1183-90, 1980.
85. THATCHER, F.S. & CLARK, D.S. - Analysis microbiologico de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acribia, 1973.
86. TIMONEY, J.F. et alii - Feline Salmonellosis - A nosocomial outbreak and experimental studies. Cornell Vet., 68(2):211-9, 1978.
87. VIGILANCIA de las salmonelosis. Cron. Org. mund. Salud., 29:253-7, 1975.
88. WALTON, J.R. - Salmonellosis. Brit. vet. J., 139(3):185-91, 1983.
89. WILLIAMS, B.M. - Environmental considerations in salmonellosis. Vet. Rec., 96(14):318-21, 1975.
90. WILLIAMS JR., L.P. - Salmonellosis. In: STEELE, J.H. ed. CRC handbook series in zoonoses. Boca Raton, CRC Press, 1980. v.2, Section A, p.11-34.
91. WRAY, C. - Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary importance within the environment. Vet. Bull., 45(8):543-50, 1975.
92. WRAY, C. & SOJKA, W.J. - Review of the progress of Dairy

Science: bovine salmonellosis. J. Dairy Sci., 44:383-425, 1977.

93. ZAVANELLA, M. et alii - Sierotipi di *Salmonella* isolati nel biennio 1980-1981 in Provincia di Brescia da uomo, animali, alimenti e ambiente. G. Mal. infett. parassit., 35(8):924-5, 1983.
94. ZECHA, B.C. et alii - The Dillon Beach project. A five-year epidemiological study of naturally occurring *Salmonella* infection in turkeys and their environment. Avian Dis., 21(2):141-59, 1977.

A N E X O S

ANEXO 1

DISTRIBUIÇÃO DOS BEBEDOUROS SEGUNDO AS PROPRIEDADES DE ORIGEM, DATA DE COLETA E RESULTADOS DAS DIFERENTES ANÁLISES REALIZADAS, BOTUCATU, S.P., 1982

Propriedades	Data da coleta	Nº de bebedouros	Tipo de Bebedouro	Temp. da água do bebed. (°C)	pH da água do bebed.	Salmonella (sorotipo)	Col. fecal (NMP/100 ml)
1	12/04/82	1	Cx cimento	19,5	6,88	----	33
		2	Cx cimento	20,0	6,02	----	6400
2	19/04/82	1	Córrego	19,0	6,57	----	9,4
3	20/04/82	1	Banheira	14,5	6,55	----	22000
		2	Charco	17,0	6,31	----	7900
		3	Córrego	18,0	6,63	S.I 9,12:i:-	23
4	28/04/82	1	Riacho	15,0	6,82	S. saphra	79
		2	Cx cimento	14,0	7,09	----	700
5	03/05/82	1	Cx cimento	15,0	7,15	----	240
		2	Cx cimento	12,0	6,89	----	7000
6	05/05/82	1	Riacho	16,0	7,71	----	33
		2	Cx cimento	14,0	7,08	----	490
7	10/05/82	1	Charco	14,0	6,81	----	1100
		2	Córrego	15,0	5,20	----	130
8	12/05/82	1	Riacho	14,0	6,71	----	23
		2	Cx cimento	14,0	9,25	----	49
9	17/05/82	1	Açude	20,0	6,68	----	23
		2	Açude	20,0	6,81	----	23
10	19/05/82	1	Riacho	16,0	7,90	----	390
		2	Represamento	16,0	6,13	----	3300
11	24/05/82	1	Riacho	13,0	7,18	----	170
		2	Banheira	14,0	7,43	----	70
12	26/05/82	1	Cx cimento	14,0	8,90	----	0
		2	Banheira	14,0	6,85	----	240000
	28/05/82	3	Riacho	14,0	6,06	----	23
		4	Cx cimento	19,0	5,48	----	4,5
13	09/06/82	1	Cx cimento	15,0	7,09	----	33
14	10/06/82	1	Cx cimento	19,0	6,12	----	4
15	21/06/82	1	Córrego	19,0	6,23	----	33
		2	Tambor metálico	20,0	6,08	----	2
16	24/06/82	1	Banheira	18,0	5,75	----	240
		2	Banheira	19,0	5,85	S. dublin	1300
17	28/06/82	1	Cx cimento	19,0	7,68	----	490
		2	Riacho	18,0	6,92	S. IV 43:g,z57:-	70
18	05/07/82	1	Riacho	17,0	6,74	----	17
		2	Cx cimento	17,5	7,00	S. dublin	7900
19	07/07/82	1	Banheira	19,0	6,64	----	0
		2	Banheira	22,0	6,70	----	27
20	12/07/82	1	Cx cimento	16,0	7,42	----	110
		2	Cx cimento	16,0	9,04	----	13
21	15/07/82	1	Riacho	15,0	7,38	----	31
		2	Riacho	14,0	6,77	----	540
22	20/07/82	1	Calha	18,0	6,09	----	950
		2	Calha	18,0	5,97	----	0
23	27/07/82	1	Córrego	16,0	7,28	----	220
		2	Charco	15,0	7,42	----	240

Propriedades	Data da coleta	Nº de bebedouros	Tipo de Bebedouro	Temp. da água bebed. (°C)	pH da água do bebed.	Salmonella (sorotipo ⁹)	Col. fecal (NMP/100 ml)
24	05/08/82	1	Córrego	18,0	7,09	----	540
		2	Córrego	17,0	7,26	----	350
25	11/08/82	1	Banheira	14,0	7,62	----	540
26	23/08/82	1	Córrego	17,0	7,10	----	23
		2	Riacho	16,0	7,20	----	13
27	25/08/82	1	Cx cimento	15,0	6,70	----	350
28	01/09/82	1	Represamento	17,0	7,10	----	7900
		2	Cx cimento	18,0	8,40	----	1400
29	08/09/82	1	Banheira	14,0	7,50	<i>S. dublin</i>	14
		2	Açude	15,0	7,60	<i>S. 1V 43:g,z57:-</i>	220
30	17/09/82	1	Córrego	21,0	7,00	----	1300
31	05/10/82	1	Cx cimento	22,0	8,06	----	7,8
		2	Cx cimento	22,0	7,35	----	33
32	10/11/82	1	Açude	20,0	6,70	----	11000
		2	Cx cimento	21,0	6,30	----	4
33	18/11/82	1	Cx cimento	20,0	9,00	----	49
		2	Açude	21,0	7,10	----	33
34	25/11/82	1	Represamento	22,0	6,80	<i>S. newport</i>	70
		2	Cx cimento	20,0	9,00	----	0
35	09/12/82	1	Banheira	18,0	6,70	----	0
36	29/12/82	1	Represamento	21,0	6,60	<i>S. newport</i>	1,8
	04/01/83	2	Cx zinco	21,5	6,70	----	6,8
		3	Represamento	24,0	6,70	<i>S. sp</i>	2400
37	26/01/83	1	Açude	22,0	6,70	----	950
		2	Açude	21,0	6,80	----	1700
38	02/02/83	1	Banheira	20,0	6,57	----	17000
		2	Banheira	18,0	6,75	----	110
39	08/02/83	1	Banheira	20,0	6,50	----	9500
40	10/02/83	1	Cx cimento	22,0	6,50	<i>S. maderia</i>	490
		2	Cx cimento	21,0	7,40	<i>S. maderia</i>	1100
41	17/02/83	1	Banheira	22,0	6,90	----	17000
		2	Riacho	21,0	7,10	----	2700
42	22/02/83	1	Cx cimento	21,0	6,30	----	400
		2	Córrego	20,0	7,00	----	350
43	24/02/83	1	Charco	19,0	6,20	----	23
		2	Banheira	21,0	6,20	----	23
44	01/03/83	1	Riacho	19,0	6,70	----	1700
45	03/03/83	1	Represamento	21,0	6,50	----	4900
		2	Cx cimento	22,0	6,40	----	220
46	08/03/83	1	Cx cimento	19,0	7,00	----	270
		2	Cx cimento	20,0	6,90	----	3500
47	10/03/83	1	Cx cimento	23,0	6,50	----	33
		2	Cx cimento	20,0	7,10	----	350
48	15/03/83	1	Represamento	20,0	6,30	----	1300
		2	Cx cimento	20,0	8,70	----	790
49	22/03/83	1	Cx cimento	19,0	8,10	----	0
		2	Cx cimento	18,0	6,80	<i>S. glostrup</i>	220

Propriedades	Data da coleta	Nº de bebedouros	Tipo de Bebedouro	Temp. da água do bebed. (°C)	pH da água do bebed.	Salmonella (sorotipo)	Col. fecal (NMP/100 ml)
50	24/03/83	1	Cx cimento	18,0	6,80	----	350
		2	Represamento	19,5	7,10	----	110
51	29/03/83	1	Açude	20,0	6,60	----	49
		2	Cx cimento	19,0	9,20	----	21
52	05/04/83	1	Riacho	23,0	7,00	----	490
53	07/04/83	1	Charco	18,0	6,90	S. IV oehsenzool	1700
		2	Banheira	19,0	6,50	----	2400
54	12/04/83	1	Charco	21,0	6,70	----	17
		2	Banheira	19,0	6,80	S. sp	6,8
55	14/04/83	1	Cx cimento	20,5	6,50	----	350
		2	Cx cimento	19,0	5,90	----	33
56	19/04/83	1	Riacho	19,5	6,75	----	140
57	28/04/83	1	Bicos mamadeira	20,5	6,30	----	2200
		2	Cx cimento	19,0	6,20	----	2
58	03/05/83	1	Banheira	20,5	6,00	----	24000
		2	Charco	19,0	6,30	----	27
59	05/05/83	1	Açude	19,5	6,40	----	1300
		2	Açude	20,5	6,50	----	17000
60	10/05/83	1	Córrego	18,0	6,00	----	490
		2	Cx cimento	19,0	6,80	----	2400

ANEXO 2

SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

MEIO DE RAPPAPORT MODIFICADO POR HOFFER¹⁸

SOLUÇÃO A: meio básico

Bacto triptona	5,0 g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	8,0 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a....	1,6 g
Água destilada	1000 ml
pH final após esterilização: 6,5 - 6,8	

Estes ingredientes eram acrescentados a 1000 ml de água destilada. A mistura era aquecida, sob agitação, até a completa dissolução, evitando-se atingir a temperatura de ebulição. Após ser resfriado, este meio era distribuído em volume de 200 ml em erlenmeyer com capacidade de 500 ml e esterilizado em autoclave por 121°C durante 15 minutos.

SOLUÇÃO B:

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a.....	40,0 g
Água destilada	100 ml

Esta solução era esterilizada em autoclave com vapor fluente, a 100°C por 30 minutos.

SOLUÇÃO C:

Verde malaquita	0,4 g
Água destilada	100 ml

Esta solução era esterilizada em autoclave com vapor fluente, a 100°C por 30 minutos.

SOLUÇÃO D

Tiossulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) p.a. ... 20,0 g

Água destilada 100 ml

Esta solução era esterilizada em autoclave com vapor fluente, a 100°C por 30 minutos.

SOLUÇÃO E

Iodo (I_2) p.a. 5,0 g

Iodeto de potássio (KI) p.a. 8,0 g

Água destilada 40 ml

Esta solução era preparada no dia do seu uso e colocada em frasco ambar protegido da luz.

PREPARO DO MEIO DE RAPPAPORT MODIFICADO POR HOFFER

A cada erlenmeyer contendo 200 ml do meio básico acrescentava-se:

Solução B (cloreto de magnésio 40%) ... 20 ml

Solução C (verde malaquita 0,4%) 6 ml

Solução D (tiossulfato de sódio 20%) .. 20 ml

Solução E (iodo-iodeto de potássio) ... 4 ml

CALDO SELENITO COM NOVOBIOCINA¹⁸

A 1000 ml de água destilada eram adicionados 23g de Caldo Selenito desidratado (Difco 0275) sendo a mistura, aquecida, sob agitação, até a completa dissolução do meio, evitando-se, porém, o aquecimento excessivo. Em seguida o meio

era adicionado de 0,04 gramas de novobiocina cálcica por litro e distribuído, assepticamente, em volumes de 200 ml em erlenmeyers com capacidade de 500 ml, previamente esterilizados. O pH final do meio após esterilização era de 7,0.

AGAR VERDE BRILHANTE⁵⁸ (Difco 0285)

A 58 g de agar verde brilhante desidratado acrescentavam-se 1000 ml de água destilada e a mistura era aquecida até a ebulição, para se obter a dissolução completa do meio. O meio era esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e, a seguir, distribuído em volumes de 15 ml em placas de Petri esterilizadas. O pH final do meio era de 6,9. Este meio era mantido sob refrigeração a 4°C.

AGAR SULFITO DE BISMUTO⁵⁸ (Difco 0073)

A 52 g de agar sulfito de bismuto desidratado eram adicionados 1000 ml de água destilada, e a mistura era aquecida até a dissolução do meio, evitando-se porém um superaquecimento. A seguir ajustava-se o pH para 7,7 e o meio era distribuído em volumes de 15 ml em placas de Petri esterilizadas. Este meio era mantido sob refrigeração a 4°C.

AGAR MACCONKEY⁵⁸ (Difco 0075)

Dissolviam-se, por aquecimento, 50 g de agar MacConkey desidratado em 1000 ml de água destilada. A seguir,

após ajustar o seu pH em 7,1, o meio era esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, enquanto ainda quente, o meio era distribuído em volumes de 15 ml em placas de Petri esterilizadas. Posteriormente mantinha-se sob refrigeração a 4°C.

AGAR XILOSE-LISINA-DESOXICOLATO³¹ (Difco 0788)

A 57 g de agar Xilose-Lisina-Desoxicolato desidratado, adicionavam-se 1000 ml de água destilada, sendo a mistura aquecida até fervura com frequente agitação, para haver completa dissolução do meio. O pH era ajustado em 7,4 sendo o meio a seguir distribuído em volumes de 15 ml em placa de Petri esterilizadas. Este meio era mantido sob refrigeração a 4°C.

ÁGUA PEPTONADA (THATCHER & CLARK⁸⁵, 1973)

Peptona 5,0 g

Cloreto de sódio 10,0 g

Em 1000 ml de água destilada dissolviam-se a peptona e o cloreto de sódio, sendo a seguir, o pH ajustado em 7,2. O meio era distribuído em volumes de 3 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm, seguido de sua esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização este meio era resfriado e mantido em temperatura ambiente.

CALDO MR-VP (Merck, art. 5712)

Seguindo as instruções do fabricante, dissolviam-se 17 g do produto desidratado em 1000 ml de água destilada sendo o seu pH ajustado em 7,0. O meio, em seguida era distribuído em volumes de 3 ml, em tubos de ensaio de 13 x 100 mm, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização o meio era resfriado e mantido em temperatura ambiente.

AGAR CITRATO DE SIMMONS⁵⁸ (Difco 0091)

A 1000 ml de água destilada adicionavam-se 24,2 g do meio desidratado, e a mistura era aquecida até completa dissolução do meio. Ajustava-se o pH em 6,0, sendo o meio, a seguir, distribuído em volumes de 3 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Em seguida, os tubos eram mantidos em posição inclinada e em temperatura ambiente. Após solidificação do agar, o meio era conservado em geladeira a 4°C.

AGAR TRÍPLICE AÇÚCAR-FERRO⁵⁸ (Difco 0265)

A 1000 ml de água destilada acrescentavam-se 65g de agar tríplice açúcar-ferro desidratado, sendo a mistura aquecida até completa dissolução do meio. Ajustava-se o pH em 7,4, sendo o meio, a seguir, distribuído em volumes de 4 ml em tubos de ensaio de 12 x 120 mm e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram

mantidos em temperatura ambiente e em posição inclinada de forma a se ter, após a solidificação, o ápice inclinado e a base com 3 cm de altura, aproximadamente. Este meio era conservado em geladeira a 4°C.

AGAR FENIL ALANINA³¹ (Difco 0745)

A 1000 ml de água destilada acrescentavam-se 23g do meio desidratado, sendo a mistura aquecida até completa dissolução do meio. Ajustava-se o pH em 7,3, sendo o meio, a seguir, distribuído em volumes de 3 ml em tubos de ensaio 13 x 100 mm e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos em temperatura ambiente, em posição inclinada, até solidificação do meio, sendo posteriormente colocados em geladeira a 4°C.

AGAR PARA PROVA DE MOTILIDADE⁵⁸ (Difco 0869)

Em 1000 ml de água destilada eram dissolvidos - por aquecimento, 81,4 g do meio desidratado "Bacto-Motility GI Medium". Ajustava-se o pH em 7,2, sendo o meio, a seguir, distribuído em volumes de 3 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização os tubos eram mantidos em posição vertical, em temperatura ambiente, até a solidificação do meio. Os tubos eram posteriormente, colocados em geladeira a 4°C.

MEIO DE URÉIA (Merck art. 8492)

Seguindo instruções do fabricante, em 950 ml de água destilada eram dissolvidos, por aquecimento, 21 g de "Urea agar (base)" desidratado. Ajustava-se o pH em 6,8 e procedia-se a esterilização do meio em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, o meio era resfriado a 55°C e adicionado de 50 ml de solução de uréia 40%, esterilizada por filtração em filtro Seitz. Logo a seguir, o meio era distribuído em volumes de 3 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm, os quais eram mantidos em posição inclinada, em temperatura ambiente, até a solidificação do agar. Os tubos, posteriormente, eram colocados em geladeira a 4°C.

CALDO COM CARBOIDRATO (EDWARDS & EWING³⁴, 1972, com modificação)

MEIO BASE

Peptona	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Glicose	10 g
Indicador Andrade	10 ml

A 1000 ml de água destilada eram dissolvidos por aquecimento os ingredientes do meio base. Ajustava-se o pH em 7,2 e em seguida o caldo era distribuído em volumes de 4 ml em tubos de ensaio de 12 x 120 mm com tubos de Durham, sendo posteriormente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização o caldo era resfriado e mantido em geladeira a 4°C.

CALDO COM CARBOIDRATO (EDWARDS & EWING³⁴, 1972, com modificação)

MEIO BASE

Peptona	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Lactose	10 g
Indicador Andrade	10 ml

A 1000 ml de água destilada eram dissolvidos por aquecimento os ingredientes do meio base. Ajustava-se o pH em 7,2 e em seguida o caldo era distribuído em volumes de 2 ml em tubos de ensaio de 12 x 100 mm, sendo posteriormente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização o caldo era resfriado e mantido em geladeira a 4°C.

CALDO LISINA⁵⁸ (Difco 0890)

A 1000 ml de água destilada eram dissolvidos - 10,5 g do meio desidratado "Decarboxylase base Moeller" e 10 g de L-lisina e o pH ajustado em 6,2. A seguir o meio era distribuído em volumes de 3 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm e esterilizado em autoclave a 121°C por 10 minutos. Após a esterilização este meio era conservado em geladeira a 4°C.

AGAR PARA A MANUTENÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS (agar estoque)

Peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Agar	15,0 g

Estes ingredientes eram dissolvidos em 1000 ml de água destilada, sendo o pH, a seguir, ajustado em 7,4. O meio era distribuído em volumes de 3 ml em tubos de ensaio de 13 x 100 mm e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Logo após a esterilização os tubos eram mantidos em temperatura ambiente em posição inclinada até solidificação do meio e, em seguida conservados em geladeira a 4°C.

ÁGUA DE DILUIÇÃO¹⁷

SOLUÇÃO ESTOQUE A

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a. ... 34,0 g
Água destilada 1000 ml

Dissolvia-se o fosfato monopotássico em 500 ml de água destilada e ajustava-se o pH para 7,2 com solução de hidróxido de sódio 1 N, completando-se, a seguir, o volume para 1000 ml com água destilada.

SOLUÇÃO ESTOQUE B

Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a. .. 50,0 g
Água destilada 1000 ml

Dissolvia-se o sulfato de magnésio em 1000 ml de água destilada.

PREPARO DA ÁGUA DE DILUIÇÃO:

Para isto, adicionavam-se 1,25 ml da solução estoque A e 5 ml da solução estoque B a 1000 ml de água desti

lada. Em seguida, esta solução era distribuída em frascos, em quantidades que após autoclavação a 121°C por 15 minutos, assegurassem volumes de 90 ± 2 ml.

CALDO LACTOSADO CONCENTRAÇÃO SIMPLES¹⁷ (Difco 0004)

Em 1000 ml de água destilada eram dissolvidos, por aquecimento, 13 g do produto desidratado. O meio era distribuído em volumes de 10 ml em tubos de ensaio de 16 x 150mm, contendo em seu interior tubos de Durham, e, a seguir esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. O pH final do meio era de 6,9.

CALDO LACTOSADO CONCENTRAÇÃO DUPLA¹⁷ (Difco 0004)

Este meio era preparado da mesma forma que o anterior, porém empregando-se o dobro da quantidade de meio desidratado e tubos de ensaio de 18 x 180 mm, e o pH final de 6,7.

MEIO E.C.¹⁷ (Difco 0314)

Em 1000 ml de água destilada eram dissolvidos, mediante aquecimento, 37 do produto desidratado. Em seguida, o meio era distribuído em volumes de 5 ml em tubos de ensaio de 12 x 120 mm, contendo tubos de Durham e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. O pH final do meio era de 6,9.