

## Comunicação

[Communication]

### Comparação do isolamento microbiológico e da reação em cadeia da polimerase no diagnóstico de salmonelose em bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Typhimurium

[Comparison of microbiological culture and polymerase chain reaction in the diagnosis of salmonellosis in *Salmonella* Typhimurium-infected calves]

D.G. Silva<sup>1</sup>, L.G. Ávila<sup>2</sup>, R. Berg<sup>3</sup>, D.R. Silva<sup>1</sup>, S.O. Conde<sup>4</sup>, M.V.F. Lemos<sup>4</sup>, J.J. Fagliari<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Aluna de pós-graduação - FCAV-UNESP - Jaboticabal, SP

<sup>2</sup>Aluna de pós-graduação - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - FMVA-UNESP - Araçatuba, SP

<sup>3</sup>Aluna de graduação - FCAV-UNESP - Jaboticabal, SP

<sup>4</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV-UNESP

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n

14884-900 - Jaboticabal, SP

As diarreias de bezerros recém-nascidos representam uma das principais causas de prejuízos à criação de bovinos, sendo a salmonelose uma das infecções naturais mais frequentes, principalmente aquelas relacionadas aos sorotipos *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Dublin (Santos *et al.*, 2002).

O método de isolamento tradicional da *Salmonella* inclui as etapas de pré-enriquecimento e/ou enriquecimento direto (seletivo), plaqueamento em meios semi-sólidos, análise bioquímica e tipificação sorológica (Paiva *et al.*, 2006). Estes métodos de cultivo são muito utilizados, porém os resultados demoram de quatro a sete dias, podendo ocorrer falso-negativos quando a quantidade de bactérias na amostra é pequena (Oliveira *et al.*, 2005). Vários métodos alternativos para detecção de *Salmonella* têm sido desenvolvidos. A reação em cadeia da polimerase (PCR), associada aos caldos de enriquecimento seletivo, tem sido considerada uma técnica promissora por facilitar e agilizar o diagnóstico de salmonelose a partir de amostras de fezes, uma vez que permite a multiplicação da bactéria-alvo e dilui células mortas e substâncias inibidoras da PCR (Schrank *et al.*, 2001).

O objetivo do estudo foi avaliar a eficiência do isolamento microbiológico e da PCR, com a utilização de dois caldos seletivos de enriquecimento (selenito cistina e tetrionato Muller-Kauffmann), no diagnóstico da salmonelose em bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Typhimurium.

Foram avaliadas amostras de suabes retais de 12 bezerros da raça Holandesa, com 10 a 15 dias de idade, distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, compostos de seis bezerros cada. Os do grupo 1 receberam, via oral, 10mL de caldo *Brain Heart Infusion* (CM0225, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) (BHI), e os do grupo 2 receberam, também pela via oral, 10<sup>9</sup> UFC de *Salmonella* Typhimurium (registro IOC 6333/06) diluídas em 10mL de caldo BHI. As amostras de suabes retais de cada bezerro foram colhidas em duplicata imediatamente antes da inoculação e, em seguida, a cada 24 horas até o final do experimento, ao sexto dia após a inoculação, totalizando 72 amostras. O estudo teve aprovação da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA-FCAV), Protocolo nº 009986-07.

---

Recebido em 15 de março de 2011

Aceito em 14 de julho de 2011

E-mail: danielafcav@yahoo.com.br

O isolamento microbiológico de *Salmonella* Typhimurium foi realizado a partir do enriquecimento dos suabes retais nos caldos selenito cistina (CM0699, Oxoid) (SC) e tetrionato Muller-Kauffmann (CM0343, Oxoid) (TMK), seguido de plaqueamento em ágar verde brilhante modificado (CM0329, Oxoid), testes bioquímicos presuntivos (ágar tríplice açúcar e ferro (CM0277, Oxoid) – TSI e ágar lisina ferro (CM0381, Oxoid) – LIA) e confirmação sorológica (soros polivalentes anti-O e anti-H de *Salmonella*) (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

Alíquotas dos caldos TMK e SC foram submetidas à extração de DNA pelo método *salting-out*, segundo metodologia descrita por Silva (2007). A PCR foi realizada em volume final de 25µL, com 5µL de amostra de DNA adicionados a 20µL da mistura de reação contendo 3,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 75µM de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen, Carisbad, CA, USA) (dNTP); 1µM de cada *primer* (5'-AGA ATA TGT AAT TGT CAG e 5'-TAA CCG TTT CAG TAG TTC) e 1,5U de Taq polimerase (Kongmuang *et al.*, 1994). A reação foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA) utilizando-se desnaturação inicial por 10 minutos a 94°C, 40

ciclos: 90°C por 40 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo, visualizados e registrados em fotodocumentador (Gel Doc 2000, Bio-Rad). As amostras contendo fragmento de 882pb foram consideradas positivas.

Os resultados do isolamento microbiológico e da PCR foram analisados pelo teste do qui-quadrado de McNemar, e o grau de concordância entre os testes foi avaliado pelo teste Kappa (Zar, 1999).

Não foi detectada *Salmonella* Typhimurium em nenhuma amostra de suabe retal dos bezerros do grupo 1 com a utilização do isolamento microbiológico. No grupo 2, todos os bezerros inoculados passaram a eliminar *S. Typhimurium* nas fezes 24 horas após a infecção experimental (Tab. 1). A utilização do caldo selenito cistina e do caldo tetrionato Muller-Kauffmann possibilitou a detecção de 33 amostras positivas para *S. Typhimurium*. O uso simultâneo dos dois caldos de enriquecimento permitiu o isolamento de 34 amostras positivas para *Salmonella*.

Tabela 1. Detecção de *Salmonella* Typhimurium em suabes retais obtidos de bezerros infectados com 10<sup>9</sup> UFC de *S. Typhimurium* (grupo 2), antes da inoculação (M0) e em intervalos de 24 horas, até o sexto dia pós-inoculação (M1 a M6), pelo isolamento microbiológico

Momento	Animal												
	1		2		3		4		5		6		
	SC	TMK	SC	TMK	SC	TMK	SC	TMK	SC	TMK	SC	TMK	
M0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M6	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Total	4	4	6	6	5	5	6	6	6	6	6	6	6

- = negativo; + = positivo; SC = selenito cistina; TMK = tetrionato Muller-Kauffmann.

Assim como no isolamento microbiológico, não foi detectada *Salmonella* em nenhum dos animais do grupo 1 pela técnica da PCR. Nas amostras de suabes retais dos bezerros do grupo 2, também foi possível detectar *Salmonella* Typhimurium 24 horas após a inoculação (Tab. 2 e Fig. 1). A utilização do caldo selenito cistina possibilitou a

detecção de 30 amostras positivas para *S. Typhimurium*, enquanto o caldo tetrionato Muller-Kauffmann possibilitou a detecção de 24 amostras positivas. O uso simultâneo dos caldos tetrionato Muller-Kauffmann e selenito cistina também permitiu a detecção de maior número de amostras positivas para *Salmonella* (32).

Comparação do isolamento...

Tabela 2. Detecção de *Salmonella* Typhimurium em suabes retais obtidos de bezerros infectados com  $10^9$  UFC de *S. Typhimurium* (grupo 2), antes da inoculação (M0) e em intervalos de 24 horas, até o sexto dia pós-inoculação (M1 a M6), pela técnica de PCR

Momento	Animal												
	1		2		3		4		5		6		
	SC	TMK	SC	TMK	SC	TMK	SC	TMK	SC	TMK	SC	TMK	
M0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
M2	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
M3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
M4	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
M5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M6	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Total	4	4	6	6	4	2	6	4	6	3	4	5	5

- = negativo; + = positivo; SC = selenito cistina; TMK = tetrionato Muller-Kauffmann.

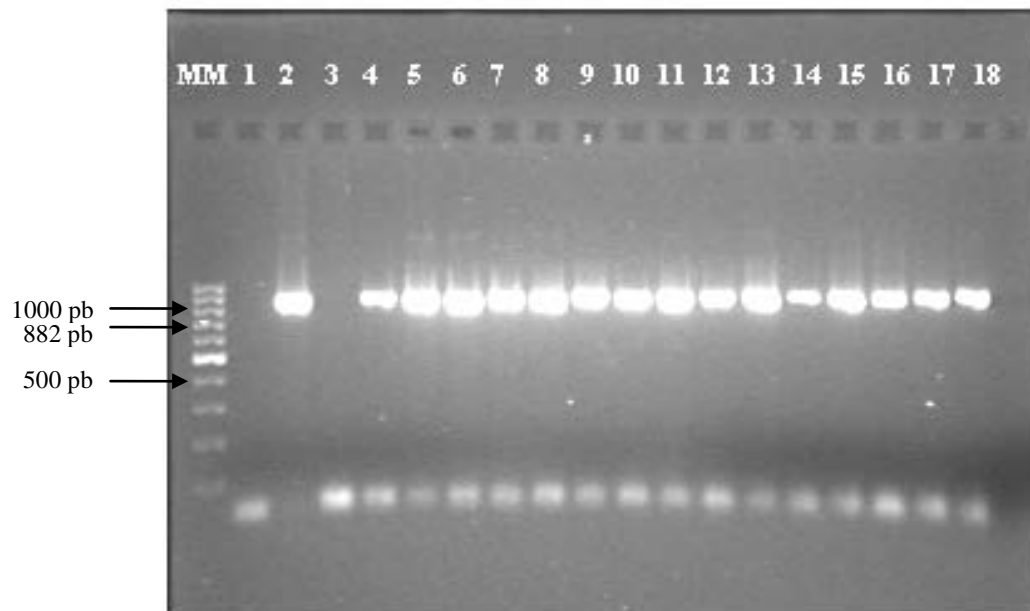


Figura 1. Eletroforograma que evidencia a detecção de *Salmonella* Typhimurium pela técnica de PCR a partir de suabes retais dos bezerros do grupo 2 enriquecidos em caldo selenito cistina (SC) e tetrionato Muller-Kauffmann (TMK), pelo método de extração de *salting-out*. MM: peso molecular DNA Ladder 100 pb, 1: controle negativo, 2: controle positivo, 3: amostra negativa; 4-18: amostras positivas.

Pelo teste do qui-quadrado de McNemar, o isolamento microbiológico foi superior à PCR na detecção de amostras positivas para *Salmonella* Typhimurium em suabes retais, tanto com a utilização do caldo selenito cistina (33 amostras positivas pelo isolamento microbiológico contra 30 amostras positivas pela PCR) quanto com o uso do caldo tetrionato Muller-Kauffmann (33 amostras positivas pelo isolamento microbiológico contra 24 amostras positivas pela PCR) ( $P < 0,05$ ). A concordância entre os resultados do isolamento microbiológico

e os resultados da PCR foi considerada moderada (0,63) com o uso do caldo selenito cistina, e fraca (0,31) com o emprego do caldo tetrionato Muller-Kauffmann pelo teste estatístico Kappa.

A maior parte das pesquisas relatam que a PCR é superior ao isolamento microbiológico convencional na detecção de *Salmonella* (Oliveira *et al.*, 2003; Castagna *et al.*, 2005; Freschi *et al.*, 2005), entretanto os resultados obtidos mostraram melhor desempenho do isolamento microbiológico.

O menor número de amostras positivas detectadas com a utilização da PCR pode estar relacionado à presença de várias substâncias inibidoras da reação de amplificação nas amostras de fezes, como bilirrubina e agentes quelantes, que não são totalmente removidas durante o processo de extração do DNA (Oliveira et al., 2005). Contudo, vários estudos verificaram que a metodologia de extração de DNA, a partir de amostras de fezes, pelo método de *salting-out* é mais sensível do que as técnicas de extração por fervura-centrifugação e fenol-clorofórmio (Freschi et al., 2005; Silva et al., 2010). Além disso, o baixo desempenho da PCR associada ao uso do caldo tetracionato Muller-Kauffmann pode ser explicado pelo fato de que este meio contém em sua composição 10% de

bile bovina, também considerada inibidora da PCR (Stone et al., 1994).

Assim, os resultados indicam que o isolamento microbiológico foi mais eficiente do que a PCR no diagnóstico da salmonelose a partir de amostras de fezes de bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella Typhimurium* e que o caldo selenito cistina apresentou desempenho superior ao caldo tetracionato Muller-Kauffmann na detecção de *Salmonella Typhimurium* com a utilização da PCR.

Palavras-chave: bovinos, fezes, isolamento bacteriano, *Salmonella Typhimurium*

### ABSTRACT

*The efficiency of microbiological culture and polymerase chain reaction (PCR) for detection of Salmonella Typhimurium is compared in fecal samples of Holstein calves experimentally infected with 10<sup>9</sup> CFU of Salmonella Typhimurium. Seventy-two fecal samples were analyzed by microbiological culture and PCR associated with selenite cystine (SC) and Muller-Kauffmann tetrathionate (TMK) selective enrichment broths. Regardless of the selective enrichment broth, the microbiological culture was significantly better than PCR for detection of positive samples of Salmonella Typhimurium. The selective enrichment broths SC and TMK had no effect on the efficiency of the microbiological culture. The SC broth was the best option as selective enrichment associated to PCR.*

*Keywords: cattle, feces, bacteriological isolation, Salmonella Typhimurium*

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP, pela concessão de bolsa e pelo auxílio financeiro, e à Fundação Oswaldo Cruz, pelo fornecimento da cepa de *Salmonella Typhimurium*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTAGNA, S.M.F.; MULLER, M.; RODENBUSCH, C.R. et al. Detection of *Salmonella* sp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. *Braz. J. Microbiol.*, v.36, p.373-377, 2005.

FRESCHI, C.R.; CARVALHO L.F.O.S.; OLIVEIRA C.J.B. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella Typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Braz. J. Microbiol.*, v.36, p.363-367, 2005.

KONGMUANG, U.; LUK, J.M.; LINDBERG, A.A. Comparison of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2 and D by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.3072-3074, 2005.

OLIVEIRA, C.J.; CARVALHO, L.F.O.S.; GIVISIEZ, P.E.N. Detection of *Salmonella enterica* in porcine fecal samples by different isolating and enrichment broth cultivation-PCR methods. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, v.100, p.193-198, 2005.

OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; CÉ M.C. et al. Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* identification. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.36, p.217-221, 2003.

PAIVA, J.B.; STERZO, E.V.; RIBEIRO, S.A. et al. Isolamento de *Salmonella*: comparação das etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento direto de amostras de fezes armazenadas por 24 e 96 horas. *Arq. Inst. Biol.*, v.73, p.263-269, 2006.

*Comparação do isolamento...*

SANTOS, R.L.; ZHANG, S; TSOLIS, R.M. *et al.* Morphologic and molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium infection in neonatal calves. *Vet. Pathol.*, v.39, p. 200-215, 2002.

SCHRANK, I.S.; MORES, M.A.Z.; COSTA, J.C.A. *et al.* Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. *Vet. Microbiol.*, v.82, p.45-53, 2001.

SILVA, D.G. *Estudo clínico, laboratorial e terapêutico da diarreia experimental em bezerros induzida por Salmonella enterica subespécie enterica sorotipo Dublin.* 2007. 153f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

SILVA, D.G.; SILVA, D.R.; SILVA, P.R.L. *et al.* Avaliação da reação em cadeia da polimerase e do isolamento bacteriológico convencional na detecção de *Salmonella* Dublin em amostras de fezes de bezerros infectados experimentalmente. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, p.752-756, 2010.

STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P. *et al.* Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.1742-1749, 1994.

ZAR, J.H. *Biostatistical analysis.* 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.