

Comunicação

[Communication]

Avaliação clínica da infecção experimental de bezerros com *Salmonella* Dublin

[Clinical evaluation of experimental *Salmonella* Dublin infection in calves]

D.G. Silva¹, P.R.L. Silva², J.J. Fagliari^{3*}, F.A. Ávila³, A.C. Alessi³, R.G. Oliveira⁴

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

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

³Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP

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

14884-900 – Jaboticabal, SP

⁴Médico veterinário autônomo

Dentre as causas de diarreia em bezerros, a salmonelose é uma das mais importantes, principalmente a enfermidade causada pela *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Dublin, a qual sobrevive bem em bovinos e induz altas taxas de morbidade e mortalidade (Veling et al., 2002).

A principal porta de entrada para a infecção é a cavidade oral, sendo necessárias doses entre 10^4 e 10^{11} unidades formadoras de colônia (UFC) para provocar a doença em bovinos sadios (Wray e Sojka, 1977). Ao atingir a lâmina própria da parede intestinal, a *Salmonella* estimula uma reação inflamatória caracterizada por enterite fibrinopurulenta necrosante (Santos et al., 2002). Por serem parasitas intracelulares facultativos, as bactérias podem sobreviver e multiplicarem-se dentro de macrófagos e neutrófilos, sendo subsequentemente transportadas aos linfonodos mesentéricos e a outros órgãos (Frost et al., 1997).

Em bezerros com um a seis semanas de idade, a infecção caracteriza-se por diarreia, desidratação, febre alta (40,5 a 42,0°C), pneumonia, poliartrite e gangrena de extremidades (Wray e Davies, 2000; Loeb et al., 2006), sendo a taxa de mortalidade inversamente proporcional à idade (Santos et al., 2002).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o quadro clínico de bezerros submetidos à infecção experimental com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin e, adicionalmente, verificar a viabilidade do modelo experimental na indução da doença em bezerros.

Foram examinados 12 bezerros machos da raça Holandesa, sadios, com 10 a 15 dias de idade e peso médio de 40,2kg, obtidos de um rebanho comercial. Os bezerros foram alojados em abrigos individuais (1,30m x 1,50m x 1,35m) e receberam quatro litros de leite *in natura* pasteurizado tipo A, duas vezes ao dia, além de ração, feno e água à vontade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais de seis animais. Os do grupo 1 foram infectados experimentalmente, por via oral e com auxílio de seringa estéril com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin suspensas em 10ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI)¹, antes da primeira mamada do dia; os do grupo 2 receberam apenas 10ml de caldo BHI (grupo-controle).

Salmonella Dublin (registro IOC 3101/03) foi isolada originalmente de bezerro infectado naturalmente e cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (Manguinhos – RJ). A bactéria foi cultivada de acordo com as recomendações de Wray e Sojka (1981) e quantificada pela técnica de Miles e Misra (1938).

Recebido em 8 de novembro de 2006

Aceito em 18 de dezembro de 2007

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: fagliari@fcav.unesp.br

¹ CM225 –Oxoid, Hampshire, Inglaterra

Os bezerros foram submetidos ao exame clínico segundo Rosenberger (1993), imediatamente antes da inoculação e a cada 12 horas, durante sete dias após a infecção experimental. O isolamento de *Salmonella* Dublin foi realizado a partir de amostras de suabes retais, enriquecidos em caldo selenito cistina¹ e tetrionato Muller-Kauffmann¹ e plaqueados em ágar verde brilhante modificado¹ com 50µg/ml de ácido nalidíxico, como preconizado por Santos et al. (2002).

Os animais que vieram a óbito foram submetidos a exame necroscópico e histológico. Nessa ocasião, foram colhidos fragmentos de tecidos e órgãos para o isolamento microbiológico de *Salmonella* Dublin.

Antes da inoculação com *Salmonella* Dublin, todos os parâmetros clínicos estavam dentro dos valores considerados normais para a espécie bovina (Rosenberger, 1993). Entre 12 e 36 horas

após a infecção experimental, todos os animais inoculados com 10⁸ UFC de *Salmonella* Dublin apresentaram diarreia grave/acentuada, com presença de muco e/ou estrias de sangue. Os primeiros sinais de febre e desidratação apareceram 24 e 36 horas após a inoculação, respectivamente, enquanto que 84 horas após a infecção experimental, os animais inoculados com a bactéria apresentaram temperatura média de 40,1°C e sintomas respiratórios, como tosse e secreção nasal e taquipnéia (Tab. 1). Não foram observadas alterações clínicas nos animais do grupo-controle.

O isolamento de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais ocorreu 12 horas após a infecção experimental, sendo verificada excreção contínua nos animais 1 e 2 e intermitente nos demais, ao longo dos sete dias de avaliação (Tab. 1). Não houve o isolamento de *Salmonella* Dublin nas amostras de suabes retais dos animais do grupo-controle.

Tabela 1. Isolamento microbiológico de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais e avaliação clínica dos bezerros infectados experimentalmente com aproximadamente 10⁸ UFC de *Salmonella* Dublin

| Bactéria e Sintomas | Horas após a infecção | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----------------------|----|----|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 12 | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 | 84 | 96 | 108 | 120 | 132 | 144 | 156 | 168 |
| Fezes | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sinais clínicos | | D | D | Dd | Dd | Dd | Dd | Dd | DdR | DdTR | DdR | TdR | DdR | DdR | M |
| Fezes | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sinais clínicos | | | D | DT | DdT | DdT | DdTR | DdTR | DdTR | DdTR | DdTR | DdTR | DdTR | DdT | DdTR |
| Fezes | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | - | - | + |
| Sinais clínicos | | | D | D | D | DT | DTR | DTR | DTR | DTR | DdR | DdTR | D | dT | R |
| Fezes | - | - | + | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - |
| Sinais clínicos | | | D | | D | DR | Dd | DdTR | DdTR | DdTR | DdTR | DdTR | DdTR | DdTR | DdTR |
| Fezes | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Sinais clínicos | | | TR | DdTR | dR | dTR | dR | DdTR | M | | | | | | |
| Fezes | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | + |
| Sinais clínicos | | | DR | DTR | DdR | DdTR | DdR | DTR | DdTR | DdTR | DdR | DdTR | DdTR | DdTR | dTR |

+ = presença de *Salmonella*; - = ausência de *Salmonella*; D = diarreia; d = desidratação; T = temperatura acima de 39,5°C; R = sintomas respiratórios (tosse, secreção nasal, taquipnéia, lacrimejamento); M = óbito

Dos seis animais inoculados com *Salmonella* Dublin, dois vieram a óbito aos sete e quatro dias após a infecção experimental. Neles, os principais achados histopatológicos observados foram enterite, pneumonia fibrinosa, esteatose

centrolobular, necrose de hepatócitos, congestão de baço, nefrite intersticial e degeneração tubular (Fig. 1 e 2). Foi detectada *Salmonella* em todas as amostras teciduais avaliadas (Tab. 2).

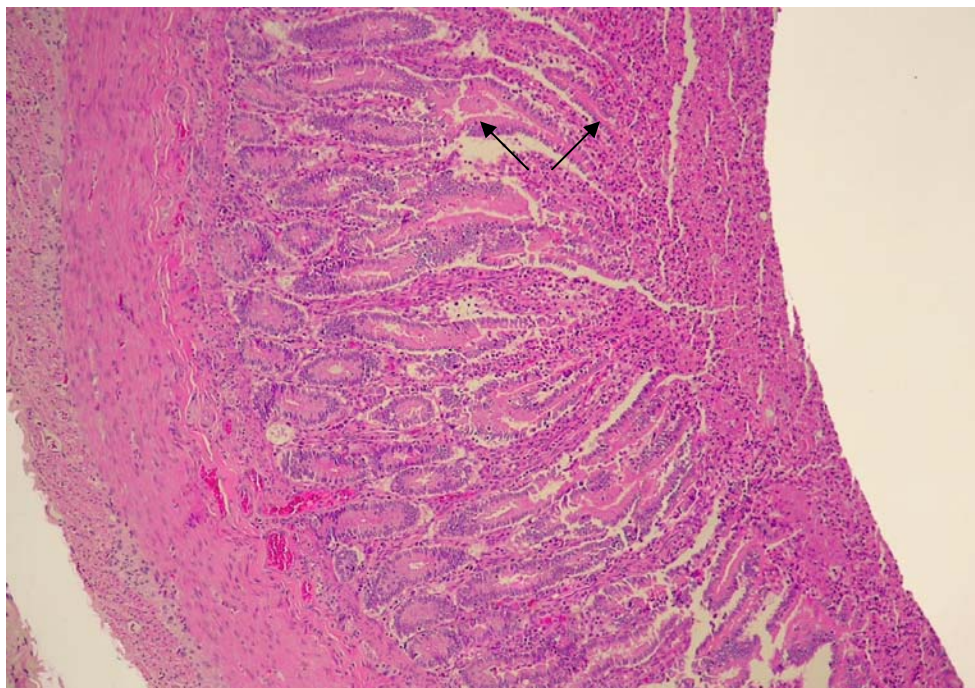


Figura 1. Fotomicrografia de intestino delgado de bezerro experimentalmente infectado com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin. Note destruição de vilosidades e infiltrado inflamatório mononuclear. HE. Objetiva 20x.

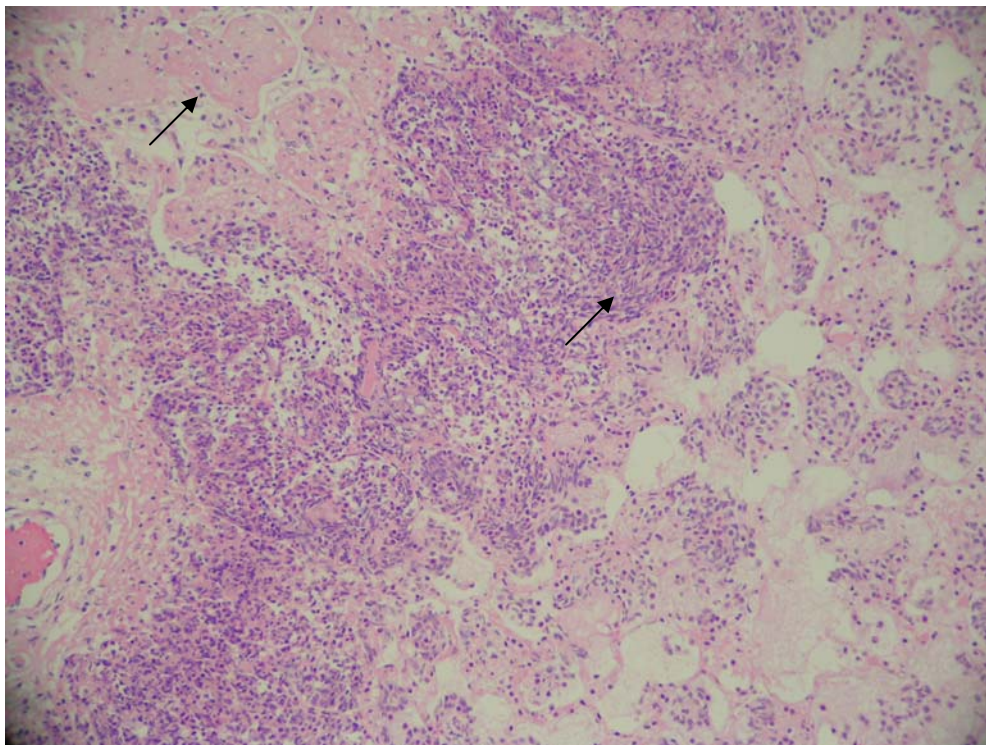


Figura 2. Fotomicrografia de pulmão de bezerro experimentalmente infectado com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin. Note infiltrado inflamatório mononuclear e edema alveolar. HE. Objetiva 20x.

Tabela 2. Detecção de *Salmonella* Dublin a partir de linfonodos e órgãos obtidos de bezerros infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin, pelo isolamento microbiológico

| Órgão/linfonodo | Animal | | | |
|-----------------------|--------|----|----|----|
| | 1 | | 5 | |
| | SC | TT | SC | TT |
| Tonsilas | + | + | + | - |
| Linf. submandibulares | + | + | + | - |
| Pulmões | + | + | + | + |
| Fígado | - | + | + | + |
| Baço | na | na | + | + |
| Duodeno | + | + | + | + |
| Jejuno | + | + | + | + |
| Íleo | + | + | + | + |
| Linf. mesentéricos | + | + | + | + |
| Intestino Grosso | + | + | + | + |
| Rins | - | + | + | + |

na = não avaliado; + = positivo; - = negativo; SC= selenito cistina; TT= tetrationato Muller-Kauffmann

A administração oral de 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin em caldo BHI mostrou-se eficaz na indução de salmonelose, uma vez que todos os bezerros inoculados apresentaram sinais clínicos evidentes, como diarreia severa, febre, desidratação e sintomas respiratórios, também relatados por Wray e Davies (2000) e Veling et al. (2002). Similarmente, Yokoyama et al. (1998) observaram que a maioria dos animais inoculados com *Salmonella* Dublin apresentaram febre a partir do segundo dia e diarreia ao terceiro dia após a infecção. Nesse mesmo experimento, notaram um período de sobrevivência de cinco a sete dias e taxa de mortalidade de 100% no 10º dia após o desafio, quando os animais não receberam nenhum tipo de tratamento. Contudo, nos animais infectados experimentalmente não foram constatados sinais de poliartrite e gangrena de extremidades, aspectos já descritos por Loeb et al. (2006).

De acordo com Smith et al. (1979) e Tsolis et al. (1999), a infecção oral com 10^4 a 10^7 UFC de *Salmonella* causa diarreia transitória que persiste por 48 a 192 horas, enquanto doses entre 10^8 a 10^{11} UFC causam doença septicêmica de evolução aguda, com morte em curto espaço de

tempo. Segundo Eicher et al. (2003), dose de 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin é adequada para infectar animais com até três semanas de idade.

Apesar de alguns estudos indicarem o uso de antiácidos juntamente com o inóculo para evitar a inibição da multiplicação da *Salmonella* Dublin pela microbiota ruminal e pelo baixo pH abomasal (Nazer e Osborne, 1977; Santos et al., 2002), a administração do inóculo suspenso no caldo de cultura, não foi afetada pela acidez abomasal, pois foi possível realizar o isolamento da *Salmonella* tanto nas amostras de suabes retais dos animais inoculados quanto nas amostras de tecidos dos dois animais que vieram a óbito.

Os resultados permitem concluir que a administração oral de 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin em caldo BHI é suficiente para induzir quadro clínico de salmonelose em bezerros com idade entre 10 e 15 dias, cujos principais sinais clínicos constatados foram diarreia, febre, desidratação e sintomas respiratórios.

Palavras-chave: bezerro, *Salmonella* Dublin, salmonelose

ABSTRACT

The clinical conditions of healthy calves infected with experimental 10^8 CFU of Salmonella Dublin were evaluated and the viability of the experimental model in disease induction in calves was verified. Twelve 10 to 15-day-old male Holstein calves were examined. They were allocated into two groups, control and experimentally infected with 10^8 CFU of Salmonella Dublin. Animals were submitted to clinical examination after inoculation and at every 12 hours, during seven days after the experimental infection. Samples of rectal swabs were collected for Salmonella Dublin isolation. All animals had severe diarrhea,

with mucus and bleeding, 12 to 84 hours after the experimental infection with *Salmonella* Dublin, accompanied by fever, dehydration and respiratory signs. The isolation of *Salmonella* Dublin from rectal swabs occurred 12 hours after the infection. Two out of the six animals inoculated with *Salmonella* Dublin died with symptoms of enteritis, fibrinous pneumonia, centrilobular hepatic steatosis, hepatocyte necrosis, spleen congestion, interstitial nephritis, and tubular degeneration. Thus, the oral administration of 10^8 CFU of *Salmonella* Dublin induced clinical signs of salmonellosis in 10 to 15-day-old calves.

Keywords: calf, *Salmonella* Dublin, salmonellosis

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

EICHER, S.D.; PATTERSON, J.A.; WILCOX, C.S. et al. Thermal imaging indications of elevated body temperature during a *Salmonella* Dublin challenge. In: RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASES CONFERENCE, 2003, St. Louis. *Proceedings...* St. Louis, 2003. p.52. (abstract)

FROST, A.J.; BLAND, A.P.; WALLIS, T.S. The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Vet. Pathol.*, v.34, p.369-386, 1997.

LOEB, E.; TOUSSAINT, M.J.; RUTTEN, V.P. et al. Dry gangrene of the extremities in calves associated with *Salmonella dublin* infection; a possible immune-mediated reaction. *J. Comp. Pathol.*, v.134, p.366-369, 2006.

MILLES, A.A.; MISRA, S.S. The estimation of the bactericide power of the blood. *J. Hyg.*, v.38, p.732-739, 1938.

NAZER, A.H.K.; OSBORNE, A.D. Experimental *Salmonella dublin* infection in calves. *Br. Vet. J.*, v.133, p.388-398, 1977.

ROSENBERGER, G. *Exame clínico dos bovinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419p.

SANTOS, R.L.; TSOLIS, R.M.; BAÜMLER, A.J. et al. Hematologic and serum biochemical

changes in *Salmonella* ser Typhimurium-infected calves. *Am. J. Vet. Res.*, v.63, p.1145-1150, 2002.

SMITH, B.P.; HABASHA, F.; REINA-GUERA, M. Bovine salmonellosis: experimental production and characterization of the disease in calves, using oral challenge with *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.1510-1513, 1979.

TSOLIS, R.M.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A. et al. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.*, v.67, p.4879-4885, 1999.

VELING, J.; BARKEMA, H.W.; SCHANS, I. et al. Herd-level diagnosis for *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Dublin infection in bovine dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, v.53, p.31-42, 2002.

WRAY, C.; SOJKA, W.J. Reviews of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. *J. Dairy Res.*, v.44, p.383-425, 1977.

WRAY, C.; SOJKA, W.J. *Salmonella dublin* infection of calves: use of small doses to simulate natural infections on the farm. *J. Hyg.*, v.87, p.501-509, 1981.

WRAY, C.; DAVIES, R.H. *Salmonella* infections in cattle. In: WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella in domestic animals*. Oxon: CABI Publishing, 2000. p.169-191.

YOKOYAMA, H.; PERALTA, R.C.; UMEDA, K. et al. Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.416-420, 1998.