

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Fernanda Stoduto Ferreira
(Engenheira de Alimentos – UFRGS)

**AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE *SALMONELLA*
ENTERITIDIS SE86 EM DIFERENTES DILUENTES, MEIOS DE CULTURA E
MÉTODOS DE SEMEADURA, APÓS EXPOSIÇÃO AO
DICLOROISOCIANURATO DE SÓDIO**

Porto Alegre
Janeiro de 2011

S869a Stoduto, Fernanda
Avaliação da multiplicação e recuperação de *salmonella* enteritidis se86 em diferentes diluentes, meios de cultura e métodos de sementeira, após exposição ao dicloroisocianurato de sódio. / Fernanda Stoduto. -- Porto Alegre, 2011.

58f. : il.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR-RS, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tondo

Bibliografia

1. Microbiologia dos alimentos 2. Doenças transmitidas por alimentos 3. *Salmonella Enteritidis* I. Título. II. Tondo, Eduardo César (Orient.).

CDU 664:576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Fernanda Stoduto Ferreira
(Engenheira de Alimentos – UFRGS)

**AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE *SALMONELLA*
ENTERITIDIS SE86 EM DIFERENTES DILUENTES, MEIOS DE CULTURA E
MÉTODOS DE SEMEADURA, APÓS EXPOSIÇÃO AO
DICLOROISOCIANURATO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Porto Alegre
Janeiro de 2011

Fernanda Stoduto Ferreira
(Engenheira de Alimentos - UFRGS)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil

Aprovada em:

Homologada em:

Pela Banca Examinadora:

Por:

EDUARDO CESAR TONDO
Orientador – Programa de Pós Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFRGS

JOSÉ MARIA WIEST
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA)

FERNANDA ARBOITE DE OLIVEIRA
Banca – Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Rio Grande do Sul

VITOR MANFROI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

FLORENCIA CLADERA
Banca – Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos/UFRGS

JOSÉ MARIA WIEST
Banca – Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo pela orientação, paciência, ensinamentos, exemplo, amizade e pela oportunidade de desenvolvimento.

Aos professores do PPGCTA, por todos os conhecimentos transmitidos.

A Prof. Dra. Florência Cladera, pela ajuda com os gráficos e com a análise estatística dos dados do experimento.

Ao Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos e a Prof^ª Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pelas cepas utilizadas neste trabalho.

Ao Ministério da Educação, através do Programa de Expansão das Universidades Públicas Brasileiras – REUNI, pela oportunidade e concessão de bolsa.

A Kalykim, pelos produtos cedidos ao Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, que auxiliaram na realização deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos da UFRGS, pela amizade, alegria, apoio, por compartilharem comigo esses dois anos de ‘estrada’ e por me ensinarem muito sobre cada ‘Flor’, com suas qualidades e pontos a melhorar.

A Fabiana Fernanda Pacheco da Silva, que desde os primeiros dias do Mestrado foi uma amiga verdadeira, sincera, fiel, que me ajudou em muitos diversos momentos, com paciência e carinho.

A Márcia Loiko, pela amizade, carinho, conselhos, por ter um coração tão grandioso e por sempre estar disposta a ajudar.

A Letícia Casarin, pela amizade, carinho, apoio e pelo ombro amigo em tantos ‘desabafos’.

A Cheila de Paula, pelos conselhos, auxílio em muitos momentos e por estar sempre disposta a ajudar e dividir seus conhecimentos e experiências.

A Juliana Guedes Silveira, pela amizade, alegria e emoção que trouxe a nossa ‘rotina’.

A minha família: minha mãe e minha irmã, por todo apoio, carinho e amor, e por sempre estarem ao meu lado, independente das minhas escolhas.

Ao Cris, meu Amor, por ser o bálsamo de todas as dores, pelos ‘colos’, palavras e por cada momento de paz e alegria que me ajudou a suportar todos os desafios e dificuldades.

Ao Dr. Edward Bach, que sintonizou as primeiras Essências Florais, Essências que foram fundamentais para meu equilíbrio e cura durante grande parte do mestrado e que também puderam ajudar as ‘Flores’ que estava abertas a elas.

A Deus, que me conduziu, abençoou, iluminou e protegeu durante esses dois anos.

AValiação DA MULTIPLICAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS SE86 EM DIFERENTES DILUENTES, MEIOS DE CULTURA E MÉTODOS DE SEMEADURA, APÓS EXPOSIÇÃO A DICLOROISOCIANURATO DE SÓDIO

Autor: Fernanda Stoduto Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Eduardo César Tondo

RESUMO

No Rio Grande do Sul (RS), uma cepa de *Salmonella* (S.) Enteritidis (SE86) foi identificada como o principal microrganismo causador de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), nos últimos anos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a multiplicação e a recuperação da *S. Enteritidis* SE86 em diluentes, meios de cultura e métodos de semeadura, após a exposição ao Dicloroisocianurato de sódio (NaDCC). Em um primeiro momento, o microrganismo foi ativado em caldo BHI e exposto a 200ppm de NaDCC, por cinco minutos. Em seguida, ele foi diluído em diferentes soluções, as quais foram armazenadas a 7° C e 30° C, separadamente, sendo amostradas e analisadas microbiologicamente, a cada hora, durante seis horas. Em um segundo momento, foi avaliada a recuperação do microrganismo, antes e após exposição ao NaDCC, através de semeadura em superfície e pelo método da Camada Fina de Ágar (*Thin Agar Layer* - TAL), em cinco diferentes meios de cultura [Agar Triptona de Soja (TSA), Agar Verde Brilhante Manitol Lisina Cristal de Violeta (MLCB), Agar Verde Brilhante (BGA), Agar *Salmonella Shigella* (SS) e Agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD)]. Na terceira fase do estudo, foram avaliadas a multiplicação e a recuperação de dois outros sorovares de *Salmonella*, além da *S. Enteritidis* SE86, utilizando o diluente, o meio de cultura e o método de semeadura que demonstraram os melhores resultados nas fases antecedentes. Os resultados demonstraram que houve multiplicação significativa ($P < 0,05$) da *S. Enteritidis* SE86 não exposta ao NaDCC, armazenada a 30° C, nos diluentes Água peptonada (P), Água peptonada + Tween 80, Lecitina e Tiosulfato de sódio (P + N), Solução salina + Tween 80, Lecitina e Tiosulfato de sódio (SaS + N) e Água peptonada + Solução salina (P + SaS). O diluente Solução salina (SaS) não propiciou multiplicação durante as seis horas de incubação, mas manteve as células viáveis, sendo, portanto, escolhido para os demais experimentos. Células expostas e não expostas ao NaDCC não foram capazes de se multiplicar em nenhum dos diluentes testados, a 7° C. Da mesma forma, após exposição ao NaDCC, nenhuma multiplicação significativa foi observada nos diluentes armazenados a 30° C. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) nas contagens de *S. Enteritidis* SE86 exposta ao NaDCC quando semeada em TSA, meios seletivos ou meios seletivos adicionados de sobre camada de TSA (TAL). O meio XLD foi escolhido para os demais experimentos, uma vez que permitiu praticamente a mesma multiplicação que o meio TSA. Quando foram avaliadas a multiplicação e a recuperação de *S. Enteritidis* SE86, *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*, expostas e não expostas ao NaDCC, diluídas em SaS e semeadas em TSA, XLD e XLD + sobre camada de TSA (TAL), não houve diferença significativa entre as contagens de células obtidas nos meios e no TAL, sugerindo que a semeadura direta em XLD pode ser um método adequado para a quantificação de *Salmonella* exposta ao NaDCC, em condições laboratoriais.

Palavras-chave: *Salmonella*, recuperação, Dicloroisocianurato de sódio

EVALUATION OF GROWTH AND RECOVERY OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS SE86 IN DIFFERENT DILUENTS, CULTURE MEDIA AND METHODS OF PLANTING, AFTER EXPOSURE TO SODIUM DICHLOROISOCYANURATE

Author: Fernanda Stoduto Ferreira

Adviser: Eduardo César Tondo

ABSTRACT

In Rio Grande do Sul State (RS), a strain of *Salmonella* (S.) Enteritidis (SE86) was identified as the main causative microorganism of foodborne diseases, in recent years. The aim of this study was to evaluate diluents, media and plating methods for growth and recovery of this pathogen, after exposure to Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC). At first, the microorganism was exposed to 200 mg kg⁻¹ NaDCC by five minutes. Then it was diluted in different diluent solutions, which were stored at 7° C and 30° C, separately, being sampled and microbiologically analyzed for six hours. In a second step, the recovery of the microorganism before and after exposed by NaDCC was evaluated, through surface plating method and Thin Layer Agar (TAL) method, in five different culture media [Tryptic Soy Agar (TSA), Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green Agar (MLCB); Brilliant Green Agar (BGA), *Salmonella Shigella* Agar (SS) and Xylose Lysine Desoxychole Agar (XLD)]. In the third phase of this study, the growth and recovery of *S. Enteritidis* SE86 and two other serovars of *Salmonella* were evaluated, using the diluent, the culture medium and plating method that showed the best results in previous phases. The results showed significant multiplication ($P < 0.05$) of *S. Enteritidis* SE86 not exposed to NaDCC, stored at 30 °C, in diluents Peptone water (P), Peptone water + Tween 80, Lecithin and Sodium thiosulfate (P + N), Saline solution + Tween 80, Lecithin and Sodium thiosulfate (SaS + N) and Peptone water + Saline solution (P + SaS). Saline solution (SaS) did not sustain bacterial multiplication, but maintained viable cells, being chosen for the next experiments. Exposed and not exposed cells were not able to multiply in any of the diluents at 7° C during six hours of storage. After NaDCC exposure, no significant multiplication was observed in any of the diluents stored at 30° C. No significant difference ($P < 0,05$) in growth of *S. Enteritidis* SE86 exposed to NaDCC was observed on TSA, selective medium or on selective media overlaid with TSA (TAL). The XLD medium was chosen for the next experiments, since it allowed the same multiplication that TSA. When the multiplication and recovery of exposed and not exposed *S. Enteritidis* SE86, *S. Typhimurium*, and *S. Bredeney* were evaluated after dilution in SaS and plating on TSA, XLD, and XLD overlaid with TSA, there was no significant difference in counts obtained on media and TAL, suggesting that direct plating on XLD could be an adequate method for the quantification of *Salmonella* exposed to NaDCC, under laboratory conditions.

Keywords: *Salmonella*, recovery, Sodium dichloroisocyanurate.

LISTA DE ABREVIATURAS

° C: grau Celsius

ANOVA: Análise de Variância

APHA - American Public Health Association

BGA: Agar Verde Brilhante

BHI: Infusão de Cérebro e Coração

DDA: Doenças Diarréicas Agudas

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

EUA: Estados Unidos da América

ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

ISO: International Organization for Standardization

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDDA: Monitorização de Doenças Diarréicas Agudas

mL: mililitro

MLCB: Agar Verde Brilhante Manitol Lisina Cristal de Violeta

n: número

OPAS: Organização Panamericana da Saúde

P: Água peptonada

P + N: Água peptonada + Tween 80, Lecitina e Tiosulfato de sódio

P + SaS: Água peptonada + Solução salina

ppm: partes por milhão

RS: Rio Grande do Sul

RODAC: Replicate Organism Detection and Counting

SE86: *Salmonella* Enteritidis nº 86

SIH: Sistema de Informações Hospitalares

SaS: Solução salina

SaS + N: Solução salina + Tween 80, Lecitina e Tiosulfato de sódio

SS: Agar *Salmonella Shigella*

TAL: *Thin Agar Layer*

SB: *Salmonella* Bredeney

SE: *Salmonella* Enteritidis

ST: *Salmonella* Typhimurium

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VE-DTA: Sistema de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos

XLD: Agar Xilose Lisina Desoxicolato

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Método de semeadura da Camada Fina de Ágar (*Thin Agar Layer – TAL*).....25
- Figura 2: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC (Controle), a 30°C, em Água peptonada (♦), Água peptonada + Tween 80 + Lecitina + Tiosulfato de sódio (▪), Solução salina (▲), Solução salina + Tween 80 + Lecitina + Tiosulfato de sódio (■) e Água peptonada com Solução salina (*). Cada ponto foi representado pela média e desvio padrão.....32
- Figura 3: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 exposta ao NaDCC, a 30°C, em Água peptonada (♦), Água peptonada + Tween 80 + Lecitina + Tiosulfato de sódio (▪), Solução salina (▲), Solução salina + Tween 80 + Lecitina + Tiosulfato de sódio (■) e Água peptonada com Solução salina (*). Cada ponto foi representado pela média e desvio padrão.....34
- Figura 4: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC, a 7°C, em Água peptonada (♦), Água peptonada + Tween 80 + Lecitina + Tiosulfato de sódio (▪), Solução salina (▲), Solução salina + Tween 80 + Lecitina + Tiosulfato de sódio (■) e Água peptonada com Solução salina (*). Cada ponto foi representado pela média e desvio padrão.....35
- Figura 5: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 exposta ao NaDCC, a 7°C, em Água peptonada (♦), Água peptonada + Tween 80 + Lecitina + Tiosulfato de sódio (▪), Solução salina (▲), Solução salina + Tween 80 + Lecitina + Tiosulfato de sódio (■) e Água peptonada com Solução salina (*). Cada ponto foi representado pela média e desvio padrão.....36
- Figura 6: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC (C) e exposta ao NaDCC (H) em TSA, MLCB e MLCB + sobre camada de TSA (TAL). Cada ponto foi representado pela média e desvio padrão.....37
- Figura 7: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC (C) e exposta ao NaDCC (H) em TSA, BGA e BGA + sobre camada de TSA (TAL). Cada ponto foi representado pela média e desvio padrão.....39
- Figura 8: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC (C) e exposta ao NaDCC (H) em TSA, SS e SS + sobre camada de TSA (TAL). Cada ponto foi representado pela média e desvio padrão.....39
- Figura 9: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC (C) e exposta ao NaDCC (H) em TSA, XLD e XLD + sobre camada de TSA (TAL). Cada ponto foi representado pela média e desvio padrão.....40
- Figura 10: Multiplicação de *S. Enteritidis* SE86 (SE), *S. Typhimurium* (ST) e *S. Bredeney* (SB) não expostas ao NaDCC em TSA, XLD e XLD + sobre camada de TSA (TAL). Cada ponto foi representado pela média e desvio padrão42

Figura 11: Multiplicação de *S. Enteritidis* SE86 (SE), *S. Typhimurium* (ST) e *S. Bredeney* (SB) expostas ao NaDCC em TSA, XLD e XLD + sobre camada de TSA (TAL). Cada ponto foi representado pela média e desvio padrão.....42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVO GERAL	16
1.2 Objetivos específicos	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 DTA no Brasil.....	17
2.2 DTA causada por <i>Salmonella</i>	18
2.3 DTA causada por <i>Salmonella</i> no Rio Grande do Sul	19
2.4 Higienização de equipamentos e utensílios na produção de alimentos	20
2.5 Análises microbiológicas de superfície de equipamentos	21
2.6 Bactérias estressadas.....	22
2.7 Recuperação de bactérias estressadas	23
2.8 Meios de cultura e métodos de semeadura para recuperação de células estressadas	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Local de Trabalho	26
3.2 Meios de cultura, diluentes e neutralizantes	26
3.3 Linhagens bacterianas	26
3.4 Armazenamento das culturas bacterianas e preparo dos inóculos	27
3.5 Aval. da multiplicação e recuperação bacteriana em diferentes diluentes	27
3.6 Avaliação da multiplicação e recuperação bacteriana em diferentes meios de cultura sólidos e técnicas de semeadura	29
3.7 Multiplicação e recuperação da <i>S. Enteritidis</i> SE86, <i>S. Typhimurium</i> e <i>S. Bredeney</i> cultivadas em XLD e diferentes métodos de semeadura.....	29
3.8 Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Aval. da recuperação e da multiplicação bacteriana em diferentes diluentes	31
4.1.1 Multiplicação da <i>S. Enteritidis</i> SE86 a 30°C (grupo controle).....	31
4.1.2 Multiplicação e recuperação da <i>S. Enteritidis</i> SE86 exposta ao NaDCC, a 30°C.....	33
4.1.3 Multiplicação e recuperação da <i>S. Enteritidis</i> SE86 não exposta (controle) e exposta ao NaDCC, a 7°C.....	34

4.2 Avaliação da multiplicação e recuperação bacteriana em diferentes meios de cultura sólidos e técnicas de semeadura.....	36
4.2.1 Meio de cultura MLCB e métodos de semeadura em superfície e TAL	36
4.2.2 Meios de cultura XLD, SS e BGA e métodos de semeadura em superfície e TAL.....	37
4.3 Recuperação de <i>S. Enteritidis</i> SE 86, <i>S. Typhimurium</i> e <i>S. Bredeney</i> cultivadas em XLD e diferentes métodos de semeadura.....	40
5. CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO A – Meios de cultura, diluentes e soluções utilizadas	54
ANEXO B – Autorização para uso de produto – Kalykim Ind. e Com. Ltda.....	58

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são causadas por microrganismos ou suas toxinas, após a ingestão de água ou alimentos contaminados. Elas constituem um sério problema de saúde pública e podem causar expressivas perdas econômicas (NYACHUBA, 2010; WELKER et al., 2010). Apesar de diversos casos de DTA serem notificados, é reconhecido que apenas uma pequena parte dos surtos reais seja registrada nas estatísticas oficiais (GREIG e RAVEL, 2009).

No Brasil, de 1999 a 2009, foram notificados 6.349 surtos de DTA, envolvendo 123.917 pessoas doentes e 70 óbitos. O Rio Grande do Sul (RS) foi responsável por 30,26% destas notificações. Dentre os agentes etiológicos mais freqüentes, a *Salmonella* spp. foi identificada como sendo a causadora de 42,5% dos casos identificados (BRASIL, 2009).

Embora diversos sorovares de *Salmonella* (S.) tenham sido isolados de diferentes alimentos, a *S. enterica*, subsp. *enterica*, sorovar Enteritidis tem sido o principal microrganismo envolvido nas salmoneloses alimentares no RS (GEIMBA et al., 2004). Uma cepa de *S. Enteritidis* (SE86) foi o microrganismo identificado em mais de 90% dos alimentos envolvidos em salmoneloses de 2001 a 2002 (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., "in press"). O mesmo microrganismo também demonstrou maior adaptação ácida e térmica que demais sorovares de *Salmonella* (MALHEIROS et al., 2009) e maior resistência ao hipoclorito de sódio a 200 e 400ppm (TONDO et al., 2010).

Entre os principais fatores causais de surtos, entre 2000 e 2002, em serviços de alimentação, no RS, a higiene deficiente de utensílios e equipamentos e a contaminação cruzada somaram um total de 14,15%, indicando a possível deficiência na higienização de superfícies que entram em contato com os alimentos, nas várias etapas da produção dos mesmos (CUNHA, 2008).

Análises microbiológicas das superfícies de utensílios e equipamentos são uma importante ferramenta de verificação da eficácia dos procedimentos de limpeza e desinfecção (MOORE e GRIFFITH, 2007). Uma das técnicas de coleta e análise mais indicada é o suabe de superfície (APHA, 2001).

Após a desinfecção de superfícies, muitos microrganismos são inativados, porém pode haver a sobrevivência de parte da população bacteriana. Essas bactérias podem ter sido afetadas pela ação dos desinfetantes, perdendo a capacidade de formar colônias em meios seletivos, porém, continuam podendo se reproduzir em meios não-seletivos, sendo denominadas “estressadas” ou “injurizadas” (WU, 2008). Células bacterianas stressadas apresentam grande relevância às indústrias de alimentos e aos serviços de alimentação, uma vez que podem não ser detectadas nas análises microbiológicas, mas virem a causar surtos alimentares ou problemas de qualidade, após a sua recuperação. Nesse sentido, os métodos de análises devem permitir a recuperação destas células, a fim de que não sejam obtidas contagens inferiores ao número de microrganismos que realmente estão presentes na amostra (JASSON et al, 2007). Como é sabido, os compostos liberadores de cloro estão dentre os desinfetantes mais utilizados para a desinfecção de superfícies que entram ou não em contato com os alimentos (JAENISCH et al., 2010; PENG et al, 2002; ROSSONI e GAYALARDE, 2000). No Brasil, um dos compostos de cloro mais utilizado é o Dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) a 200 ppm, que pode ser um agente stressante dos microrganismos existentes nas superfícies. Por esse motivo, a avaliação do efeito desse composto sobre patógenos alimentares importantes, como a *S. Enteritidis* SE86, e a possibilidade de recuperação desses microrganismos, após a exposição a este desinfetante, assume grande importância.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a multiplicação e a recuperação de *S. Enteritidis* SE86, em diferentes diluentes, meios de cultura e métodos de semeadura, após exposição ao NaDCC.

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a multiplicação e a recuperação de *S. Enteritidis* SE86 exposta e não exposta ao Dicloroisocianurato de sódio.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a multiplicação e a recuperação de *S. Enteritidis* SE86, em diferentes diluentes utilizados no método de análise de superfícies por suabe, antes e após a exposição ao Dicloroisocianurato de sódio;
- Avaliar a multiplicação e recuperação de *S. Enteritidis* SE86, em diferentes meios de cultura e métodos de semeadura, antes e após a exposição ao Dicloroisocianurato de sódio;
- Avaliar a multiplicação e a recuperação dos sorovares *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Bredeney, além da *S. Enteritidis* SE86, utilizando o diluente, o meio de cultura e o método de semeadura que demonstraram os melhores resultados nas fases antecedentes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DTA no Brasil

Surtos de DTA são um dos principais problemas dos serviços de alimentação. Um surto por DTA é definido pela ocorrência de dois ou mais casos de doença similar, resultante da ingestão de um alimento em comum. Nos casos mais graves, como aqueles causados por *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli* O157:H7, apenas um caso já é considerado um surto alimentar comum (OLIVEIRA et al., 2010; GREIG e RAVEL, 2009).

No Brasil, de 1999 a 2009, foram notificados 6.349 surtos de DTA. Em 51,3% dos surtos, o agente etiológico não foi identificado, e dos agentes identificados, os mais significativos foram: *Salmonella* spp (42,5%), *Staphylococcus* sp (20,5%), *Bacillus cereus* (7,0%), e *Clostridium perfringens* (4,9%) (BRASIL, 2009). Apenas em 2004, de acordo com o Sistema de Monitorização de Doenças Diarréicas Agudas (MDDA), do Ministério da Saúde, foram notificados um total de 2.395.485 casos de doença diarréica aguda (DDA) (BRASIL, 2004). Segundo o Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, de 1999 a 2004, ocorreram 3.410.048 internações por DTA, com uma média de 568.341 casos por ano (BRASIL, 2005).

O RS é um dos poucos Estados brasileiros onde há dados epidemiológicos sobre DTA há mais de 20 anos (BARTZ, 2008). Dos 6.349 surtos notificados no Brasil entre 1999 e 2009, 30,25% ocorreram no RS, e essa alta porcentagem se deve à implantação do Sistema de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA) nos municípios (BRASIL, 2009). De 2000 a 2002, foram investigados 527 surtos de DTA no Rio Grande do Sul. A população exposta foi de 68.679 pessoas, os doentes representaram 6.986 e os hospitalizados totalizaram 2.508. A maioria dos indivíduos acometidos foi jovens e adultos com idade entre 20 e 49 anos (54,20%), ficando, em segundo lugar, as crianças e adolescentes entre 10 e 19 anos (21,66%), seguido dos adultos com 50 anos ou mais (11,2%). Os agentes etiológicos identificados nos surtos foram: *Salmonella* sp. (44,76%), *Staphylococcus aureus* (12,9%), *Escherichia coli* (8,06%), *Bacillus cereus* (6,85%), *Clostridium* sp. (4,84%), *Shigella* sp. (2,83%), sendo que em 19,36% o

agente não foi identificado. Os principais fatores causais foram: matéria-prima sem inspeção (22,25%), manutenção em temperatura ambiente por mais de duas horas (21,35%), higiene deficiente de utensílios e equipamentos (8,1%), manutenção em refrigeração inadequada (8,1%), manipulação inadequada (7,64%), contaminação cruzada (6,05%) e em 12,8% o fator causal não foi identificado (CUNHA, 2008).

2.2 DTA causada por *Salmonella*

Salmonella é um importante patógeno causador de DTA em diversas partes do mundo (GREIG e RAVEL, 2009). *Salmonella* é a principal causadora de DTA em diversos países, tais como: os Estados Unidos (NYACHUBA, 2010), a Itália (MURESU et al., 2001), a França (BOUVET et al., 2002) e a Grécia (TASSIOS et al., 1997). O gênero *Salmonella* está dividido em 2 espécies (*S. enterica* e *S. bongori*) e em mais de 2.600 sorovares (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Os sorovares *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (ST) são os mais comumente implicados em infecções alimentares humanas, as quais normalmente ocorrem veiculadas por alimentos contaminados (BABU et al., 2006).

Até a década de 80, *S. Enteritidis* era isolada de humanos e animais com frequência consideravelmente baixa na maioria dos países. Porém, a partir do final dessa década, ocorreu uma mudança, uma vez que as salmoneloses causadas por *S. Enteritidis* tornaram-se mais frequentes, inclusive que aquelas causadas por *S. Typhimurium*, que, até então, era predominante. Esta mudança foi observada nos países da Europa e, posteriormente, em países das Américas (CASTILLA, 2003). Durante a década de 1990, o aumento das salmoneloses por *S. Enteritidis* foi observado em estudos também em outras regiões do Brasil, incluindo cidades do Estado de São Paulo (PERESI et al., 1998; TAVECHIO et al, 2002; FERNANDES, 2003). Da mesma forma, no RS, em 1990, a *S. Typhimurium* foi isolada de 86% dos alimentos envolvidos em salmoneloses e não houve relatos envolvendo *S. Enteritidis*. No entanto, no ano de 1993, este sorovar foi encontrado em 64% dos alimentos relacionados aos surtos, enquanto a *S. Typhimurium* foi isolada em apenas 4% desses alimentos (GEIMBA et al., 2004). O aumento no isolamento de *S. Enteritidis* pode ser atribuído ao sucesso das campanhas de erradicação de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, causadoras do tifo aviário e da diarreia bacilar em frangos.

Essas campanhas possibilitaram a abertura de um novo nicho ecológico que vem sendo ocupado pela *S. Enteritidis* (BÄUMLER et al., 2000). No Brasil, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, dentre as 1313 salmoneloses registradas no período de 1999 a 2009, 279 tiveram o sorovar identificado, sendo 77% destes causados por *S. Enteritidis*. Os demais 23% foram atribuídos a 18 diferentes sorovares (BRASIL, 2009).

2.3 DTA causada por *Salmonella* no Rio Grande do Sul

Nadvorny et al. (2004) relataram que no RS, no ano de 2000, *Salmonella* foi a principal causadora de surtos alimentares. A manipulação inadequada dos alimentos e a utilização de produtos sem inspeção sanitária foram os principais fatores que possibilitaram a ocorrência dessas salmoneloses, sendo responsáveis por 74,2% dos surtos confirmados. Em um estudo que avaliou dados epidemiológicos de surtos alimentares no RS, no período de 2000 a 2002, Cunha (2008) relatou que 41,4% dos surtos ocorreram em serviços de alimentação, sendo a *Salmonella* sp. responsável por 44,76% destes. Os alimentos mais comumente relacionados com os surtos foram as saladas com maionese caseira (45,61%), seguida dos produtos cárneos (24,56%) e produtos de confeitaria (12,28%), que juntos somam 82,45% dos surtos de salmoneloses investigados.

Estudos demonstraram que uma cepa de *S. Enteritidis* (SE86) foi identificada na maioria dos alimentos envolvidos nos surtos de 1999 a 2002 (GEIMBA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007).

Alguns estudos têm sido direcionados com o objetivo de buscar informações sobre as características que capacitam a *S. Enteritidis* SE86 a destacar-se de outras como patógeno alimentar. Esses estudos indicaram importantes informações sobre esse microrganismo, tais como: *S. Enteritidis* foi o microrganismo identificado em 97% dos alimentos envolvidos em salmoneloses entre 1999 e 2000 (GEIMBA et al., 2004) e uma cepa específica foi isolada em mais de 92% dos alimentos consumidos por indivíduos acometidos por salmonelose no período de 2001 a 2002 (OLIVEIRA et al., 2007). A *S. Enteritidis* SE86 sobreviveu ao congelamento em hambúrguer de frango, artificialmente contaminado, por um período maior que outros microrganismos, tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (CASARIN et

al., 2009). Esta cepa apresentou maior taxa de crescimento, nas primeiras seis horas de incubação, em meio de cultura e em maionese caseira, que outros sorovares de *Salmonella* testados (MALHEIROS et al., 2007). Também foi observado um aumento significativo na resistência a antibióticos como ampicilina e ácido nalidíxico, no período de 1999 a 2006 (GEIMBA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al. "in press"). Esta cepa demonstrou capacidade de multiplicação maior que *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, após 3 horas de armazenamento a 30° C, em panos de algodão e panos descartáveis utilizados para higienização em serviços de alimentação (BARTZ et al., 2010). Recentemente, Tondo et al. (2010) demonstraram que a *S. Enteritidis* SE86 foi mais resistente ao hipoclorito de sódio (800, 400 e 200ppm) que a *S. Typhimurium* e a *S. Bredeney*, aderidas sobre o polietileno e ao aço inoxidável. Esse fato assume grande importância principalmente porque os compostos liberadores de cloro, nessas concentrações, são amplamente utilizados para higienização de superfícies que entram ou não em contato com alimentos.

2.4 Higienização de equipamentos e utensílios na produção de alimentos

Uma das formas mais importantes de prevenção de DTA é a correta higienização de superfícies de equipamentos e utensílios. A higienização é uma operação que compreende duas etapas, a limpeza, a qual é responsável pela remoção de substâncias minerais e ou orgânicas indesejáveis, tais como terra, poeira, gordura e outras sujidades, e a desinfecção, responsável pela redução do número de microrganismos até níveis que não comprometam a qualidade higiênico-sanitária do alimento (SILVA Jr., 2008).

Os desinfetantes recomendados e mais utilizados para a desinfecção ambiental, de equipamentos e utensílios são: o Álcool 70° GL e o Hipoclorito de sódio 200ppm (SILVA Jr., 2008). O Álcool é eficiente contra bactérias na forma vegetativa, vírus e fungos, mas não contra endósporos. Já os compostos liberadores de cloro são eficazes contra vírus, fungos e bactérias na forma vegetativa e esporulada, e têm sido utilizados na prevenção e remoção de biofilmes (McDONNELL e RUSSELL, 1999; JOSEPH et al., 2001; PENG et al., 2002; RUSSELL, 2003; DeQUEIROZ e DAY, 2007).

O método comumente utilizado para comprovar as condições de higiene dos equipamentos consiste em inspecioná-los visualmente após terem passado por processo de higienização. Entretanto, esse método não permite avaliar a eficácia da higienização (LEWIS et al., 2008; SHERLOCK et al., 2009). Além disso, a higiene aparente pode induzir ao erro e dar uma falsa sensação de segurança. Por isso, é recomendada a análise microbiológica das superfícies que entram em contato com os alimentos, a qual passa a ser uma importante ferramenta de verificação da eficácia da higienização (SILVA Jr., 2008).

2.5 Análises microbiológicas de superfície de equipamentos

Para análise microbiológica de superfícies de equipamentos, a American Public Health Association (APHA, 2001) recomenda os seguintes métodos:

Suabe: recomendado para superfícies com cantos, fendas, aberturas, utensílios de mesa e de cozinha;

Esponja: recomendado para áreas extensas de superfícies de equipamentos e ambientes;

Placas RODAC (Replicate Organism Detection and Counting) e Petrifilm (3M): recomendado somente para superfícies planas, impermeáveis e relativamente fáceis de higienizar.

O método mais comumente utilizado é o suabe. O suabe é umedecido em solução diluente e passado na superfície a ser analisada.

Quanto aos padrões satisfatórios de microrganismos para análise de superfície, não há uma legislação brasileira que determine-os, e sim valores de referência adotados a partir de critérios internacionais (APHA, Organização Panamericana da Saúde – OPAS) e estudos nacionais. Como exemplo disso, Silva Jr. (1993) realizou um estudo que permitiu a recomendação de valores de referência mais próximos, segundo esse autor, da realidade Brasileira (SILVA Jr., 2008).

A seguir estão descritos os critérios internacionais e valores de referência adotados no Brasil para contagem de bactérias em superfícies que entram em contato com alimentos (SILVA Jr., 2008).

APHA (2001):

Contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos (heterotróficos):

- $\leq 2\text{UFC/cm}^2$: satisfatório;
- $> 2\text{UFC/cm}^2$: insatisfatório.

OPAS:

Contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos (heterotróficos):

- Excelente: 0 - 10UFC/cm²;
- Boa: 11 - 29UFC/cm²;
- Regular: de 30 - 49UFC/cm²;
- Má: 50 - 99UFC/cm²;
- Péssima: maior que 100UFC/cm²

Silva Jr. (1993):

Contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos (heterotróficos):

- $\leq 50\text{UFC/cm}^2$: satisfatório;
- $>50\text{UFC/cm}^2$: insatisfatório;
- Ausência de coliformes fecais, *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* em 50cm²;
- Para utensílios de mesa:
 - $\leq 100\text{UFC/cm}^2$: satisfatório
 - $> 100\text{UFC/cm}^2$: insatisfatório

2.6 Bactérias estressadas

Após a ocorrência de processos como aquecimento, congelamento, secagem, irradiação, alta pressão hidrostática, fermentação ou uso de produtos químicos, tais como desinfetantes utilizados na desinfecção de equipamentos e utensílios, pode-se ter três populações de bactérias:

- População inativada ou morta;

- População sobrevivente e capaz de multiplicação;
- População estressada ou injuriada (WU et al., 2001).

De acordo com Wu (2008), a primeira definição de bactérias estressadas foi realizada por Hartsell, em 1951, que as definiu como células que tem a capacidade de se recuperar e readquirir a capacidade de formar colônias em meios não-seletivos, mas não em meios seletivos. Na célula estressada podem ocorrer alterações estruturais, tais como danos na parede celular e na membrana citoplasmática, que as deixam suscetíveis a agentes seletivos ou antimicrobianos. Após estresse, as bactérias podem apresentar uma extensão de sua fase lag, chamado período de recuperação, até que suas células recuperem suas capacidades perdidas e comecem a se multiplicar a uma taxa igual à das células não estressadas (TOMLINS e ORDAL, 1971). Portanto, a etapa de recuperação é necessária, e se não for realizada, pode-se obter contagens inferiores às que corresponderiam ao número de microrganismos realmente presentes na amostra (JASSON et al, 2007).

2.7 Recuperação de bactérias estressadas

Bactérias estressadas têm a capacidade de se recuperar e retornar ao estado fisiológico normal, com início de crescimento e divisão celular sob condições favoráveis. Durante a reparação, a restauração da capacidade de multiplicação irá ocorrer antes que a multiplicação normal ocorra. Para esta recuperação, são utilizados meios líquidos e sólidos (WU, 2008). Meios de cultura seletivos, que permitem a diferenciação de patógenos, podem não permitir o crescimento de células estressadas (WU et al., 2001).

Uma alternativa é a adição de substâncias aos diluentes e aos meios seletivos, com os seguintes objetivos: reagir e eliminar compostos que afetam o mecanismo de reparação da célula, neutralizar a ação dos desinfetantes e melhorar o desprendimento das bactérias a partir das superfícies. São exemplos de agentes estressantes o peróxido de hidrogênio e os próprios desinfetantes. Alguns dos compostos adicionados aos diluentes e aos meios seletivos são: catalase, piruvato, Tween 80 (polisorbato), lecitina, oxyrase e tiosulfato de sódio. O Tween 80, por exemplo, é considerado um neutralizante tensoativo de desinfetantes fenólicos,

auxiliando na redução da tensão superficial da solução, aumentando a sua capacidade de entrar em contato com toda a superfície a ser amostrada e retirar as células que estão nela aderidas (APHA, 2001; MOORE e GRIFFITH, 2007; WU, 2008). O tiosulfato de sódio tem o poder de inativação de produtos que liberam cloro, permitindo avaliar a contaminação microbiológica de produtos como água clorada de estações de tratamento (SILVA et al. 1997; COSTA e FERREIRA, 1998).

Uma boa estratégia para a recuperação bacteriana é a incubação, por um curto período, sob condições ótimas (JAY et al., 2005). Geralmente, a maioria das células estressadas se recupera entre duas e quatro horas, sob temperatura adequada de incubação, em um meio não-seletivo e nutricionalmente rico (WU, 2008).

Outra alternativa para recuperação de células bacterianas estressadas são os meios sólidos, utilizados com diferentes métodos de semeadura. De forma geral, os microrganismos da amostra são recuperados em um meio não-seletivo por um curto período (ex. 1 - 4h) e temperaturas adequadas (ex. 25 - 37° C) e, após a recuperação, apenas os microrganismos de interesse se desenvolvem em uma sobre-camada ou camada inferior de meio seletivo (KANG e FUNG, 1999; HAJMEER et al., 2001; WU et al., 2001; DUAN et al., 2006). A seguir são exemplificados alguns métodos de semeadura utilizados para a recuperação de células bacterianas estressadas.

2.8 Meios de cultura e métodos de semeadura para recuperação de células estressadas

Os métodos indicados para recuperação e detecção de bactérias em superfícies são:

- Método clássico: utilização de diluente líquido e semeadura em superfície em meio de cultura seletivo ou não, conforme o microrganismo de interesse:

O suabe é esfregado em 50cm² da superfície e inserido em um tubo com solução diluente, podendo ser adicionada de neutralizantes. Em seguida, o suabe imerso é transportado até o laboratório, em condições adequadas de refrigeração, devendo ser analisado em menos de 24 horas após a coleta (APHA, 2001).

- Método de sobre-camada em semeadura por *Pour Plate*:

Desenvolvido por Ray e Speck (1973) e Ray (1979), neste método a amostra é semeada através do método Pour-Plate, em meio TSA ou PCA e incubada a aproximadamente 35° C (para coliformes, por exemplo), para recuperação de células estressadas. Após uma hora de incubação, a camada de ágar já semeado é coberta por uma camada de ágar com meio seletivo e incubada a temperatura desejada.

- Método de sobre-camada em semeadura por superfície:

Segundo Wu (2008), este método foi desenvolvido por Speck (1975) e Hartman (1975). A amostra é semeada na superfície de um meio não seletivo, como o TSA, já solidificado, e incubada a 35° C (para coliformes, por exemplo), por duas a quatro horas, para recuperação. Em seguida, uma camada de meio seletivo é superposta às células recuperadas sobre o meio não seletivo. Após solidificação do meio, as placas são incubadas em temperaturas e tempo desejados.

- Método da Camada fina de ágar (*Thin Agar Layer* - TAL):

No método TAL, desenvolvido por KANG e FUNG (1999), a amostra é semeada sobre uma camada fina de meio não seletivo, o qual foi colocado sobre uma camada mais grossa de meio seletivo solidificado (Figura 1). Devido à recuperação das células na camada superior (meio não seletivo), os microrganismos patogênicos interagem com os compostos seletivos do meio do fundo da placa.

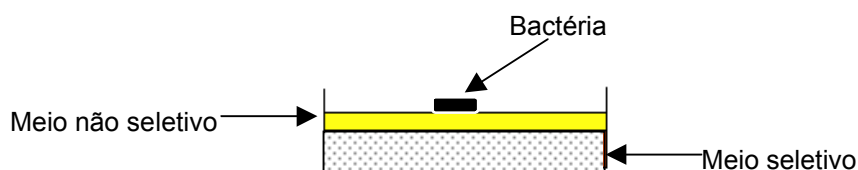


Figura 1: Método de semeadura da Camada fina de Ágar (*Thin Agar Layer* – TAL).

Dentre os métodos de semeadura, o método clássico é o mais amplamente utilizado e recomendado. Já o método TAL tem sido sugerido por ser bastante eficaz para a recuperação de células bacterianas estressadas (KANG e FUNG, 1999; KANG e FUNG, 2000; WU et al. 2001; WU e FUNG., 2006; QIU e WU, 2007; OSAILI et al., 2010). Por esse motivo, estes serão os dois métodos avaliados no presente estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de Trabalho

Todos os experimentos, assim como o armazenamento das cepas e demais materiais, foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS).

3.2 Meios de cultura, diluentes e neutralizantes

Os meios de cultura e diluentes utilizados foram das marcas Himedia (Mumbai, Índia) e Oxoid (Basingstoke, Inglaterra). O Cloreto de sódio utilizado foi da marca Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O desinfetante utilizado foi o Kalyclean S313 da Kalykim (Rio Grande do Sul, Brasil). Este produto foi gentilmente cedido pela Empresa Kalykim Indústria e Comércio Ltda, para uso no presente trabalho (Anexo B). Para Os neutralizantes Tween 80, Lecitina de soja e Tiossulfato de sódio utilizados foram da Oxiteno (São Paulo, Brasil), Viafarma (São Paulo, Brasil) e Top Glass (Rio Grande do Sul, Brasil), respectivamente. A composição e o modo de preparo dos meios de cultura e dos diluentes utilizados neste trabalho estão descritos no Anexo A.

3.3 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas cepas de *Salmonella enterica* de três sorovares distintos. Um dos sorovares foi o *S. Enteritidis* (SE86) proveniente de um surto de salmonelose ocorrido no Rio Grande do Sul, em 1999, o qual foi investigado pela Vigilância Sanitária do RS e isolado pelo Laboratório Central do RS (FEPPS/IPB/LACEN/RS). O microrganismo em questão foi genotipificado por GEIMBA et al. (2004) e apresentou o mesmo perfil genotípico das linhagens de *S. Enteritidis* envolvidas na maioria dos surtos (mais de 90%) de salmonelose ocorridos entre o período de 1999 a 2002, no Rio Grande do Sul (GEIMBA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007). A *S. Enteritidis* SE86 foi proveniente da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e

Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS). A segunda e a terceira cepa utilizadas neste trabalho foram a *S. Typhimurium* e a *S. Bredeney*, isoladas de fezes de suínos, cedidas pela Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

3.4 Armazenamento das culturas bacterianas e preparo dos inóculos

As três cepas de *Salmonella* foram mantidas em Caldo Cérebro Coração (BHI), adicionado de 50% (v/v) de glicerol estéril, sob temperatura de -15° C. As culturas para os experimentos realizados com maior frequência, foram mantidas em placas contendo Ágar BHI, armazenadas a 4° C. Antes de cada experimento, as culturas foram ativadas em caldo BHI, incubadas a 37° C, por 18 a 24 horas.

3.5 Avaliação da multiplicação e recuperação bacteriana em diferentes diluentes

As avaliações da multiplicação e da recuperação em diferentes diluentes foram realizadas utilizando a bactéria *S. Enteritidis* SE86. Para essas avaliações, culturas desse microrganismo foram expostas a um composto comercial liberador de cloro (NaDCC, Kalyclean S313), por cinco minutos. Esse produto foi escolhido por ser amplamente utilizado em indústrias de alimentos e serviços de alimentação no RS e demais Estados brasileiros. O tempo de exposição de cinco minutos foi definido por permitir uma redução no número de microrganismos, mas não eliminar a totalidade das células, possibilitando a avaliação da recuperação. Esse tempo de exposição foi avaliado previamente aos experimentos de recuperação e multiplicação das *Salmonella*, uma vez que a concentração e o tempo de exposição recomendados pelo fabricante do produto eliminavam totalmente os inóculos iniciais de *Salmonella* (aproximadamente 10⁹UFC/mL). As contagens das culturas expostas ao NaDCC foram comparadas às contagens de culturas não expostas ao NaDCC e a diferença entre elas foi considerada o efeito do desinfetante sobre a cultura da *S. Enteritidis* SE86. A recuperação foi considerada a capacidade de determinado diluente propiciar o aumento do número de células,

em determinado tempo, além daquele número verificado na população inicial. A comparação entre a cultura exposta ao NaDCC e a não exposta ao NaDCC foi realizada, a fim de avaliar diferenças de comportamento do microrganismo e o tempo necessário para haver a multiplicação das células, quando não submetido ao estresse.

As culturas de *S. Enteritidis* SE86 foram ativadas em 9mL de caldo BHI a 37°C por 18 a 24h, atingindo uma concentração de aproximadamente 10⁹UFC/mL. Foram realizados dois experimentos em paralelo: um com bactérias não expostas ao NaDCC (Grupo Controle) e outro com bactérias expostas ao NaDCC (H). A exposição ao NaDCC foi realizada inoculando 1mL de cultura bacteriana em 9mL de solução NaDCC a 200ppm, por cinco minutos. As culturas de bactérias expostas e não expostas foram diluídas nas soluções diluentes listadas a seguir (com ou sem os neutralizantes) até uma concentração final de aproximadamente 10⁸UFC/mL. A concentração inicial de células nas culturas foi determinada anteriormente pela quantificação em placa com ágar BHI.

- Água peptonada 0,1% (P);
- Água peptonada 0,1% + Tween 80 0,5% + Lecitina de Soja 0,07% + Tiosulfato de sódio 1% (P + N);
- Solução salina 0,85% (SaS);
- Solução salina 0,85% + Tween 80 0,5% + Lecitina de Soja 0,07% + Tiosulfato de sódio 1% (SaS + N);
- Solução salina 0,85% + Água peptonada 0,1% (P + SaS).

As soluções de diluentes contendo o inóculo de *S. Enteritidis* SE86 foram incubadas durante 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas, em temperaturas de 7° C e 30° C. Estas temperaturas foram escolhidas, uma vez que representam temperaturas facilmente atingíveis, em condições controladas (7° C) e não controladas (30° C), de transporte de amostras. A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. Enteritidis* SE86 exposta ao NaDCC foi quantificada pela técnica de gotas, segundo SILVA et al. (1997). Seguindo essa técnica, 20µL das diluições a serem quantificadas foram colocadas sobre a superfície de Ágar BHI. Para a quantificação das UFC de *Salmonella* não exposta, 0,1mL de cada diluição foi cultivada pelo método do espalhamento em Ágar BHI. As placas foram deixadas para secar em

temperatura ambiente, dentro de uma câmara de fluxo laminar (LabConco, Kansas City, Missouri) previamente esterilizada. Em seguida as placas foram incubadas a 37° C, por 18 a 24 horas, e as colônias bacterianas quantificadas e expressas em UFC.mL⁻¹. Cada quantificação foi realizada em duplicata e cada experimento foi repetido, no mínimo, duas vezes.

3.6 Avaliação da multiplicação e recuperação bacteriana em diferentes meios de cultura sólidos e técnicas de semeadura

A bactéria *S. Enteritidis* SE86 foi exposta ao NaDCC conforme descrito nos itens 3.5. As culturas de bactérias expostas e não expostas foram diluídas em Solução salina 0,85% até 10⁸UFC.mL⁻¹ e semeadas (0,1mL) em duplicata, pela técnica do espalhamento em TSA (meio não seletivo), em quatro meios seletivos (MLCB, BGA, SS e XLD) e nos meios seletivos (MLCB, BGA, SS e XLD) adicionados de sobre camada de meio não seletivo (TSA), pelo método TAL. As placas do método TAL foram preparadas sobrepondo 14 mL de meio não seletivo (TSA) em 25 mL de meio seletivo. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas, a 37° C. Após incubação, foram efetuadas as contagens (UFC.mL⁻¹) e os resultados em cada meio de cultura comparados.

3.7 Multiplicação e recuperação de *S. Enteritidis* SE86, *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* cultivadas em XLD e diferentes métodos de semeadura

Após a escolha do melhor diluente e do melhor meio e método de semeadura para a *S. Enteritidis* SE86, outros sorovares de *Salmonella* (*S. Typhimurium* e *S. Bredeney*) foram avaliados pelas mesmas técnicas, a fim de comparar o desempenho das mesmas para diferentes sorovares de *Salmonella*. Para tanto, as bactérias *S. Enteritidis* SE86, *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* foram cultivada em BHI, por 18 a 24 horas, a 37° C. As bactérias foram expostas ao NaDCC e diluídas conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6. As diluições foram semeadas (0,1mL) em duplicata, pela técnica do espalhamento, em TSA, XLD e XLD adicionado de sobre camada de meio não seletivo (TSA), pelo método TAL.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C. Após incubação as UFC.mL⁻¹ foram quantificadas e os resultados de cada sorovar em cada meio de cultura comparados.

3.8 Análise Estatística

Todos os experimentos realizados para avaliar a multiplicação e recuperação dos microrganismos foram repetidos, pelo menos duas vezes, sendo todos os resultados provenientes de contagens em duplicatas.

Para avaliar se houve variações estatisticamente significativas nas contagens de microrganismos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para comparar as diferenças entre os valores médios das contagens. Para todos os testes, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da recuperação e da multiplicação bacteriana em diferentes diluentes

4.1.1 Multiplicação da *S. Enteritidis* SE86 a 30° C (grupo controle)

A *S. Enteritidis* SE86, não exposta ao desinfetante (grupo controle, não exposto ao NaDCC), incubada a 30° C, não apresentou multiplicação significativa em nenhum dos diluentes testados nas três primeiras horas. O diluente P + SaS sustentou multiplicação significativa, após quatro horas de incubação, enquanto que os diluentes P e SaS + N, após cinco horas de incubação. O diluente P + N sustentou multiplicação significativa, após seis horas de incubação, enquanto o diluente SaS não apresentou multiplicação significativa em nenhum tempo avaliado (Figura 2).

O P + SaS foi o diluente que mais sustentou a multiplicação da *S. Enteritidis* SE86, apresentando aumento médio de 2,0 log UFC.mL⁻¹, após seis horas de incubação. Os diluentes P e P + N apresentaram aumento médio de 1,5 e 1,2 log UFC.mL⁻¹, respectivamente, ao final das seis horas de incubação a 30° C. MOORE e GRIFFITH (2007) relataram resultados semelhantes referente à Água peptonada tamponada, demonstrando que esse diluente puro e também acrescido de Tween 80, Lecitina e Tween 80 + Lecitina proporcionaram o crescimento de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, armazenados a temperatura ambiente, em aproximadamente 1,5 log UFC.mL⁻¹ após seis horas de armazenamento.

Os diluentes SaS e SaS + N apresentaram aumento médio de 0,2 e 1,0 log UFC.mL⁻¹, respectivamente, após as seis horas de experimento. Comparando SaS e SaS + N, não houve diferença significativa de multiplicação entre os mesmos, em nenhuma das seis horas de incubação, indicando que a adição dos neutralizantes ao diluente SaS não promoveu diferença significativa na multiplicação celular. Comparando os diluentes P e P + N, o diluente P sustentou multiplicação significativa em relação a P + N, após cinco horas de incubação, indicando que a adição dos neutralizantes não favoreceu a multiplicação celular em comparação com o diluente puro.

Se o objetivo da análise microbiológica é a quantificação das células, o diluente adequado será aquele que não sustentar multiplicação das bactérias existentes na amostra, durante o transporte da mesma, a fim de que no resultado da análise não haja um número de bactérias maior do que havia no momento da coleta. Por outro lado, um diluente ideal poderia influenciar na recuperação de células estressadas, “desestressando” as mesmas, porém sem propiciar a sua multiplicação ou morte, durante as primeiras horas de cultivo. (WU, 2008). É possível que fases lag prolongadas sejam necessárias para a recuperação celular e posterior multiplicação (TOMLINS e ORDAL, 1971).

A facilidade de preparo e o custo são fatores importantes no momento da escolha de um diluente. Levando em consideração essas questões e os resultados acima citados, o diluente considerado mais apropriado, segundo o presente estudo, foi a Solução salina (SaS), por não ter causado a diminuição do número de células e não ter sustentado a multiplicação bacteriana, durante as seis primeiras horas de incubação. Além disso, esse diluente é fácil de ser preparado e acessível economicamente.

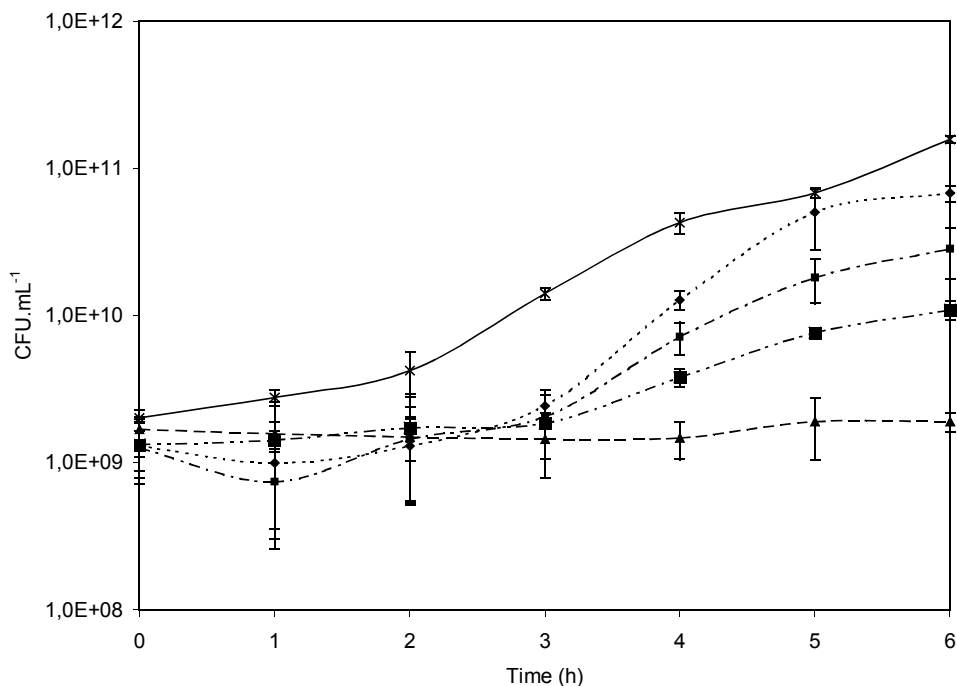


Figura 2: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC (Controle), a 30°C, em Água peptonada (♦), Água peptonada + Tween 80 0,5% + Lecitina 0,07% + Tiosulfato de sódio 1% (▪), Solução salina (▲), Solução salina + Tween 80 0,5% + Lecitina 0,07% + Tiosulfato de sódio 1% (■) e Água peptonada com Solução salina (*). Cada ponto foi representado pela média e pelo desvio padrão.

4.1.2 Multiplicação e recuperação da *S. Enteritidis* SE86 exposta ao NaDCC, a 30° C

Após o a exposição ao NaDCC, a *S. Enteritidis* SE 86 não apresentou crescimento significativo em nenhum dos diluentes, durante as seis horas do experimento, nem houve diferença significativa entre as contagens obtidas entre os diluentes (Figura 3). Se a Figura 3 for comparada com a Figura 2, o efeito do NaDCC sobre a população bacteriana poderá ser observado, uma vez que, na Figura 2, a maioria das contagens estavam em cerca de 9 log UFC.mL⁻¹, enquanto que na Figura 3, as contagens bacterianas variaram de 5 a 6 log UFC.mL⁻¹. Como na Figura 3 não houve multiplicação significativa em nenhum dos diluentes, a recuperação celular não pôde ser observada, não sendo possível diferenciar as células mortas das células estressadas ou células viáveis mas não cultiváveis (VNC). Bactérias estressadas apresentam uma extensão de sua fase lag, chamado período de recuperação, até que suas células comecem a se multiplicar a uma taxa igual à das células não estressadas (TOMLINS e ORDAL, 1971). Como exemplo disso, após o estresse por calor a 48° C por 30 minutos, a *S. Typhimurium* cultivada em meio TSB (Trypticase Soy Broth) e semeada em meio TSA, apresentou fase lag de quatro a cinco horas de duração, até a completa recuperação e início da multiplicação (CLARK e ORDAL, 1969). Segundo CLARK et al. (1968) e IANDOLO e ORDAL (1966), *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, submetidos a estresse por calor (55° C por 15 minutos e 60° C por 15 minutos, respectivamente), quando cultivados em meio TSB e semeados em meio TSA, apresentaram fases lag com duração de quatro e seis horas, respectivamente, até o início da multiplicação. Com base nos experimentos realizados no presente estudo, pode-se sugerir que a extensão da fase lag da *S. Enteritidis* SE86 exposta ao NaDCC é de, no mínimo, seis horas. É possível que tempos maiores de incubação demonstrassem a duração exata da fase lag dessas células e a recuperação de células estressadas, porém esse não foi o objetivo desse trabalho, uma vez que o tempo de 6 horas foi escolhido por ser um período médio freqüentemente recomendado para o transporte de amostras (SILVA et al., 1997; LIGHTFOOT e MAIER; 2003)

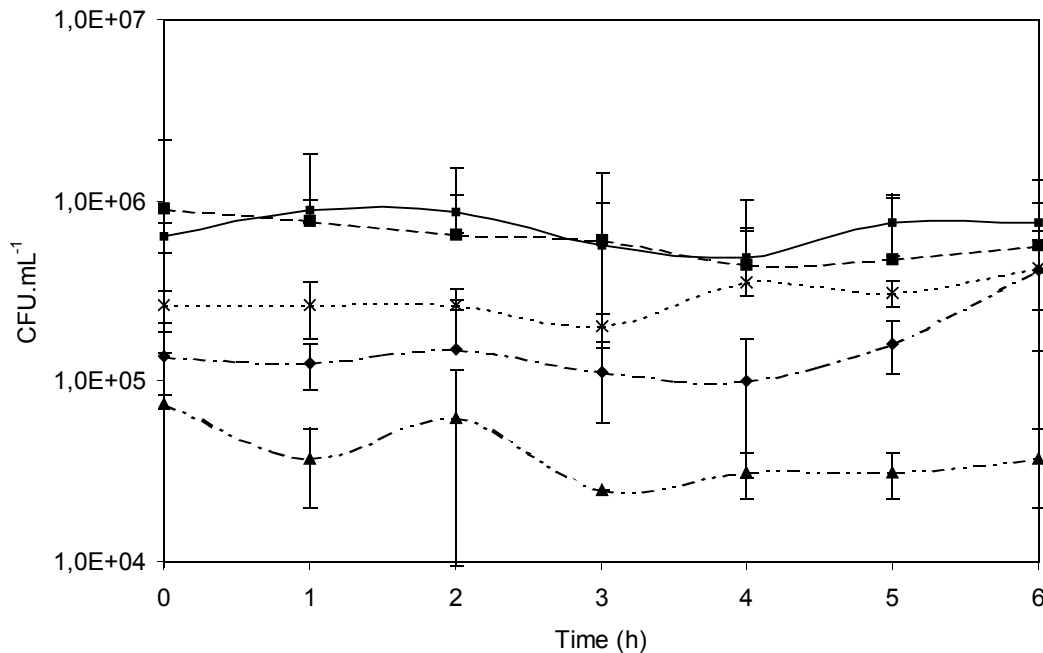


Figura 3: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 exposta ao NaDCC, a 30°C, em Água peptonada (♦), Água peptonada + Tween 80 0,5% + Lecitina 0,07% + Tiosulfato de sódio 1% (▪), Solução salina (▲), Solução salina + Tween 80 0,5% + Lecitina 0,07% + Tiosulfato de sódio 1% (■) e Água peptonada com Solução salina (*). Cada ponto foi representado pela média e pelo desvio padrão.

4.1.3 Multiplicação e recuperação da *S. Enteritidis* SE86 não exposta (controle) e exposta ao NaDCC, a 7° C

A 7° C, a *S. Enteritidis* SE 86 (controle) não apresentou crescimento significativo nos diluentes avaliados, durante as seis horas do experimento (Figura 4). Semelhante resultado foi demonstrado por MOORE e GRIFFITH (2007) que relataram que a água peptonada tamponada e também acrescida de Tween 80, Lecitina e Tween 80 + Lecitina não proporcionaram a multiplicação de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, armazenados a temperatura de 4° C, por seis horas.

O mesmo resultado também pôde ser observado para células expostas ao NaDCC (Figura 5). O efeito do NaDCC pôde ser verificado através da comparação das contagens das Figuras 4 e 5, contudo como não houve crescimento, não foi possível avaliar se houve recuperação celular bacteriana, após exposição ao desinfetante. FUKUYAMA et al. (2009) demonstraram não haver aumento significativo no número inicial de células de *Salmonella* spp., *Escherichia coli*

O157:H7 e *Staphylococcus aureus*, durante 9 horas de armazenamento a 4° C, após desinfecção de repolho ralado submetido ao calcinato de cálcio 0,1%, por 20 minutos, combinado com hipoclorito de sódio 100ppm, por 20 minutos. Esses resultados, juntamente com os resultados das Figuras 4 e 5, sugerem que a temperatura de 7° C pode ser utilizada para o transporte de amostras sem a multiplicação da *S. Enteritidis* SE86. É possível que esse resultado possa ser válido para demais microrganismos, uma vez que o American Public Health Association (APHA, 2001) recomenda temperatura de refrigeração para o transporte das amostras bacterianas.

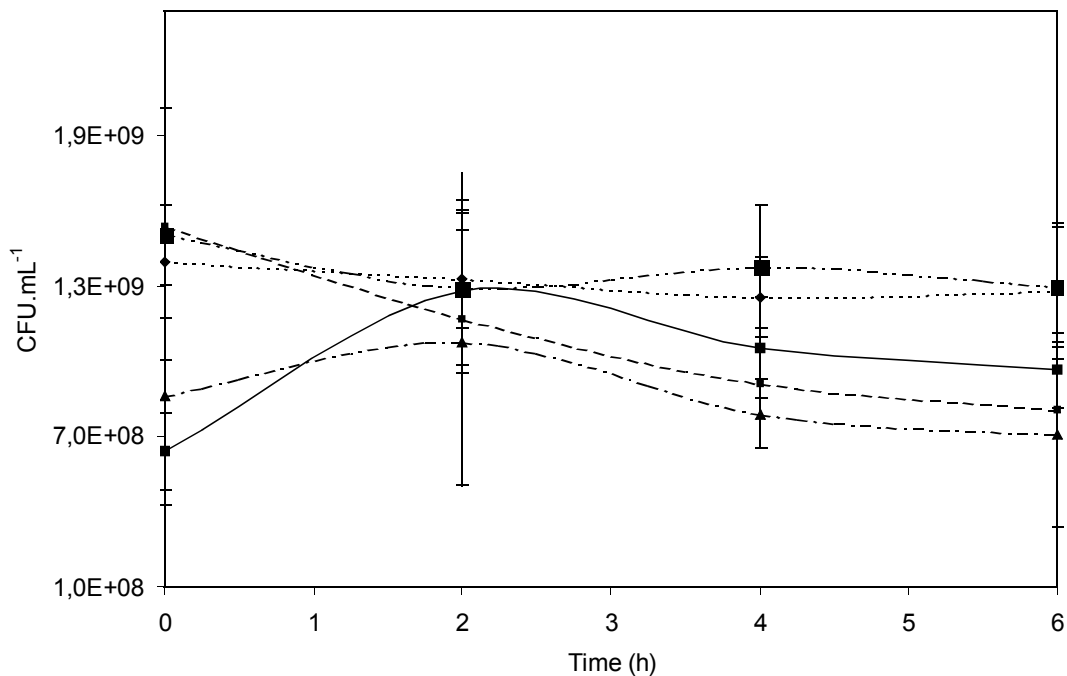


Figura 4: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC, a 7°C, em Água peptonada (♦), Água peptonada + Tween 80 0,5% + Lecitina 0,07% + Tiosulfato de sódio 1% (◻), Solução salina (▲), Solução salina + Tween 80 0,5% + Lecitina 0,07% + Tiosulfato de sódio 1% (■) e Água peptonada com Solução salina (*). Cada ponto foi representado pela média e pelo desvio padrão.

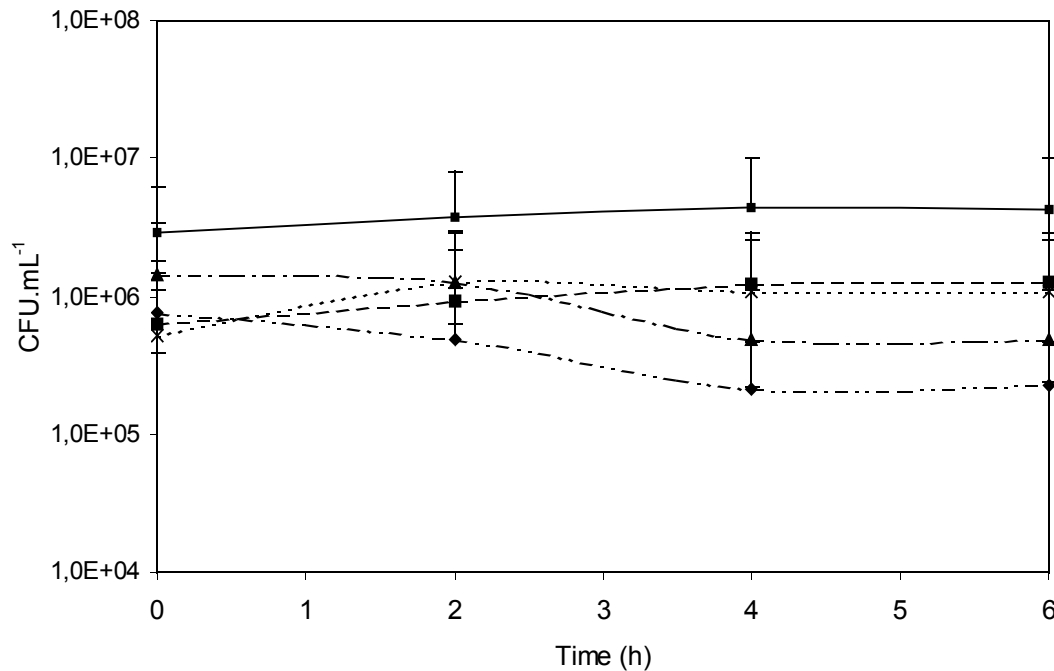


Figura 5: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 exposta ao NaDCC, a 7°C, em Água peptonada (◆), Água peptonada + Tween 80 0,5% + Lecitina 0,07% + Tiosulfato de sódio 1% (◼), Solução salina (▲), Solução salina Tween 80 0,5% + Lecitina 0,07% + Tiosulfato de sódio 1% (■) e Água peptonada com Solução salina (*) (♦). Cada ponto foi representado pela média e pelo desvio padrão.

4.2 Avaliação da multiplicação e recuperação bacteriana em diferentes meios de cultura sólidos e técnicas de semeadura

4.2.1 Meio de cultura MLCB e métodos de semeadura em superfície e TAL

A *S. Enteritidis* SE86 não exposta ao NaDCC (controle) apresentou contagens significativamente menores ($P < 0,05$) em MLCB quando comparados aos números obtidos em TSA (meio não-seletivo) e MLCB + sobre camada de TSA (TAL) (redução de 0,21 e 0,23 log UFC.mL⁻¹, respectivamente). Após exposição ao NaDCC, a multiplicação em MLCB foi 0,23 log UFC.mL⁻¹ menor do que nos meios TSA e em MLCB + sobre camada de TSA (TAL), porém a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 6). As pequenas diferenças entre o meio seletivo e os demais sugerem recuperação de poucas células de *S. Enteritidis* SE86 nos meios TSA e MLCB + sobre camada de TSA (TAL). Resultados semelhantes foram encontrados por WU et al. (2001), na recuperação de *Listeria*

monocytogenes, comparando os meios TSA, MOX (Modified Oxford; DIFCO) e TAL (MOX + sobre camada de TSA), antes e depois exposição das células ao ácido acético. Houve diferença numérica entre o meio seletivo e os demais, antes e após o estresse, mas esta diferença não foi significativa estatisticamente. Segundo esses autores, a falta de diferença significativa poderia indicar que não havia muitas células estressadas, ou seja, as células estavam simplesmente viáveis e foram capazes de se multiplicar no meio seletivo ou estavam mortas.

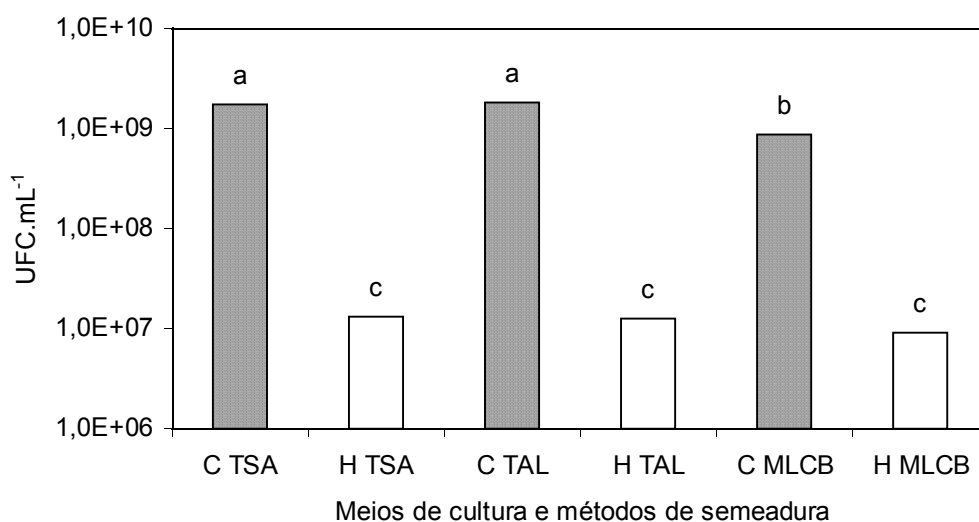


Figura 6: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis não exposta ao NaDCC (C) e exposta ao NaDCC (H) em TSA, MLCB e MLCB + sobre camada de TSA (TAL). Cada ponto foi representado pela média e pelo desvio padrão.

a,b,c Valores com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) diferem entre si.

Obs.: Não foi realizada comparação entre expostas (C) e não expostas (H) ao NaDCC.

4.2.2 Meios de cultura XLD, SS e BGA e métodos de semeadura em superfície e TAL

A *S. Enteritidis* SE86 não exposta e exposta ao NaDCC não apresentou diferença significativa de multiplicação ($P < 0,05$) entre os meios seletivos (XLD, SS e BGA), o meio não seletivo TSA e os meios seletivos (XLD, SS, BGA) + sobre camada de TSA (TAL) (Figuras 7, 8 e 9). Esses resultados sugerem que os meios de cultura seletivos não inibiram a multiplicação da *S. Enteritidis* SE86, sendo portanto adequados para o seu cultivo, inclusive para semeadura direta. Corroborando essa idéia, a norma ISO 6579/2002 recomenda a semeadura em meio XLD para a contagem de *Salmonella*.

Os meios XLD, SS e BGA (Figuras 7, 8 e 9) adicionado de sobre camada de meio TSA (TAL) também não apresentaram diferença significativa de multiplicação da *S. Enteritidis* SE86, quando comparado com os demais meios de cultura. Esse resultado é interessante, uma vez que o método TAL tem sido sugerido como importante para a recuperação de células bacterianas estressadas (KANG e FUNG, 1999; KANG e FUNG, 2000; WU et al. 2001; WU et al., 2006; OSAILI et al., 2010). A não utilização do método TAL pode apresentar vantagem na prática laboratorial, uma vez que esse método é mais trabalhoso para a confecção das placas. WU et al. (2001) demonstraram que *S. Typhimurium*, estressada por ácido acético, não apresentou diferença significativa de recuperação no meio não seletivo TSA e o TAL, utilizando o XLD + sobre camada de TSA. Contudo, ambos meios recuperaram mais células do que o meio XLD sozinho. Esses resultados foram justificados pela maior sensibilidade das células estressadas por ácido aos agentes seletivos do meio XLD. Resultados semelhantes foram demonstrados por KANG e FUNG (2000) que demonstraram que a *S. Typhimurium* estressada pelo calor não apresentou diferença significativa de recuperação entre TSA e TSA + XLD pelo método TAL, mas mais células foram recuperadas em comparação ao XLD sozinho. Sem estresse pelo calor, a *S. Typhimurium* não apresentou diferença significativa entre TSA, XLD e ambos meios no método TAL.

Dentre os meios de cultura testados, o MLCB e o XLD são recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003) para a pesquisa de *Salmonella*. Além disso, o XLD é recomendado para a quantificação de *Salmonella* pela ISO 6579/2002. Segundo o presente trabalho, o XLD não apresentou diferença significativa nas contagens em comparação com o meio não seletivo (TSA) e com os meios seletivos + sobre camada de TSA (TAL), com ou sem exposição ao NaDCC, podendo ser considerado adequado para semeadura direta de *S. Enteritidis* SE86.

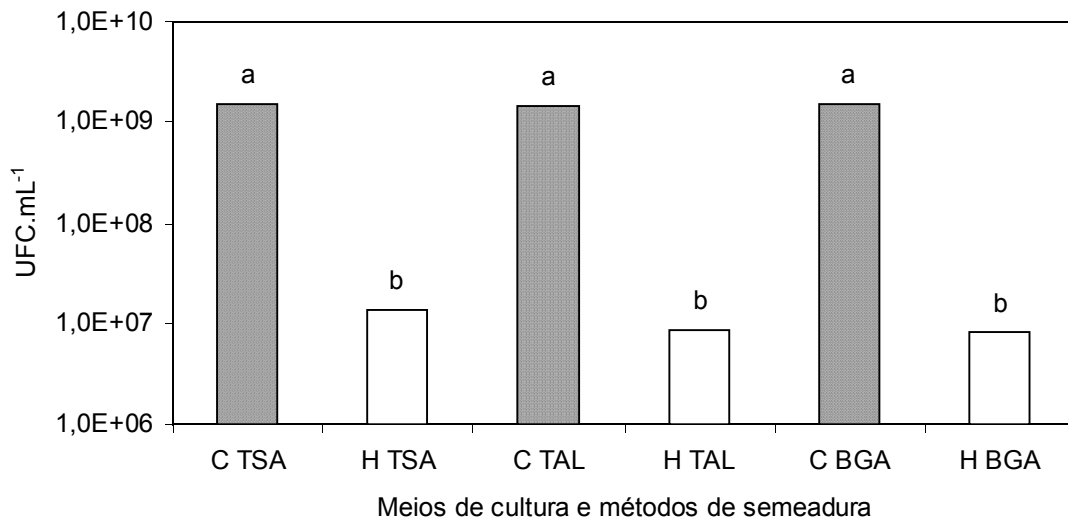


Figura 7: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC (C) e exposta ao NaDCC (H) em TSA, BGA e BGA + sobre camada de TSA (TAL). Cada ponto foi representado pela média e pelo desvio padrão.

a,b: Valores com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) diferem entre si.

Obs.: Não foi realizada comparação entre expostas (C) e não expostas (H) ao NaDCC.

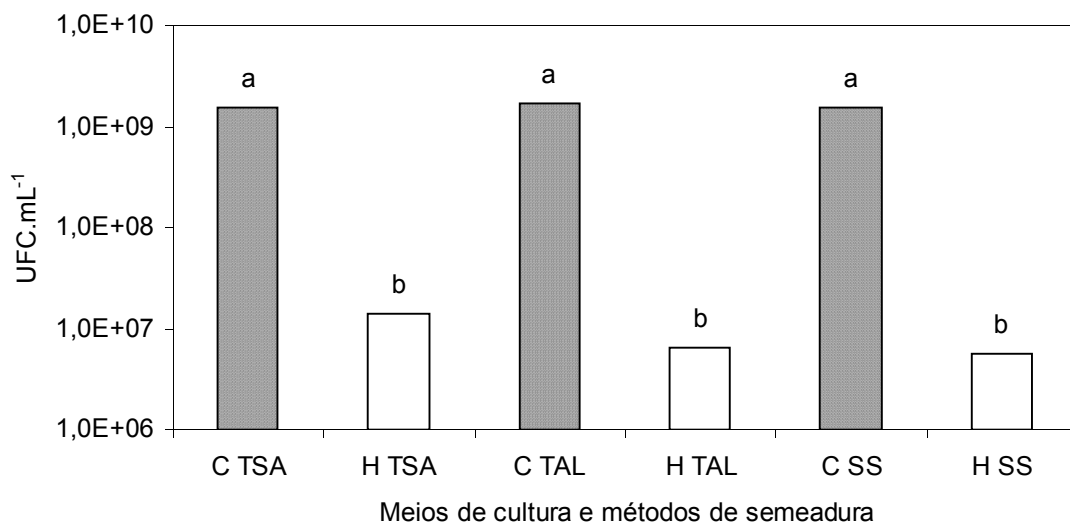


Figura 8: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC (C) e exposta ao NaDCC (H) em TSA, SS e SS + sobre camada de TSA (TAL). Cada ponto foi representado pela média e pelo desvio padrão.

a,b: Valores com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) diferem entre si.

Obs.: Não foi realizada comparação entre expostas (C) e não expostas (H) ao NaDCC.

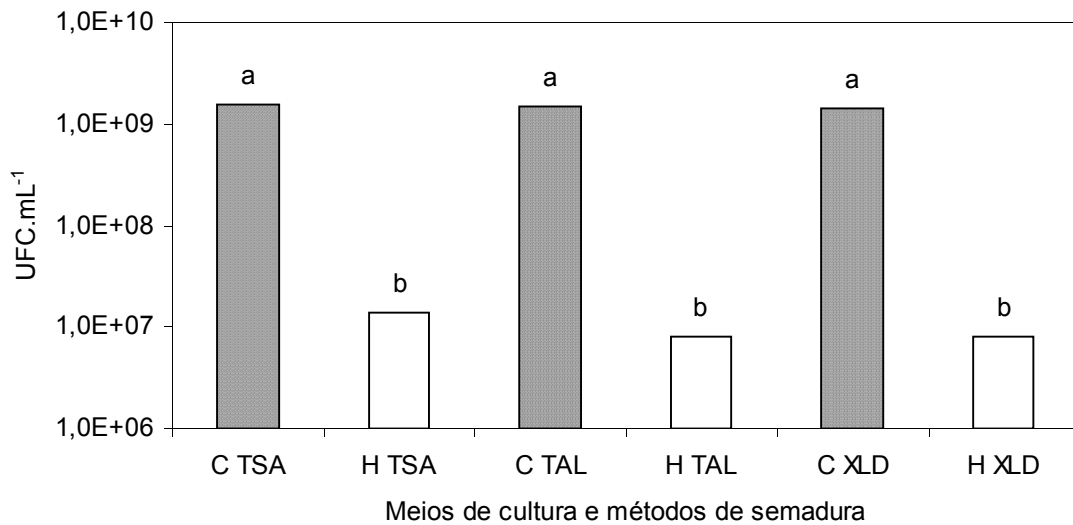


Figura 9: Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 não exposta ao NaDCC (C) e exposta ao NaDCC (H) em TSA, XLD e XLD + sobre camada de TSA (TAL). Cada ponto foi representado pela média e pelo desvio padrão.

a,b: Valores com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) diferem entre si.

Obs.: Não foi realizada comparação entre expostas (C) e não expostas (H) ao NaDCC.

4.3 Recuperação de *S. Enteritidis* SE 86, *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* cultivadas em XLD e diferentes métodos de semeadura

Os três sorovares *S. Enteritidis* SE86, *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*, não expostos e expostos ao NaDCC não apresentaram diferença significativa nas contagens no meio seletivo XLD, meio não seletivo TSA e XLD + sobre camada de TSA (TAL) (Figuras 10 e 11). Entretanto, pôde-se observar que, após exposição ao desinfetante clorado, os sorovares se desenvolveram numericamente mais em meio TSA, em comparação com o meio seletivo XLD e o TAL (XLD + sobre camada de TSA). Essa diferença numérica sugere que havia células estressadas, mas que os meios de cultura seletivos não inibiram o crescimento destas cepas de forma significativa estatisticamente, sendo, portanto, adequados para o desenvolvimento de *Salmonella*. Esses resultados podem ser aplicados para *Salmonellas* ativadas em laboratório e expostas ao NaDCC. Demais estudos são necessários para avaliar o comportamento desses microrganismos, estressados por desinfetantes em superfícies de serviços de alimentação.

Quando comparados entre si, os sorovares *S. Enteritidis* SE86, *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*, não expostas ao NaDCC (grupo controle), não apresentaram diferença significativa nas contagens. Contudo, após a exposição ao NaDCC, houve uma diferença numérica entre as cepas (Figura 11). A *S. Typhimurium* apresentou o menor número de células recuperadas, seguida pela *S. Enteritidis* SE86 e pela *S. Bredeney*, tanto no meio seletivo (XLD), quanto no meio não seletivo e no XLD + sobre camada de TSA (TAL). Entretanto, essa diferença somente foi significativa comparando a *S. Bredeney* com a *S. Typhimurium*, no meio XLD. Esses resultados indicam que os microrganismos testados apresentaram diferentes sensibilidades ao NaDCC, ocasionando maior morte celular ou a não recuperação do sorovar *S. Typhimurium*.

Experimentos realizados por NGWAI et al. (2007) demonstraram que *S. Enteritidis* apresentou diferença significativa de multiplicação em comparação com *S. Typhimurium*, quando estressada por peróxido de hidrogênio e cultivada em TSA, mas semelhante sobrevivência quando estressada em pH ácido, alta salinidade, etanol e alta temperatura. Segundo o presente estudo, as três cepas de *Salmonella*, quando expostas ao NaDCC e cultivadas em TSA, não apresentaram diferença significativa de multiplicação. Por outro lado, Tondo et al. (2010) demonstraram que a *S. Enteritidis* SE86 apresentou maior resistência ao Hipoclorito de sódio 200 e 400ppm que as *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*.

MICHAEL et al. (2003) observaram que *S. Enteritidis*, em comparação com *S. Typhimurium* e um *pool* de *Salmonella* sp., *S. Bredeney* e *S. Derby* recuperaram menos células nos caldos de enriquecimento Reppaport-Vassiliadis incubado a 42° C, Tetracionato Müller-Kauffmann a 37° C e 42° C e Selenito Cistina, quando amostras de fezes de suínos foram artificialmente contaminadas. Quando alíquotas dos meios de enriquecimento foram semeados em três diferentes meios de cultura, não houve diferença significativa entre eles, demonstrando que o isolamento dependeu mais da etapa de enriquecimento do que do meio de cultura.

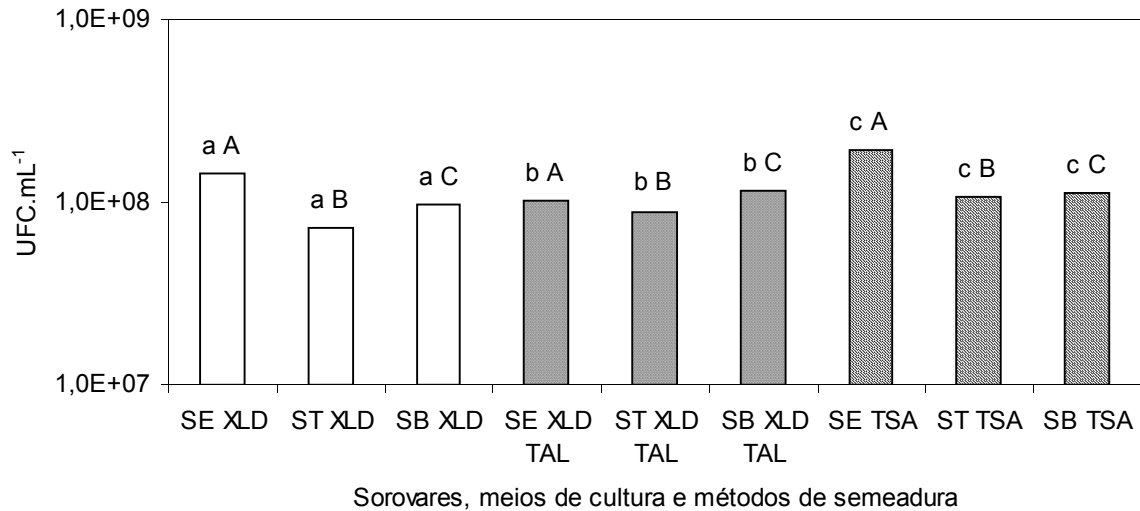


Figura 10: Multiplicação de *S. Enteritidis* SE86 (SE), *S. Typhimurium* (ST) e *S. Bredeney* (SB) não expostas ao NaDCC em XLD, XLD + sobre camada de TSA (TAL) e TSA. Cada ponto foi representado pela média e pelo desvio padrão.

a,b,c / A, B, C: Valores com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si.

Letras minúsculas: Comparação entre sorovares em um mesmo meio de cultura / método de sementeira.

Letras maiúsculas: Comparação entre meio de cultura / método de sementeira, para um sorovar.

Obs. 1: Não foi realizada comparação entre diferentes sorovares em diferentes meios e métodos de sementeira.

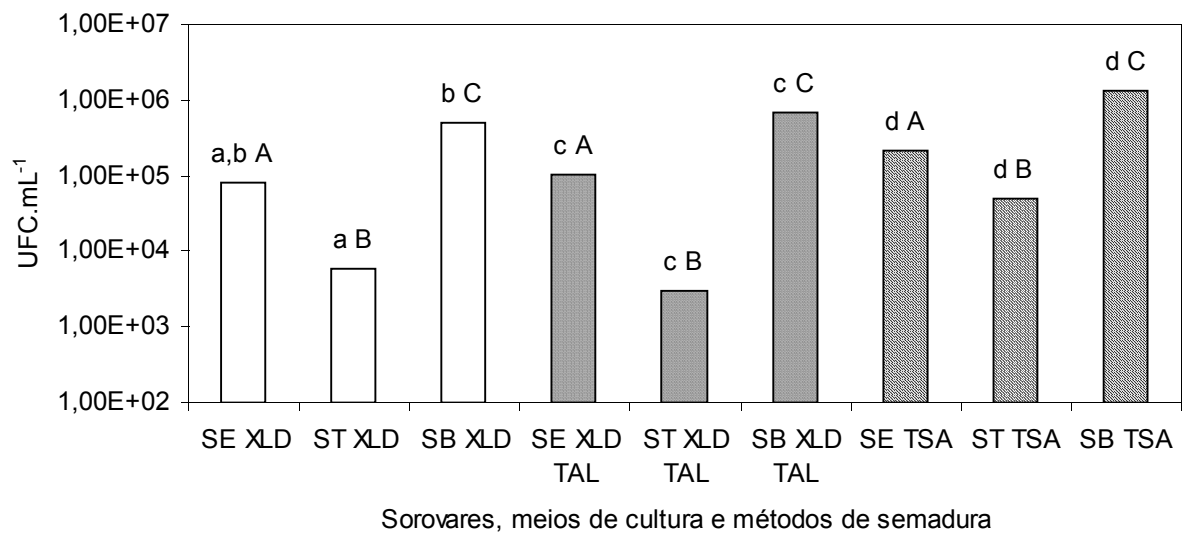


Figura 11: Multiplicação de *S. Enteritidis* SE86 (SE), *S. Typhimurium* (ST) e *S. Bredeney* (SB) expostas ao NaDCC em XLD, XLD + sobre camada de TSA (TAL) e TSA. Cada ponto foi representado pela média e pelo desvio padrão.

a,b,c,d / A, B, C: Valores com letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si.

Letras minúsculas: Comparação entre sorovares em um mesmo meio de cultura / método de sementeira.

Letras maiúsculas: Comparação entre meio de cultura / método de sementeira, para um sorovar.

Obs.: Não foi realizada comparação entre diferentes sorovares em diferentes meios e métodos de sementeira.

5. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

1) O melhor diluente para coleta e transporte de suabes de superfície para análise de *S. Enteritidis* SE86 foi a Solução salina 0,85%, por não sustentar multiplicação microbiana durante seis horas a temperatura de refrigeração (7° C) e de 30° C, tanto sem exposição ao NaDCC, quanto com exposição ao NaDCC, além de ser um diluente de fácil preparo e de custo acessível.

2) Não houve recuperação da *S. Enteritidis* SE86 em nenhum dos diluentes testados, após a exposição ao NaDCC, tanto a temperatura de refrigeração (7° C) quanto a 30° C, não sendo possível observar a diferenciação entre as células mortas e as células estressadas ou células viáveis mas não cultiváveis (VNC).

3) Não houve multiplicação ou recuperação celular em nenhum dos diluentes testados, antes e após exposição ao NaDCC, a 7°C, sugerindo que a temperatura de 7° C pode ser utilizada para o transporte de amostras sem a multiplicação da *S. Enteritidis* SE86.

4) Entre os meios de cultura e métodos de semeadura, o XLD, pelo método de semeadura em superfície, demonstrou ser o mais adequado para análise de *S. Enteritidis* SE86, por não apresentar diferença significativa em comparação com o meio de cultura não seletivo e o método TAL (meio seletivo + sobre camada de TSA), e por ser recomendado pela ISO 6579/2002 e pelo MAPA.

5) Não houve diferença significativa de multiplicação entre os meios XLD, TSA e XLD + sobre camada de TSA pelo método TAL, em nenhum dos três sorovares de *Salmonella* analisados, confirmando a indicação da semeadura direta em XLD como a mais adequada, uma vez que a preparação das placas de XLD é mais simples que pelo método TAL e apresentou os mesmos resultados que o meio não seletivo.

REFERÊNCIAS

APHA, **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**, American Public Health Association, 4^a ed, Washington DC: Frances Pouch Downes and Keith Ito, 2001, 600p.

BABU, U. S.; GAINES, D. W.; LILLEHOJ, H.; RAYBOURNE, R. B. Differential reactive oxygen and nitrogen production and clearance of *Salmonella* serovars by chicken and mouse macrophages. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 30, n. 10, p. 942-953, 2006.

BÄUMLER, A. J.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, v. 287, p. 50-52, 2000.

BARTZ, S.; RITTER, A. C.; TONDO, E. C.; Evaluation of bacterial multiplication in cleaning clothes containing quantities of organic matter. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 9, p. 566-571, 2010.

BARTZ, S. **Contaminação microbiológica e avaliação de métodos de higienização de panos de limpeza utilizados em Serviços de Alimentação** 2008. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS: 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa IN nº 62, de 26 de agosto de 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 22 de novembro de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. FUNASA. CENEPI. Mortalidade Brasil 2004. Brasília: CENEPI/FUNASA; 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico, 6:1-7. Atualizado em 28.12.2005. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf
Acesso em: 04 de novembro de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Atualizado em 04.09.2009. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf.
Acesso em: 04 de novembro de 2010.

BOUVET, P. J. M.; FOUGERAT, I.; GUESNIER, F. Human salmonellosis surveillance in France: recent data from the National Reference Center, In P. Colin and G. Clément (ed.), **Proceedings of the International Symposium Salmonella & Salmonellosis.** AFSSA/INRA/InVS/Institut Pasteur/ISPAIA, St. Brieue, France, 2002, p. 411-416.

CASARIN, L. S.; KLEIN, M. P.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Survival of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis in frozen chicken hamburger. **Journal of Muscle Foods**, v. 20, p. 478–488, Outubro 2009.

CASTILLA, K. S. **Detecção de genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de *Salmonella* Enteritidis utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)** 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. SP: 2003.

CLARK, C. W.; ORDAL, Z. J. Thermal injury and recovery of *Salmonella* Typhimurium and its effect on enumeration procedures. **Applied Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 332-336, 1969.

CLARK, C. W.; WITTER, L. D.; ORDAL, Z. J. Thermal Injury and Recovery of *Streptococcus faecalis*. **Applied microbiology**, v. 16, n. 11, p. 1764-1769, 1968.

COSTA, M. R.; FERREIRA, W. A. Avaliação térmica do tiosulfato de sódio em solução como inativante para determinações microbiológicas de produtos clorados. **Revista da Universidade de Alfenas**, v. 4, p. 155-157, 1998.

CUNHA, B. **Investigação de Surtos Alimentares ocorridos em Serviços De Alimentação no Rio Grande Do Sul**. 2008. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

de PAULA, C. M. D. **Avaliação da sorologia e susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens de *Salmonella* sp. envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul no período de janeiro de 2003 junho de 2006**. Monografia (Curso de Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2006.

DeQUEIROZ, G. A.; DAY, D. F. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 794-802, 2007.

DUAN, J.; LIU C.; SU, Y. C. Evaluation of a Double Layer Agar Plate For Direct Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. 77-82, 2006.

FERNANDES, S. A. Phenotypic and Molecular Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.

FUKUYAMA, S; WATANABE, Y; KONDO, N; NISHINOMIYA, T; KAWAMOTO, S; ISSHIKI, K; MURATA, M. Efficiency of Sodium Hipoclorite and Calcinated Calcium in killing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*

attached to freshly shredded cabbage. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 9-14, 2009.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in human foodborne outbreaks that occurred in the south of Brazil, 1999-2000. **Journal of Food Safety**, v. 25, p. 173-182, 2005.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; OLIVEIRA F. A.; CANAL C. W.; BRANDELLI A., Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* sp. isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, South of Brasil. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1229-1233, 2004.

GREIG, J.D.; RAVEL, A., Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 77-87, 2009.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. F.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 (N° 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26-29, 2010.

HAJMEER, M. N.; FUNG, D. Y. C.; MARDSEN, J. L.; MILLIKEN, G. A. Effects of preparation method, age, and plating technique of thin agar layer media on recovery of *Escherichia coli* O157:H7 injured by sodium chloride. **Journal of Microbiological Methods**, v. 47, p. 249-253, 2001.

HARTMAN, P. A.; HARTMAN, P. S.; LANZ, W. W. Violet Red Bile 2 Agar for Stressed Coliforms. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 537-539, 1975.

HARTSELL, S. E., The Longevity and Behavior of Pathogenic Bacteria in Frozen Foods: The Influence of Plating Media. **American Journal of Public Health**, v. 41, p. 1072-1077, 1951.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews / Microbiology**, v. 2, p. 504-509, 2004.

JAY, J. M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 7^a ed. Nova York: Springer, 2005. 790p.

IANOLO, J. J.; ORDAL, Z. J. Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n 1, p. 134-142, 1966.

JAENISCH, F. R. F.; KUCHIISHI, S. S.; COLDEBELLA, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso da produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 384-388, 2010.

JASSON, V.; DEBEVERE, J.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M. Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157:H7 to serve method performance testing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 241-249, 2007.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 367-372, 2001.

KANG, D. H.; FUNG, D. Y. C. Thin Agar Layer Method for Recovery of *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 127-132, 2000.

KANG, D. H.; FUNG, D. Y. C. Thin Agar Layer Method for Recovery of Heat-Injured *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 11, p. 1346-1349, 1999.

LEWIS, T; GRIFFITH, C; GALLO, M; WEINBREN, M. A modified ATP benchmark for evaluating the cleaning of some hospital enviromental surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 69, p. 156-163, 2008.

LIGHTFOOT, N. F.; MAIER, E. A. **Análise microbiológica de alimentos e água**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 284p.

MALHEIROS, P. S.; BRANDELLI, A.; NOREÑA, C. P. Z.; TONDO, E. C. Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 302-317, 2009.

MALHEIROS, P. S.; de PAULA, C. M. D.; TONDO, E. C. Avaliação da cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com outros sorovares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 751-755, 2007.

McDONNELL, G.; RUSSELL A. D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MICHAEL, G. B.; SIMONETI, R.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 138-142, 2003.

MOORE, G.; GRIFFITH, C. Problems associated with traditional hygiene swabbing: the need for in-house standardization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1090-1103, 2007.

MURESU, E., PIANA A., AZARA A., MAIDA I., NASTASI A., SAJID S. D., RUBINO S. Clonal relations among *Salmonella* Enteritidis phage type 3 outbreak isolates traced by DNA fingerprinting. **The new Microbiologica**, v. 24, p. 371-377, 2001.

NADVORNY, Y. A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no RS em 2000. **Acta Scientiae Veterinae.**, v. 32, n.1, p. 47-51, 2004.

NYACHUBA, D. G. Foodborne illness: is it on the rise? **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 5, p. 257-269, 2010.

NGWAI, Y. B.; WAMBEBE, C.; ADACHI, Y. Survivability of *Salmonella* Typhimurium L1388 and *Salmonella* Enteritidis L1225 under stressful growth conditions. **Online Journal of Health and Allied Sciences**, v. 6, n. 2, Abr-Jun 2007.

OLIVEIRA, F. A.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from food involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. **Journal of infection in eveloping countries**, v.1, n. 2, p.170-176, 2007.

OLIVEIRA, F. A.; FRAZON, A. P. G.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. **The new Microbiologica**, v. 29, p. 49-54, 2006.

OLIVEIRA, A. B. A.; de PAULA, C. M. ; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I. TONDO, E. C. Doenças Transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v.30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, F. A.; PASQUALOTO, A. P. ; SILVA, W. P.; TONDO, E. C. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. **Food research International**, 'In Press'.

OSAILI, T. M.; AL-NABULSI, A. A.; SHAKER, R. R.; AL-HOLY, M. M.; AL-HADDAQ, M. S.; OLAIMAT, A. N.; AYYASH, M. M.; AL TA'ANI, M. K.; FORSYTHE, S. J. Efficacy of the Thin Agar Layer Method for the Recovery of Stressed *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). **Journal of Food Protection**, v. 73, Nº 10, p. 1913-1918, 2010.

PENG, J.; TSAI, W.; CHOU, C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizers and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 11-18, 2002.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A Z.C.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. F.; RODRIGUES, E. C. A.; FERNANDES, S. A.; GELLI, D. S.; IRINO K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteretidis. **Revista de Saúde Pública**. v. 32, n. 5, 1998.

QIU, X.; WU, V. C. H. Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* in ground beef with cranberry concentrate by thin agar layer method. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 282-294, 2007.

RAY, B. Methods to detect stressed microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 42, p. 346-355, 1979.

RAY, B.; SPECK M. L. Enumeration of *Escherichia coli* in Frozen Samples After Recovery from Injury. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 499-503, 1973.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Portaria N° 78, de 28 de janeiro de 2009. **Diário Oficial**, RS, 2009.

ROSSONI, E. M.; GAYLARDE C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.

RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides., **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 750-763, 2003.

SHERLOCK, O; O'CONNELL, N.; CREAMER, E; HUMPHREYS, H. Is it really clean? Na evaluation of the efficacy of four methods for determining hospital cleanliness., **Journal of Hospital Infection**, v. 72, p. 140-146, 2009.

SILVA Jr., E. A., **Manual de Controle Higiênico Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6ª ed. São Paulo: Varela, 2008. 625p.

SILVA Jr., E. A., **Contaminação microbiológica como indicadora das condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios de cozinhas industriais, para determinação de pontos críticos de controle.** 1993. 83f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 1993.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos.** 1ª ed. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SPECK, M. L.; RAY, B.; READ, R. B. Repair and enumeration of injured coliforms by a plating procedure. **Applied Microbiology**, v. 29, Nº 4, p. 549-550, 1975.

TASSIOS, P. T., Markogiannakis, A.; Vatopoulos, A. C.; Katsanikou, Velonakis, E. N.; Kourea-Kremastinou, J.; Legakis N. J. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis during a 7-years period in Greece. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n. 6, p. 1316-1321, 1997.

TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C.; PERESI, J. T.; FUZIHARA, T. O.; YONAMINE, E. K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S. A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, p.1041-1044, 2002.

TOMLINS, R.; ORDAL, Z. J. Precursor ribosomal ribonucleic acid and ribosome accumulation in vivo during the recovery of *Salmonella* Typhimurium from thermal injury. **Journal of Bacteriology**, v. 107, n. 1, p. 134-142, 1971.

TONDO, E. C.; MACHADO, T. R. M.; MALHEIROS, P. S.; PADRÃO, D. K.; CARVALHO, A. L.; BRANDELLI, A. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, 2010.

WELKER, C. A. D., BOTH, J. M. C., LONGARAY, S. M., HAAS, S., SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WU, V. C. H. A review of microbial injury and recovery methods in food. **Food Microbiology**, v. 25, p. 735-744, 2008.

WU, V. C. H.; FUNG, D. Y.C. Simultaneous recovery and detection of four heat-injured foodborne pathogens in ground beef and milk by a four-compartment thin agar layer plate. **Journal of Food Safety**, v. 26, N° 2, p. 126-136, 2006.

WU, V. C. H.; FUNG, D. Y. C.; KANG, D. H.; THOMPSON, L. K. Evaluation of Thin Agar Layer Method for Recovery of Acid-Injured Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1067-1071, 2001.

ANEXO A – Meios de cultura, diluentes e soluções utilizadas

1. Ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI)

Composição (g/L)

Infusão de cérebro	12,5 g
Infusão de coração	5,0 g
Proteose peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dissódico (Na₂HPO₄)	2,5 g
Glucose	2,0 g
Ágar-Ágar	10,0 g

Preparo:

Dissolver 47 g do meio em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. Distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. O pH final deve ser 7,4 ± 0,2.

2. Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI)

Composição (g/L)

Infusão de cérebro	12,5 g
Infusão de coração	5,0 g
Proteose peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dissódico (Na₂HPO₄)	2,5 g
Glucose	2,0 g

Preparo:

Dissolver 37 g do meio em 1L de água destilada, distribuir em tubos estéreis. Esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. O pH final deve ser 7,4 ± 0,2.

3. Solução de Dicloroisocianurato de Sódio a 200ppm (Kalyclean S313)

Composição (g/L)

Dicloroisocianurato de sódio	Não especificado
Cloreto de sódio	Não especificado
Água destilada estéril	1000,0 mL

Preparo:

Dissolver 2g de Kalyclean S313 em 1L de água destilada esterilizada em autoclave a 121° C por 15 min. A concentração de Cloro livre deve ser 200ppm.

Obs.: O fornecedor não especificou a porcentagem da composição por ser segredo industrial.

4. Água Peptonada 0,1%

Composição (g/L)

Peptona de carne ou de caseína	1 g
Água destilada	1000,0 mL

Preparo:

Dissolver 1g de Peptona em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. O pH final deste diluente deve ser $7,2 \pm 0,2$.

4. Solução Salina 0,85%

Composição (g/L)

Cloreto de sódio (NaCl)	8,5 g
Água destilada	1000,0 mL

Preparo:

Dissolver o NaCl em água destilada, esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min.

5. Água Peptonada 0,1% + Tween 80 0,5% + Lecitina de Soja 0,07% + Tiosulfato de sódio 1%

Composição (g/L)

Peptona de carne ou de caseína	1 g
Tween 80	5 mL
Lecitina	0,7 g
Tiosulfato de sódio 10%	0,1 mL
Água destilada	1000,0 mL

Preparo:

Dissolver 1g de Peptona, 5mL de Tween 80, 0,7g de Lecitina e 0,1mL de Tiosulfato de sódio 10% em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min.

6. Solução Salina 0,85% + Tween 80 0,5% + Lecitina de Soja 0,07% + Tiosulfato de sódio 1%

Composição (g/L)

Cloreto de sódio (NaCl)	8,5 g
Tween 80	5 mL
Lecitina	0,7 g
Tiosulfato de sódio a 10%	0,1 mL
Água destilada	1000,0 mL

Preparo:

Dissolver 8,5g de Cloreto de Sódio, 5mL de Tween 80, 0,7g de Lecitina e 0,1mL de Tiosulfato de sódio a 10% em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min.

7. Solução Salina 0,85% + Água Peptonada 0,1%

Composição (g/L)

Cloreto de sódio (NaCl)	8,5 g
Peptona de carne ou de caseína	1 g
Água destilada	1000,0 mL

Preparo:

Dissolver 8,5g de Cloreto de sódio e 1g de Peptona em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min.

8. Ágar Triptona de Soja (TSA)

Composição (g/L)

Caseína digerida	15,0 g
Soja digerida	5,0 g
Cloreto de Sódio	5,0 g
Ágar-Ágar	15,0 g

Preparo:

Dissolver 40 g do meio em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. Distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. O pH final deste meio deve ser de $7,3 \pm 0,2$.

9. Ágar Verde Brilhante Manitol Lisina Cristal de Violeta (MLCB)

Composição (g/L)

Extrato de levedura	5,0 g
Peptona	10,0 g
Pó de Lab-Lemco	2,0 g
Cloreto de sódio	4,0 g
Manitol	3,0 g
Cloridrato de L-Lisina	5,0 g
Tiosulfato de sódio	4,0 g
Citrato de amônio férrico	1,0 g
Verde brilhante	0,0125 g
Cristal de Violeta	0,01 g
Ágar-Ágar	15,0 g

Preparo:

Dissolver 49 g do meio em 1L de água destilada. Misturar delicadamente e ferver com agitação freqüente para dissolver o meio completamente. Resfriar até 50° C, distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. Não autoclavar ou sobreaquecer.

10. Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD)

Composição (g/L)

Extrato de levedura	3,0 g
L-Lisina HCl	5,0 g
Xilose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Sacarose	7,5 g
Desoxicolato de sódio	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Tiosulfato de sódio	6,8 g
Citrato de Amônio Férrico	0,8 g
Vermelho de Fenol	0,08 g
Agar-Agar	12,5 g

Preparo:

Dissolver 53 g do meio em 1L de água destilada. Aquecer com agitação frequente, não sobreaquecer. Distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. O pH final deste meio deve ser de $7,4 \pm 0,2$.

11. Ágar *Salmonella Shigella* (SS)**Composição (g/L)**

Pó Lab-Lemco	5,0 g
Peptona	5,0 g
Sais biliares	8,5 g
Lactose	10,0 g
Citrato de sódio	10,0 g
Tiosulfato de sódio	8,5 g
Verde brilhante	0,00033 g
Vermelho neutro	0,025 g
Agar-Agar	15,0 g

Preparo:

Dissolver 63g do meio em 1L de água destilada. Levar à fervura com agitação freqüente e deixar ferver suavemente para dissolver o ágar. Não autoclavar. Esfriar até 50°C e distribuir em placas de Petry estéreis. O pH final deste meio deve ser de $7,0 \pm 0,2$.

12. Ágar Verde Brilhante (BGA)

Composição (g/L)

Peptona Proteose	10,0 g
Lactose	10,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Sacarose	10 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Vermelho de fenol	0,08 g
Verde brilhante	0,0125 g
Ágar-Ágar	12,0 g

Preparo:

Suspender 50g em 1 litro de água destilada. Deixar ferver para dissolver completamente. Esterilizar em autoclave a 121 ° C por 15 minutos. Esfriar e distribuir em placas de Petry estéreis. O pH final deste meio deve ser de $6,9 \pm 0,2$.

ANEXO B – Autorização para uso de produto – Kalykim Ind. e Com. Ltda.

Av. Presidente Getúlio Vargas, 8856
Alvorada RS Distrito Industrial
CEP 94836-000
Tel. (51) 3044.8000
kalykim@kalykim.com.br
www.kalykim.com.br

Alvorada, 22 de fevereiro de 2011.

Vimos, por meio desta, comunicar a permissão de uso do produto Kayclean S313, da Empresa Kalykim Indústria e Comércio Ltda, no trabalho de Mestrado intitulado "AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS SE86 EM DIFERENTES DILUENTES, MEIOS DE CULTURA E MÉTODOS DE SEMEADURA, APÓS EXPOSIÇÃO AO DICLOROISOCIANURATO DE SÓDIO", realizado pela Mestranda Fernanda Stoduto Ferreira, sob supervisão do Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRGS, bem como a divulgação dos resultados deste trabalho, após a avaliação da Empresa Kalykim.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Paulo Freitas', is written over a circular stamp or seal.

Paulo Freitas
Representante Legal