

PRÉ-ENRIQUECIMENTO E ENRIQUECIMENTO DIRETO NA PESQUISA DE *Salmonella* EM FARINHA DE CARNE¹

A. BERCHIERI JR.², K. IRINO³, A. C. PAULILIO², S. N. NEME³, S. A. FERNANDES³,
S. N. KRONKA⁴ e G. V. A. PESSÔA⁵

ABSTRACT - Berchieri Jr. A., Irino K., Paulillo A.C., Neme S.N., Fernandes S.A., Kronka S.N. & Pessôa G.V.A. 1986. [Preenrichment and direct enrichment in survey of *Salmonella*.] Pré-enriquecimento e enriquecimento direto na pesquisa de *Salmonella* em farinha de carne. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 6(3):93-97. Depto Patol. Veterinária, Fac. Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Rodovia Carlos Tonanni, Km 5, Jaboticabal, SP 14870, Brazil.

A comparison on several different culture procedures for *Salmonella* isolation from meat meals was made, using lactose broth, buffered peptone water, quarter strength Ringer's solution for preenrichment and selenite-novobiocin for direct enrichment in cultures incubated at 37°C and 43°C, with or without a layer of vaseline. All preenrichment procedures using cultures incubated at 43°C were superior to preenrichment ones using cultures incubated at 37°C and direct enrichment procedures using both 37°C and 43°C incubation temperatures. Nothing seemed to be gained by the use of a vaseline layer over for the purpose of stopping aerobic incubation. In what concerns lactose broth, buffered peptone water and quarter strength Ringer's solution media, no significant differences for efficiency were found.

INDEX TERMS: *Salmonella*; isolation, preenrichment, direct enrichment, meat meals.

SINOPSE.- O presente estudo teve o propósito de avaliar, durante investigação da presença de *Salmonella* em farinha de carne, o aproveitamento da solução de Ringer 1/4 (SR 1/4), como pré-enriquecimento, em comparação com o caldo lactosado e a água peptonada tamponada (APT) e também com o caldo selenito-novobiocina (SN) como enriquecimento direto, incubados a 37°C ou a 43°C, com ou sem uma camada de vaselina. Os resultados alcançados demonstraram que a 37°C é indiferente utilizar o pré-enriquecimento ou o enriquecimento direto. Mas a 43°C o pré-enriquecimento apresenta rendimento superior ao enriquecimento direto incubado a 37°C e a 43°C e ao pré-enriquecimento incubado a 37°C. A adição de vaselina é dispensável, por que não melhora o índice de isolamento. Quanto ao pré-enriquecimento, constatou-se que a SR 1/4 pode ser aproveitada em substituição ao caldo lactosado e à APT.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Salmonella*, isolamento, pré-enriquecimento, enriquecimento direto, farinha de carne.

INTRODUÇÃO

A inclusão do pré-enriquecimento entre as etapas da rotina bacteriológica, para isolamento de *Salmonella* em alimentos desidratados que sofreram tratamento térmico, foi inicialmente recomendada por North Jr. (1961), tendo em vista revitalizar as salmonelas, possibilitando a sua multiplicação em melhores condições, nos meios seletivos. Surgiram então outras publicações favoráveis ao pré-enriquecimento para isolamento de *Salmonella* de produtos alimentícios processados industrialmente (Taylor 1961, Gerichter & Sechter 1966, Ordal 1970, Smyser & Snoeyenbos 1971, Edel & Kampelmacher 1973, Gabis & Silliker 1974, Sveum & Kraft 1981, Werney et al. 1982, Yde & Ghysels 1984). Todavia, alguns trabalhos contestaram a sua indicação (Dawkins & Robertson 1967, Cox et al. 1980, Cox et al. 1982, Cox et al. 1983), inclusive, considerando o pré-enriquecimento prejudicial a ação posterior do caldo seletivo (Silliker et al. 1964). Outro aspecto de análise refere-se a temperatura de incubação desses meios. A temperatura de 37°C tem sido confrontada especialmente com as de 42°C e 43°C. Em geral, as salmonelas se multiplicam a 42°C ou 43°C enquanto outros microrganismos indesejáveis tem seu crescimento restringido (Taylor et al. 1964, Carlson et al. 1967, Harvey & Price 1968, Smyser & Snoeyenbos 1969, Smyser et al. 1970, Smyser & Snoeyenbos 1971).

Quanto a composição do caldo utilizado como pré-enriquecimento, North Jr. (1961) sugeriu o caldo lactosado. Van Schothorst & Van Leusden (1975) comparando o caldo lactosado com água peptonada tamponada, não notaram nenhuma

¹ Aceito para publicação em 2 de junho de 1986.

² Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal (FCAVJ) - Unesp, Rodovia Carlos Tonanni, km 5, Jaboticabal, SP 14870

³ Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, Caixa Postal 7027, São Paulo, SP 01000.

⁴ Departamento de Ciências Exatas, FCAVJ - Unesp.

⁵ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP, Caixa Postal 4365, São Paulo, SP 01000.

diferença nos resultados. Outros autores, avaliando caldos com diferentes composições, utilizados como pré-enriquecimento, também constataram que os resultados não dependem da constituição do meio (Gerichter & Sechter 1966, Thomason & Dodd 1978, D'Oust & Maishment 1979). Já Taylor & Silliker (1961) não assinalaram diferença quanto ao açúcar utilizado, mas ao compararem caldo lactosado com PBS (salina fosfatada tamponada), o primeiro apresentou melhores resultados.

A solução de Ringer 1/4 (SR 1/4) recomendada por Walker (1975) como diluente de amostras de farinha de origem animal para a análise microbiológica, foi empregada por Patterson (1969) em substituição ao caldo selenito e posteriormente, por Berchieri Jr. et al. (1984) como pré-enriquecimento de farinhas de origem animal para detecção de *Salmonella*. Berchieri Jr. et al. (1984) adicionaram à SR 1/4 e aos caldos enriquecedores vaselina líquida para diminuir a aeração e dificultar a multiplicação de *Pseudomonas* sp. Preocupação essa já demonstrada por Kafel & Kossakowska (1973) e Grunnet (1975).

Tendo-se em vista a necessidade de se viabilizar uma metodologia que possa ser de uso corrente para a pesquisa de *Salmonella* em um dos principais elos da cadeia epidemiológica, que são as matérias primas de origem animal destinadas à fabricação de rações, delineou-se o presente trabalho, em amostras de farinha de carne por ser a mais utilizada. Objetivou-se comparar durante a fase de pré-enriquecimento a SR 1/4, com o caldo lactosado e a água peptonada tamponada (APT) que são os mais utilizados (Galton et al. 1968, Edel & Kampelmacher 1973, Poelma & Silliker 1976, Andrews et al. 1978, LANARA 1981, Thomas et al. 1981), como também comparar o pré-enriquecimento com o enriquecimento direto em caldo selenito-novobiocina (SN). O ensaio foi efetuado incubando-se esses meios a 37°C e 43°C e adicionando-se ou não em suas superfícies uma camada de vaselina.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste ensaio utilizou-se 30 amostras de farinha de carne naturalmente contaminadas provenientes de remessas oriundas de uma fábrica de rações.

A seqüência bacteriológica empregada seguiu as recomendações contidas no Bacteriological Analytical Manual (BAM) (Andrews et al. 1978) e no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (CMMEF) (Poelma & Silliker 1976) com algumas modificações segundo Berchieri Jr. et al. (1984).

De cada amostra, quatro inóculos de 25 gramas foram semeados em quatro frascos contendo 225 ml de caldo lactosado. Após homogeneização, adicionava-se vaselina líquida a dois dos frascos, para formar uma camada de aproximadamente dois centímetros na superfície do caldo. Todos os frascos permaneciam a temperatura ambiente durante 6 horas. Em seguida, um contendo a camada de vaselina e outro sem essa camada, eram incubados a 37°C durante 18 horas e os outros dois a 43°C pelo mesmo período. Posteriormente, de cada frasco, após homogeneização pipetava-se 2 ml de seu conteúdo para semeá-los em tubos contendo 20 ml de caldo selenito-novobiocina (SN). Os tubos contendo o caldo SN eram incubados por período de 24 a 120 horas, a 37°C ou 43°C, com ou sem a camada de vaselina, conforme o frasco com caldo lactosado que lhe deu origem. O caldo SN, demonstrando crescimento bacteriano, era plaqueado em ágar MacConkey e ágar verde brilhante, os quais eram incubados durante 24 horas a 37°C. As colônias não fermentadoras eram inoculadas no meio de diagnóstico presuntivo IAL (Instituto Adolfo Lutz) sendo incubadas por 24 horas a 37°C. A tipificação

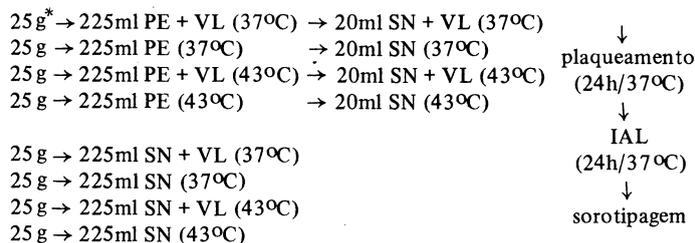
das salmonelas foi realizada pela Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, SP.

A água peptonada tamponada (APT) e a SR 1/4 receberam o mesmo tratamento do caldo lactosado.

Com relação ao enriquecimento direto, quatro espécimes de 25 gramas de cada amostra de farinha, foram semeadas em quatro frascos contendo 225 ml de caldo SN. Desses, após homogeneização, dois receberam vaselina líquida para formar uma camada de aproximadamente dois centímetros de espessura. Todos os frascos permaneciam 6 horas à temperatura ambiente e em seguida, um contendo a camada de vaselina e outro sem, eram incubados a 37°C por período de 24 a 120 horas e os demais eram incubados pelo mesmo período a 43°C. Dentro desse período, quando o caldo SN apresentava coloração avermelhada, denotando multiplicação bacteriana, era plaqueada em ágar MacConkey e ágar verde brilhante, que eram incubados durante 24 horas a 37°C. A rotina a seguir era a mesma descrita para o caldo lactosado.

Para análise estatística empregou-se o teste do Qui-quadrado (X²) segundo Gomes (1970).

Fluxograma da Análise Bacteriológica:



* 25g da amostra;

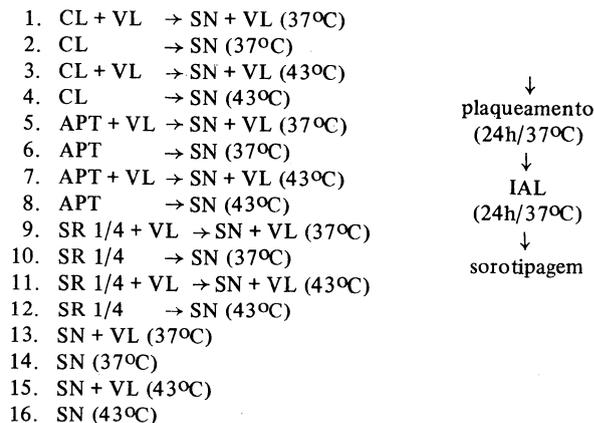
PE = Pré-enriquecimento; corresponde aos três meios utilizados: caldo lactosado, água peptonada tamponada e solução de Ringer 1/4;

VL = Vaselina líquida;

SN = Caldo selenito-novobiocina;

IAL = Meio Instituto Adolfo Lutz.

Seqüências Bacteriológicas Estudadas:



CL = Caldo lactosado;

VL = Vaselina líquida;

SN = Caldo selenito-novobiocina;

APT = Água peptonada tamponada;

SR 1/4 = Solução de Ringer 1/4;

IAL = Meio Instituto Adolfo Lutz.

RESULTADOS

No Quadro 1, estão presentes os dados correspondentes ao isolamento de *Salmonella* nas 30 amostras de farinha de carne uti-

lizadas para avaliação do pré-enriquecimento seguido de enriquecimento e do enriquecimento direto, incubados em diferentes temperaturas (37°C e 43°C) e recebendo ou não uma camada de vaselina. Conforme análise desses dados pelo teste do X² verificou-se que, durante a incubação à temperatura de 37°C não houve diferença quanto ao uso do pré-enriquecimento e do enriquecimento direto; entretanto à temperatura de 43°C, melhores resultados foram conseguidos com o emprego do pré-enriquecimento (significativo ao nível de 1% de probabilidade). Também observou-se que a 43°C ocorreu maior número de isolamento de salmonelas, levando a um maior número de amostras positivas (com significância ao nível de 1% de probabilidade). Quanto à influência da camada de vaselina, os resultados indicaram que o seu uso é indiferente. Ainda foi constatado que os três meios empregados como pré-enriquecimento tiveram desempenho semelhante, não havendo diferença significativa nos resultados.

Dentre as 30 amostras de farinha de carne estudadas, de apenas uma, não foi isolado sorotipo algum de *Salmonella* por nenhum dos métodos bacteriológicos empregados.

No Quadro 2 estão as salmonelas isoladas, conforme os meios de cultivo empregados durante as fases de pré-enriquecimento e enriquecimento direto, sendo ainda, considerada a temperatura de incubação e presença da camada de vaselina nas fases mencionadas. Com relação aos meios empregados como pré-enriquecimento e enriquecimento direto, pode-se observar que das 30 salmonelas encontradas, 22 foram isoladas através da SR 1/4, resultado esse numericamente superior aos verificados com os demais meios. Contudo, a análise estatística pelo teste do X² revelou que essa diferença não é significativa.

Quadro 1. Isolamento de *Salmonella*, em 30 amostras de farinha de carne, considerando o pré-enriquecimento, o enriquecimento direto, a temperatura de incubação e a adição de vaselina líquida nos meios líquidos.

Meios	Temperatura	Nº de amostras		Total
		Positivas	Negativas	
CL sem VL	37°C	4	26	30
CL + VL	37°C	7	23	30
CL sem VL	43°C	17	13	30
CL + CVLE	43°C	14	16	30
SR 1/4 sem VL	37°C	10	20	30
SR 1/4 + VL	37°C	9	21	30
SR 1/4 sem VL	43°C	15	15	39
SR 1/4 + VL	43°C	20	10	30
APT sem VL	37°C	7	23	30
APT + VL	37°C	8	22	30
APT sem VL	43°C	16	14	30
APT + VL	43°C	18	12	30
SN sem VL	37°C	6	24	30
SN + VL	37°C	10	20	30
SN sem VL	43°C	8	22	30
SN + VL	43°C	6	24	30

CL Caldo lactosado;
 SR 1/4 Solução de Ringer 1/4;
 APT Água peptonada tamponada;
 SN Caldo selenito + novobiocina usado como enriquecimento direto;
 VL Vaselina líquida.

Quadro 2. *Salmonelas detectadas conforme os pré-enriquecimentos, o enriquecimento direto, as temperaturas de incubação e a adição de vaselina líquida nos meios líquidos*

Sorotipo	CL	SR 1/4	APT	SN	37°C	43°C	C/V	S/V
<i>S. agona</i>	+	+	+		+	+	+	+
<i>S. anatum</i>	+	+	+		+	+	+	+
<i>S. binza</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. bredeney</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerro</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. eimsbuettel</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. grumpensis</i>	+	+	+		+	+	+	+
<i>S. havana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. infantis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. infantis 014+</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. inganda</i>			+			+		+
<i>S. kentucky</i>		+				+	+	+
<i>S. lexington</i>	+	+	+		+	+	+	+
<i>S. lille</i>		+				+		+
<i>S. manila</i>	+		+		+	+	+	+
<i>S. mbandaka</i>		+	+	+		+	+	+
<i>S. mdandaka 014+</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. montevidéo</i>		+	+		+	+	+	+
<i>S. morehead</i>	+				+	+	+	+
<i>S. newington</i>		+		+	+	+	+	+
<i>S. oranienburg</i>		+	+	+		+	+	+
<i>S. senftenberg</i>	+	+	+	+		+	+	+
<i>S. taksony</i>				+		+	+	
<i>S. saint paul</i>				+		+		+
<i>S. 4,12:-SG I</i>	+					+		+
<i>S. 4,12:d:-SG I</i>		+				+	+	
<i>S. cubana</i>	+	+	+		+	+	+	+
<i>S. cubana d-tartarato-</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. cepa rugosa SG I</i>			+		+		+	
<i>S. cepa rugosa SG I dt+</i>				+	+			+
Total	18	22	20	15	20	28	25	26

CL Caldo lactosado;
 SR 1/4 Solução de Ringer 1/4;
 APT Água peptonada tamponada;
 SN Caldo selenito-novobiocina;
 C/V Com camada de vaselina;
 S/V Sem camada de vaselina;
 SGI Sub-gênero I.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O propósito desta pesquisa não é a preconização da melhor metodologia para o isolamento de salmonelas em farinha de carne empregada como matéria prima de ração animal. Esse assunto tem sido focado de forma mais abrangente em países possuidores de melhores condições econômicas e tecnológicas. Mesmo assim, a metodologia para o isolamento de salmonelas de farinhas de origem animal, de rações e de produtos alimentícios industrializados para consumo humano, continua sendo objeto de estudo. Assim planejou-se o presente ensaio para se verificar a possibilidade de uso de uma rotina bacteriológica que mais se identifique com as condições do nosso país; mas que também leve a resultados semelhantes aos observados em rotinas convencionais.

Foram comparados três meios, de diferentes constituições, empregados durante a fase de pré-enriquecimento: caldo lacto-

sado, água peptonada tamponada (APT) e a solução de Ringer 1/4 (SR 1/4) contendo apenas sais minerais indicado como diluente de produtos em pó para investigação de salmonelas (Walker 1957) e que, tendo sido posteriormente usado, em substituição ao caldo enriquecedor, por Patterson (1969), apresentou resultados irrisórios. Entretanto, ao ser empregada pela primeira vez como pré-enriquecimento, em amostras de farinhas de origem animal destinadas à fabricação de rações, por Berchieri Jr. et al. (1984), apresentou resultados favoráveis. Apesar de North Jr. (1961) enfatizar que os caldos à base de açúcares são necessários para dificultar o desenvolvimento dos competidores das salmonelas através da diminuição do pH, os resultados observados, no que concerne ao caldo lactosado e a APT são concordantes a relatos anteriores (Van Schothorst & Van Leusden 1975, Thomason & Dodd 1978), onde o rendimento de ambos foi equivalente. Quanto à SR 1/4, os resultados da análise estatística, demonstraram-na igualmente eficiente aos demais meios estudados, indicando sua utilização para a fase de pré-enriquecimento para pesquisa de *Salmonella* em amostras de farinha de origem animal, conforme pressuposição anterior (Berchieri Jr. 1984).

Os resultados alcançados na presente pesquisa, enfatizando o uso do pré-enriquecimento, encontram apoio na literatura especializada (Edel & Kampelmacher 1973, Kafel & Kossakowska 1973, Thomason & Dodd 1978, Sveum & Kraft 1981, Wernery et al. 1982). Contudo, só foi visualizado quando a temperatura de incubação era de 43°C. À temperatura de 37°C, estatisticamente, o pré-enriquecimento não diferiu do enriquecimento direto, resultado esse já demonstrado em trabalhos como o de Taylor et al. (1964) em produtos alimentícios, o de Thomason & Dodd (1978) em carne e em carcaça de aves e o de Cox et al. (1980) em carcaça resfriada de aves, assim como em outros, contestando a utilidade do pré-enriquecimento, inclusive achando-o prejudicial a ação subsequente do caldo enriquecedor, durante pesquisa de salmonelas em amostras de rações (Cox et al. 1982, Cox et al. 1983).

No tocante a temperatura de incubação, durante o isolamento de *Salmonella*, em materiais contendo outras bactérias, alguns autores consideram a incubação do pré-enriquecimento a 35°C ou a 37°C satisfatória (Gerichter & Sechter 1966, D'Oust & Maishment 1979), seguida de incubação do caldo enriquecedor a 43°C (Edel & Kampelmacher 1973, Van Schothorst & Van Leusden 1975), enquanto outros acham indiferente incubar a 37°C ou a 43°C (Cox et al. 1982). Todavia, abundantes são os relatos atinentes à incubação do pré-enriquecimento, do enriquecimento ou de ambos, à temperatura de 42°C ou 43°C (Carlson et al. 1967, Harvey & Price 1968, Smyser & Snoeyenbos 1969, Smyser et al. 1970, Smyser & Snoeyenbos 1971).

Carlson et al. (1967), durante pesquisa de *Salmonella* em farinha de carne e osso e em cama de aves, notaram melhor desempenho do caldo selenito incubado à 43°C em detrimento do mesmo a 37°C. Nesta pesquisa, a temperatura não interferiu nos resultados com relação ao enriquecimento direto, mas no que diz respeito ao pré-enriquecimento seguido do enriquecimento em caldo SN, houve interferência estatisticamente significativa (Quadro 1). As seqüências bacteriológicas incubadas

a 43°C detectaram salmonelas aproximadamente, em número dobrado de amostras em comparação aos conseguidos durante a incubação do pré-enriquecimento a 37°C e do enriquecimento direto a 37°C e a 43°C. Concomitantemente ao maior número de isolamentos, ocorreu também detecção de maior número de salmonelas (Quadro 2). Assim como Van Schothorst & Van Leusden (1975), que não notaram evidência alguma de que a temperatura (37°C ou 43°C) interfira com a salmonela isolada, presume-se que o maior número detectado a 43°C, seja decorrente da maior freqüência de isolamentos conseguidos nesta temperatura.

Já a aplicação da camada de vaselina nos meios utilizados como pré-enriquecimento e enriquecimento e considerando os resultados alcançados (Quadros 1 e 2), mediante análise estatística, observa-se que o seu uso é dispensável, apesar de Berchieri et al. (1984) haverem acreditado que ela favorecia o isolamento de *Salmonella* por dificultar a multiplicação de *Pseudomonas sp.* em virtude de diminuir a aeração do meio. Outros autores utilizando diferentes métodos como anaerobiose em jarra (Kafel & Kossakowska 1973) e adição de uma camada de óleo mineral (Grunnet 1975) também concluíram que a anaerobiose não contribui para melhorar as condições de isolamento. Todavia, ao exame do Quadro 1, é possível notar que a SR 1/4 e a APT, quando portadores de uma camada de vaselina, com incubação a 43°C, apresentaram os melhores resultados entre as seqüências bacteriológicas confrontadas nesta pesquisa.

Especialmente no que diz respeito à farinha de carne, a investigação de *Salmonella* constitui-se em um importante passo para a determinação de medidas de combate à salmonelose humana e animal. Haja visto, neste trabalho, onde constatou-se que das 30 amostras colhidas de 30 diferentes remessas recebidas por uma fábrica de ração, 20 continham *Salmonella*.

REFERÊNCIAS

- Andrews W.H., Poelma P.L., Wilson G.R., Romero A. 1978. VI. Isolation and identification of *Salmonella*, p. 1-29. In: Bacteriological Analytical Manual. 5th ed. Department of Health, Education and Welfare, Washington.
- Berchieri Jr. A., Irino K., Neme S.N., Paulillo A.C., Calzada C.R., Ferreira S.A., Pessoa G.V.A. 1984. Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal utilizadas no preparo de rações. *Pesq. Vet. Bras.* 4(3): 83-88.
- Carlson V.L., Snoeyenbos G.H., McKie B.A., Smyser C.F. 1967. A comparison of incubation time and temperature for the isolation of *Salmonella*. *Avian Dis.* 11(2): 217-225.
- Cox N.A., Bailey J.S., Thomson J.E. 1982. Effect of various media and incubation conditions on recovery of inoculated *Salmonella* from poultry feed. *Poultry Sci.* 61:1314-1321.
- Cox N.A., Bailey J.S., Thomson J.E. 1983. Comparison of preenrichment to direct enrichment and the effect of pyruvate in media for recovery of salmonellae infected. *Poultry Sci.* 62: 947-951.
- Cox N.A., Bailey J.S., Thomson J.E., Carson M.O. 1980. Lactose preenrichment versus direct enrichment for recovering *Salmonella* from deep-chilled broilers and frozen meat products. *Poultry Sci.* 59: 2431-2436.
- D'Oust J.Y. & Maishment C. 1979. Preenrichment conditions for effective recovery of *Salmonella* in foods and feed ingredients. *J. Food Protection* 42(2): 153-157.

- Dawkins H.C. & Robertson L. 1967. Salmonellas in animal feeding stuffs. Mon. Bull. Minist. Hlth 26: 215-221.
- Edel W. & Kampelmacher E.H. 1973. Comparative studies on the isolation of sublethally injured salmonellae in nine european laboratories. Bull. Wld Hlth Org. 48: 167-174.
- Gabis D.A. & Silliker J.H. 1974. ICMSF methods studies. II. Comparison of analytical schemes for detection of *Salmonella* in high-moisture foods. Can. J. Microbiol. 20: 663-669.
- Galton M.M., Morris G.K., Martin W.T. 1968. Salmonellae in foods and feeds. Review of isolation methods and recommended procedures. US-HEW, Department of Health, Education and Welfare. 41p.
- Gerichter C.B. & Sechter I. 1966. Comparison of methods for the isolation of *Salmonella* from bone meal. Appl. Microbiol. 14 (5): 711-715.
- Gomes F.P. 1970. Curso de Estatística Experimental. 4.º ed. ESALQ, Piracicaba. 430 p.
- Grunnet K. 1975. *Salmonella* in sewage and receiving waters. Copenhagen: Fadl's Forlag. Citado por Harvey R.W.S. & Price T.H. 1979. A review principles of *Salmonella* isolation. J. Appl. Bacteriol. 46: 27-56.
- Harvey R.W.S. & Price T.H. 1968. Elevated temperature incubation of enrichment media for the isolation of salmonellas from heavily contaminated materials. J. Hyg., Camb., 66: 377-381.
- LANARA 1981. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus integrantes. I. Métodos microbiológicos. Vol. 1. Laboratório Nacional de Referência Animal, Secr. Nac. Defesa Agropecuária, Min. Agricultura, Brasília.
- Kafel S. & Kossakowska A. 1973. Comparative investigations on various methods of *Salmonella* isolation from fodder meals. Bull. Vet. Inst. Pullawy 17(1-2): 38-43.
- North Jr. W.R. 1961. Lactose pre-enrichment method for isolation of *Salmonella* from dried egg. Its use in a survey of commercially produced albumen. Appl. Microbiol. 9: 188-195.
- Ordal Z.J. 1970. Current developments in a detection of microorganisms in foods: influence of environmental factors on detection methods. J. Milk Food Technol. 33(1): 1-5.
- Patterson J.T. 1969. Salmonellae in meat and poultry, poultry plant cooling waters and effluents, and animal feedingstuffs. J. Appl. Bacteriol. 32: 329-337.
- Poelma A.L. & Silliker J.H. 1976. *Salmonella*. p. 301-308. In: Speck M.L. (ed.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA.
- Silliker J.H., Deibel R.H., Fagan P.T. 1964. Isolation of salmonellae from food samples. VI. Comparison of methods for the isolation of *Salmonella* from egg products. Appl. Microbiol. 12(3): 224-228.
- Smyser C.F. & Snoeyenbos G.H. 1969. Evaluation of several methods of isolating salmonellae from poultry litter and animal feedstuffs. Avian Dis. 13(1): 134-141.
- Smyser C.F. & Snowyenbos G.H. 1971. Enrichment serology compared with a direct-culture procedure for isolating salmonellae from rendered animal by-products. Avian Dis. 15(3): 581-587.
- Smyser C.F., Snoeyenbos G.H., McKie B. 1970. Isolation of salmonellae from rendered by-products and poultry litter cultured in enrichment media incubated at elevated temperatures. Avian Dis. 14(2): 248-254.
- Sveum W.H. & Kraft A.A. 1981. Recovery of salmonellae from foods using a combined enrichment technique. J. Food. Sci. 46: 94-99.
- Taylor W.I. 1961. Isolation of salmonellae from food samples. V. Determination of the method of choice for enumeration of *Salmonella*. Appl. Microbiol. 9: 487-490.
- Taylor W.I., Hobbs B.C., Smith M.E. 1964. Comparison of two methods for the isolation of salmonellae from imported foods. Appl. Microbiol. 12 (1): 53-56.
- Taylor W.I. & Silliker J.H. 1961. Isolation of salmonellae from samples. IV. Comparison of methods of enrichment. Appl. Microbiol. 9: 484-486.
- Thomason B.M. & Dodd D.J. 1978. Enrichment procedures for isolating salmonellae from raw meat and poultry Appl. Environ. Microbiol. 36(4): 627-628.
- Thomas R.J., Smeltzer T.I., Tranter G. 1981. Examination of stock-feeds for *Salmonella*. Aust. Vet. J. 57: 69-61.
- Van Schothorst M. & Van Leusden F.M. 1975. Comparison of several methods for the isolation of salmonellae from egg products. Can. J. Microbiol. 21: 1041-1045.
- Walker J.H.C. 1957. Organic fertilizers as a source of *Salmonella* infection. Lancet 11: 283-284.
- Wernery U., Leach A., Pangumen M. 1982. Comparative quantitative study of sublethally damaged *Salmonella* in heated an unheated chicken feed. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 89 (11): 445-450. (Vet. Bull. 53(7): 635, 1983)
- Yde M. & Ghysels G. 1984. Performance of several enrichments media in the isolation of salmonellae from egg products. J. Food Protection 47(3): 217-219.