

Comunicação

[Communication]

**Comparação da eficiência dos caldos de enriquecimento seletivo no isolamento de *Salmonella* Dublin**

[Comparison of the efficiency of selective enrichment broths for *Salmonella* Dublin isolation]

D.G. Silva<sup>1</sup>, J.J. Fagliari<sup>2\*</sup>, T.B. Garcia<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP –Jaboticabal, SP  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n  
14884-900 – Jaboticabal, SP

A salmonelose constitui uma das principais causas de morbidade e mortalidade em bezerros, sendo a *Salmonella* Dublin e a *Salmonella* Typhimurium os sorotipos mais freqüentemente isolados na espécie bovina (Santos et al., 2002; Veling et al., 2002).

Os procedimentos microbiológicos para o isolamento de *Salmonella* de amostras de fezes geralmente incluem etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento em caldo seletivo, plaqueamento em meio semi-sólido, análise bioquímica e sorotipificação (Litchfield, 1973). As etapas de enriquecimento em caldo seletivo e plaqueamento em meios semi-sólidos são utilizadas para auxiliar na recuperação e no desenvolvimento da bactéria de interesse e para inibir o crescimento de microrganismos competidores (Fernandes et al., 2004).

Segundo Waltman (1998), há três tipos de meios de enriquecimento: caldo Rappaport-Vassiliadis, caldo selenito e caldo tetrionato. A escolha do melhor caldo para detecção ou recuperação de *Salmonella* de amostras de fezes muitas vezes é difícil devido, principalmente, à falta de resultados conclusivos a esse respeito (Freschi et al., 2005; Paiva et al., 2006).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência dos caldos de enriquecimento seletivos

Rappaport-Vassiliadis, selenito cistina e tetrionato Muller-Kauffmann no isolamento ou na recuperação de *Salmonella* Dublin de amostras de fezes de bezerro experimentalmente infectado, de modo a facilitar a escolha do meio mais apropriado.

Foram analisadas 14 amostras de fezes obtidas por meio de suabes retais de bezerro macho da raça Holandesa, com 15 dias de idade, infectado experimentalmente com  $10^8$  unidades formadoras de colônia de *Salmonella* Dublin (Fecteau et al., 2003). As amostras foram colhidas em triplicata, imediatamente antes da inoculação (A0) e a intervalos de 12 horas, ao longo de sete dias após a infecção experimental (A1 a A13).

Para o isolamento de *Salmonella* Dublin, foram testados três caldos de enriquecimento seletivo: Rappaport-Vassiliadis (RV), selenito cistina (SC) e tetrionato Muller-Kauffmann (TMK). Também foi avaliada a temperatura de incubação do caldo RV, 37°C (RV37) e 42°C (RV42).

Das três amostras de suabes retais colhidas em um mesmo momento, duas amostras foram diretamente inoculadas em 10ml de caldo SC (Oxoid CM 699) e TMK (Oxoid CM 343) e incubadas a 37°C durante 24 horas. A outra amostra foi inicialmente pré-enriquecida em 10ml de caldo GN-Hajna (Difco 0486-17) e

---

Recebido em 16 de maio de 2007

Aceito em 4 de abril de 2008

\*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: fagliari@fcav.unesp.br

### Comparação da eficiência dos caldos...

incubada a 37°C por 24 horas. Após o crescimento, transferiu-se 0,1ml para dois tubos que continham 9,9ml de caldo RV (Oxoid CM 866) que foram incubados a 37°C e a 42°C durante 24 horas. Após incubação, os caldos foram semeados em placas contendo ágar verde brilhante modificado (Oxoid CM 329) 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 (Oxoid CM 277) e ágar lisina ferro (Oxoid CM 381). Todas as colônias identificadas presuntivamente como *Salmonella* foram submetidas ao teste de soroglutinação em lâmina, com soro polivalente antiantígenos somáticos (O) e com soro polivalente antiantígenos flagelares (H) de *Salmonella*.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste McNemar (Zar, 1999).

Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram encontradas entre os caldos de enriquecimento usados na recuperação de *Salmonella* Dublin de amostras de fezes. Todas as amostras colhidas após a infecção experimental foram positivas

para *Salmonella* Dublin após cultivo em caldo SC, enquanto somente 69% (9/13) das amostras foram positivas quando se utilizou o caldo TMK (Tab. 1). Este resultado confirma os descritos por Forward e Rainnie (1997) e Alvseiek e Skjerve (2000) que relataram bons resultados com o uso do caldo SC na recuperação de *Salmonella* das fezes. Por outro lado, Freschi et al. (2005) verificaram melhor rendimento com a utilização do caldo TMK. O caldo RV apresentou o pior desempenho dentre os caldos avaliados no isolamento microbiológico, detectando apenas 23% (3/13, RV37) e 8% (1/13, RV42) de amostras positivas. Apesar de o caldo RV ser um meio de alta seletividade (Paiva et al., 2006), Peterz et al. (1989) relataram que a temperatura de incubação de 42°C pode inibir o crescimento de *Salmonella* Dublin. As amostras colhidas antes da inoculação foram negativas para *Salmonella* Dublin em todos os caldos avaliados.

Desse modo, os resultados obtidos mostraram que o caldo SC foi a melhor opção de enriquecimento seletivo para o isolamento ou recuperação de *Salmonella* Dublin de amostras de fezes de bezerro.

Tabela 1. Resultados do isolamento de *Salmonella* Dublin em amostras de fezes de bezerro infectado experimentalmente, utilizando-se os caldos de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis incubado a 37°C (RV37), Rappaport-Vassiliadis incubado a 42°C (RV42), selenito cistina (SC) e tetratonato Muller-Kauffmann (TMK).

Amostras	Caldos de enriquecimento seletivo			
	RV37	RV42	SC	TMK
A0	-	-	-	-
A1	+	-	+	-
A2	+	-	+	-
A3	-	-	+	-
A4	+	-	+	+
A5	-	+	+	+
A6	-	-	+	+
A7	-	-	+	-
A8	-	-	+	+
A9	-	-	+	+
A10	-	-	+	+
A11	-	-	+	+
A12	-	-	+	+
A13	-	-	+	+
Total	3	1	13	9

+ : positivo para *Salmonella* Dublin; - : negativo para *Salmonella* Dublin.

Palavras-chave: bezerro, *Salmonella* Dublin, meio seletivo, fezes

## ABSTRACT

The aim of this study was to compare three different selective enrichment broths: Rappaport-Vassiliadis (RV), selenite cystine (SC) and Muller-Kauffmann tetrathionate (MKT) for *Salmonella* Dublin isolation from faecal samples of calf experimentally infected. The bacteriological procedure involved pre-enrichment stages in Hajna-GN broth (only for the samples inoculated in RV broth), selective enrichment, culture in modified brilliant green agar (BGA), presumptive biochemistry tests (using triple-sugar-iron agar and lysine-agar) and slide agglutination test with poli-O and poli-H *Salmonella* antiserum. The effects of enrichment temperatures using RV broth were also evaluated (37°C and 42°C). SC broth was significantly more efficient in the isolation of *Salmonella* Dublin ( $P < 0,05$ ), whereas RV broth incubated at 42°C had a lower efficiency in the microbiological isolation.

Keywords: *Salmonella* Dublin, selective enrichment, calves, feces

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVSEIKE, O.; SKJERVE, E. Probability of detection of *Salmonella* using different analytical procedures, with emphasis on subspecies diarizonae serovar 61:k:1,5,(7) [S. IIIb 61:k:1,5,(7)]. *Int. J. Food. Microbiol.*, v.58, p.49-58, 2000.
- PECTEAU, M.V.; HOUSE, J.K.; KOTARSKI, S.F. et al. Efficacy of ceftiofur treatment of experimental salmonellosis in neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.*, v.64, p.918-925, 2003.
- FERNANDES, A.C.; BERCHIERI Jr., A.; OLIVEIRA, G.H. et al. Avaliação de meios de cultivo para o isolamento de *Salmonella*. *Ars Vet.*, v.20, p.330-337, 2004.
- FORWARD, K.R.; RAINNIE, B.J. Use of selenite enrichment broth for the detection of *Salmonella* from stool: a report of one year experience at a provincial public health laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.29, p.215-217, 1997.
- 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.
- LITCHFIELD, J.H. *Salmonella* and the food industry: methods for isolation, identification and enumeration. *Crit. Rev. Food Technol.*, v.3, p.415-456, 1973.
- 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.
- PETERZ, M.; WIBERG, C.; NORBERG, P. The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in home-made and commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. *J. Appl. Bacteriol.*, v.66, p.523-528, 1989.
- 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.
- 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.
- WALTMAN, W.D. Isolation of *Salmonella* from poultry environments. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD-BORNE SALMONELLA IN POULTRY, 1998, Baltimore. *Proceedings...* Baltimore, 1998. p.133-153.
- ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 4.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663p.