

Comunicação

[Communication]

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

[Evaluation of polymerase chain reaction and standard microbiological techniques for detection of *Salmonella* Dublin in fecal samples of infected calves]

D.G. Silva¹, D.R. Silva², P.R.L. Silva³, E.A.S. Cícero², A.L.J. Ferraz², M.V.F. Lemos⁴, J.J. Fagliari^{4*}

¹Aluna de pós-graduação - DCCV-FCAV-UNESP – Jaboticabal, SP

²Aluno de pós-graduação - FCAV-UNESP – Jaboticabal, SP

³Médico veterinário autônomo

⁴Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP

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

14884-900 – Jaboticabal, SP

Salmonella é uma bactéria de ocorrência cosmopolita que infecta várias espécies animais, inclusive os seres humanos, sendo incriminada como importante causa de infecções alimentares decorrentes do consumo de carne e leite e seus derivados (Salmonellosis..., 1988). Os sorotipos *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Typhimurium são os mais frequentemente isolados em bovinos, sendo *Salmonella* Dublin o sorotipo adaptado à espécie bovina e um dos principais agentes etiológicos de diarreia em bezerros (Santos et al., 2002).

O método de isolamento tradicional de *Salmonella* baseia-se no cultivo bacteriológico, com a utilização de meios seletivos, seguido de caracterização das colônias suspeitas em testes bioquímicos e sorológicos (Soumet et al., 1999). Porém, sua realização é demorada (quatro a sete dias), podendo ser laboriosa e onerosa quando aplicada em larga escala.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) vem se destacando como importante ferramenta no diagnóstico de salmonelose, em termos de rapidez e sensibilidade (Freschi et al., 2005). Entretanto, o maior obstáculo para o uso dessa técnica é a presença de altas concentrações de substâncias inibidoras da PCR em amostras de

fezes, o que limita a utilização direta das fezes como DNA-molde (Feder et al., 2001). O enriquecimento em meio seletivo antes da etapa de extração do DNA tem sido considerado um procedimento promissor para detecção de *Salmonella* em amostras de fezes, pois, além de ser uma etapa comum ao isolamento microbiológico, permite a multiplicação da bactéria-alvo e, também, dilui células mortas e substâncias inibidoras da PCR (Knutsson et al., 2002).

O objetivo do estudo foi avaliar a eficiência da PCR combinada com enriquecimento em caldo seletivo comparativamente ao isolamento bacteriológico convencional na detecção de *Salmonella* Dublin em amostras de fezes de bezerros infectados experimentalmente com a bactéria.

Foram analisadas 76 amostras de fezes obtidas por meio de suabes retais de seis bezerros da raça Holandesa, com 10 a 15 dias de idade, infectados experimentalmente com 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Salmonella* Dublin (registro IOC 3101/03, Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos, RJ), por via oral. As amostras foram colhidas em duplicata, imediatamente antes da inoculação, e em intervalos de doze horas, ao longo de sete dias após a infecção experimental.

Recebido em 16 de novembro de 2009

Aceito em 10 de junho de 2010

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: fagliari@fcav.unesp.br

O isolamento de *Salmonella* Dublin foi realizado por meio de cultura bacteriológica convencional e pela técnica de PCR. No isolamento bacteriológico, as amostras de suabes retais foram inoculadas nos caldos de enriquecimento seletivo selenito cistina (SC) (CM0699, Oxoid) e tetrionato Muller-Kauffman (TKM) (CM 0343, Oxoid) e incubados a 37°C durante 24 horas. Após incubação, os caldos foram semeados em placas contendo ágar verde-brilhante modificado (CM0329, Oxoid), com 50µg/mL de ácido nalidíxico, e incubados a 37°C por 24 horas. De cada placa, três colônias sugestivas de bactérias do gênero *Salmonella* foram inoculadas em tubos contendo ágar tríplice açúcar e ferro (CM0277, Oxoid) e ágar lisina ferro (CM0381, Oxoid). Todas as colônias identificadas presuntivamente como *Salmonella* foram submetidas ao teste de soroglutinação em lâmina, com soro polivalente antiantígeno somático (O) e com soro polivalente antiantígeno flagelar (H) de *Salmonella*.

A partir de alíquotas dos dois caldos de enriquecimento seletivo, foi realizada a extração de DNA para realização de PCR, pela técnica de *salting-out* (Silva, 2007). Também foi avaliada a sensibilidade da PCR na detecção de *Salmonella* Dublin com o uso das técnicas de extração de DNA por fervura-centrifugação, fervura-fenol e *salting-out* nos caldos Rappaport-Vassiliadis, selenito cistina e tetrionato Muller-Kauffmann (Freschi, 2003). A PCR tipo multiplex foi realizada em volume final de 25µL, com 5µL de amostra de DNA adicionado a 20µL da mistura de reação contendo 2,0mM de MgCl₂; 70µM de cada deoxinucleotídeo; 0,4µM de cada primer (RE1:5'-CTTGGGAGTAATCTTGCC-3'; RE2:5'-TATACTGCCGTACTGCCT-3'; FC1:5'-TGATCTCTTTAAGACCACTA-3'; FC2:5'-ACATCCGTCGCGCCAGTGGC-3'), específicos para os segmentos *rfbE* e *fliC* presentes nas cepas de *Salmonella* pertencentes ao sorogrupo D (Itoh et al., 1997), e 1U de Taq polimerase. A reação foi realizada em termociclador (PTC-100, MJ Research) ajustado para 35 ciclos: 95°C por 30 segundos (desnaturação), 56°C durante 30 segundos

(pareamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). A amplificação do DNA também foi realizada nos controles positivos e negativos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo, visualizados e registrados em fotodocumentador (Gel Doc 2000, Bio-Rad). As amostras apresentando fragmentos de 307 e/ou 225pb foram consideradas positivas.

Os resultados da detecção de *Salmonella* Dublin obtidos pelo isolamento bacteriológico convencional e pela PCR foram submetidos à análise estatística, pelo teste do qui-quadrado e pelo índice de concordância Kappa (Zar, 1999).

O isolamento bacteriológico convencional possibilitou a detecção de 44 (57,9%) e 42 (55,3%) amostras positivas para *Salmonella* Dublin, enquanto a técnica de PCR possibilitou a detecção de 41 (53,9%) e 35 (46,1%) amostras positivas para *Salmonella* Dublin, ambas com a utilização dos caldos SC e TMK, respectivamente (Fig. 1). O limiar de detecção da PCR pelo método de extração de DNA por *salting-out* foi de 10² UFC/mL nos caldos SC e TMK (Tab. 1). Nenhuma das amostras obtidas antes da infecção experimental foi positiva para *S. Dublin*, em ambas as técnicas.

Independentemente do caldo de enriquecimento seletivo utilizado, o isolamento bacteriológico convencional foi superior à PCR na detecção de amostras positivas para *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais (P<0,0001). A concordância entre o isolamento bacteriológico convencional e a PCR foi considerada moderada (0,49 com o uso do caldo SC e 0,45 com o uso do caldo TMK).

A PCR, quando comparada ao isolamento bacteriológico convencional, apresentou sensibilidade e especificidade de 75,0%, quando associada ao caldo SC (Tab. 2), e sensibilidade de 66,7% e especificidade de 79,4%, quando associada ao caldo TMK (Tab. 3).

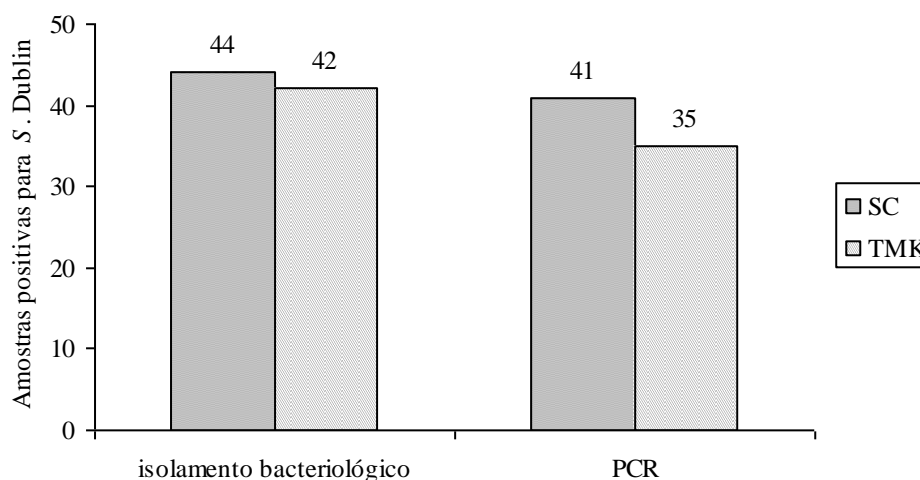


Figura 1. Número de amostras positivas para *Salmonella* Dublin detectadas em isolamento bacteriológico convencional e em PCR, nos caldos selenito cistina (SC) e tetrationato Muller-Kauffmann (TMK), em amostras de fezes de bezerros infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin*.

Tabela 1. Limiar de detecção de cultura pura de *Salmonella* Dublin (UFC/mL) em PCR utilizando-se diferentes métodos de extração de DNA (fervura-centrifugação, fervura-fenol e *salting-out*) e diferentes caldos de enriquecimento seletivo (Rappaport-Vassiliadis, selenito cistina e tetrationato Muller-Kauffmann)

Caldos de enriquecimento seletivo	Métodos de extração de DNA		
	Fervura-centrifugação	Fervura-fenol	<i>Salting-out</i>
Rappaport-Vassiliadis	10^6	10^5	10^5
Selenito cistina	10^3	10^4	10^2
Tetrationato Muller-Kauffmann	10^7	10^8	10^2

Tabela 2. Resultados comparativos entre o isolamento bacteriológico convencional e a PCR, com a utilização do caldo selenito cistina, na detecção de *Salmonella* Dublin em fezes de bezerros infectados experimentalmente com a bactéria

PCR	Isolamento bacteriológico		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	33	8	41
Negativo	11	24	35
Total	44	32	76

sensibilidade=75,0%; especificidade=75,0%; Kappa=0,49.

Tabela 3. Resultados comparativos entre o isolamento bacteriológico convencional e a PCR, com a utilização do caldo tetrationato Muller-Kauffmann, na detecção de *Salmonella* Dublin em fezes de bezerros infectados experimentalmente com a bactéria

PCR	Isolamento bacteriológico		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	28	7	35
Negativo	14	27	41
Total	42	34	76

sensibilidade=66,7%; especificidade=79,4%; Kappa=0,45.

Apesar de a maior parte das pesquisas relatarem que a PCR é superior ao isolamento bacteriológico convencional na detecção de *Salmonella* em diversos tipos de amostras biológicas (Schrack et al., 2001), os resultados obtidos mostraram melhor desempenho do isolamento bacteriológico.

Em relação à associação da PCR ao caldo de enriquecimento, notou-se que o caldo SC é menos inibidor à PCR do que o caldo TMK. Segundo Stone et al. (1994), o caldo TMK contém sais biliares capazes de interferir negativamente no desempenho da PCR.

A despeito de o isolamento bacteriológico convencional ter apresentado desempenho

superior ao da PCR na detecção de amostras positivas para *Salmonella* Dublin, a PCR foi capaz de detectar amostras positivas não identificadas pelo isolamento bacteriológico, em um menor intervalo de tempo.

Assim, os resultados obtidos indicaram superioridade do isolamento bacteriológico convencional em relação à PCR na detecção de *S. Dublin* em amostras de fezes de bezerros infectados experimentalmente com a bactéria e que o caldo SC foi a melhor opção de enriquecimento seletivo para ambas as técnicas.

Palavras-chave: bezerro, fezes, *Salmonella* Dublin, PCR, cultura

ABSTRACT

The efficiency of the Polymerase Chain Reaction (PCR) combined with selective enrichment broth was compared with the standard microbiological techniques for detection of Salmonella Dublin in fecal samples of 10 to 15-days-old Holstein calves, experimentally infected with 10⁸ CFU of Salmonella Dublin. Seventy-six fecal samples were analyzed using PCR associated with selenite cystine (SC) and Muller-Kauffmann tetrathionate (TMK) broths and standard microbiological techniques. Regardless of the selective enrichment broth used, the standard microbiological techniques were significantly better than PCR in detection of positive samples of Salmonella Dublin. However, the simultaneous use of both techniques provided detection of a larger number of positive samples. The SC broth was the best option as selective enrichment in both techniques.

Keywords: calves, feces, Salmonella Dublin, PCR, culture

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FEDER, I.; NIETFELD, J.C.; GALLAND, J. et al. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.2477-2484, 2001.

FRESCHI, C.R. *Efeito de diferentes meios de enriquecimento seletivo e técnicas de extração de DNA de amostras de fezes suínas sobre a detecção de Salmonella Typhimurium pela reação em cadeia da polimerase (PCR)*. 2003. 32f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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.

ITOH, Y.; HIROSE, K.; MYIAKE, M. et al. Amplification of *rfbE* e *fliC* genes by polymerase chain reaction for identification and detection of *Salmonella* serovar Enteritidis, Dublin and Gallinarum-Pullorum. *Microbiol. Immunol.*, v.41, p.791-794, 1997.

KNUTSSON, R.; LOFSTROM, C.; GRAGE, H. et al. Modeling of 5' nuclease real-time responses of optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, p.52-60, 2002.

SALMONELLOSIS control: the role of animal product hygiene. Geneva: WHO, 1988. (Technical Report Series, 774).

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) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SOUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, V. et al. Identification by multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains of environmental swabs of poultry houses. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.29, p.1-6, 1999.

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.