

PRINCIPAIS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS BACTERIANOS – REVISÃO DE LITERATURA

PEREIRA, Rose Elisabeth Peres

PETRECHEN, Guilherme Grande

Laboratório de Patologia Veterinária e Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça – FAMED, Garça, São Paulo, Brasil



RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura dos principais métodos diagnósticos bacterianos em Medicina Veterinária. As enfermidades causadas por estes microrganismos atingem todas as espécies e raças animais, em qualquer idade e são responsáveis pelos principais surtos de ETA (Enfermidades transmitidas por alimentos) em humanos que anualmente causam enormes prejuízos em todo mundo e possuem, na grande maioria das vezes, os animais como reservatórios ou portadores. Para que ocorra um efetivo tratamento e controle é imprescindível o conhecimento do agente etiológico bem como o melhor medicamento a ser utilizado.

Palavras-chaves: bactérias, enfermidades bacterianas, *Salmonella*, toxinfecções alimentares, zoonose.

ABSTRACT

This study aimed to perform a literature review of major bacterial diagnostic methods in veterinary medicine. Illnesses caused by these microorganisms affect all species and breeds at any age and are responsible for major outbreaks of foodborne illness in humans that cause huge losses each year worldwide and have, in most cases, animals as reservoirs or carriers. For the occurrence of an effective treatment and control is essential to know the etiologic agent as well as the best drug to be used.

Keywords: bacterial, bacterial disease *Salmonella*, foodborne illness, zoonosis

1.INTRODUÇÃO

O diagnóstico de doenças bacterianas pode ser realizado por diversos procedimentos. O diagnóstico definitivo é realizado pelo isolamento e identificação do agente bacteriano a partir de materiais clínicos colhidos adequadamente do sítio de infecção, conhecido normalmente como exame bacteriológico ou cultura (MARTINEZ; TADEI, 2005). Um histórico clínico completo, incluindo idade, sexo, espécie, número de animais afetados e tratamento realizado devem acompanhar os espécimes, junto com a suspeita do diagnóstico clínico. Na ausência destas informações, procedimentos importantes para detecção de patógenos podem não ser realizados (QUINN et al., 2005).



A precisão e a validade dos resultados de exames laboratoriais são amplamente influenciados pelos cuidados na seleção, colheita e no envio das amostras para o laboratório.

As amostras devem, de preferência, ser obtidas de animais vivos antes da administração de antibioticoterapia. Amostras de animais mortos deverão ser colhidas o quanto antes, se possível, sem alterações autolíticas ou putrefativas. Quando houver locais onde provavelmente haja contaminação por mais de um patógenos, os espécimes devem ser colhidos mediante procedimentos que minimizem a contaminação e em dias quentes, se faz necessário a refrigeração (QUINN et al., 2005).

O diagnóstico bacteriano rápido e eficiente é necessário, já que as enfermidades infecciosas dos animais e as zoonoses, em particular as de natureza epizoótica, estão adquirindo uma importância econômica e social cada vez maior nos sistemas agrícolas e comerciais dos países industrializados e em desenvolvimento. Algumas enfermidades infecciosas emergentes podem ultrapassar rapidamente a esfera local e passar dos animais às pessoas (OIE, 2003).

Estima-se que há 33 milhões de casos de *Salmonella* em humanos todo ano (MEAD et al, 1999). A incidência de surtos de *Salmonella* Enteritidis (SE) em humanos tem aumentado nos últimos anos em países como Estados Unidos, Grã-Bretanha e outros países da Europa (BARROW, 1993, TAUXE, 1997). Na Inglaterra e País de Gales, a carne de frango foi responsável por surtos e casos esporádicos e por aproximadamente 30.000 casos/ano de toxinfecção alimentar em humanos (WARD; THRELFALL, 1997). Na França há mais de 16.000 pessoas afetadas todo ano desde 1989 (TOURON et al., 2005). No Brasil, os surtos de SE no homem tem aumentado a partir de 1993 (SILVA, 1995; TAUNAY et al., 1996; LIRIO et al., 1998) e grande parte deles tem sido relacionada ao consumo de ovos ou prato preparados com ovos (BARROW 1993; TAUXE, 1997).

O presente trabalho tem como objetivo realizar uma revisão de literatura dos métodos diagnósticos bacterianos mais relevantes para que se proceda um efetivo tratamento e controle das enfermidades causadas por estes microrganismos.



2. REVISÃO DE LITERATURA

A presença de bactérias patogênicas pode ser confirmada pelo exame de esfregaços corados, pelas características culturas e bioquímicas e pela detecção realizada com métodos imunológicos e moleculares (MURRAY et al., 1999).

2.1 Exame de esfregaços corados

A maioria das observações iniciais dos microrganismos é feita com preparações coradas. Material celular e microrganismos são frequentemente transparentes e podem ser mais bem distinguidos pelo uso de corantes. A visualização direta de amostras clínicas em diversas montagens a fresco, entre lâminas e lamínulas, dá informações da composição celular, morfologia do microrganismo e motilidade. As amostras podem ser observadas por microscópio de luz direta, de contraste de fase ou de campo escuro (MARTINEZ; TADEI, 2005; TORTORA et al., 2003).

Existem dois métodos gerais utilizados para preparar espécimes microbiológicos para observações por meio de microscópio luminoso. Um utiliza uma suspensão de microrganismos vivos em uma gota ou uma camada líquida. No outro uma camada fina do espécime é seca e corada, assim o microrganismos ficam fixados à superfície e apresentam-se corados para facilitar a visualização (PELCZAR JR et al., 2004).

2.1.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram. Ela é um dos procedimentos mais úteis, pois classifica as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivas e gram-negativas (TORTORA et al., 2003).

É o método de coloração diferencial mais utilizado em exames diretos ao microscópio de amostras clínicas e de colônias bacterianas devido ao seu largo espectro de coloração. Este espectro inclui praticamente todas as bactérias, muitos fungos e parasitas, tais como *Trichomonas*, *Strongyloides* e cistos de vários protozoários. As exceções significantes incluem *Treponema*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* e *Rickettsia* que são pequenos demais para visualização em microscopia óptica de luz direta ou que perderam a parede (MARTINEZ; TADEI, 2005).



Neste procedimento um esfregaço fixado pelo calor é recoberto com um corante básico púrpura, usualmente a violeta genciana que impregna todas as células, esta é a coloração primária. Após um curto período, o corante púrpura é lavado e o esfregaço é coberto com iodo, quando o iodo é lavado, ambas bactérias gram-positivas e gram-negativas aparecem na cor violeta. A seguir a lâmina é lavada com álcool ou uma solução de álcool-acetona, esta é a solução descolorante. O álcool é lavado e a lâmina é então corada com um corante básico vermelho, como a fucsina e o esfregaço é lavado novamente (TORTORA et al., 2003).

Os microrganismos gram-positivos são aqueles que retêm o corante cristal violeta devido ao aumento na quantidade de ácido teióico e a diminuição da permeabilidade na parede celular aos solventes orgânicos, por conterem menos lipídeos na parede celular. A parede das bactérias gram-negativas apresenta grande quantidade de lipídeos, que aumenta a permeabilidade aos solventes orgânicos, permitindo a descoloração. Estes microrganismos perdem, portanto, o cristal violeta, corando-se com o corante de fundo, como a fucsina (MARTINEZ; TADEI, 2005, QUINN et al., 2005).

2.1.1.1 Coloração Ácido-Resistente

Certos microrganismos possuem na sua parede ácidos graxos de cadeia longa (ácido micólico), que conferem impermeabilidade ao cristal violeta e a outros corantes básicos. Calor ou detergentes devem ser usados para permitir a entrada de corantes primários nestas bactérias. Uma vez dentro das células bacterianas, o corante não é eliminado mesmo com solvente álcool-ácido. A coloração álcool-ácido diferencia grupos específicos de bactérias como *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Tsukamurella*, *Gordona*, *Legionella micdadei*, além de corar oocistos de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* e *Cyclospora*. É o método mais utilizado para a pesquisa de micobactérias, sendo que a coloração de Ziehl-Neelsen é o único recurso disponível para o diagnóstico da hanseníase (MARTINEZ; TADEI, 2005).

A *Coxiella burnetti*, espécie de *Brucella* e clamídias podem ser demonstradas em esfregaços usando a coloração de Ziehl-Neelsen modificada (QUINN et al., 2005).



2.2 Características culturais e bioquímicas

A seleção de meios de cultura, de condições atmosféricas e de outros fatores essenciais para o isolamento são determinados pela suspeita de um patógeno bacteriano. O isolamento de rotina de muitos patógenos envolve inoculação em placas de ágar-sangue e ágar MacConkey, seguidos de incubação por 24 a 48 horas. A temperatura e a atmosfera (atm) de incubação são fatores determinantes para que se tenha sucesso no isolamento e identificação do microrganismo. Geralmente a temperatura de incubação utilizada para a maioria dos microrganismos gira em torno de 36 a 37 °C. Quanto a atm, algumas bactérias exigem 5 ou 10% de CO₂ no ar, outras são microaerófilas ou anaeróbias estritas (MARTINEZ; TADEI, 2005).

Ágar nutriente é um meio básico que supre os nutrientes essenciais ao crescimento de bactérias não-fastidiosas. Contudo não é indicado para o isolamento primário de bactérias patogênicas fastidiosas. O ágar-sangue, que favorece o crescimento de muitos patógenos, é apropriado para o isolamento primário de rotina. Meios seletivos podem ser usados para microrganismos específicos (QUINN et al., 2005).

Os métodos de isolamento das bactérias envolvidas em infecções não sofreram alterações. Meios de culturas seletivos e enriquecidos mais utilizados são o ágar-sangue, ágar chocolate, ágar MacConkey, ágar SS (*Salmonella-Shigella*), ágar Hektoen, caldos BHI (*Brain Heart Infusion*), tioglicolato, rappaport, selenito entre outros. Mais recentemente foram introduzidos meios de cultura cromogênicos. Estes meios são compostos por substratos enzimáticos sintéticos (reagentes cromogênicos) que se ligam aos açúcares utilizados pelas bactérias durante seu crescimento. Quando a bactéria utiliza um ou mais carboidratos, os reagentes cromogênicos são liberados e se precipitam no meio de cultura, permitindo a coloração diferenciada. São utilizados amplamente em análises clínicas, de alimentos e ambiental. Permitem diferenciação entre espécies de *Candida*, *Listeria*, além de diferenciação entre colônias de *E. coli* e outros coliformes. Também permitem a identificação de colônias de bactérias de gram-positivas como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* e de bactérias patogênicas como *Salmonella Typhi* e *E. coli* O157:H7 (MARTINEZ; TADEI, 2005).

Nascimento et al., (2000) verificaram que não há diferenças estatísticas na detecção em *Salmonella* em carcaças de frango quando se utilizam os caldos de



enriquecimento Rapaport-novobiocina (RVN), selenito-cistinovanobiocina (SCN) e tetrionato-novobiocina (TN) e os meios de plaqueamento ágar Hektoen (HE), ágar *Salmonella-Shigella* (SS), ágar verde brilhante (VB) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). Quanto ao exame de fezes, o caldo TN mostrou-se superior aos demais, não havendo diferenças de resultado para os meios de plaqueamento. Os resultados sugerem que a utilização de mais de um meio de enriquecimento e de plaqueamento poderia aumentar as chances de isolamento das bactérias.

As placas devem ser inoculadas usando-se a técnica de esgotamento por estrias que facilita o crescimento de colônias isoladas. Esse é um passo essencial para identificar patógenos em espécimes clínicos que podem conter espécimes contaminantes. As características morfológicas e os testes bioquímicos permitem a identificação presuntiva de um patógeno bacteriano. Testes adicionais podem ser usados para auxiliar na identificação de microrganismos específicos (QUINN et al., 2005).

2.3 ELISA

Um teste com grande sensibilidade é o método de imunológico de suporte sólido, o mais utilizado é o ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*).

O agente bacteriano se presente no espécime se liga ao anticorpo específico e pode ser demonstrado por um anticorpo marcado por uma enzima. Técnicas que usam reações imunes podem ser associadas a outros métodos para melhorar a detecção dos patógenos. Pode ser usado para bactérias como *E. coli* e outros membros da família Enterobacteriaceae como *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (QUINN et al., 2005).

2.4 PCR

A PCR (Reação em Cadeia Polimerase) é uma técnica de amplificação *in vitro* que pode, em questões de horas, amplificar seqüências específicas de DNA. A importância deste procedimento está em sua habilidade de amplificar DNA intacto ou fragmentado por meio de uma simples reação química em tubo de ensaio, tornou-se possível a clonagem de seqüências de tamanhos que variam entre 500 e 2000 pares de base (bp) de forma rápida e sem a necessidade de uma célula viva (EISENSTEIN, 1990).



A PCR é baseada num ciclo repetitivo de três reações que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação, em um mesmo tubo e na presença de reagente termo-estáveis. Em adição à seqüência específica de DNA a ser amplificada, os reagentes são dois pequenos oligonucleotídeos iniciadores, denominados *primers*, sintetizados para serem complementares as seqüências conhecidas do DNA-alvo, grande quantidade dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e a enzima termo-estável Taq DNA-polimerase, isolada de bactéria termofílica (EISENSTEIN, 1990).

Malorny et al. (2003) ao analisarem a acurácia do método de PCR na detecção de *Salmonella* sp. em 435 amostras de suabes de carcaças suínas e de frangos verificaram, que a acurácia para sensibilidade e especificidade foi de 97,5%. Portanto trata-se de um método diagnóstico seguro e importante para a detecção desta bactéria que se constitui o maior patógeno responsável pelos caos de infecção alimentar em humanos em todo o mundo (HUMPREY, 2000).

2.4.1 Multiplex PCR

O método multiplex PCR foi desenvolvido para detectar simultaneamente *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, e *Escherichia coli* O157:H7 em amostras de carne. A sensibilidade na detecção de DNA desse método foi de 10^3 UFC/mL para cada patógeno. Quando este protocolo foi utilizado na detecção de cada uma das bactérias patogênicas em amostras de suíno "spiked", uma célula/25g de amostra inoculada pôde ser detectada dentro de 30 horas. Nas amostras de carne naturalmente contaminadas, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, e *E. coli* O157:H7 foram detectadas no mesmo período de tempo. Excelente concordância foi obtida entre os resultados de PCR e o método de cultura convencional, sugerindo que o PCR é um método confiável e útil para análise rápida de produtos derivados de carne contaminados por *Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, e *E. coli* O157:H7 (KAWASAKI, 2005).

Cortez et al. (2006) identificaram salmonelas em frangos abatidos por multiplex-PCR usando três primers *invA*, *pefA* e *sefA* seqüências de gene para diagnosticar *Salmonella* spp, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* respectivamente. Foi detectado *Salmonella* spp em 10% (29/288) das amostras, entretanto os sorotipos Enteritidis e Typhimurium foram identificados em 62% das amostras. Os resultados indicam a



necessidade de melhorar a higiene e os padrões sanitários em linhas de abate de frangos, além da educação em alimentação.

2.4.2 Nested PCR

Nesta técnica, duas amplificações são realizadas, a primeira etapa de amplificação é realizada com um par de iniciadores, por 20 a 30 ciclos e o produto desta reação é transferido para outro tubo, onde uma segunda amplificação será realizada, tendo como molde o DNA amplificado na primeira. Porém, na segunda amplificação, os iniciadores utilizados irão anelar-se em uma região mais interna do fragmento amplificado na primeira reação, permitindo desta forma, uma maior especificidade da reação (MARTINEZ; TADEI, 2005).

2.4.3 PCR em tempo real

Este procedimento compreende uma amplificação convencional de DNA, porém a detecção do resultado é feita ao longo de ciclos de amplificações. Para que isso ocorra, é adicionada na reação brometo de etídio ou alguma outra molécula fluorescente (SYBR Green, por exemplo), que a medida que o DNA vai sendo amplificado, vai-se intercalando na dupla fita, resultando num aumento da fluorescência, a qual é detectada por uma luz UV acoplada ao termociclador (MARTINEZ; TADEI, 2005).

Atualmente, esta técnica tem sido largamente para o diagnóstico da salmonelose e campilobacteriose em produtos e subprodutos de frangos (WOLFFS et al., 2007).

2.5 Soroaglutinação Rápida (SAR)

A prova de soroaglutinação rápida (SAR) é indicada para a detecção de anticorpos contra *Salmonella Pullorum* (SP) e *Salmonella Gallinarum* (SG) e algumas espécies de micoplasma, mas não detecta anticorpos contra as salmonelas paratifóides. Mesmo para SP, a sorologia não é um método eficiente para o diagnóstico da doença, porque quando a infecção ocorre precocemente, anticorpos circulantes não aparecem até 20 a 40 dias após a infecção e, mesmo num período de 100 dias pós-infecção pode-se não observar a produção de anticorpos. Portanto para fins de diagnóstico preciso, deve-se efetuar o isolamento da bactéria, a sua identificação e classificação em espécies (ITO et al., 2004).



3. CONCLUSÃO

Conclui-se que existem diversos métodos diagnósticos bacterianos e estes são imprescindíveis para o rápido, correto e eficiente diagnóstico, controle, prevenção e tratamento das enfermidades causadas por estes agentes.

4. REFERÊNCIAS

BARROW, P.A. *Salmonella* - present, past and future. **Avian Pathology**, v.22, p.651-669, 1993.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; IKUNO, A.A.; BURGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoir by multiplex-PCR. **Research in Veterinary Science**, v.81, p. 340-344, 2006.

EISENSTEIN, B.I. The Polymerase Chain Reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, v.3, p.178-183, 1990.

HUMPREY, T. Public-health aspects of *Salmonella* infection. In: Way, C., Way, A. *Salmonella in domestic animals*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp 245-263, 2000.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; LIMA, E.A.; OKABAYASHI, S. Saúde gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. In: **Produção de Frangos de corte**. 1 ed., Campinas: FACTA. 2004, p.205-253.

KAWASAKI S, NAOKO HORIKOSHI, YUKIO OKADA, KAZUKO TAKESHITA, TAKASHI SAMESHIMA, and SHINICHI KAWAMOTO. Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia*



coli O157:H7 in Meat Samples. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 3, p. 551–556, 2005.

LIRIO, V.S.; SILVA, E.A.; STEFONI, S. et al. Frequência de 17 tipos de *Salmonella* isolados de alimentos. **Higiene Alimentar**, v.12, p.36-42, 1998.

MARTINEZ, M.B., TADEI, C.R. In: **Microbiologia**, TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F.4ª Ed, São Paulo: Atheneu, 2005, 718 p.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, L.; MCCAIG, L.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food- related illness and death in United States. **Emerg. Infec.Dis.**, v.5, p.607-625, 1999.

MURRAY, P.R, BARON, E.J, PFALIER, M.A, YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed. ASM. Washington DC, 1999.

NASCIMENTO, M.S; BERCHIERI JUNIOR, A.; BARBOSA, M.D.; ZANCAN, F.T.; ALMEIDA, W.A.F. Comparação de meios de enriquecimento de plaqueamento utilizados na pesquisa de *Salmonella* em carcaças de frango e fezes de aves. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v.2, p.85-91, 2000.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZZOTIES (OIE). **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. 2000. 5ª edição. Paris. Disponível em http://www.oie.int/normes/mmanual/A_00023htm. Acesso em 23/11/2010.

PELCZAR JR, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. In: **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2ª Ed, v. 1, São Paulo: Pearson, 2005. 524p.

QUINN, P.J., MARKEY, B.K, CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**.1 ed., São Paulo: Artmed, 2005, 512p.



SILVA, E.N. Salmonella Enteriditis em aves e saúde pública. **Higiene Alimentar**, v.9, p.7-13, 1995.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. Center Dis. Control Prevention, Atlanta, v.3, p.12, 1997.

TOURON, A.; BERTHE, T.; PAWLAK, B.; PETIT, F. Detection of Salmonella in environmental water and sediment by nested-multiplex polymerase chain reaction assay. **Rev. Microbioly.** v.56, p.541-553, 2005.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. In: **Microbiologia**, 6a ed, São Paulo: Artmed., 2003, p.267-393.

WARD, L.R.; THRELFALL, E.J. Human salmonellosis in England and Wales – current situation. In: Salmonella and Salmonellosis Symposium, Ploufragan, França, 1997.

WOLFFS, P.F.G, GLENCROSS, K, GRIFFITHS, M.W. Simultaneous quantification of pathogenic Campylobacter and Salmonella in chicken rise fluid by a flotation and real-time PCR procedure. **Journal of Food Protection**: v. 117, p. 50–54, 2007.

