



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÁDYRA JERÔNIMO DA SILVA

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Salmonella enterica* EM AMOSTRAS DE ÁGUA

AREIA
2023

NÁDYRA JERÔNIMO DA SILVA

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Salmonella enterica* EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira.

AREIA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586m Silva, Nádyra Jerônimo da.

Métodos de detecção de Salmonella enterica em
amostras de água / Nádyra Jerônimo da Silva. -
Areia:UFPB/CCA, 2023.

31 f. : il.

Orientação: Celso José Bruno de Oliveira.
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Medicina veterinária. 2. Meio de cultura. 3.
Teste bioquímico. 4. Identificação molecular. I.
Oliveira, Celso José Bruno de. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(02)

NÁDYRA JERÔNIMO DA SILVA

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Salmonella enterica* EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso em Medicina
Veterinária da Universidade Federal da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Medicina
Veterinária.

Aprovado em: 15/06/2023.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira
Orientador – UFPB



Documento assinado digitalmente
ALAN DOUGLAS DE LIMA ROCHA
Data: 21/06/2023 10:03:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Alan Douglas de Lima Rocha.
Examinador – UFPB



Dr. Gustavo Felipe Correia Sales
Examinador – UFPB

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosa e Pedro, por me amarem, acreditarem no meu potencial, me apoiarem e compreenderem a minha ausência durante os últimos anos. Mainha, a sua força, incentivo, carinho e amizade, foram meu combustível durante muitos dias.

Aos meus irmãos Célia, Janda, Manoel, Cadu e Mica, pela amizade, carinho, incentivo e por estarem presentes, mesmo com a distância física.

Aos meus sobrinhos, Miguel, Enzo, Pedro, Sarah e Jasmim, por me alegrarem e compartilharem amor de uma forma tão genuína, que eu definitivamente não teria conseguido sem vocês. Poder estar presente e incentivar vocês a estudar e enxergar o mundo de uma forma diferente, é o que me move diariamente.

Aos meus amigos Luayne e Gustavo, que eu tanto admiro e foram meus maiores incentivadores e companheiros durante minha vivência em Areia. Recordarei com carinho de todos os bons momentos e irei levar todos os conhecimentos que adquirimos juntos. A rotina foi menos pesada porque tinha vocês.

A John e Matheus, companheiros de café e estudo durante tantas madrugadas, levarei a amizade e o carinho de vocês para sempre.

Aos amigos que estiveram ao meu lado me incentivando e proporcionando bons momentos em meio a rotina corrida, Rafa, Gabi, Nayanne, Naylson, Ilda, Bárbara, Vítor, Irber, Ermerson, Edson e tantos outros que foram importantes nessa caminhada, agradeço de coração.

Aos meus colegas de turma, por compartilharem tantas experiências e conhecimentos e por terem crescido junto comigo durante o curso.

A equipe do Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA), aos técnicos Juliana e Berg, a Elma, Alan, Letícia, Almy, Thalís, Dani, Laiorayne, Valéria, Willyane, Nathan, e a todos que contribuíram com a minha formação, me auxiliaram na rotina e que participaram, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho.

Aos professores e técnicos, que me orientaram durante o curso, em especial meu orientador de pesquisa e TCC Prof. Celso, pela ajuda, correções, ensinamentos e paciência que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional.

A todos os professores do Curso de Medicina Veterinária pelo exemplo e conhecimento transmitido. Foi uma honra ter vocês como mestres.

Aos funcionários do Centro de Ciências Agrárias por todo o apoio e por terem contribuído com a minha formação, em especial Seu Expedito, pela disponibilidade e auxílio durante o curso.

As pessoas que convivi ao longo desses anos de curso, que mesmo não citados aqui, me incentivaram e tiveram impacto na minha formação acadêmica, muito obrigada.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a frequência de *Salmonella enterica* em águas superficiais de interesse agropecuário no estado da Paraíba e comparar a eficácia dos caldos de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis-RV e tetracionato-TT e ágares seletivos xilose lisina tergitol 4-XLT-4, bismuto sulfito-BS e Hektoen entérico-HE no isolamento de *Salmonella enterica*. Foram coletadas amostras de 29 pontos, incluindo açudes e rios com proximidade a alguma atividade agropecuária, em 9 municípios do estado da Paraíba durante 4 meses consecutivos, através de técnica de swab modificado de Moore (MMS). As etapas para detecção de *Salmonella* spp. incluíram o pré enriquecimento com água peptonada, enriquecimento seletivo através dos caldos RV e TT, plaqueamento nos meios de cultura seletivos XLT-4, HE e BS, e semeadura das colônias selecionadas no ágar triplo açúcar ferro e no ágar lisina ferro para confirmação bioquímica. A frequência de *Salmonella enterica* em amostras de água foi de 81,9%. Os resultados obtidos demonstram uma maior recuperação do caldo RV, com 75% das amostras positivas, em comparação a 56% do TT. Quanto aos meios de cultura seletivos, quando o isolamento foi avaliado a partir de um caldo específico, o XLT-4 resultou em maior número de amostras positivas, seguido do HE e do BS, nos dois caldos de enriquecimento, com diferença significativa no isolamento a partir do caldo TT, onde foram avaliadas 59 amostras positivas para o meio XLT-4, 29 para o HE e 26 para o BS. Os resultados do presente estudo demonstram elevada frequência de *Salmonella enterica* em amostras de águas superficiais em reservatórios hídricos da Paraíba e indicam a necessidade de utilização de mais de um caldo de enriquecimento seletivo e ágares seletivos para o isolamento do agente.

Palavras-Chave: meio de cultura; teste bioquímico; identificação molecular.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the frequency of *Salmonella enterica* in surface waters of agricultural interest in the state of Paraíba and to compare the effectiveness of the selective enrichment broths Rappaport-Vassiliadis-RV and tetrathionate-TT and selective agars (xylose lysine tergitol 4-XLT -4, bismuth sulphite-BS and enteric Hektoen-HE in the isolation of *Salmonella enterica*. Samples were collected from 29 points, including dams and rivers close to some agricultural activity, in 9 municipalities of the state of Paraíba during 4 consecutive months, through Moore's modified swab technique (MMS). The steps for detection of *Salmonella* spp. included pre-enrichment with peptone water, selective enrichment through RV and TT broths, plating on XLT-4, HE and BS selective culture media, and sowing of selected colonies on triple sugar iron agar and lysine iron agar for biochemical confirmation. The frequency of *Salmonella enterica* in water samples was 81.9%. The results obtained demonstrate a greater recovery of the RV broth, with 75% of the positive samples, compared to 56% of the TT. As for the selective culture media, when isolation was evaluated from a specific broth, XLT-4 resulted in the highest number of positive samples, followed by HE and BS, in both enrichment broths, with a significant difference in isolation from from TT broth, where 59 positive samples were evaluated for XLT-4 medium, 29 for HE and 26 for BS. The results of the present study demonstrate a high frequency of *Salmonella enterica* in surface water samples from water reservoirs in Paraíba and indicate the need to use more than one selective enrichment broth and selective agars for the isolation of the agent.

Keywords: culture media; biochemical test; molecular identification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Presença de <i>Salmonella</i> spp. quanto aos caldos de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis e Tetracionato.....	20
Figura 2 – Presença de <i>Salmonella</i> spp. de acordo com os meios de cultura seletivos XLT-4, Hekoten enterico e bismuto sulfito, utilizados para isolamento.....	20
Figura 3 – Presença de <i>Salmonella</i> spp. nos meios de cultura XLT-4, Hekoten entérico e bismuto sulfito, a partir dos caldos de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis e Tetracionato.....	21
Figura 4 – Quantidade de isolados recuperados nos diferentes meios de cultura.....	22
Figura 5 – Confirmação molecular das amostras isolados a partir dos meios de cultura seletivos e identificadas por testes bioquímicos.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reservatórios hídricos de coleta das amostras de água na Paraíba.....	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAM	Bacteriological Analytical Manual
BS	bismuto sulfito
FDA	Food and Drug Administration
HE	Hektoen entérico
LIA	ágar lisina ferro
RV	Rappaport-Vassiliadis
TSI	ágar triplo açúcar ferro
TT	Tetracionato
XLT-4	xilose lisina tergitol 4

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	CARACTERÍSTICAS DO AGENTE.....	11
2.2	EPIDEMIOLOGIA E PATOGENICIDADE.....	12
2.3	METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i>	14
3	METODOLOGIA.....	16
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM.....	16
3.2	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE AMOSTRAS.....	18
4	RESULTADOS.....	19
5	DISCUSSÃO.....	23
6	CONCLUSÃO.....	25
	REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Salmonella* spp. pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são caracterizados como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não produtores de esporos, e em maioria, produtores de gás a partir da fermentação da glicose, além de serem móveis, através de flagelos peritríquios, presentes na grande maioria dos sorovares. Bactérias pertencentes a este gênero podem ser encontradas em diferentes habitats e comumente estão presentes na microbiota gastrointestinal de vários animais vertebrados, incluindo o ser humano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; RUBY *et al.*, 2012).

A salmonelose é causada por sorotipos paratíficos de *Salmonella enterica* e constituem uma das principais causas de infecções, associadas ao alimento, em humanos e em animais, afetando a saúde de milhões de pessoas e exigindo investimentos cada vez maiores nos sistemas de produção animal com o objetivo de produzir alimentos seguros (HALEY; COLE; LIPP, 2009).

Vários produtos podem ser contaminados com *Salmonella* spp., como carne de origem suína, bovina, frango, assim como, frutos do mar, ovos e laticínios, principalmente os que possuem níveis elevados de água, proteína e de carboidratos, pois são mais propensos à degradação (SHINOHARA *et al.*, 2008). Além disso, alimentos como frutas e vegetais processados podem disseminar patógenos (UKUKU, 2006).

Reservatórios hídricos contaminados por efluentes de produção animal muitas vezes são utilizados para irrigação de vegetais como castanhas, verduras e frutas. Um número crescente de surtos de salmonelose associado a alimentos irrigados por água contaminada por *Salmonella* spp. tem sido registrado (HARRIS *et al.*, 2003; LIU; WHITEHOUSE; LI, 2018).

A qualidade microbiológica da água na agropecuária é determinante para manter produtos alimentícios seguros. As fontes de águas não residuais que normalmente são consideradas contaminadas com resíduos ou material fecal podem desempenhar um papel importante na contaminação por *Salmonella* e outros microrganismos patogênicos em alimentos (HANNING; NUTT; RICKE, 2009).

As salmonelas parecem possuir os mecanismos para manter a viabilidade e sobreviver com sucesso também em ambientes aquáticos. No estudo realizado por Domingo *et al.* (2000), os autores observaram que em amostras de água de rios, a

Salmonella mostrou-se viável mesmo após 31 dias. Portanto, há necessidade de investigar a ocorrência e diversidade de *Salmonella* em fontes hídricas sob impacto agropecuário.

Os métodos de isolamento convencional de microrganismos são muito utilizados e proporcionam resultados entre quatro a sete dias, podendo apresentar falso-negativos devido à baixa quantidade de bactérias na amostra (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; FEDER *et al.*, 2001). Outras técnicas de identificação vêm sendo pesquisadas, como; imunodifusão, imunoensaios, hibridização do DNA e aglutinação em látex. Além disto, testes como ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), e métodos moleculares como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), diminuem o trabalho e o tempo na avaliação das amostras (BLACKBURN, 1993; BOHAYCHUK *et al.*, 2005).

Mediante o exposto, o presente trabalho teve como objetivo realizar o levantamento da frequência de *Salmonella* spp., através do isolamento convencional de microrganismos, em reservatórios hídricos sob impacto agropecuário da Paraíba, avaliando comparativamente os caldos de enriquecimento seletivo Tetrationato (TT) e Rappaport-Vassiliadis (RV) e os ágaros seletivos xilose lisina tergitol 4 (XLT-4), Bismuto Sulfito (BS) e Hektoen entérico (HE). Após o isolamento dos microrganismos, este estudo teve como objetivo realizar a confirmação molecular das amostras positivas em testes bioquímicos, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DO AGENTE

O gênero *Salmonella* spp., pertencente à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes gram-negativos, não esporulados, a maioria são móveis por possuírem flagelos e são anaeróbios facultativos. A temperatura ótima de multiplicação se encontra entre 35°C e 43°C, sendo classificadas como mesófilos. Quanto ao pH, pode ser observado crescimento em faixas entre 3,8 e 9,4, não possuindo grandes especificações, porém indicadores ótimos estão entre o pH de 7,0 à 7,6 (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; RUBY *et al.*, 2012).

Bioquimicamente são oxidase e indol negativos, catalase positiva, reduzem nitritos e nitratos, produzem gás pela fermentação da glicose e a maior parte dos sorovares produzem ácido sulfídrico (H₂S) por reduzir o enxofre em ágar açúcar ferro (TSI). Não hidrolisam uréia e podem utilizar apenas o citrato como fonte de carbono (ABULREESH, 2012). Sua biossistemática está associada com a composição das suas moléculas de superfície, que são caracterizadas pelos antígenos somáticos (O), os flagelares (H) e os capsulares (Vi) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Esses patógenos estão bastante difundidos na natureza, podendo ser encontrados no ar, no solo, em águas residuais e equipamentos, contudo possui como habitat natural o intestino de animais e seres humanos, especialmente das aves. Possuem resistência a dessecação e sensibilidade a antissépticos como ácidos fênicos, fenol 1%, luz solar e calor (JAY, 2000).

Atualmente são reconhecidas duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A primeira é subdividida em seis subespécies; *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *hutnae* e *indica*, baseado em modificações genômicas e bioquímicas (TINDALL *et al.*, 2005). *Salmonella* é um gênero de microrganismo bastante envolvido em casos e surtos de enfermidades de origem alimentar em vários países (JAY, 2000).

Alguns sorovares de *Salmonella enterica* podem ser específicas para espécies animais, como *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum e sorovar Pullorum, que causam doenças apenas as aves, outros são sorovares zoonóticos, que atingem tanto o ser humano como os animais, como *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Existem também sorovares altamente adaptados ao homem, como *Salmonella enterica* sorovar Paratyphi e *Salmonella enterica* sorovar Typhi (BRASIL, 2011). Dentre os sorovares que desencadeiam episódios de gastroenterite nos seres humanos, o sorovar *Typhimurium* é o que tem sido mais relatado (GERMANO; GERMANO, 2019)

2.2 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENICIDADE

A via de infecção por *Salmonella enterica* ocorre principalmente pela ingestão de água ou alimentos contaminados por conteúdo fecal (GERMANO; GERMANO, 2019).

Sorovares de *Salmonella* são diferentes nos seus hospedeiros e nas enfermidades que causam. A *Salmonella Typhimurium* está presente no trato gastrointestinal de várias espécies, como aves e humanos, e pode desencadear infecções em ovos e carne de frango, diferente do sorovar *Typhi*, que causa doença somente em seres humanos (FORSYTHE, 2013).

A *Salmonella* é capaz de produzir mais 400 proteínas que ocasionam inflamação, possuindo capacidade de provocar gastroenterite mesmo que não estejam dentro da célula intestinal (SRIKANTH *et al.*, 2011).

Na Europa, a *Salmonella* é o segundo agente que mais desencadeia gastroenterite bacteriana, logo após *Campylobacter*, e é responsável por mais de 6 milhões de casos anualmente nos países membros da União Europeia (HAVELAAR *et al.*, 2013)

A maior parte dos casos de infecção por *Salmonella enterica* resulta em gastroenterite autolimitada, com baixa taxa de mortalidade. (MAJOWICZ *et al.*, 2010). O quadro infeccioso depende da virulência do sorovar envolvido, espécie hospedeira e imunidade do indivíduo, podendo se estabelecer sistemicamente, levando a um quadro de septicemia e até óbito (BAUMLER; FANG, 2013).

A qualidade microbiológica da água que é utilizada para atividades agropecuárias é essencial para segurança dos alimentos produzidos nesses ambientes. Surtos de infecções por *Salmonella* tem sido relacionado com o uso da água contaminada para práticas agrícolas (LIU *et al.*, 2018; HARRIS *et al.*, 2003).

A contaminação da água por *Salmonella* pode ser contínua, como por exemplo pelo uso da água reciclada de sistema de produção pecuário (ABULREESH, 2012), ou acontecer devido a situações isoladas por contaminação de origem fecal. Esse agente possui mecanismos que permitem a viabilidade em ambientes aquáticos por diversos meses (LIU *et al.*, 2018, DOMINGO *et al.*, 2000).

A qualidade da água é avaliada a partir de padrões microbiológicos, onde se utiliza de organismos indicadores que, podem não ser patogênicos, mas são relacionados com patógenos, aumentando a probabilidade da presença de potenciais patógenos (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

A qualidade da água de irrigação possui influência microbiana oriunda de atividades agrícolas, insumos humanos, vida selvagem, escoamento de esterco, contaminação fecal direta do gado e de animais de vida livre, transbordamento de lagoas de estrume e locais de armazenamento. As concentrações de microrganismos

na água dependem da troca com fontes contaminadas em contato direto com a água, englobando sedimentos de fundo, perifíton, algas e solos ribeirinhos (PACHEPSKY *et al.*, 2011).

A contaminação de alimentos com patógenos microbianos pode ocorrer por diversos mecanismos, desde a produção, colheita, processamento, transporte e estabelecimentos de venda, até na preparação final em casa (HARRIS *et al.*, 2003).

Um fato que ocorre mundialmente é a baixa notificação de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) pela vigilância sanitária. Em países desenvolvidos, menos de 10% das ocorrências são notificadas, enquanto nos países em desenvolvimento, essa informação provavelmente é abaixo de 1% (FORSYTHE, 2013).

No Brasil, nas últimas décadas, está sendo observado um declínio na morbidade e mortalidade causada pela *Salmonella*. Contudo, devido à dificuldade de diagnóstico para identificação do agente e acesso aos serviços de saúde, além do uso precoce de antibióticos em casos clínicos indefinidos, esses dados devem ser considerados com cautela (BRASIL, 2005).

2.3 METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE *SALMONELLA*

O crescimento de microrganismos depende de vários fatores como temperatura, pH, pressão osmótica, presença de carbono e de nutrientes necessários para seu desenvolvimento e síntese de material celular. A escolha do meio de cultura mais adequado para isolamento de um microrganismo deve ser feita levando em consideração a capacidade de inibir o crescimento de bactérias competidoras e possuir componentes que favoreçam o microrganismo de interesse (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017)

O processo para isolamento e identificação de exemplares do gênero *Salmonella* seguem um passo a passo, incluindo etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento direto (seletivo), plaqueamento, análise bioquímica e avaliação sorológica (LITCHFIELD; INSALATA, 1973).

O pré enriquecimento é uma etapa importante na detecção de amostras com baixos níveis de *Salmonella*, como alimentos ou água, tanto para execução de

técnicas de isolamento convencional, como métodos moleculares. O objetivo é de aumentar o número de células-alvo e auxiliar na recuperação de organismos danificados (MALORNY *et al.*, 2008).

O enriquecimento seletivo é um processo que favorece o crescimento de um grupo específico de bactéria, quando existe várias espécies na mesma amostra. Para a detecção de *Salmonella* spp. os meios líquidos seletivos mais utilizados são os caldos Tetrationato, selenito cistina e Rappaport-Vassiliadis (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Existem várias condições que limitam o isolamento de *Salmonella*, abrangendo a quantidade de microrganismos em relação aos competidores, os diferentes meios de cultura, os materiais analisados, a temperatura e o período de incubação (ALBUQUERQUE; ITO; MIYAJI, 2000).

Podem ser utilizados vários meios seletivos no isolamento de *Salmonella* spp., que compreende ágar MacConkey, ágar Levine eosina azul, ágar *Salmonella-Shigella*, ágar xilose lisina deoxicolato, ágar verde brilhante, ágar bismuto sulfito, ágar Hektoen enterico, ágar xilose lisina tergitol 4, entre outros (PAULA, 2002).

O uso do ágar xilose lisina tergitol 4 (XLT4) é indicado para o isolamento de *Salmonella* a partir de fezes, sendo esse meio exclusivo para *Salmonella* (HARA-KUDO *et al.*, 2001; MILLER *et al.*, 1991; MILLER; TATE; MALLINSON, 1994), evitando a presença de competidores, especialmente *Proteus* spp. Quanto aos caldos de enriquecimento seletivo, a combinação de dois ou mais meios de plaqueamento proporcionam melhores resultados (RALL *et al.*, 2005).

O ágar bismuto sulfito é recomendado para detecção de todos os tipos de *Salmonella*, especialmente *Salmonella Typhi*. Pode ser utilizado para detecção de *Salmonella* a partir de várias amostras, como alimentos, água, fezes, urina e possui características em sua composição que inibe o crescimento de bactérias gram-positivas e agentes do grupo coliforme (BRASIL, 2011).

O ágar Hektoen possui sais biliares que tornam o meio seletivo, inibem bactérias gram-positivas e reduzem algumas espécies de gram-negativas, com exceção de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp., no entanto, colônias de *Citrobacter freundii* e *Proteus* spp. podem apresentar características de crescimento semelhantes a *Salmonella* nesse meio de cultivo, devido a produção de H₂S (PARK; RYU; KANG, 2012).

Para confirmação bioquímica das colônias típicas de *Salmonella*, realiza-se a semeadura em ágar específicos, como ágar lisina ferro (LIA), ágar triplo açúcar ferro (TSI), que são testes de descarboxilação da lisina, fermentação da lactose e/ou sacarose e produção de H₂S, e ágar citrato de Simmons, que diferencia *Enterobacteriaceae* através da utilização do citrato, onde a *Salmonella* se classifica como positiva, com exceção de *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi* (SILVA et al., 2017; SILVA, 2012).

O método sorológico pode ser utilizado após o isolamento das colônias ou após teste bioquímico, geralmente é disponibilizado na forma de kit com a presença de anticorpos contra antígenos flagelar (H), somático (O) e capsulares (Vi) para identificação de *Salmonella*. A leitura da presença de aglutinação é feita em lâmina ou placa de vidro (ZEE; VELD, 2000).

O uso de um método baseado em PCR para fins de diagnóstico de rotina em um grande número de amostras apresenta várias demandas específicas, como velocidade, facilidade de uso e ausência de resultados falso-positivos ou falso-negativos (OLIVEIRA et al., 2007).

Muitos trabalhos têm provado que a PCR é mais sensível que o método convencional (LÖFSTRÖM et al., 2004; MYINT et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2003), tendo em vista que essa reação permite à amplificação de uma região específica do genoma de qualquer microrganismo, facilitando a análise genética. Além desses fatores, é uma técnica rápida e fácil execução, conseguindo analisar muitas amostras ao mesmo tempo.

Uma limitação para o uso da PCR para detecção de *Salmonella* é que, apesar do número de estudos de validação relatados na literatura, existem poucos estudos que relatam a sensibilidade e especificidade da PCR para a detecção de *Salmonella* em amostras naturalmente contaminadas e sem enriquecimento seletivo (OLIVEIRA et al., 2003).

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

Foram coletadas amostras de água de superfície, em triplicata, de 29 pontos hídricos nos municípios de Areia (1), Araçagi (2), Bananeiras (3), Boqueirão (4), Itatuba (5), Sousa (6), Coremas (7 e 8), Condado (9) e Cajazeiras (10), localizados no Estado da Paraíba, os quais incluíram açudes e rios em proximidade com alguma atividade agropecuária (Tabela 1). De cada ponto hídrico, foram realizadas amostragens mensais, durante 4 meses consecutivos, totalizando 348 amostras.

Tabela 1 - Reservatórios hídricos de coleta das amostras de água na Paraíba

Reserva Hídrica	Capacidade Máxima (m³)	Volume Atual (m³)	Volume Parcial (%)
1	9.833.615	5.028.896	51,14
2	63.289.037	43.591.096	68,88
3	10.032.266	497.933	4,96
4	466.525.964	172.141.844	36,90
5	253.000.000	33.146.040	13,10
6	40.582.277	20.296.877	50,01
7	744.144.694	355.651.865	47,79
8	545.017.499	260.134.307	47,73
9	36.834.375	15.086.083	40,96
10	293.617.376	91.729.495	31,24

Fonte: AESA, 2021

No momento da amostragem, foram colhidas as seguintes informações: a data de coleta; o tipo de amostra ambiental; o endereço e as coordenadas geográficas por GPS.

Para a coleta foi utilizado um dispositivo de filtração denominado Swab Modificado de Moore (SMM), segundo a metodologia de Sbodio *et al.* (2013). Foi realizada a esterilização do cassete contendo o SMM em autoclave, antes da filtração. O cassete foi acoplado à uma bomba peristáltica por um tubo de silicone

estéril. A velocidade da bomba foi regulada para 0,5 L/min, e a filtração realizada durante 20 minutos. As amostras foram coletadas em triplicata.

3.2 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE AMOSTRAS

O isolamento de *Salmonella* foi realizado conforme a versão modificada do FDA-BAM (ANDREWS *et al.*, 2014). Os swabs foram colocados em um vidro individual de amostragem contendo 250 mL de água peptonada e incubados por 37 ± 1 °C por 24 h.

Após período de incubação, a parte líquida da amostra foi dividida em duas alíquotas. A primeira, de 0,1 mL, foi transferida para um tubo de ensaio com 10 mL do caldo de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis (RV) e a segunda, de 1 mL, foi adicionada em tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo Tetrationato (TT). Ambas foram incubadas em banho-maria a 42,5°C por 24 h.

A partir dos caldos RV e TT foi realizado a semeadura em placas de Petri, utilizando alça de platina, com os seguintes ágaros seletivos: XLT-4, Hektoen entérico (HE) e bismuto sulfito (BS). Em seguida, incubados a 37 ± 1 °C por 24h. Três colônias típicas de cada ágar foram semeadas em ágar triplo açúcar ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA) para confirmação bioquímica. Os resultados positivos foram semeados do LIA em ágar tripton de soja (TSA) para posterior extração de DNA e avaliação molecular.

A confirmação molecular foi realizada por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A extração de DNA foi realizada pela adaptação do método de fervura descrito por Ahmed e Dablood (2017). Foi centrifugado a 12.000 RPM por 2 minutos 100µl de água ultrapura (UltraPure™ DNase/RNase) contendo uma quantidade de massa bacteriana adicionada através de alça bacteriana. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 800µl de água ultrapura e centrifugado novamente a 12.000 RPM durante 2 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 200µl de água ultrapura e aquecido durante 10 minutos a 95°C. Após esse período, foi realizado uma nova centrifugação, na mesma velocidade e tempo supracitados, transferindo 100µl do sobrenadante para um novo tubo. Foi utilizado primer específico para a detecção de *Salmonella*; *invA* (forward: 5' - GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA - 3' e

reverse: 5' - TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C -3'). A reação de PCR foi preparada na concentração de 25 mM MgCl₂a, 2,5 U de Taq DNA Polimerase, 10 mM de cada Dntp, 10 µM de primer forward e reverse, 5 ng de DNA e 10X Taq Buffer (livre de Mg²⁺) e 17,25µL água destilada ultrapura, totalizando 25µl de volume final. A amplificação do DNA foi realizada no termociclador BIOMETRA T-ADVANCED, ajustada para realizar o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos compostos por um período de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, um período de anelamento a 60°C por 15 segundos, um período de extensão a 72 °C por 2 minutos e 20 segundos e finalizando com um período de extensão a 72 °C por 5 minutos.

A visualização dos produtos da PCR foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com SYBR Safe DNA GelStain concentrado 10.000X em DMSO. As condições de corrida foram ajustadas para 80 V por 40 minutos em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 1x. A presença ou ausência de amplicons foi analisada visualmente sob luz ultravioleta, com auxílio de fotodocumentador.

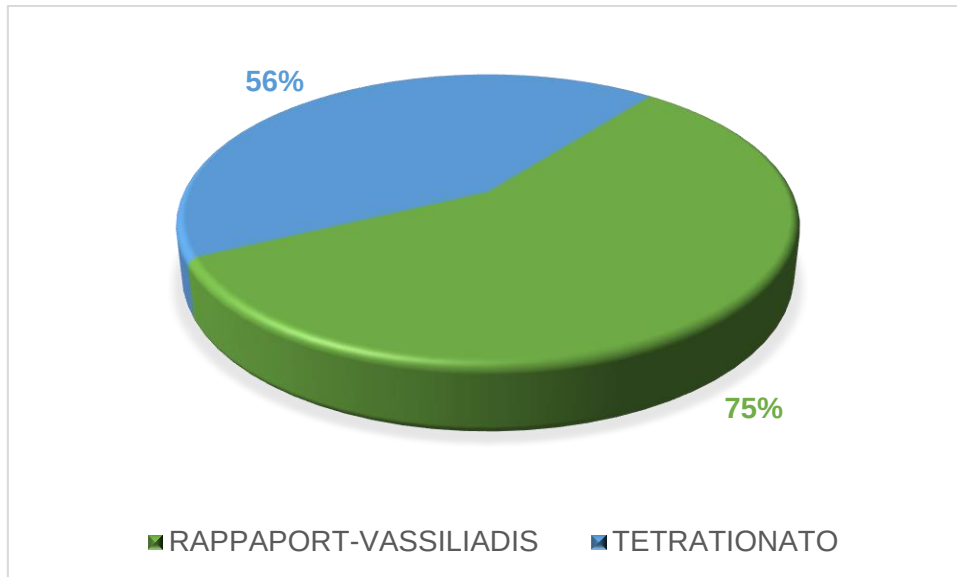
As colônias isoladas, preferencialmente três por amostra, foram colocadas em tubos de ensaio contendo 1,5 mL de caldo brain heart infusion (BHI) com glicerol a 20% e incubadas a 37± 1°C por 24 horas. Após o período de incubação foram acondicionadas em ultracongelador a – 80°C.

4 RESULTADOS

Das amostras de água avaliadas para detecção de *Salmonella* spp., foram obtidas 1.139 amostras positivas a partir de técnicas de isolamento convencional, de diferentes açudes e rios no estado da Paraíba.

Com os dados obtidos é possível observar (Figura 1) que das 116 amostras coletadas durante os 4 meses, 75% foram positivas para *Salmonella* spp. a partir do caldo RV, totalizando 87 amostras. Enquanto o Caldo TT teve um crescimento em 56% do total de amostras, totalizando 65 amostras positivas.

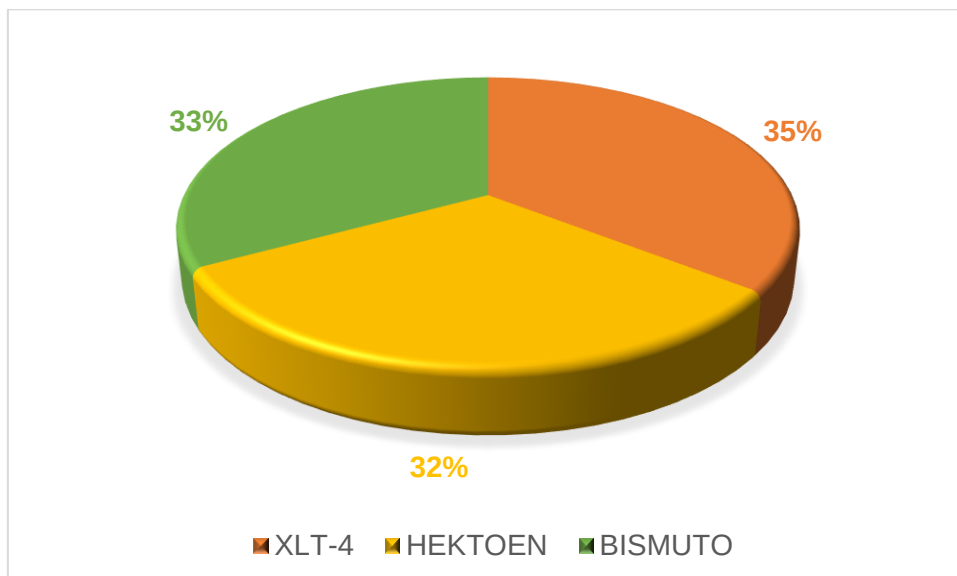
Figura 1 - Presença de *Salmonella* spp. quanto aos caldos de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis e Tetrationato



Fonte: Autoral, 2023.

A presença de *Salmonella* nos meios de cultura utilizados para isolamento obteve valores semelhantes quando a presença de *Salmonella* foi avaliada sem levar em consideração o caldo de enriquecimento utilizado, não havendo diferença no número de amostras positivas entre os meios de cultura (Figura 2).

Figura 2 - Presença de *Salmonella* spp. de acordo com os meios de cultura seletivos XLT-4, Hektoen entérico e bismuto sulfito, utilizados para isolamento

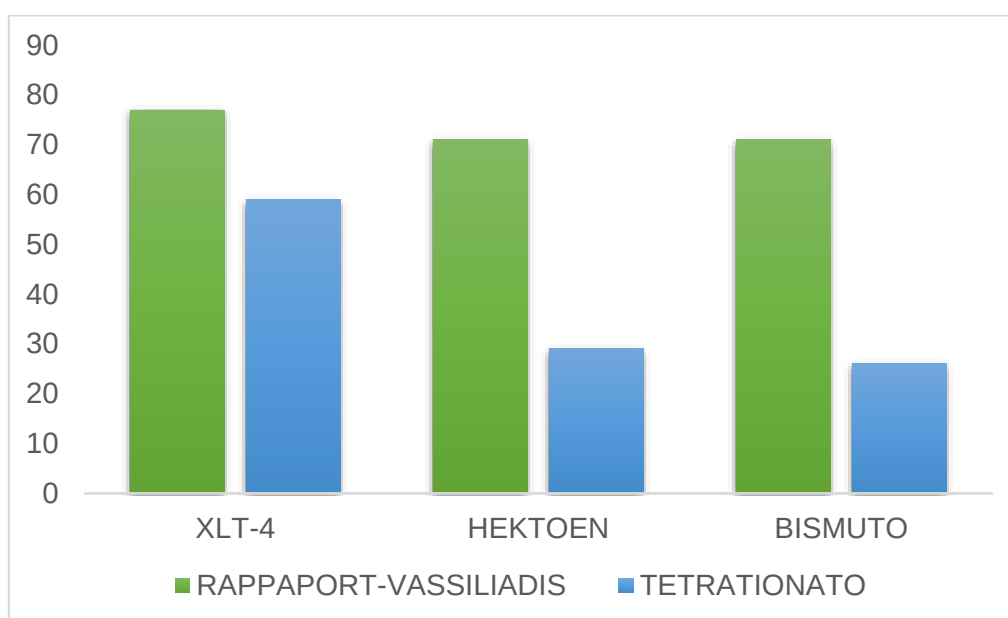


Fonte: Autoral, 2023.

Em contrapartida, quando avaliado o crescimento nos meios de cultura a partir de um caldo de enriquecimento específico, valores descritos na figura 3, podemos

observar uma maior recuperação desses microrganismos a partir do caldo de enriquecimento RV em todos os meios de cultura utilizados para o isolamento, com porcentagens de recuperação acima de 62%. Além disso, a partir do caldo TT, houve uma maior presença de *Salmonella* spp. no meio de cultura XLT-4, com 59 amostras positivas, seguidas por 29 amostras do meio de cultura Hektoen entérico e 26 amostras do bismuto sulfito.

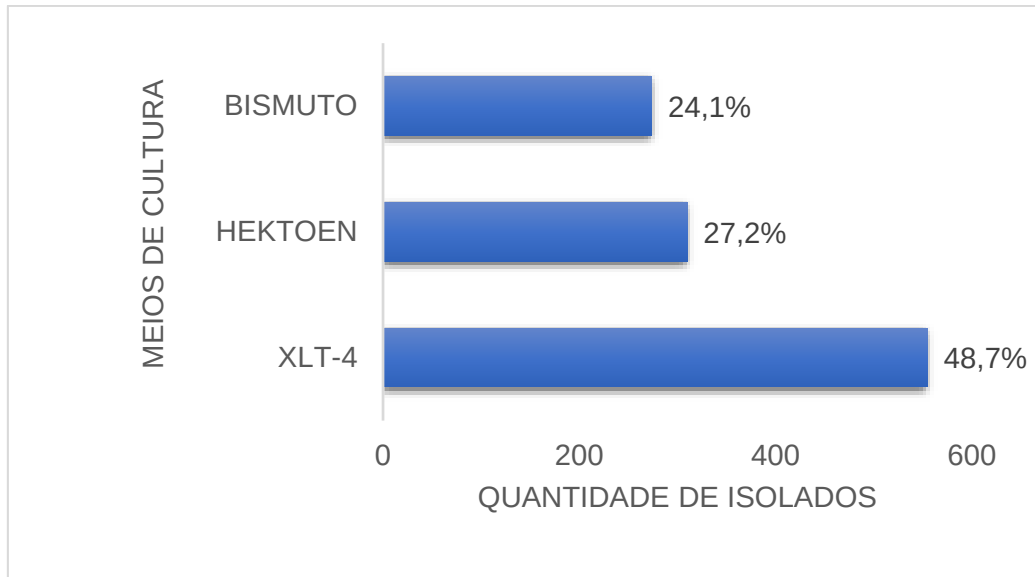
Figura 3 - Presença de *Salmonella* spp. nos meios de cultura XLT-4, Hektoen enterico e bismuto sulfito, a partir dos caldos de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis e Tetrionato



Fonte: Autoral, 2023.

Observa-se na figura 4 que no meio de cultura XLT-4 foi recuperado a maior quantidade de isolados confirmados pela PCR, totalizando 555 amostras, 48,7% do total, enquanto o Hektoen e o bismuto obtiveram porcentagens semelhantes, com isolamento de 310 amostras (27,2%) e 274 amostras (24,1%), respectivamente.

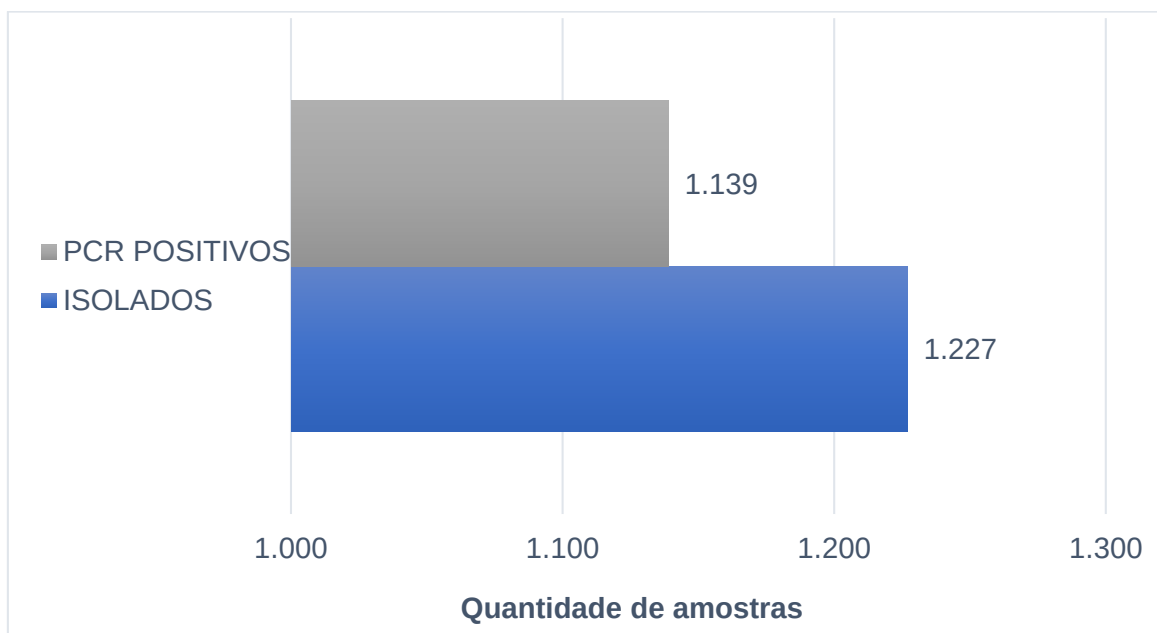
Figura 4 - Quantidade de isolados recuperados nos diferentes meios de cultura



Fonte: Autoral, 2023.

A figura 5 descreve a quantidade de isolados positivos no teste bioquímico e a quantidade de amostras positivas para *Salmonella* spp. pelo método da PCR. Foi possível observar uma confirmação molecular de 92,8% dos isolados, equivalente a 1.139 amostras, do total de 1.227 isolados positivos no teste bioquímico.

Figura 5 - Confirmação molecular das amostras isolados a partir dos meios de cultura seletivos e identificadas por testes bioquímicos



Fonte: Autoral, 2023.

5 DISCUSSÃO

A seleção do procedimento laboratorial mais adequado é indispensável para o isolamento de todos os microrganismos, tendo em vista que existem várias condições que influenciam na recuperação e desenvolvimento desses agentes.

Águas de superfícies estão mais expostas a contaminação, em comparação a águas subterrâneas (GERBA, 2009). Os rios têm sido amplamente utilizados como fonte de irrigação para práticas agrícolas, no entanto, a água tem se mostrado um dos maiores reservatórios de *Salmonella* (BAUDART *et al.*, 2009). Além da capacidade de sobrevivência de *Salmonella* em ambiente aquático, LI *et al.* (2014), sugeriram que a detecção frequente de *Salmonella* na água de irrigação pode ser devido a numerosos eventos de reintrodução de diferentes hospedeiros no ambiente.

No presente estudo foi utilizado como fonte de pré-enriquecimento a água peptonada, que é um meio de cultura que permite o crescimento de todas as bactérias presentes em uma determinada amostra e é amplamente utilizada para a detecção de *Salmonella* em análises de alimentos.

É possível concluir com base na literatura que a utilização de mais de um caldo seletivo pode aumentar a recuperação de salmonelas (ALBUQUERQUE; ITO; MIYAJI, 2000; HAMMACK *et al.*, 1999; PAIVA *et al.*, 2006). Através dos resultados do presente trabalho, verificou-se uma maior recuperação de salmonelas pelo caldo de enriquecimento RV, em comparação ao caldo TT. Esse resultado corrobora com as informações descritas por Andrews *et al.* (2014), no FDA- BAM, indicando que o RV é um meio adequado para o crescimento de diversos sorovares de *Salmonella* spp, diferente do caldo TT, que possui uma maior seletividade.

A composição do caldo RV, associa cloreto de magnésio com o corante verde malaquita, que atuam na inibição de bactérias competidoras, além disto, o meio é composto por peptona de soja que auxilia no crescimento da maior parte dos sorovares de *Salmonella* spp., exceto *S. Typhi* (BRASIL, 2011). Em contrapartida, o caldo de enriquecimento TT possui uma maior seletividade, tendo em vista que para que um microrganismo tenha a capacidade de crescer nesse caldo, é necessário que este seja capaz de produzir a enzima tetracionato-redutase, e alguns sorovares de *Salmonella* como Choleraesuis, Typhisuis, Gallinarum e Pullorum, não produzem (DUARTE *et al.*, 2016).

Embora o caldo RV tenha tido um maior sucesso quantitativo, sem que haja a identificação dos sorovares isolados pelos dois caldos de enriquecimento, não é possível afirmar que um protocolo utilizando exclusivamente o caldo RV seja suficiente para identificar todos os sorovares de *Salmonella* presentes em uma determinada amostra.

Segundo a pesquisa de Hammack *et al.* (1999), a associação do TT e RV como meios de enriquecimento seletivo, é a metodologia mais eficaz para ser utilizada com amostras que possuem uma baixa carga microbiana.

Houve um maior crescimento de isolados no meio de cultura XLT-4 em relação aos demais, possuindo melhor seletividade e conseqüentemente maior detecção de *Salmonella* spp. Esse resultado está de acordo com Michael *et al.* (2003), que conseguiu aumentar a detecção e recuperação de *Salmonella* utilizando este meio para o cultivo, principalmente em amostras que foram cultivadas a partir de um enriquecimento seletivo. Budiati *et al.* (2011), também obtiveram maior taxa de crescimento do ágar XLT-4 (80%) em relação ao ágar bismuto sulfito (40%) em amostras de corpo inteiro e intestino de peixe-gato, constatando uma maior sensibilidade do primeiro meio de cultura.

O ágar XLT-4 é um meio seletivo para isolamento de *Salmonella* não-typhi e diferenciação de microrganismos intestinais. Nesse meio, bactérias do gênero *Salmonella* fermentam a xilose, descarboxilam a lisina e produzem H₂S. Além da composição do meio possuir componentes que favorecem o isolamento de *Salmonella*, este meio possui também componentes que inibem o crescimento de *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Providencia* spp., entre outros, porém, pode haver crescimento de outros microrganismos como *Citrobacter* e *Escherichia coli*, sendo importante realizar a identificação baseada na seletividade e características das colônias (MILLER *et al.*, 1991).

Na avaliação de amostra de fezes desenvolvida por Dusch e Altwegg (1995) o XLT-4 apresentou sensibilidade comparável à do HE e quase 100% de especificidade, tanto no plaqueamento direto, como após o enriquecimento com o caldo tetrationato, correspondendo a 32,9 e 86,6%, respectivamente, para XLT4 e 34,1 e 79,3%, respectivamente, para HE, discordando do resultado obtido na presente pesquisa.

O desenvolvimento de técnicas e protocolos que facilitam e aceleram a detecção de *Salmonella* é essencial para a detecção de *Salmonella enterica* e para realizar medidas de prevenção e controle de surtos relacionados a água e alimentos.

6 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados no presente estudo, a investigação da qualidade microbiológica de águas superficiais utilizadas com interesse agropecuário, é essencial para diminuir os surtos relacionados a doenças de origem alimentar. Os resultados também demonstram um maior isolamento de microrganismos no caldo de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis, em comparação ao Tetracionato, e maior quantidade de isolados provenientes do meio de cultura XLT-4. Foram obtidos uma confirmação molecular, através da PCR, de 92,8% das amostras positivas através do teste bioquímico. É importante ressaltar a dificuldade de definir apenas um caldo de enriquecimento ou meio de cultura seletivo, já que cada meio possui uma composição diferente, beneficiando sorovares específicos, reforçando dessa forma a ideia de que o melhor protocolo inclui a associação de dois ou mais caldos de enriquecimento e meios de plaqueamento.

REFERÊNCIAS

- ABULREESH, H. H. Salmonellae in the Environment. In: ANNOUS, B.; GURTLE, J. B. (Eds.). . **Salmonella - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies**. 1. ed. [s.l.] InTech, 2012. p. 19–50. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-distribution-adaptation-control-measures-and-molecular-technologies/salmonellae-in-the-environment>. Acesso em: 30 de abr de 2023.
- ALBUQUERQUE, R. DE; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Estudo comparativo de diferentes meios de cultura para o isolamento de salmonelas em matérias-primas e rações. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 1, p. 00–00, 2000. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/issue/view/5852>. Acesso em: 14 de abr de 2023.
- AHMED, O. B.; DABLOOL, A. S. Quality Improvement of the DNA extracted by boiling method in Gram negative bacteria. **International Journal of Bioassays**, v. 6, n. 4, p. 5347, 2 abr. 2017. Disponível em: <https://www.ijbio.com/articles/quality-improvement-of-the-dna-extracted-by-boiling-method-in-gram-negative-bacteria.pdf>. Acesso em: 23 de maio de 2023.
- ANDREWS, W. H. et al. Salmonella. In: **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. [s.l.] FDA U. S. Food & Drug, 2014. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>. Acesso em: 13 de fev de 2023.
- ASHBOLT, N. J.; GRABOW, W. O. K.; SNOZZI, M. Indicators of microbial water quality. In: FEWTRELL, L.; BARTRAM, J. (Eds.). . **Water Quality: Guidelines, Standards and Health**. London, UK: IWA Publishing, 2001. p. 289–308. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/252756462_Indicators_of_microbial_water_quality. Acesso em: 17 de maio de 2023.
- BAUDART, J. et al. Diversity of Salmonella Strains Isolated from the Aquatic Environment as Determined by Serotyping and Amplification of the Ribosomal DNA Spacer Regions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1544–1552, abr. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92021/>. Acesso em: 20 de maio de 2023.
- BAUMLER, A.; FANG, F. C. Host Specificity of Bacterial Pathogens. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 12, p. a010041–a010041, 1 dez. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3839602/>. Acesso em: 10 de maio de 2023.
- BLACKBURN, C. DE W. Rapid and alternative methods for the detection of salmonellas in foods. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 3, p. 199–214, set. 1993. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article/75/3/199/6722848>. Acesso em: 20 de maio de 2023.
- BOHAYCHUK, V. M. et al. Evaluation of Detection Methods for Screening Meat and Poultry Products for the Presence of Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 12, p. 2637–2647, dez. 2005. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0362028X22012601> Acesso em: 10 de maio de 2023.

BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. ed. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf. Acesso em: 20 de maio de 2023.

BRASIL. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp.** 1. ed. Brasília-DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_laboratorial_salmonella_spp.pdf. Acesso em: 08 de fev de 2023.

BUDIATI, T. et al. **Prevalence of Salmonella spp. from Catfish (Clarias gariepinus) by using improvement isolation methods**. International Conference on Asia Agriculture and Animal. **Anais...** Singapore: IACSIT Press, 2011. Disponível em: <https://docplayer.net/63122265-Prevalence-of-salmonella-spp-from-catfish-clarias-gariepinus-by-using-improvement-isolation-methods.html>. Acesso em: 17 de maio de 2023.

DOMINGO, J. W. S.; HARMON, S.; BENNETT, J. Survival of Salmonella Species in River Water. **Current Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 409–417, 30 jun. 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002840010079>. Acesso em: 23 de maio de 2023.

DUARTE, S. C. et al. **Guia ilustrado para isolamento de Salmonella spp de origem avícola**. 1. ed. Concórdia-SC: Embrapa Suínos e Aves, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1065434/guia-ilustrado-para-isolamento-de-salmonella-spp-de-origem-avicola>. Acesso em: 17 de abr de 2023.

DUSCH, H.; ALTWEGG, M. Evaluation of five new plating media for isolation of Salmonella species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 802–804, abr. 1995. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jcm.33.4.802-804.1995>. Acesso em: 12 de maio de 2023.

FEDER, I. et al. Comparison of Cultivation and PCR-Hybridization for Detection of Salmonella in Porcine Fecal and Water Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2477–2484, jul. 2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.39.7.2477-2484.2001>. Acesso em: 15 de mar de 2023.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2. ed. [s.l.] Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. DE M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1. ed. [s.l.] Cap. 4. Editora Atheneu, 2008.

GERBA, C. P. The Role of Water and Water Testing in Produce Safety. In: **Microbial Safety of Fresh Produce**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009. p. 129–142. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444319347.ch7>. Acesso em: 20 de maio de 2023.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos : qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por**

alimentos, treinamento de recursos humanos. 6. ed. Cap: 12. Barueri-SP: Manole, 2019.

HALEY, B. J.; COLE, D. J.; LIPP, E. K. Distribution, Diversity, and Seasonality of Waterborne Salmonellae in a Rural Watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 5, p. 1248–1255, mar. 2009. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01648-08>. Acesso em: 23 de fev de 2023.

HAMMACK, T. S. et al. Relative Effectiveness of Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth, and Rappaport-Vassiliadis Medium for the Recovery of Salmonella spp. from Foods with a Low Microbial Load. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 1, p. 16–21, jan. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9921822/>. Acesso em: 28 de abr de 2023.

HANNING, I. B.; NUTT, J. D.; RICKE, S. C. Salmonellosis Outbreaks in the United States Due to Fresh Produce: Sources and Potential Intervention Measures. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, p. 635–648, jul. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19580447/>. Acesso em: 12 de abr de 2023.

HARA-KUDO, Y. et al. Detection of Salmonella enteritidis in shell and liquid eggs using enrichment and plating. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 395–399, mar. 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816050000475X>. Acesso em: 18 de abr de 2023.

HARRIS, L. J. et al. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. s1, p. 78–141, jan. 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.15414337.2003.tb00031.x>. Acesso em: 12 de abr de 2023.

HAVELAAR, A. H. et al. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 2, p. 293–302, 13 fev. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22717051/>. Acesso em: 02 de jun de 2023.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6. ed. Cap. 26. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc, 2000. Disponível em: https://cdn.preterhuman.net/texts/science_and_technology/nature_and_biology/MicroBiology/Modern Food Microbiology 6th ed - James M. Jay.pdf. Acesso em: 31 de mar de 2023.

LITCHFIELD, J. H.; INSALATA, N. F. Salmonella and the food industry - methods for isolation, identification and enumeration. **C R C Critical Reviews in Food Technology**, v. 3, n. 4, p. 415–456, 29 jun. 1973. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408397309527149>. Acesso em: 13 de mar de 2023.

LI, B. et al. Diversity and Antimicrobial Resistance of Salmonella enterica Isolates from Surface Water in Southeastern United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 20, p. 6355–6365, 15 out. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25107969/>. Acesso em: 25 de maio de 2023.

LIU, H.; WHITEHOUSE, C. A.; LI, B. Presence and Persistence of Salmonella in Water: The Impact on Microbial Quality of Water and Food Safety. **Frontiers in Public Health**, v. 6, 30 maio 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2018.00159/full>. Acesso em: 20 de abr de 2023.

LÖFSTRÖM, C. et al. Rapid and Specific Detection of Salmonella spp. in Animal Feed Samples by PCR after Culture Enrichment. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 1, p. 69–75, jan. 2004. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.70.1.69-75.2004?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 15 de fev de 2023.

MAJOWICZ, S. E. et al. The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882–889, 15 mar. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20158401/>. Acesso em: 05 de maio de 2023.

MALORNY, B.; JUNKER, E.; HELMUTH, R. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of Salmonella enterica serotype Enteritidis. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 84, 2008. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-8-84>. Acesso em: 20 de maio de 2023.

MICHAEL, G. B. et al. Comparison of different selective enrichment steps to isolate Salmonella sp. from feces of finishing swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, jun. 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/FYtBTGc3YD4GkdzrjWYj5Pq/?lang=en> Acesso em: 12 de maio de 2023.

MILLER, R. G. et al. Xylose-Lysine-Tergitol 4: An Improved Selective Agar Medium for the Isolation of Salmonella. **Poultry Science**, v. 70, n. 12, p. 2429–2432, dez. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1784564/>. Acesso em: 12 de maio de 2023.

MILLER, R. G.; TATE, C. R.; MALLINSON, E. T. Improved XLT4 Agar: Small Addition of Peptone to Promote Stronger Production of Hydrogen-Sulfide by Salmonellae. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 10, p. 854–858, out. 1994. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0362028X22023602>. Acesso em: 13 de maio de 2023.

MYINT, M. S. et al. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated Salmonella in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology*, v. 23, n. 6, p. 599–604, set. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16943057/> Acesso em: 12 de fev de 2023.

NASCIMENTO, M. et al. Comparação de Meios de Enriquecimento e de Plaqueamento Utilizados na Pesquisa de Salmonella em Carcaças de Frango e Fezes de Aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, p. 85–91, abr. 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbca/a/JjFbSbGMbmgHwwwxFMTs7dKx/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 30 de abr de 2023.

OLIVEIRA, M. C. DE S. et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia polimerase. São Carlos-SP: Embrapa Pecuária Sudoeste, 2007. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>. Acesso em: 26 de maio de 2023.

OLIVEIRA, S. D. et al. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for Salmonella detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 217–221, abr. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12641714/>. Acesso em: 14 de abr de 2023.

PACHEPSKY, Y. et al. Irrigation Waters as a Source of Pathogenic Microorganisms in Produce: A Review. In: **Advances in Agronomy**. [s.l: s.n.]. p. 75–141. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864734000026>. Acesso em: 30 de abr de 2023.

PAIVA, J. B. DE et al. Isolamento de Salmonella: Comparação das etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento direto de amostras de fezes armazenadas por 24 e 96 horas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 73, n. 3, p. 263–269, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/rdcP47vCD5SnL84zWLjDKkj/?lang=pt>. Acesso em: 12 de maio de 2023.

PARK, S.-H.; RYU, S.; KANG, D.-H. Development of an Improved Selective and Differential Medium for Isolation of Salmonella spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 10, p. 3222–3226, out. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22814469/>. Acesso em: 12 de abr de 2023.

PAULA, A. M. R. DE. **Deteção de Salmonella em alimentos crus de origem animal empregando os imunoensaios rápidos TECRATM Salmonella VIA, TECRATM Salmonella UNIQUE e o método convencional de cultura**. 2002. Dissertação (mestrado em ciência dos alimentos). São Paulo: Universidade de São Paulo, 22 mar. 2002. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-08072009-160822/pt-br.php>. Acesso em: 30 de abr de 2023.

RALL, V. L. M. et al. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for Salmonella detection in poultry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 2, jun. 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822005000200009&lng=en&nrm=iso&tng=en. Acesso em: 30 de abr de 2023.

RUBY, T. et al. Salmonella 's long-term relationship with its host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 600–615, maio 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/36/3/600/635108>. Acesso em: 01 de mar de 2023.

SBODIO, A. et al. Modified Moore swab optimization and validation in capturing E. Coli O157: H7 and Salmonella enterica in large volume field samples of irrigation water. **Food Research International**, vol. 51, n. 2, p. 654-662, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996913000306>. Acesso em: 12 de jan de 2023.

SHINOHARA, N. K. S. et al. Salmonella spp., importante agente patogênico

veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675–1683, out. 2008. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232008000500031&lng=pt&tlng=pt)

[81232008000500031&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232008000500031&lng=pt&tlng=pt). Acesso em: 20 de maio de 2023.

SILVA, N. DA et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017. Disponível em:

https://issuu.com/editorablucher/docs/issuu_8cc4608f0c0cfd. Acesso em: 04 de abr de 2023.

SILVA, Q. M. DA. **Epidemiologia molecular das salmonelas de sete estados brasileiros**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal da Grande Dourados: Dourados, 2012. Disponível em:

[https://files.ufgd.edu.br/arquivos/arquivos/78/MESTRADO-DOUTORADO-CIENCIAS-](https://files.ufgd.edu.br/arquivos/arquivos/78/MESTRADO-DOUTORADO-CIENCIAS-SAUDE/EPIDEMIOLOGIA%20MOLECULAR%20DAS%20SALMONELAS%20DE%20SETE%20ESTADOS%20BRASILEIROS%20-%20QU%20C3%89ZIA%20MOURA%20DA%20SILVA.pdf)

[SAUDE/EPIDEMIOLOGIA%20MOLECULAR%20DAS%20SALMONELAS%20DE%20SETE%20ESTADOS%20BRASILEIROS%20-](https://files.ufgd.edu.br/arquivos/arquivos/78/MESTRADO-DOUTORADO-CIENCIAS-SAUDE/EPIDEMIOLOGIA%20MOLECULAR%20DAS%20SALMONELAS%20DE%20SETE%20ESTADOS%20BRASILEIROS%20-%20QU%20C3%89ZIA%20MOURA%20DA%20SILVA.pdf)

[%20QU%20C3%89ZIA%20MOURA%20DA%20SILVA.pdf](https://files.ufgd.edu.br/arquivos/arquivos/78/MESTRADO-DOUTORADO-CIENCIAS-SAUDE/EPIDEMIOLOGIA%20MOLECULAR%20DAS%20SALMONELAS%20DE%20SETE%20ESTADOS%20BRASILEIROS%20-%20QU%20C3%89ZIA%20MOURA%20DA%20SILVA.pdf). Acesso em: 12 de maio de 2023.

SRIKANTH, C. V. et al. Salmonella effector proteins and host-cell responses.

Cellular and Molecular Life Sciences, v. 68, n. 22, p. 3687–3697, 9 nov. 2011.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3746315/>. Acesso em: 05 de maio de 2023.

TINDALL, B. J. et al. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 55, n. 1, p. 521–524, 1 jan. 2005. Disponível em:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.63580-0>. Acesso em: 10 de abr de 2023.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

UKUKU, D. O. Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 289–293, maio 2006. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002005000547> Acesso em: 13 de fev de 2023.

ZEE, H.; VELD, J. H. J. H. Methods for the Rapid Detection of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 373–391. Disponível em:

<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.1079/9780851992617.0373?download=t>. Acesso em: 15 de maio de 2023.