

T 636.039 69

R 833e

2002

Marcos Horacio Rostagno

**Epidemiologia e Diagnóstico
das Infecções por *Salmonella* sp. em Suínos**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2002**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

29/05/02

713002-03

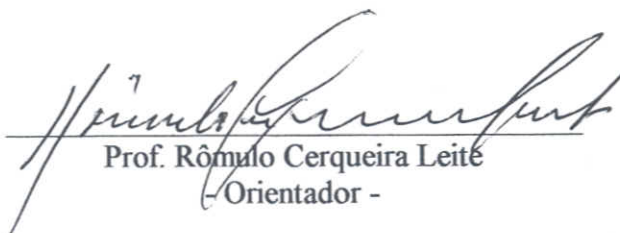
0330 - 71560


R839e Rostagno, Marcos Horacio, 1968-
2002 Epidemiologia e diagnóstico das infecções por Salmonella sp. em suínos / Marcos
Horacio Rostagno. - Belo Horizonte : UFMG-Escola de Veterinária, 2002.
56p. : il.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Salmonelose em animais – Diagnóstico – Teses.
3. Epidemiologia – Teses. I. Título.

CDD – 636.408 96

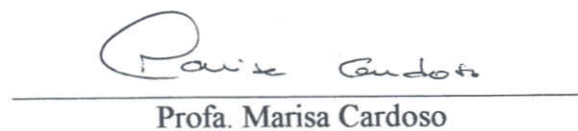
Tese defendida e aprovada em 19 de abril de 2002, pela Comissão Examinadora, constituída por:

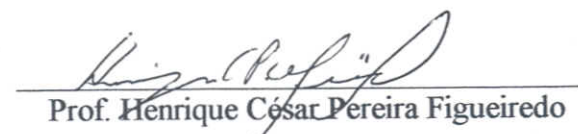



Prof. Rômulo Cerqueira Leite
- Orientador -


Prof. Andrey Pereira Lage


Prof. Renato de Lima Santos


Profa. Marisa Cardoso


Prof. Henrique César Pereira Figueiredo

À minha esposa Luciane
e aos meus filhos Pedro e Esther
pelo amor, apoio, paciência e compreensão.

Aos meus pais
Horacio e Mirtha por ser o que sou.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, pela orientação, apoio e grande amizade.
Ao Dr. Howard Scott Hurd, pela acolhida, orientação, apoio e amizade inestimável.
Aos Profs. Andrey Pereira Lage, Renato de Lima Santos, Marisa Cardoso e Henrique César Pereira Figueiredo pelas valiosas críticas, discussões e contribuições para a conclusão deste trabalho.
Aos colegas de pós-graduação, pela agradável convivência, amizade e troca de idéias.
À Escola de Veterinária da UFMG e ao National Animal Disease Center do USDA, pela acolhida e por possibilitarem o nosso treinamento e a realização deste trabalho.
À Capes, pelo apoio financeiro, através da concessão da bolsa de estudos.
Ao Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, e em especial aos colegas do Setor de Medicina Veterinária Preventiva, pela colaboração e apoio recebidos.
A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original...”
(Albert Einstein)

SUMÁRIO

1.	RESUMO	11
2.	ABSTRACT	12
3.	INTRODUÇÃO	13
4.	CAPÍTULO 1. Infecção experimental rápida por <i>Salmonella</i> Typhimurium em suínos.	
4.1.	Introdução.....	15
4.2.	Material e Métodos.....	15
4.3.	Resultados e Discussão.....	17
4.4.	Referências Bibliográficas.....	22
5.	CAPÍTULO 2. Infecções por <i>Salmonella</i> sp. em suínos durante o período de descanso pré-abate.	
5.1.	Introdução.....	24
5.2.	Material e Métodos.....	24
5.3.	Resultados e Discussão.....	26
5.4.	Referências Bibliográficas.....	30
6.	CAPÍTULO 3. Sensibilidade relativa de métodos de cultivo bacteriológico para o isolamento de <i>Salmonella</i> sp. de amostras fecais de suínos.	
6.1.	Introdução.....	31
6.2.	Material e Métodos.....	32
6.3.	Resultados e Discussão.....	33
6.4.	Referências Bibliográficas.....	37
7.	CAPÍTULO 4. Avaliação comparativa de ensaios de detecção de <i>Salmonella</i> sp. em amostras fecais de suínos.	
7.1.	Introdução.....	39
7.2.	Material e Métodos.....	39
7.3.	Resultados e Discussão.....	40
7.4.	Referências Bibliográficas.....	43
8.	DISCUSSÃO GERAL	44
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
10.	CONCLUSÕES FINAIS	52
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Experimento 1 – Dose de inoculação de <i>Salmonella</i> Typhimurium, níveis de contaminação ambiental e frequência de infecção dos animais expostos ao ambiente contaminado.....	19
Tabela 1.2 -	Experimento 2 – Dose de inoculação de <i>Salmonella</i> Typhimurium, níveis de contaminação ambiental e frequência de infecção dos animais expostos ao ambiente contaminado.....	19
Tabela 1.3 -	Proporção, por amostra, de suínos positivos para <i>Salmonella</i> Typhimurium, após exposição a ambiente contaminado por animais excretores inoculados artificialmente, nos experimentos 1 e 2 combinados.....	19
Tabela 2.1 -	Sorovares de <i>Salmonella</i> sp. isolados (seguidos do número total de isolados obtidos) a partir das amostras coletadas nos caminhões de transporte, baias de descanso pré-abate e suínos após o abate (conteúdo cecal e linfonodo íleocecal), no frigorífico A.....	27
Tabela 2.2 -	Sorovares de <i>Salmonella</i> sp. isolados (seguidos do número total de isolados obtidos) a partir das amostras coletadas nos caminhões de transporte, baias de descanso pré-abate e suínos após o abate (conteúdo cecal e linfonodo íleocecal), no frigorífico B.....	27
Tabela 2.3 -	Prevalência de <i>Salmonella</i> sp. em suínos ao abate, determinada através da análise de amostras de conteúdo cecal e linfonodo íleocecal, em dois frigoríficos.....	28
Tabela 3.1 -	Sensibilidade relativa de quatro métodos de cultivo bacteriológico para o isolamento de <i>Salmonella</i> sp. de amostras de fezes de suínos.....	35
Tabela 3.2 -	Distribuição de frequência dos sorovares de <i>Salmonella</i> sp. isolados pelos métodos de cultivo B e C.....	35
Tabela 4.1 -	Sensibilidade relativa e concordância com o padrão-ouro de quatro ensaios de detecção de <i>Salmonella</i> sp., utilizando-se amostras fecais de suínos.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Métodos de cultivo bacteriológico avaliados comparativamente para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de fezes de suínos..... 33

1. RESUMO

Quatro estudos foram conduzidos com o objetivo de 1) avaliar a possibilidade de suínos se tornarem infectados por *Salmonella* sp. a partir de um ambiente contaminado, em um curto intervalo de tempo, 2) determinar se as baias de descanso pré-abate constituem uma fonte de infecção por *Salmonella* sp. para suínos, 3) avaliar quatro métodos de cultivo bacteriológico para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras fecais de suínos, e 4) avaliar quatro ensaios de detecção de *Salmonella* sp. disponíveis comercialmente, para a detecção de *Salmonella* sp. em amostras fecais de suínos. No primeiro estudo, demonstrou-se que, sob condições experimentais, suínos podem ser infectados por *Salmonella* Typhimurium, quando expostos a um ambiente contaminado por um período de tempo tão curto quanto 30 minutos. No segundo estudo, demonstrou-se que as baias de descanso pré-abate estão freqüentemente contaminadas com uma variedade de sorovares de *Salmonella* sp., constituindo uma importante fonte de infecções para suínos antes do abate. Dos quatro métodos de cultivo bacteriológico avaliados no terceiro estudo, dois apresentaram sensibilidade relativa superior para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de fezes de suínos. Os métodos de cultivo que apresentaram melhor desempenho consistiram de enriquecimento primário em caldos Tetracionato ou Rappaport-Vassiliadis, seguido de enriquecimento secundário em caldo Rappaport-Vassiliadis e isolamento em ágar XLT-4, com sensibilidade relativa de 94 e 95%, respectivamente. Os ensaios de detecção de *Salmonella* sp. avaliados no último estudo consistiram de dois ensaios imunoenzimáticos de captura de antígeno (ELISA 1 e 2), um ensaio de hibridização de DNA e um ensaio imunocromatográfico. A combinação dos resultados obtidos utilizando-se os dois métodos de cultivo de melhor sensibilidade determinada no estudo anterior foi definida como o padrão-ouro. A sensibilidade e a concordância (estatística Kappa) em relação ao padrão-ouro definido para cada ensaio de detecção avaliado foram; 87.36% e 0.64 para o ELISA 1; 98.85% e 0.96 para o ELISA 2; 97.70% e 0.92 para o ensaio de hibridização de DNA; e 80.46% e 0.48 para o ensaio imunocromatográfico. Concluiu-se que o ELISA 2 e o ensaio de hibridização de DNA apresentaram desempenho superior aos demais ensaios avaliados. Além disso, concluiu-se que atualmente existem ensaios de detecção de *Salmonella* sp. comercialmente disponíveis, que poderiam ter aplicação em investigações de segurança alimentar que utilizam amostras clínicas.

Palavras-chave: *Salmonella*, suíno, infecção, diagnóstico.

2. ABSTRACT

Four studies were conducted with the objective of 1) evaluate the possibility of swine becoming infected with *Salmonella* sp. from a contaminated environment in a short time interval, 2) determine if abattoir holding pens constitute a *Salmonella* sp. infection source for swine prior to slaughter, 3) evaluate four bacteriologic culture methods for the isolation of *Salmonella* sp. from swine fecal samples, and 4) evaluate four commercially available detection assays for the detection of *Salmonella* sp. in swine fecal samples. In the first study, it was demonstrated, under experimental conditions, that swine may become infected with *Salmonella* sp., when exposed to a contaminated environment for a period of time as short as 30 minutes. In the second study, it was demonstrated that the abattoir holding pens are frequently contaminated with a variety of *Salmonella* sp. serovars, constituting an important source of infections for swine prior to slaughter. Of the four culture methods evaluated in the third study, two had the best relative sensitivity for the isolation of *Salmonella* sp. from swine fecal samples. The best culture methods consisted of a primary enrichment in Tetrathionate or Rappaport-Vassiliadis broth, followed by secondary enrichment in Rappaport-Vassiliadis broth and plating on XLT-4 agar, with relative sensitivities of 94 and 95%, respectively. The commercially available *Salmonella* sp. detection assays evaluated in the last study consisted of two antigen capture enzyme-linked immunoassays (ELISA 1 and 2), a DNA hybridization assay, and an immunochromatographic assay. The combination of results obtained using the best two culture methods from the previous study was defined as the gold-standard. The sensitivity and agreement (Kappa statistics) with the defined gold-standard for each of the evaluated detection assays were; 87.36% and 0.64 for the ELISA 1; 98.85% and 0.96 for the ELISA 2; 97.70% and 0.92 for the DNA hybridization assay; and 80.46% and 0.48 for the immunochromatographic assay. It was concluded that the ELISA 2 and the DNA hybridization assay performed better than the other evaluated assays. Also, it was concluded that there are efficient and reliable commercial *Salmonella* sp. detection assays currently available, that could be useful in pre-harvest food safety investigations using clinical samples.

Keywords: *Salmonella*, swine, infection, diagnosis.

3. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Salmonella* são reconhecidas como importantes patógenos causadores de zoonose de significativa importância econômica mundial, ampliando-se o interesse neste grupo de patógenos durante os últimos anos. A existência de mais de 2.400 sorovares de *Salmonella* sp., cada qual com uma biologia particular, torna bastante complexo e intrigante qualquer estudo e discussão a respeito das infecções por estes organismos, bem como sobre sua epidemiologia. O gênero *Salmonella* contém duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, cada qual contendo múltiplos sorovares. A espécie *Salmonella enterica* é ainda dividida em seis subespécies, indicadas por algarismos romanos e nomes (I, *S. enterica* subsp. *enterica*; II, *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV, *S. enterica* subsp. *houtenae*; e VI, *S. enterica* subsp. *indica*). A grande maioria dos mais de 2.400 sorovares de *Salmonella* sp. existentes pertence à subespécie I, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Brenner et al., 2000).

Como causadoras de infecções no homem, as bactérias do gênero *Salmonella*, juntamente com as bactérias do gênero *Campylobacter*, constituem os patógenos de origem alimentar mais comuns em todo mundo, sendo a fonte principal destas infecções representada por produtos de origem animal contaminados, sustentando a hipótese de que os animais portadores representam uma fonte potencial de contaminação destes produtos. Estima-se que 76 milhões de casos de infecções de origem alimentar em seres humanos ocorram anualmente nos Estados Unidos, causando 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes (Mead et al., 1999). O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos estimou o custo anual das infecções por *Salmonella* sp. em seres humanos em

2.3 bilhões de dólares, sendo que 6 a 9% do total de casos estariam especificamente associados à ingestão de carne suína contaminada (Frenzen et al., 1999).

Além disto, é extremamente importante salientar que a ocorrência de resistência a agentes antimicrobianos, inclusive de caráter múltiplo, é comum nas bactérias do gênero *Salmonella*, aumentando ainda mais a importância destas bactérias como causadoras de infecções no homem.

A importância dos produtos suínos como fontes de infecção por *Salmonella* sp. em seres humanos tem sido demonstrada por grande número de investigações. A infecção subclínica por *Salmonella* sp. em suínos constitui um risco à saúde humana, pois o conteúdo do trato gastrointestinal e o material fecal destes animais podem contaminar as carcaças ao longo da linha de abate. A carne oriunda de carcaças contaminadas pode subseqüentemente originar a doença no homem, direta ou indiretamente, pela contaminação cruzada de outros produtos alimentares ao longo das linhas de manufatura e distribuição, do frigorífico ao consumidor final.

Investigações sobre *Salmonella* sp. na produção de suínos e de alimentos derivados tem apresentado intenso crescimento durante os últimos anos. Entretanto, há uma marcante premência quanto à compreensão da epidemiologia deste grupo de bactérias nos animais ainda vivos, no sentido de complementar os conhecimentos existentes na cadeia de processamento e distribuição de alimentos, visando a redução de contaminações. Atualmente, reconhece-se que apenas através da integração e cooperação de todas as fases da cadeia de produção de carne suína (pré- e pós-abate), será possível reduzir a prevalência de contaminações por *Salmonella* sp., e conseqüentemente, a frequência de infecções por *Salmonella* sp. em seres humanos.

Devido à relevância deste grupo de patógenos, testes de diagnóstico rápidos e

precisos para a detecção de *Salmonella* sp. são necessários para a indústria de alimentos e para os laboratórios de microbiologia clínica. Apesar dos avanços obtidos e do número de métodos práticos e rápidos desenvolvidos, a detecção de *Salmonella* sp. em amostras clínicas ainda apresenta problemas, principalmente quanto à sua sensibilidade, sendo que a aplicação direta aos espécimes clínicos freqüentemente não é possível. O diagnóstico das infecções por *Salmonella* sp. atualmente é baseado no cultivo e identificação do organismo. Entretanto, o cultivo através dos métodos tradicionais é trabalhoso e demorado.

Nos últimos anos, os laboratórios de diagnóstico concentraram-se em reduzir o tempo necessário para o diagnóstico das infecções por *Salmonella* sp.. Assim, o desenvolvimento e a implementação de métodos mais sensíveis e rápidos de identificação das infecções por *Salmonella* sp. a partir de espécimes clínicos é premente. Diversas técnicas para incrementar a detecção destes microrganismos, tais como; métodos seletivos de cultivo, imunológicos e de biologia molecular têm sido desenvolvidos. Entretanto, problemas com a sensibilidade e a especificidade destes métodos têm impedido a sua aplicação rotineira.

Atualmente, as infecções por bactérias do gênero *Salmonella*, bem como o seu diagnóstico, constituem alvos de grande atenção para profissionais das áreas de produção e sanidade animal, e de saúde pública. Informações sobre a freqüência e a

distribuição dos sorovares de *Salmonella* sp. em populações de animais domésticos são essenciais para o entendimento da relação hospedeiro-parasita nos reservatórios de salmoneloses humana e animal.

Com base no exposto, os objetivos deste trabalho consistiram em:

1. Avaliar a possibilidade de suínos serem infectados por *Salmonella* sp. quando expostos por curto período de tempo a um ambiente contaminado com fezes contendo a bactéria;
2. Determinar se infecções por *Salmonella* sp. constituem um fenômeno que rotineiramente ocorre durante o período de descanso pré-abate nos frigoríficos, e conseqüentemente, determinar o papel deste descanso pré-abate como um ponto crítico para a infecção de suínos por *Salmonella* sp. antes do abate;
3. Avaliar comparativamente quatro métodos de cultivo bacteriológico, com relação à sua sensibilidade relativa para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de fezes de suínos;
4. Avaliar comparativamente quatro ensaios de detecção de *Salmonella* sp. comercialmente disponíveis, originalmente desenvolvidos para serem utilizados em amostras de alimentos, para a detecção de *Salmonella* sp. em amostras de fezes de suínos.

4. CAPÍTULO 1

Infecção experimental rápida por *Salmonella Typhimurium* em suínos.

4.1. INTRODUÇÃO

O transporte e o descanso pré-abate prolongado (>12 horas) têm sido associados ao aumento da prevalência de *Salmonella* sp. ao abate em suínos (Hansen et al.,1964; Williams e Newell,1967, 1968, 1970; Craven e Hurst,1982; Morgan et al.,1987). Entretanto, este aumento na prevalência tem sido atribuído aos efeitos do estresse sobre a imunidade e à re-excreção da bactéria nas fezes. Pouca atenção tem sido dispensada ao ambiente como fonte de infecção por *Salmonella* sp..

Estudos recentes apresentaram evidências de que suínos poderiam ser infectados durante o período de descanso pré-abate nos frigoríficos (Hurd et al.,2001b; Mckean et al.,2001). Em ambos estudos, uma diferença significativa na prevalência, assim como na diversidade de sorovares de *Salmonella* sp., foi encontrada entre grupos de suínos amostrados nos rebanhos de origem e ao abate nos frigoríficos, após um período de descanso pré-abate de duas a três horas.

Em estudos de infecção experimental (Fedorka-Cray et al.,1995; Blaha et al.,1997), utilizando leitões, demonstraram a disseminação de *Salmonella Typhimurium* ao longo do seu trato intestinal, em poucas horas.

Apesar de infecções rápidas (em intervalos de duas a três horas) por *Salmonella* sp. em suínos aparentemente serem passíveis de ocorrer, esta possibilidade ainda não foi testada sob condições experimentais, que mimetizem a exposição dos animais sob condições naturais.

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a possibilidade de suínos, à idade e peso de abate serem infectados por

Salmonella sp. quando expostos por um curto período de tempo a um ambiente contaminado com fezes contendo a bactéria.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Local de execução e animais:

O presente estudo foi conduzido em baias de concreto (piso inteiro), localizadas no National Animal Disease Center / USDA, localizado em Ames, Iowa, nos Estados Unidos. As baias localizavam-se no interior de edifícios próprios para estudos de infecção experimental com isolamento total e nenhuma influência do meio externo. Os animais utilizados consistiram de machos e fêmeas mestiços, adquiridos de um rebanho de ciclo completo de produção comercial, localizado na região. O peso vivo médio dos animais utilizados foi de 92 kg. Amostras de fezes foram coletadas de cada animal aos sete dias, cinco dias e imediatamente antes de iniciar a exposição ao ambiente contaminado por *Salmonella* sp., a fim de verificar se estes eram realmente negativos para a presença da bactéria.

4.2.2. Bactéria e inóculo:

Uma amostra de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, naturalmente resistente ao Ácido Nalidixico ($\chi 4232$) foi utilizada para o desafio nos experimentos descritos a seguir. Raspados da cultura pura (mantida a -80°C) foram utilizados para inocular 5 ml de caldo LB, o qual foi incubado a 37°C (18 horas). A seguir, 1 ml da cultura foi transferido para outros 5 ml de caldo LB (incubação a 37°C por 18 horas). Após incubação, diluições seriadas foram realizadas para atingir uma concentração aproximada de 10^8 a 10^9

unidades formadoras de colônias (UFCs) por ml. O número de diluições necessárias foi determinado de acordo com experiências prévias, utilizando-se como parâmetro a densidade óptica da cultura (600nm). Entretanto, a concentração final real do inóculo foi determinada mediante semeadura e contagem em placas de Petri contendo ágar soja tripticaseína (TSA).

4.2.3. Delineamento experimental:

O presente estudo foi composto por dois experimentos, conforme descritos a seguir.

O experimento 1 consistiu de cinco repetições, contendo oito animais cada (total: 40 animais). Em cada repetição, os animais foram aleatoriamente designados para um dos cinco tratamentos: excretores (n=2/repetição), exposição por duas horas (n=2/repetição), exposição por três horas (n=2/repetição), exposição por seis horas, ou controle positivo (n=1/repetição), e sem exposição, ou controle negativo (n=1/repetição). Quatro dias antes do início de cada repetição do experimento, os animais aleatoriamente designados para o tratamento denominado de excretores foram isolados em uma baía separada, e após jejum de 12 a 18 horas, foram inoculados por via intranasal com 5 ml da cultura de desafio, ou inóculo (de 0.5 em 0.5 ml, alternando narinas). Na manhã de exposição, os demais animais, com exceção do selecionado para ser o controle negativo (sem exposição), foram transferidos para uma baía isolada localizada no mesmo edifício onde estavam alojados os excretores. Todos os animais foram submetidos a jejum (com água *ad libitum*) de aproximadamente 18 horas. As fezes dos excretores foram deixadas para se acumular no piso da baía ocupada durante este período de jejum. Os excretores foram sacrificados e removidos da baía para uma área de necrópsia adjacente. O piso da baía foi levemente molhado, a fim de possibilitar a homogeneização das fezes acumuladas, simulando condições frequentemente

observadas nas baias de descanso pré-abate dos frigoríficos. Uma mescla de 30g de fezes foi coletada de diversas partes do piso da baía de exposição (10 amostras de aproximadamente 3 g cada), a fim de determinar os níveis de contaminação ambiental obtidos, quantificando-se a bactéria utilizada. Os suínos a serem expostos foram então transferidos para a baía contaminada, sacrificados e necropsiados após duas, três e seis horas. O animal utilizado como controle negativo foi necropsiado imediatamente antes do controle positivo (exposição por seis horas), tendo sido mantido em outra baía isolada por todo o período. Todas as amostras foram coletadas assepticamente, utilizando instrumentos estéreis, luvas descartáveis e sacos plásticos individuais. Estas amostras consistiram de: linfonodo inguinal superficial (LIS), linfonodo ileocecal (LIC), linfonodo mandibular (LM), conteúdo cecal (CC), porção distal do íleo (PDI) e fezes (F). As fezes foram coletadas de duas maneiras. Nas repetições A, B e C, as fezes foram coletadas diretamente através do ânus. Nas repetições D e E, a coleta foi realizada internamente, através do corte e esvaziamento da porção terminal do intestino grosso (reto).

O experimento 2 foi conduzido de modo semelhante às repetições D e E do experimento 1, conforme descrito anteriormente. Entretanto, neste experimento apenas 3 repetições foram realizadas, contendo 10 animais cada (total: 30 animais), e os tempos de exposição consistiram de 30 minutos (n=2 animais/repetição), 60 minutos (n=2 animais/repetição), duas horas (n=2 animais/repetição) e seis horas (n=1 animal/repetição). Além destes, um animal por repetição não foi exposto ao ambiente contaminado. Os controles positivo e negativo foram semelhantes aos utilizados no experimento 1, ou seja, exposição por seis horas e sem exposição, respectivamente. As amostras coletadas

INSTITUTO DE VETERINÁRIA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
RIO DE JANEIRO

foram as mesmas do experimento 1 anteriormente descrito.

4.2.4. Procedimentos bacteriológicos:

Os LIS, LIC e LM foram imersos em etanol 70%, flambados e individualmente macerados em bolsas plásticas estéreis, utilizando-se um martelo de borracha. Adicionou-se água peptonada 0.3% (10ml) a cada amostra, e após homogeneização, 1 ml de cada amostra foi adicionado aos meios de pré-enriquecimento e enriquecimento primário (10ml). Amostras fecais (10g) e de conteúdo cecal (10g) foram diretamente adicionadas aos meios de pré-enriquecimento (100ml) e enriquecimento primário (100ml). As amostras de PDI (10cm) foram longitudinalmente cortadas e adicionadas diretamente aos meios de pré-enriquecimento e enriquecimento primário (100ml).

Os métodos de cultivo bacteriológico utilizados para o isolamento de *Salmonella* sp. foram:

Método 1: pré-enriquecimento em caldo GN-Hajna (37°C/24horas), seguido de enriquecimento em 10ml caldo Rappaport-Vassiliadis, contendo 50µg/ml de ácido nalidixico (37°C/24horas).

Método 2: enriquecimento primário em caldo Tetrionato (37°C/48horas), seguido de enriquecimento secundário em 10ml caldo Rappaport-Vassiliadis, contendo 50µg/ml de ácido nalidixico (37°C/24horas).

Em ambos os métodos, o isolamento foi realizado em placas contendo ágar Xilose-Lisina-Tergitol-4 (XLT-4) e Verde Brilhante com Sulfa (BGS), incubadas a 37°C por 24horas.

Colônias suspeitas foram presuntivamente identificadas como *Salmonella* sp. ou não-*Salmonella* sp., em ágar triplice açúcar e ferro (TSI) e ágar lisina e ferro (LIA). Isolados

bioquimicamente identificados como *Salmonella* sp. foram considerados como sendo a amostra utilizada no desafio, após confirmação mediante aglutinação com antisoro específico para antígeno O de *Salmonella enterica* do grupo B (Becton, Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Estados Unidos).

No experimento 2, os métodos de cultivo foram modificados, aumentando-se a sua sensibilidade para a bactéria utilizada. Ácido Nalidixico continuou sendo adicionado ao caldo de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis, mas também foi adicionado (50µg/ml) aos meios de isolamento, que passaram a ser XLT-4 e Chromoagar. Colônias suspeitas foram transferidas para placas contendo ágar Rambach, e sua identificação bioquímica realizada através do sistema de identificação BBL Crystal Enteric/Non-fermenter (Becton, Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Estados Unidos).

Em ambos os experimentos, análises quantitativas da contaminação ambiental (mescla de fezes dos animais excretadores) foram realizadas utilizando-se o método de número mais provável (NMP), conforme descrito por Wood e Rose (1992), com duas importantes adições. O Ácido Nalidixico (50µg/ml) foi adicionado ao caldo GN-Hajna, a fim de selecionar a amostra bacteriana utilizada no desafio, e também às placas de XLT-4, BGS ou Chromoagar, a fim de aumentar a sua sensibilidade.

Todos os meios de cultivo bacteriológico utilizados neste estudo foram adquiridos de Becton, Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Estados Unidos.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento 1, todos os animais sem exposição ao ambiente contaminado (controles negativos) foram negativos para a amostra de *Salmonella* Typhimurium utilizada (χ^{4232}). A tabela 1.1, referente ao

experimento 1, apresenta as doses dos inóculos administrados aos animais excretadores e os respectivos níveis de contaminação ambiental, medidos nas fezes que estavam no piso da baía de exposição. Além disto, a tabela 1.1 também apresenta a frequência de infecção dos animais expostos, em cada repetição do experimento. Conforme pode ser observado, a dose do inóculo administrada aos animais excretadores variou durante o experimento (de 2.0×10^8 a 3.6×10^9 UFCs). Entretanto, não se observou nenhuma inter-relação entre a dose inoculada nos animais excretadores e o nível de contaminação ambiental obtido.

No experimento 1, duas horas pós-exposição, a amostra de *Salmonella* Typhimurium utilizada foi isolada, de pelo menos uma das amostras colhidas de 80% dos animais expostos. Mais especificamente, a amostra marcada foi isolada em 70% das porções de íleo terminal coletadas e em 50% das amostras de fezes coletadas destes animais. A mesma amostra foi também isolada em 30% das amostras de conteúdo cecal e 20% das amostras de linfonodo íleocecal deste mesmo grupo de animais. Três horas pós-exposição, pelo menos uma amostra foi positiva para a *Salmonella* Typhimurium utilizada em 60% dos animais. A bactéria foi mais frequentemente isolada de amostras de fezes, com 50% das amostras sendo positivas. Além disso, a amostra de *Salmonella* sp. utilizada foi também isolada a partir de porção distal de íleo (30%), conteúdo cecal (20%) e linfonodo mandibular (10%). Estes resultados estão apresentados detalhadamente na tabela 1.3.

Conforme esperado, os animais necropsiados após seis horas de exposição apresentaram o maior número de amostras positivas. *Salmonella* Typhimurium foi isolada a partir de pelo menos uma amostra em todos os animais deste grupo (100%). Amostras de conteúdo cecal foram positivas em todos os animais, sendo que 80% das

amostras de porção distal do íleo, 40% das amostras de fezes, 20% das amostras de linfonodo superficial inguinal e de linfonodo íleocecal foram positivas (Tabela 1.3).

No experimento 2, todos os animais sem exposição (controles negativos) permaneceram negativos por todas as repetições do experimento. A tabela 1.2 apresenta as doses dos inóculos administrados aos animais excretadores, os respectivos níveis de contaminação ambiental, medidos nas fezes que estavam no piso da baía de exposição, e a frequência de infecção dos animais expostos (experimento 2). Conforme pode ser novamente observado, independentemente da dose do inóculo administrada aos animais excretadores, o nível de contaminação ambiental permaneceu relativamente constante. Após apenas 30 minutos de exposição, 50% dos animais foram positivos para a amostra de *Salmonella* sp. utilizada, sendo a sua grande maioria na porção distal do íleo (Tabela 1.3). Após 60 minutos de exposição, 50% dos animais foram positivos. Dos animais expostos por duas horas, 33% foram positivos, enquanto 100% dos animais expostos por seis horas foram positivos para a amostra marcada de *Salmonella* sp. utilizada.

Os resultados obtidos nos experimentos 1 e 2, considerando cada tipo de amostra, para todos os tratamentos (excretadores, 30 minutos, 60 minutos, duas horas, três horas e seis horas de exposição, e sem exposição) estão apresentados na tabela 1.3. Esta tabela apresenta apenas a totalização dos resultados, sem possibilitar entretanto maiores comparações, pois os níveis de exposição ambiental foram diferentes nos experimentos realizados, bem como a sensibilidade da metodologia utilizada para a pesquisa da amostra de *Salmonella* Typhimurium utilizada.

Tabela 1.1. Experimento 1 – Dose de inoculação de *Salmonella* Typhimurium, níveis de contaminação ambiental e frequência de infecção dos animais expostos ao ambiente contaminado.

Repetição	Dose de inoculação (UFC/animal)	Contaminação ambiental (UFC/g)	Animais expostos/2hs. (+/expostos)	Animais expostos/3hs. (+/expostos)	Animais expostos/6hs. (+/expostos)
A	2.0×10^8	4.2×10^2	0/2	0/2	1/1
B	3.1×10^8	1.5×10^3	2/2	0/2	1/1
C	9.0×10^8	4.4×10^3	2/2	2/2	1/1
D	3.6×10^9	4.5×10^2	2/2	2/2	1/1
E	2.2×10^9	2.2×10^4	2/2	2/2	1/1
Médias/Totais:	1.4×10^9	5.8×10^3	8/10	6/10	5/5

Tabela 1.2. Experimento 2 – Dose de inoculação de *Salmonella* Typhimurium, níveis de contaminação ambiental e frequência de infecção dos animais expostos ao ambiente contaminado.

Repetição	Dose de inoculação (UFC/animal)	Contaminação ambiental (UFC/g)	Animais expostos por 30min. (+/expostos)	Animais expostos por 60 min. (+/expostos)	Animais expostos por 2 horas (+/expostos)	Animais expostos por 6 horas (+/expostos)
A	4.5×10^9	1.6×10^5	2/2	2/2	2/2	1/1
B	9.5×10^9	1.4×10^5	½	1/2	0/2	1/1
C	7.5×10^8	2.6×10^5	0/2	0/2	0/2	1/1
Médias/Totais:	4.9×10^9	1.9×10^5	3/6	3/6	2/6	3/3

Tabela 1.3. Proporção, por amostra, de suínos positivos para *Salmonella* Typhimurium, após exposição a ambiente contaminado por animais excretores inoculados artificialmente, nos experimentos 1 e 2 combinados.

Tratamento	Linfonodo						
	Linfonodo Mandibular	Linfonodo Ileocecal	Linfonodo Inguinal Superficial	Conteúdo cecal	Íleo distal	Fezes	Todas as amostras combinadas
Excretores	13/16	16/16	3/16	16/16	16/16	16/16	16/16
Exp. 30min.	0/6	0/6	1/1	1/6	3/6	1/6	3/6
Exp. 60min.	0/6	0/6	1/6	2/6	3/6	1/6	3/6
Exp. 2 horas	0/16	3/16	2/16	3/16	8/16	5/16	10/16
Exp. 3 horas	1/10	0/10	0/10	2/10	3/10	5/10	6/10
Exp. 6 horas	0/8	1/8	1/8	8/8	7/8	2/8	8/8
S/ exposição	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8

Nos animais excretores (artificialmente inoculados) foi possível reisolara amostra de *Salmonella* Typhimurium utilizada de todos os animais quatro dias pós-inoculação. Nestes animais, a bactéria foi reisolada em 100% das amostras de linfonodo ileocecal, porção distal do íleo, conteúdo cecal e fezes analisadas. Amostras de linfonodo mandibular foram positivas em 81% dos casos, enquanto de linfonodo inguinal

superficial foram positivas em apenas 19% dos casos.

O objetivo fundamental destes experimentos foi o de testar a hipótese de que suínos poderiam ser infectados por *Salmonella* sp. após um curto período de exposição (30 minutos, 60 minutos, duas horas e três horas) a um ambiente contaminado, mimetizando as condições naturais de transmissão da bactéria entre os animais. A observação de pelo menos um

animal exposto positivo é suficiente para aceitar a hipótese proposta, de que esta infecção rápida é possível. Além disso, o estudo não foi delineado para determinar o tempo de exposição mínimo, ou a dose de exposição ambiental mínima necessária para que a infecção ocorra, uma vez que o número de animais utilizados por repetição não é suficiente para atender tais objetivos. A observação de que os animais expostos por duas horas na repetição A do experimento 1 (nível de contaminação ambiental = 4.2×10^2 UFCs) não foram infectados, mas de que na repetição D do mesmo experimento, o mesmo tempo de exposição a níveis de contaminação similares (4.5×10^2 UFCs) resultou na infecção dos animais sugere que maiores estudos são necessários para se determinar o limiar da dose e do tempo de exposição, bem como dos possíveis fatores envolvidos.

Inicialmente, foi surpreendente encontrar *Salmonella* Typhimurium nas amostras de fezes dos animais expostos por apenas duas horas ao ambiente contaminado, no experimento 1. Nas repetições A, B e C, as amostras foram coletadas através do ânus, o que criou uma preocupação com uma possível contaminação externa na região perineal, gerando a positividade das amostras analisadas. Entretanto, nas repetições D e E, amostras fecais positivas também foram observadas em animais submetidos ao mesmo tempo de exposição, sendo que as fezes foram coletadas internamente, através da exposição asséptica do reto, eliminado qualquer suspeita de contaminação. Além disso, três dos quatro animais identificados nas repetições A, B e C como positivos para *Salmonella* sp. nas amostras fecais, também apresentaram-se positivos nas amostras de linfonodo ileocecal. A partir de então, surgiu a questão que levou à realização do segundo experimento, testando a possibilidade da ocorrência desta infecção em animais expostos ao ambiente contaminado por períodos de tempo menores, tais como 30 e 60 minutos.

Conforme apresentado, os resultados obtidos foram ainda mais surpreendentes, demonstrando que *Salmonella* Typhimurium é capaz de passar por todo o trato gastrointestinal dos animais expostos ao ambiente contaminado, em apenas 30 minutos.

Apesar dos resultados encontrados parecerem surpreendentes, Clemens et al.(1975) demonstraram que apesar do intestino delgado de suínos ter aproximadamente 18 metros de comprimento, é possível para um marcador fluido ingerido alcançar o ceco em duas horas, enquanto uma partícula de 2mm alcança a mesma região em quatro horas. Fedorka-Cray et al.(1995) observaram que o ceco de leitões esofagostomizados inoculados por via intranasal se tornaria colonizado por *Salmonella* sp. em três horas. Blaha et al.(1997) observaram que suínos inoculados por via oral apresentavam a bactéria no jejuno uma hora pós-inoculação, no ceco e reto duas horas pós-inoculação, e linfonodo ileocecal quatro horas pós-inoculação. Entretanto, estes estudos utilizaram suínos jovens, inoculados artificialmente com doses elevadas, levando freqüentemente à ocorrência de doença clínica nos animais inoculados. Fedorka-Cray et al.(1995) utilizaram leitões de seis a oito semanas de idade e dose de inoculação de 10^9 UFCs. Blaha et al.(1997) utilizaram leitões de seis a 12 semanas de idade e dose de inoculação de 10^8 a 10^{10} UFCs.

Conforme exposto anteriormente, os níveis de contaminação das baias de exposição obtidos em ambos os experimentos componentes deste estudo apresentaram-se significativamente inferiores às doses de inoculação utilizadas em outros estudos. A questão que emerge é: Será que as doses de "desafio ambiental" obtidas neste estudo refletem a realidade dos níveis de contaminação por *Salmonella* sp. normalmente encontrados nas baias de descanso pré-abate dos frigoríficos? Através da utilização de animais excretores

procurou-se acomodar parcialmente esta incerteza, simulando a dose de contaminação ambiental e as características patogênicas da amostra de *Salmonella* sp. utilizada. De acordo com Smith (1998), bactérias do gênero *Salmonella in vivo* apresentam propriedades patogênicas distintas, em relação às bactérias do mesmo grupo cultivadas *in vitro*. Assim sendo, a utilização de animais excretores para provocar a contaminação ambiental possibilitou a utilização de bactérias cultivadas *in vivo* como desafio aos animais expostos ao ambiente das baías contaminadas naturalmente. Um estudo recente, realizado por Swanenburg et al.(2001), onde se descreveu níveis de contaminação por *Enterobacteriaceae* de 10^3 a 10^4 UFCs/cm² em baías de descanso pré-abate de frigoríficos sustentam a possibilidade de que os níveis de contaminação ambiental obtidos nos experimentos realizados representem a realidade. Entretanto, dados mais precisos são ainda necessários para confirmar esta hipótese.

Apesar deste estudo ter sido planejado tentando-se simular as condições encontradas no descanso pré-abate dos frigoríficos, algumas questões persistem. Neste estudo, os animais foram submetidos a uma restrição alimentar de aproximadamente 18 horas antes da exposição ao ambiente contaminado. Na prática, é comum que a maioria dos animais destinados ao abate sejam submetidos a uma restrição de apenas quatro a oito horas. Entretanto, Isaacson et al.(1999) demonstraram que a restrição alimentar na realidade reduz a frequência de isolamento de *Salmonella* sp., sugerindo que o período de restrição utilizado neste estudo poderia reduzir as chances de se isolar a bactéria, em relação às condições normais encontradas nos frigoríficos. Outra questão remanescente refere-se ao fato de que o estresse associado ao transporte tem recebido importância como fator determinante da prevalência de animais

infectados por *Salmonella* sp.. Apesar de não ter se realizado nenhuma quantificação do estresse sofrido pelos animais utilizados neste estudo, a rápida movimentação (10 a 15 minutos), a ausência de mistura com outros animais, e os cuidados adotados para a sua manipulação, provavelmente reduziram significativamente o seu estresse, em comparação ao que normalmente ocorre por ocasião do transporte e manipulação dos animais antes do abate. Novamente, o efeito do menor estresse, em relação às condições normalmente observadas nos frigoríficos, sugere que a frequência de infecções encontrada seria menor do que o esperado ao submeter os animais às condições normais prévias ao abate.

Mais estudos são necessários a fim de se determinar a natureza da infecção observada nos experimentos componentes deste estudo (trato gastrointestinal e linfonodos mesentéricos). Não se sabe se esta infecção pode ser rapidamente eliminada, ou se levará a uma infecção sistêmica e a um estado de portador. Não se sabe se os animais expostos serão capazes de excretar a bactéria nas fezes por períodos prolongados e por quanto tempo isto ocorreria. Wood et al.(1989) realizaram a infecção experimental de leitões (sete a oito semanas de idade) com *Salmonella* Typhimurium, com o objetivo de observar a sua persistência em animais convalescentes. Os animais inoculados apresentaram amostras fecais positivas para *Salmonella* sp. durante 22 semanas pós-inoculação.

Estudos adicionais são ainda necessários, a fim de se determinar os níveis ambientais reais de contaminações por *Salmonella* sp. nas baías de descanso pré-abate dos frigoríficos, bem como a contaminação ambiental mínima necessária para ocorrer a infecção dos animais expostos a esse ambiente. Finalmente, não se sabe se os resultados aqui apresentados, utilizando uma amostra de *Salmonella* Typhimurium resistente ao ácido nalidixico, podem ser expandidos para outros sorovares de *Salmonella* sp. comumente

encontrados em suínos. Estudos futuros possivelmente virão a esclarecer estas questões.

Este estudo demonstrou que é possível para suínos ao peso e idade de abate serem infectados por *Salmonella* Typhimurium durante exposição por um curto período de tempo a um ambiente contaminado com níveis relativamente baixos da bactéria, indicando que o período de descanso pré-abate pode resultar em infecções rápidas por *Salmonella* sp. em suínos. O fato de que 100% dos animais se apresentaram infectados após seis horas de exposição ao ambiente contaminado demonstra a necessidade de se evitar longos períodos de descanso pré-abate, ou de se reduzir os níveis de contaminação das baias de descanso. Este estudo sugere que as baias de descanso pré-abate provavelmente constituem um ponto crítico para a redução das contaminações por *Salmonella* sp. em suínos e seus produtos.

4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLAHA, T.; SOLANO - AGUIAR, G. ; PIJOAN, C. The early colonization pattern of *S. Typhimurium* in pigs after oral intake. In: 2nd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 1997, Copenhagen. *Proceedings...* Copenhagen: 1997. p.71-73.
- CLEMENS, E. T.; STEVENS, C. E. ; SOUTHWORTH, M. Sites of organic acid production and pattern of digesta movement in the gastrointestinal tract of swine. *Journal of Nutrition*, v.105, p.759-768, 1975.
- CRAVEN, J.A.; HURST, D.B. The effect of time in lairage on the frequency of *Salmonella* infection in slaughtered pigs. *Journal of Hygiene*, v.88, p.107-111, 1982.
- FEDORKA-CRAY, P.J.; KELLEY, L.C.; STABEL, T.J. et al. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. *Infection and Immunity*, v.63, p.2658-2664, 1995.
- HANSEN, R.; ROGERS, R.; EMGE, S. et al. Incidence of *Salmonella* in the hog colon as affected by handling practices prior to slaughter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.145, p.140-141, 1964.
- HURD, H.S.; MCKEAN, J.D.; GRIFFITH, R.D. et al. Estimation of the on-farm *Salmonella enterica* prevalence in market swine. In: 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and Other Food Borne Pathogens in Pork, 2001, Leipzig. *Proceedings...* Leipzig: 2001(a). p.521-523.
- HURD, H.S.; MCKEAN, J.D.; WESLEY, I.V. et al. The effect of lairage and transport on *Salmonella* isolation from market pigs. *Journal of Food Protection*, v.64, p.939-944, 2001(b).
- ISAACSON, R. E.; FIRKINS, L. D.; WEIGEL, R. M. et al. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella typhimurium* among experimentally infected pigs. *American Journal of Veterinary Research*, v.60, p.1155-1158, 1999.
- MCKEAN, J. D.; HURD, H. S.; ROSTAGNO, M.H. et al. Transport and holding at the abattoir: A critical control point for *Salmonella* in market swine? In: 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and Other Food Borne Pathogens in Pork, 2001, Leipzig. *Proceedings...* Leipzig: 2001. p.292-294.

- MORGAN, I. R. ; KRAUTIL, F. L. ; CRAVEN, J.A. Effect of time in lairage on caecal and carcass *Salmonella* contamination of slaughter pigs. *Epidemiology and Infection*, v.98, p.323-330, 1987.
- SMITH, H. What happens to bacterial pathogens *in vivo*? *Trends in Microbiology*, v.6, p.239-243, 1998.
- SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; KEUZENKAMP, D.A. et al. *Salmonella* in the lairage of pig slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, v.64, p.12-16, 2001.
- WILLIAMS, L.P.; NEWELL, K.W. Sources of *Salmonellas* in market swine. *Journal of Hygiene*, v.66, p.281-293, 1968.
- WILLIAMS, L.P.; NEWELL, K.W. Patterns of *Salmonella* excretion in market swine. *American Journal of Public Health*, v.57, p.466-471, 1967.
- WILLIAMS, L. P. ; NEWELL, K. W. *Salmonella* excretion in joy-riding pigs. *American Journal of Public Health*, v.50, p.926-929, 1970.
- WOOD, R.L.; POSPISCHIL, A.; ROSE, R. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *American Journal of Veterinary Research*, v.50, p.1015-1021, 1989.
- WOOD, R.L.; ROSE, R. Populations of *Salmonella typhimurium* in internal organs of experimentally infected carrier swine. *American Journal of Veterinary Research*, v.53, p.653-658, 1992.

5. CAPÍTULO 2

Infecções por *Salmonella* sp. em suínos durante o período de descanso pré-abate.

5.1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos demonstraram a ocorrência de um aumento significativo na prevalência de suínos infectados por *Salmonella* sp. ao abate, em relação à prevalência nos rebanhos de origem (Morgan et al.,1987; Hurd et al.,2001b; Mckean et al.,2001). O transporte destes animais desde os rebanhos ao frigorífico e o descanso pré-abate têm sido associados ao aumento na prevalência de *Salmonella* sp. ao abate, o que é freqüentemente atribuído ao efeito do estresse e à re-excreção da bactéria nas fezes. Entretanto, a identificação de isolados obtidos em alguns desses estudos (Hurd et al.,2001b; Mckean et al.,2001) revela um aumento também na diversidade de sorovares encontrados ao abate em relação à encontrada nos rebanhos. Este aumento na prevalência e na diversidade de sorovares sugere que os animais estejam sendo submetidos a nova(s) fonte(s) de infecção por *Salmonella* sp., ao serem transferidos dos rebanhos para os frigoríficos.

O descanso pré-abate, onde ocorrem o contato com outros animais (inclusive de outros rebanhos) e a exposição ambiental, também pode ser um importante determinante da prevalência de *Salmonella* sp. ao abate, não apenas pelo efeito do estresse associado, mas também atuando como uma fonte de novas infecções. Um estudo recente demonstrou que sob condições experimentais, *Salmonella* Typhimurium pode infectar suínos à idade de abate durante a sua exposição a um ambiente contaminado, por um período de apenas duas horas, ou mesmo menos (Hurd et al.,2001a), o qual é considerado ser o tempo mínimo necessário para que os animais se recuperem do

estresse associado ao transporte (Warriss et al.,1992). Apesar da possibilidade de infecção durante o descanso pré-abate, pouca ou mesmo nenhuma atenção tem sido dada ao estudo da mesma na maioria dos estudos publicados até o momento.

O objetivo deste estudo foi determinar se infecções rápidas por *Salmonella* sp. constituem um fenômeno que rotineiramente ocorre durante o período de descanso pré-abate nos frigoríficos, demonstrando a importância das baias de descanso pré-abate como fonte de infecções por *Salmonella* sp. para suínos antes do abate.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Delineamento experimental:

Três repetições do experimento foram realizadas em cada um dos dois frigoríficos de alta capacidade estudados (aproximadamente 16.000 suínos abatidos/dia). Cada repetição incluiu o estudo de quatro grupos de suínos, totalizando 24 grupos estudados, sendo 12 em cada frigorífico (aproximadamente 150 animais/grupo). Para cada grupo estudado, após o transporte e seu estresse associado, foram coletadas seis mesclas de amostras de fezes do piso de seus caminhões, logo após os animais serem descarregados (amostragem pré-descanso). As respectivas baias de descanso pré-abate foram amostradas (seis mesclas de amostras por baia, consistindo de swabs do piso, líquidos e fezes residuais) logo antes dos animais serem alojados. Além disso, uma amostra de água do bebedouro de cada baia de descanso pré-abate foi coletada. Após o abate, conteúdo cecal e linfonodo ileocecal foram coletados de 30 animais por grupo,

aleatoriamente selecionados ao longo da linha de abate (amostragem pós-descanso).

5.2.2. Procedimento bacteriológico:

Todas as amostras foram processadas por métodos bacteriológicos convencionais para o isolamento e identificação de *Salmonella* sp.. Os métodos de cultivo utilizados foram:

Método 1 – pré-enriquecimento em caldo GN-Hajna (37°C/24horas), seguido de enriquecimento em 10ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (37°C/24horas);

Método 2 – enriquecimento primário em caldo Tetratonato (37°C/48horas), seguido de enriquecimento secundário em 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (37°C/24horas).

Após o enriquecimento em caldo Rappaport-Vassiliadis, em ambos os métodos, procedeu-se à semeadura de placas contendo meio Verde Brilhante com Sulfá (BGS) e ágar Xilose-Lisina-Tergitol-4 (XLT-4), e incubação por 24 horas a 37°C.

Todas as amostras coletadas nos caminhões de transporte (10g) e nas baias de descanso pré-abate (10g ou 10ml), assim como as amostras de conteúdo cecal coletadas após o abate (10g) foram inoculadas diretamente em 100ml dos meios utilizados para pré-enriquecimento e enriquecimento primário das amostras. As amostras de linfonodos íleocecal coletadas após o abate foram maceradas dentro de sacos plásticos estéreis, utilizando-se um martelo de borracha. A seguir, 10 ml de água peptonada 0.3% foram adicionados, e cada amostra foi homogeneizada. Após homogeneização, 1 ml de cada amostra foi diretamente inoculado em 10ml dos meios utilizados para pré-enriquecimento e enriquecimento primário.

Das placas onde foram semadas as amostras pré-descanso e das baias de descanso, até cinco colônias suspeitas

foram selecionadas para identificação. Para as amostras pós-descanso, até três colônias suspeitas foram selecionadas para identificação por placa. A seleção de múltiplas colônias por placa objetivou detectar a maior variedade possível de sorovares por amostra, sendo que a diferença no número de colônias selecionadas por placa entre amostras objetivou compensar a diferença de amostragem, bem como baseou-se no pressuposto de que uma maior diversidade de sorovares seria encontrada nas amostras provenientes dos caminhões, e principalmente das baias de descanso.

Colônias suspeitas foram presuntivamente identificadas através de reações bioquímicas em ágar triplice açúcar e ferro (TSI) e ágar lisina e ferro (LIA), sorogrupagem por aglutinação em lâmina, utilizando-se antisoro para antígeno O de *Salmonella enterica* dos grupos poly-A-I & Vi, B, C1 e E (Becton, Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Estados Unidos). Os isolados presuntivamente identificados como *Salmonella enterica* foram semeados em tubos contendo ágar soja tripticaseína (TSA) e submetidos a sorotipagem no National Veterinary Service Laboratory do USDA, localizado em Ames, Iowa, Estados Unidos.

Todos os meios de cultivo bacteriológico utilizados neste estudo foram adquiridos de Becton, Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Estados Unidos.

5.2.3. Análise estatística:

Os resultados foram organizados em um banco de dados eletrônico (Microsoft Access 2000, Microsoft Corporation) e transferidos para um software de análises estatísticas (Statistix for Windows, Analytical Software, version 2.0), procedendo-se à sua análise estatística. A análise dos dados incluiu análises de distribuições de frequência (utilizando-se o qui-quadrado), comparações de proporções (utilizando-se o teste de McNemar) e

tabulações cruzadas, adotando-se sempre o nível de significância de $p < 0.05$.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 24 caminhões de transporte amostrados (amostragem pré-descanso), 20(83.3%) foram identificados como positivos para *Salmonella* sp.. Todas as baias de descanso pré-abate (24/24) estavam contaminadas por diversos sorovares de *Salmonella* sp., sendo que em 8 (33.3%) destas, as amostras de água coletadas diretamente dos bebedouros apresentaram-se contaminadas por *Salmonella* sp.. Todos os grupos de suínos estudados (24/24) foram identificados como positivos para *Salmonella* sp., através da análise das amostras pós-descanso, incluindo os grupos que chegaram aos frigoríficos transportados pelos caminhões que apresentaram resultados negativos.

Isolou-se *Salmonella* sp. de 43.8% (63/144) do total de amostras de mesclas de fezes coletado nos caminhões de transporte, em ambos os frigoríficos. Em um dos frigoríficos, 33.3% (24/72) das amostras foram positivas para *Salmonella* sp., enquanto no outro, 54.2% (39/72) das amostras coletadas foram positivas. Houve diferença significativa no número de amostras positivas coletadas nos caminhões de transporte entre os frigoríficos estudados ($p < 0.05$).

Isolou-se *Salmonella* sp. de 76.4% (110/144) do total de amostras coletadas nas baias de descanso pré-abate, em ambos os frigoríficos estudados. Em um dos frigoríficos, 62.5% (45/72) das amostras coletadas foram positivas para *Salmonella* sp., enquanto no outro, 90.3% (65/72) das amostras foram positivas. Houve diferença significativa no número total de amostras das baias de descanso pré-abate positivas entre frigoríficos ($p < 0.05$).

Os sorovares de *Salmonella* sp. isolados a partir das amostras coletadas nos caminhões de transporte, nas baias de descanso pré-abate e dos animais após o

abate estão apresentados nas tabelas 2.1 e 2.2.

Um total de 36 sorovares de *Salmonella* sp. foi isolado neste estudo. Os 10 sorovares mais frequentemente encontrados foram: Typhimurium (22.3%), Derby (21.2%), Anatum (19%), Saint-Paul (12%), Infantis (5.3%), Senftenberg (4.2%), Heidelberg (4.2%), Bovis-morbificans (1.5%), Uganda (1.2%) e Hartford (1.2%).

Dos 24 caminhões de transporte amostrados, sete (29.2%) foram lavados antes de serem carregados com os animais estudados, enquanto 17 (70.8%) não o foram. Das 24 baias de descanso pré-abate amostradas, 21 (87.5%) foram lavadas com água sob pressão, antes da entrada dos animais, enquanto três (12.5%) não o foram.

A prevalência de infecções por *Salmonella* sp. nos suínos estudados em ambos os frigoríficos está apresentada na tabela 2.3.

Dos 24 grupos de suínos estudados, 25% estavam infectados por sorovares de *Salmonella* sp. que também foram encontrados nos respectivos caminhões de transporte, 25% estavam infectados por sorovares que também foram encontrados nas respectivas baias de descanso pré-abate, e 45.8% estavam infectados por sorovares encontrados simultaneamente nos respectivos caminhões de transporte e baias de descanso pré-abate.

O número médio de sorovares de *Salmonella* sp. encontrados nos caminhões de transporte foi de 1.6 sorovares/caminhão, nas baias de descanso pré-abate foi de 3.0 sorovares/baia, e nos animais de 3.7 sorovares/grupo estudado. Este resultado representa a diversidade de sorovares de *Salmonella* sp. encontrada nas amostragens pré-descanso, descanso e pós-descanso, respectivamente.

Comparando-se o número total de isolados de *Salmonella* sp. ($n=969$ isolados) obtido a partir das amostras pós-descanso (amostras de conteúdo cecal e linfonodo ileocecal), com os sorovares de *Salmonella*

sp. encontrados nos caminhões de transporte e nas baías de descanso pré-abate, observou-se que 15.7% destes isolados pertenciam a sorovares encontrados nos caminhões, 25.8% pertenciam a sorovares encontrados nas baías de descanso, e 7.9% correspondiam a sorovares encontrados simultaneamente nos caminhões e nas baías. Curiosamente,

50.6% destes isolados pertenciam a sorovares não encontrados nos caminhões e nas baías de descanso.

Tabela 2.1. Sorovares de *Salmonella* sp. isolados (seguidos do número total de isolados obtidos) a partir das amostras coletadas nos caminhões de transporte, baías de descanso pré-abate e suínos após o abate (conteúdo cecal e linfonodo ileocecal), no frigorífico A.

Caminhões	Baías de descanso	Conteúdo cecal	Linfonodo ileocecal
Saint-Paul (13)	Anatum (41)	Typhimurium (110)	Typhimurium (92)
Anatum (9)	Typhimurium (24)	Derby (95)	Saint-Paul (86)
Typhimurium (8)	Derby (23)	Saint-Paul (72)	Derby (73)
Infantis (6)	Minnesota (13)	Anatum (33)	Anatum (17)
Agona (5)	Senftenberg (5)	Mbandaka (5)	Hartford (15)
Mbandaka (3)	Montivideo (4)	Infantis (4)	Molade (4)
Muenster (2)	Saint-Paul (4)	Heidelberg (3)	Worthington (3)
Derby (1)	Infantis (3)	Montivideo (3)	Agona (1)
Give (1)	Ohio (3)	4,12:i-monofásico (2)	Choleraesuis (1)
Heidelberg (1)	Litchfield (2)	Hartford (2)	Infantis (1)
Krefeld (1)	Muenster (2)	Agona (1)	
Worthington (1)	Reading (2)	Babelsberg (1)	
	Agona (1)	Ohio (1)	
	Brandenburg (1)		
	Johannesburg (1)		
	Mbandaka (1)		
	Uganda (1)		

Tabela 2.2. Sorovares de *Salmonella* sp. isolados (seguidos do número total de isolados obtidos) a partir das amostras coletadas nos caminhões de transporte, baías de descanso pré-abate e suínos após o abate (conteúdo cecal e linfonodo ileocecal), no frigorífico B.

Caminhões	Baías de descanso	Conteúdo cecal	Linfonodo ileocecal
Senftenberg (37)	Anatum (106)	Anatum (55)	Derby (44)
Infantis (20)	Typhimurium (51)	Derby (40)	Anatum (16)
Heidelberg (19)	Derby (28)	Infantis (36)	Choleraesuis (9)
Derby (6)	Uganda (17)	Typhimurium (35)	Newport (6)
Kentucky (5)	Infantis (5)	Heidelberg (33)	Typhimurium (5)
Livingstone (2)	Heidelberg (3)	Bovis-morbificans (21)	Heidelberg (3)
Typhimurium (2)	Cerro (2)	Senftenberg (20)	Muenchen (3)
6,8:r-monofásico (1)	Mbandaka (2)	Agona (6)	4,12:autoaglutinável (2)
Anatum (1)	Muenchen (1)	Ohio (3)	Infantis (2)
Bovis-morbificans (1)	Ohio (1)	Newport (2)	
Falkensee (1)		6,7:pouco móvel (1)	
Montivideo (1)		Cerro (1)	
Ohio (1)		Worthington (1)	

Tabela 2.3. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos ao abate, determinada através da análise de amostras de conteúdo cecal e linfonodo ileocecal, em dois frigoríficos.

Frigorífico	Amostras	
	Conteúdo cecal	Linfonodo ileocecal
A	115/240 (47.92%) ^a	68/240 (28.33%) ^a
B	95/240 (39.58%) ^a	29/240 (12.1%) ^b
Total (A+B)	210/480 (43.75%)	97/480 (20.21%)

* a,b – letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que as baias de descanso pré-abate estão freqüentemente contaminadas com uma variedade de sorovares de *Salmonella* sp.. Esta importante constatação foi observada por Swanenburg et al.(2001b), que relataram freqüente contaminação por *Enterobacteriaceae* (níveis de contaminação de 10^3 a 10^4 UFCs) em baias de descanso pré-abate de dois frigoríficos na Europa. Neste mesmo estudo, 70 e 90% das amostras coletadas das baias de descanso pré-abate apresentaram-se positivas para *Salmonella* sp., nos frigoríficos estudados.

É interessante observar que em estudo anterior Williams e Newell (1968) já haviam chamado a atenção para a possibilidade desta contaminação do ambiente de descanso pré-abate e também para a possível ocorrência de infecções em suínos durante o período de descanso pré-abate. Entretanto, apenas recentemente (após mais de 30 anos) esta possibilidade começou a ser considerada e explorada, como no estudo aqui apresentado. A concordância dos sorovares isolados de 25% dos grupos de suínos estudados com sorovares isolados das respectivas baias de descanso, e de 25.8% do total de isolados obtidos após o período de descanso pré-abate com sorovares também encontrados nas respectivas baias de descanso, demonstra claramente que a contaminação das baias de descanso pré-abate constitui uma importante fonte de infecções por *Salmonella* sp. em suínos momentos antes do abate. Investigações epidemiológicas recentes sobre a fonte de contaminação por *Salmonella* sp. em suínos e seus produtos

(Swanenburg et al.,2001a) confirmam os resultados aqui apresentados sobre a importância do descanso pré-abate. Além disso, um outro estudo recente (Hurd et al.,2001b) demonstrou não haver aumento nas taxas de isolamento de *Salmonella* sp., após um período de descanso pré-abate de 18 horas, em baias limpas e desinfetadas.

Sob “condições de campo” (i.e., nos frigoríficos), outros estudos (Craven e Hurst,1982; Morgan et al.,1987) relataram o efeito do descanso pré-abate sobre a prevalência de suínos infectados por *Salmonella* sp., mas utilizando períodos de descanso variando entre 18 e 72 horas. É importante ressaltar, que a maioria dos frigoríficos atualmente evita o descanso pré-abate por mais de seis a oito horas. Entretanto, um mínimo de duas horas é recomendado, a fim de evitar o comprometimento da qualidade da carne suína. Este é considerado ser o tempo mínimo necessário para que os suínos se recuperem do estresse do transporte (Warriss et al.,1992). Neste estudo, o tempo médio de descanso pré-abate foi de 3 horas e 28 minutos (variando entre 1 hora e 55 minutos e 5 horas e 20 minutos), o que parece ter sido suficiente para a ocorrência de infecções rápidas por *Salmonella* sp.. Outro importante fator a ser considerado é o período de tempo que os animais permaneceram nos caminhões de transporte. Neste estudo, os animais permaneceram, em média, 2 horas e 24 minutos (variando entre 30 minutos e 10 horas e 10 minutos) nos caminhões de transporte, desde que foram carregados nos rebanhos de origem, até o momento de descarga nos frigoríficos. Este período de

tempo também é suficientemente longo para possibilitar a ocorrência de infecções por *Salmonella* sp., adquiridas por infecções cruzadas, ou dos próprios caminhões que por acaso estejam previamente contaminados. É importante ressaltar, que a maioria dos caminhões (70.8%) não foi lavada antes da sua utilização no transporte dos animais estudados, sendo que 80% destes apresentavam-se contaminados após serem descarregados. Rajkowski et al.(1998) em um estudo sobre a eficiência da lavagem e desinfecção de caminhões de transporte de suínos, relataram que 80% das amostras coletadas anteriormente à sua lavagem e desinfecção apresentaram-se positivas para *Salmonella* sp., reafirmando os resultados encontrados neste estudo.

É possível que suínos sejam portadores de *Salmonella* sp. enquanto ainda estão no rebanho de origem, mas não eliminem a bactéria nas fezes. O estresse dos eventos pré-abate pode então induzir estes animais infectados a iniciarem a eliminação da bactéria nas fezes. Entretanto, é também provável que os animais sejam infectados durante o transporte e o descanso pré-abate, através de infecções cruzadas e exposição a ambiente(s) contaminado(s) por *Salmonella* sp.. Os resultados encontrados neste estudo, em acordo com outros estudos realizados (Swanenburg et al.,2001a; Williams e Newell, 1968) indicam que o ambiente contaminado das baias de descanso pré-abate constitui importante fonte de infecções por *Salmonella* sp. para os suínos.

O que aparentemente ocorre é que em adição ao efeito do estresse dos eventos pré-abate (transporte, movimentação e descanso pré-abate), os suínos se tornam rapidamente infectados durante o transporte desde os rebanhos de origem aos frigoríficos, e principalmente, durante o período de descanso pré-abate, aumentando assim o risco de contaminação da linha de abate e processamento.

Curiosamente, não houve concordância para 50.6% dos isolados de *Salmonella* sp. obtidos ao abate, o que poderia ser devido a problemas de amostragem, tais como processamento de diferentes tipos de amostras pré-descanso (mescla de fezes), das baias de descanso pré-abate (swabs, líquidos e fezes residuais) e pós-descanso (conteúdo cecal e linfonodo ileocecal), bem como amostragem insuficiente dos caminhões de transporte e das baias de descanso pré-abate, não possibilitando o isolamento de todos os sorovares de *Salmonella* sp. presentes. Além disso, também deve-se considerar a ocorrência de problemas decorrentes da interação entre os métodos bacteriológicos utilizados e os diferentes tipos de amostras coletados e processados. Não se pode afirmar que os métodos de cultivo utilizados neste estudo são eficientes em detectar todos os sorovares de *Salmonella* sp. possivelmente presentes nas amostras estudadas. Provavelmente, não o são. Entretanto, os mesmos métodos foram utilizados para todas as amostras, o que permitiria o isolamento dos mesmos sorovares (caso estivessem presentes) nas amostras coletadas durante as três amostragens (pré-descanso, descanso e pós-descanso). Entretanto, de acordo com Waltman (2000), organismos do grupo *Salmonella* sp. estão virtualmente em todos os lugares, mas os meios e métodos que são mais eficientes para uma amostra em particular, não necessariamente são ótimos para outras amostras.

As baias de descanso pré-abate precisam ser melhor exploradas, talvez através de uma amostragem mais intensiva, de modo a detectar toda a diversidade de sorovares de *Salmonella* sp. que pode estar presente no ambiente, expondo os animais durante o período de descanso pré-abate.

A patogênese da infecção por diferentes sorovares de *Salmonella* sp. também precisa ser melhor conhecida. A diversidade de sorovares, a dose infectante e fatores associados ao hospedeiro podem

influenciar o risco de suínos se tornarem infectados e excretar sorovares de *Salmonella* sp., quando expostos a um ambiente contaminado.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que as baias de descanso pré-abate estão freqüentemente contaminadas com uma variedade de sorovares de *Salmonella* sp., e que a exposição ambiental nas baias de descanso pré-abate constitui uma importante fonte de infecção por *Salmonella* sp. para os suínos, aumentando conseqüentemente o risco de contaminação das carcaças suínas e seus produtos ao longo da linha de abate e processamento. Este estudo identifica um ponto crítico para a contaminação por *Salmonella* sp. na cadeia de produção suína.

5.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRAVEN, J.A.; HURST, D.B. The effect of time in lairage on the frequency of *Salmonella* infection in slaughtered pigs. *Journal of Hygiene*, v.88, p.107-111, 1982.
- HURD, H. S.; GAILEY, J. K.; MCKEAN, J.D. et al. Experimental rapid infection in market swine following exposure to a *Salmonella* contaminated environment. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, v.114, p.382-384, 2001a.
- HURD, H.S.; MCKEAN, J.D.; WESLEY, I.V. et al. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *Journal of Food Protection*, v.64, p.939-944, 2001b.
- MCKEAN, J. D. ; HURD, H. S. ; ROSTAGNO, M.H. et al. Transport and holding at the abattoir: A critical control point for *Salmonella* in market swine? In: 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and Other Food Borne Pathogens in Pork, 2001, Leipzig. *Proceedings...* Leipzig: 2001. p.292-294.
- MORGAN, I. R. ; KRAUTIL, F. L. ; CRAVEN, J.A. Effect of time in lairage on caecal and carcass *Salmonella* contamination of slaughter pigs. *Epidemiology and Infection*, v.98, p.323-330, 1987.
- RAJKOWSKI, K. T. ; EBLEN, S. ; LAUBAUCH, C. Efficacy of washing and sanitizing trailers used for swine transport in reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, v.61, p.31-35, 1998.
- SWANENBURG, M.; BERENDS, B. R.; URLINGS, H. A. P. et al. Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, v.114, p.356-359, 2001a.
- SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; KEUZENKAMP, D.A. et al. *Salmonella* in the lairage of pig slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, v.64, p.12-16, 2001b.
- WALTMAN, W. D. Methods for cultural isolation of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, Wallingford: 2000. p.355-405.
- WARRISS, P. D.; BROWN, S. N. ; EDWARDS, J.E. et al. Time in lairage needed by pigs to recover from the stress of transport. *Veterinary Record*, v.13, p.194-196, 1992.
- WILLIAMS, L.P.; NEWELL, K.W. Sources of *Salmonella* in market swine. *Journal of Hygiene*, v.66, p.281-293, 1968.

6. CAPÍTULO 3

Sensibilidade relativa de métodos de cultivo bacteriológico para o isolamento de *Salmonella* sp. de amostras fecais de suínos.

6.1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços nos novos métodos de diagnóstico, o cultivo bacteriológico convencional continua sendo a base dos estudos sobre a epidemiologia das infecções por *Salmonella* sp. em suínos (Waltman, 2000). Entretanto, apesar da sensibilidade dos métodos de cultivo bacteriológico claramente impactar os resultados de estudos epidemiológicos, isso não é frequentemente discutido na literatura publicada.

Um grande número de diferentes métodos de cultivo para o isolamento de *Salmonella* sp. tem sido publicado durante as últimas décadas. A maioria dos métodos originais foi desenvolvida para o diagnóstico da salmonelose clínica em seres humanos e animais. Entretanto, a salmonelose clínica em suínos é rara na maioria dos países produtores de suínos do mundo, com exceção das infecções por *Salmonella* Choleraesuis (Nielsen e Baggesen, 1997; Waltman, 2000). A situação mais frequentemente encontrada em suínos é a excreção intermitente de baixos números de *Salmonella* sp., o que cria a necessidade de métodos de amostragem e de cultivo bacteriológico altamente sensíveis, a fim de garantir a correta identificação do estado dos animais e populações.

Apesar da diversidade de métodos publicados, um protocolo de isolamento relativamente padronizado foi desenvolvido e correntemente é utilizado na maioria dos laboratórios veterinários. Basicamente, o protocolo consiste de 5 passos, que são os seguintes: 1) pré-enriquecimento, 2) enriquecimento, 3) isolamento, 4) identificação bioquímica presumtiva,

seguida de 5) identificação sorológica (sorogrupagem e sorotipagem). Mesmo com um protocolo bastante padronizado, resultados confusos e contraditórios são frequentemente encontrados na literatura, principalmente gerados pela multiplicidade de meios e métodos disponíveis para o isolamento de *Salmonella* sp., provavelmente mais do que para qualquer outra bactéria. Diversos artigos de revisão têm sido publicados, discutindo o isolamento de *Salmonella* sp., demonstrando a diversidade de meios e métodos utilizados para o seu isolamento a partir de diferentes tipos de amostras (Fricker, 1987; Nielsen e Baggesen, 1997; Waltman, 2000).

Diversos tipos de amostras clínicas podem ser utilizados para o isolamento de *Salmonella* sp. em suínos (e.g.; fezes, conteúdo de diversas partes do trato gastrointestinal, linfonodos, etc.). Entretanto, amostras de fezes são as preferidas para serem utilizadas em estudos de *Salmonella* sp. em populações suínas, por serem facilmente coletadas, além de possibilitarem investigar animais vivos.

Durante os últimos anos, um número crescente de estudos sobre a epidemiologia das infecções por *Salmonella* sp. tem sido realizado, devido à crescente importância da segurança alimentar nos mercados doméstico e internacional de suínos. Estas investigações dependem da disponibilidade de meios precisos de discriminar entre animais infectados e não-infectados. Entretanto, investigações de *Salmonella* sp. nos animais domésticos são dificultadas por alguns fatores, incluindo a sensibilidade variável das técnicas microbiológicas correntemente disponíveis (Bager e Petersen, 1991).

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente quatro métodos de cultivo bacteriológico, visando o

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Amostras:

As amostras de fezes de suínos utilizadas neste estudo (n=100) consistiram de mesclas de fezes coletadas em baias de descanso pré-abate. Para comparar os métodos de cultivo para o isolamento de uma ampla gama de sorovares de *Salmonella* sp., mesclas de fezes foram coletadas de diversas baias de descanso pré-abate, onde vários grupos de suínos, originários de diferentes rebanhos passaram, em duas ocasiões diferentes (amostragem: 5 amostras/baia x 10 baias de descanso pré-abate x 2 ocasiões de amostragens). Imediatamente após a coleta, as amostras foram transportadas sob refrigeração para o laboratório, localizado no National Animal Disease Center/USDA, em Ames, Iowa, Estados Unidos.

6.2.2. Processamento bacteriológico:

No laboratório, as amostras de fezes coletadas foram individualmente homogeneizadas e 10g de cada uma delas foram diretamente inoculados em cada um dos caldos de pré-enriquecimento ou enriquecimento componentes dos quatro métodos de cultivo avaliados.

O primeiro método de cultivo avaliado (Método A) consistiu de um pré-enriquecimento em 100ml de caldo GN-Hajna (GN), por 24 horas a 37°C, seguido de enriquecimento (transferência de 100µl) em 10ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), por 24 horas a 37°C.

O segundo método (Método B) consistiu de um enriquecimento primário em 100ml de caldo Tetrionato (TT) por 24 horas a 37°C, seguido de enriquecimento secundário (transferência de 100µl) em 10ml de caldo Rappaport-Vassiliadis, por 24 horas a 37°C.

isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de fezes de suínos.

O terceiro método (Método C) consistiu de um enriquecimento primário em 100ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (24 horas a 42°C), seguido de enriquecimento secundário (transferência de 100µl) em 10ml também de caldo Rappaport-Vassiliadis (42°C/24 horas).

Finalmente, o quarto método (Método D) consistiu de um pré-enriquecimento em 100ml de caldo GN-Hajna contendo 0.1% de Novobiocina (37°C/24horas), seguido de enriquecimento duplo (transferência de 100µl) em 10ml de caldo Rappaport-Vassiliadis e 10ml de caldo Tetrionato (42°C/24horas), e um pós-enriquecimento combinado (transferência de 0.5ml de cada enriquecimento) em 10ml de caldo M contendo 0.1% de Novobiocina (42°C/6 horas).

Após o enriquecimento (Métodos A, B e C) ou o pós-enriquecimento (Método D), placas contendo ágar Xilose-Lisina-Tergitol-4 (XLT-4) foram semeadas e incubadas a 37°C por 24 horas, para o isolamento. A partir das placas contendo ágar XLT-4, até 3 colônias suspeitas foram selecionadas para identificação. As colônias suspeitas foram transferidas para placas contendo ágar MacConkey, incubadas a 37°C por 24 horas, para serem identificadas como *Salmonella* sp. através de reações bioquímicas utilizando o sistema de identificação bioquímica BBL-Crystal Enteric/Non-Fermenter (Becton, Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Estados Unidos). Apenas as colônias obtidas através dos métodos de melhor desempenho, identificadas como sendo *Salmonella* sp. foram transferidas para tubos contendo ágar soja tripticaseína (TSA), e submetidas a sorotipagem no National Veterinary Service Laboratory/USDA, localizado em Ames, Iowa, Estados Unidos.

Todos os meios de cultivo bacteriológico utilizados neste estudo foram

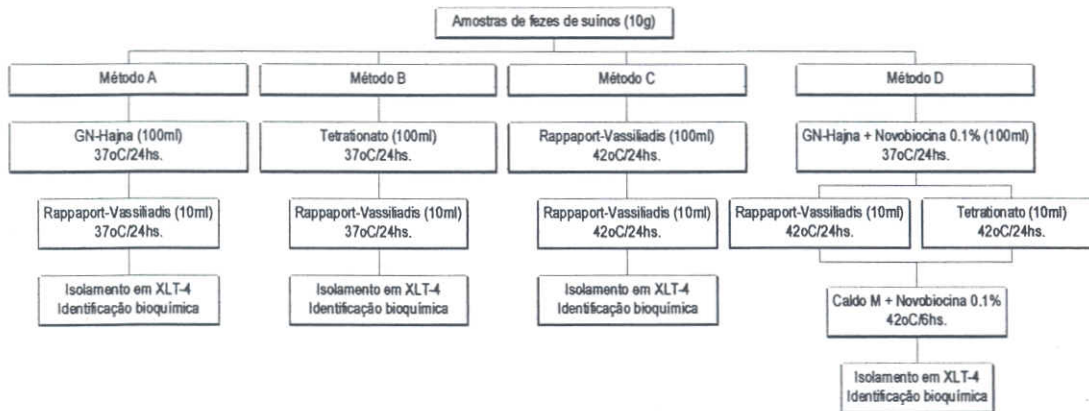
adquiridos de Becton, Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Estados Unidos.

6.2.3. Delineamento experimental:

O delineamento experimental aplicado foi o de amostras individualmente pareadas. O padrão-ouro foi definido como a combinação dos resultados de todos os quatro métodos de cultivo utilizados no estudo. As amostras analisadas foram consideradas positivas para *Salmonella* sp., quando assim determinado por qualquer um dos métodos aplicados. A análise dos dados

incluiu análises de distribuição de freqüências (qui-quadrado) e o cálculo da sensibilidade relativa de cada um dos métodos avaliados, bem como a sua concordância (Estatística Kappa), e a comparação de proporções (teste de McNemar). O nível estatístico de significância aplicado foi de $p < 0.05$. O cálculo da sensibilidade relativa de cada método de cultivo avaliado foi realizado de acordo com Gordis (1996).

Figura 3.1. Métodos de cultivo bacteriológico avaliados comparativamente para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de fezes de suínos.



6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A combinação dos resultados obtidos nos quatro métodos de cultivo avaliados neste estudo resultou nas 100 amostras analisadas sendo positivas para *Salmonella* sp.. Assim sendo, o padrão-ouro utilizado para determinar a sensibilidade relativa dos métodos avaliados foi de 100% de amostras positivas. A sensibilidade relativa dos quatro métodos de cultivo avaliados está apresentada na tabela 3.1. A comparação da sensibilidade dos métodos avaliados demonstrou que os métodos B e C apresentaram desempenho

significativamente ($p < 0.05$) superior ao dos métodos A e D (Tabela 3.1). Nenhum dos métodos foi capaz de isolar *Salmonella* sp. de todas as amostras analisadas. Entretanto, o método C isolou a bactéria de 95% das amostras, sendo o único a ser estatisticamente semelhante ao padrão-ouro (Tabela 3.1).

O número de amostras das quais isolou-se *Salmonella* sp., combinando-se os métodos de cultivo foi de: 99 através dos métodos A e B, 99 através dos métodos A e C, 95 através dos métodos A e D, 100 através dos métodos B e C, 96 através dos métodos B e D, e 98 através dos métodos C e D.

A concordância entre os métodos B e C, que apresentaram melhor desempenho, conforme determinado pela estatística Kappa, foi de 0.89.

No total, 15 sorovares de *Salmonella* sp. foram isolados neste estudo. O método de cultivo C isolou todos os 15 sorovares, enquanto o método B isolou 14 destes sorovares (Tabela 3.2). Os sorovares isolados das amostras que foram negativas pelos métodos B ou C (n= 11 amostras) não foram diferentes dos isolados das demais amostras por ambos os métodos, indicando que não houve nenhum fator relativo aos sorovares que fez com que esses métodos não fossem capazes de detectar a bactéria nas referidas amostras.

Combinando-se os resultados dos métodos B e C, apenas um sorovar foi isolado em 67.3% das amostras. Entretanto, dois sorovares diferentes foram isolados de 27.9% das amostras, e três sorovares foram isolados de 4.8% das amostras (total de amostras com múltiplos sorovares = 32.7%). O método de cultivo B isolou apenas um sorovar de 69.1% das amostras, dois sorovares de 26.6% das amostras, e três sorovares de 4.3% das amostras (do total de 94 amostras positivas por este método). O método C isolou apenas um sorovar de 63.2% das amostras, dois sorovares de 30.5% das amostras, e três sorovares de 6.3% das amostras (do total de 95 amostras positivas por este método). A comparação destas proporções demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0.05$) entre os métodos, quanto à capacidade de isolar mais de um sorovar de *Salmonella* sp. por amostra.

Do total de amostras positivas encontradas neste estudo, apenas uma foi positiva em apenas um método de cultivo, 10 foram positivas em dois métodos, 28 foram positivas em três métodos e 61 foram positivas nos quatro métodos avaliados.

Diversos estudos têm comparado métodos de cultivo para o isolamento de *Salmonella* sp., a partir de ampla variedade de amostras, mas resultados conflitantes

abundam. É difícil comparar a sensibilidade dos métodos avaliados até o momento, visto que diversos estudos relatados têm utilizado amostras artificialmente contaminadas, das quais pode ser mais fácil isolar *Salmonella* sp., quando comparadas com amostras naturalmente contaminadas. Ao avaliar métodos de cultivo, particularmente utilizando amostras altamente contaminadas por organismos competidores, tais como fezes, é provável que resultados qualitativos (positivo/negativo) sejam afetados pela concentração do organismo-alvo, e também de organismos competidores na amostra cultivada. Outro problema importante para este tipo de comparação consiste em que diversos estudos apenas incluíram pequeno número de amostras positivas e um número limitado de sorovares (Bager e Petersen,1991; Funk et al.,2000; Waltman,2000). Em função disso, este estudo foi conduzido utilizando-se amostras naturalmente contaminadas, ao invés de amostras experimentalmente (ou artificialmente) contaminadas. Além disso, com o objetivos de aumentar a probabilidade de encontrar uma alta porcentagem de amostras positivas, bem como uma ampla variedade de sorovares, mesclas de amostras fecais obtidas em baias de descanso pré-abate de um frigorífico foram utilizadas. Com base nos resultados obtidos, em que todas as amostras foram positivas para *Salmonella* sp., onde foi encontrada uma diversidade de 15 sorovares, fica evidente que o método de amostragem aplicado neste estudo foi muito eficiente para a avaliação da sensibilidade de métodos de cultivo visando o isolamento de *Salmonella* sp..

Tabela 3.1. Sensibilidade relativa de quatro métodos de cultivo bacteriológico para o isolamento de *Salmonella* sp. de amostras de fezes de suínos.

Método de cultivo	Sensibilidade relativa ¹	Comparação com padrão-ouro ²
A	82%(a)	p>0.05
B	94%(b)	p<0.05
C	95%(b)	p>0.05
D	78%(a)	p>0.05

¹Comparação de proporções: letras diferentes definem diferença estatística (p<0.05).

²Padrão-ouro = combinação dos quatro métodos de cultivo utilizados no estudo.

Tabela 3.2. Distribuição de freqüência dos sorovares de *Salmonella* sp. isolados pelos métodos de cultivo B e C.

Sorovar	Método B	Método C	Método B + C
Adelaide	22	45	67
Agona	22	13	35
Anatum	7	9	16
Brandenburg	2	3	5
Derby	85	68	153
Heidelberg	3	4	7
Infantis	4	5	9
Kinshasa	4	22	26
Livingstone	1	9	10
Mbandaka	2	17	19
Saint-Paul	60	14	74
Senftenberg	7	5	12
Typhimurium	0	4	4
Typhimurium (Copenhagen)	8	10	18
Não tipável	8	8	16
Total de isolados:	235	236	471

O método de cultivo ideal para o isolamento de *Salmonella* sp. deveria apresentar alta sensibilidade, além de ser altamente específico. Entretanto, a combinação de sensibilidade e especificidade adequada para uma investigação em particular também depende da prevalência da bactéria sob investigação. Estimar a prevalência real de uma bactéria de baixa prevalência requer um método de maior sensibilidade do que no caso de uma bactéria de alta prevalência, onde alta especificidade é mais desejável. Assumindo que o cultivo bacteriano possui 100% de especificidade, a prevalência aparente de amostras positivas é uma função da prevalência real e da sensibilidade do método aplicado (Bager e Petersen,1991;

Enoe et al.,2000; Greiner e Gardner,2000; Funk et al.,2000; Martin,1984; Waltman,2000).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os métodos de cultivo B e C foram superiores aos métodos A e D, sendo altamente eficientes para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de fezes de suínos, apresentando uma sensibilidade relativa de 94 e 95%, e isolamento de 14 e 15 sorovares diferentes de *Salmonella* sp., respectivamente. Ambos os métodos provaram ser adequados para o isolamento de *Salmonella* sp. em investigações epidemiológicas em populações de suínos.

Apesar de se desejar procedimentos unificados e padronizados, a fim de

simplificar o trabalho e possibilitar comparações inter-laboratoriais, provavelmente nenhum método isolado será ótimo para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de diferentes tipos de amostras. Portanto, estes métodos precisam ser avaliados para diferentes tipos de amostras. Entretanto, considerando-se que um método é mais eficiente para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras altamente contaminadas por organismos competidores, é razoável assumir que o mesmo será também eficiente para amostras com níveis de competidores mais baixos. Esta foi a razão pela qual a utilização de amostras de fezes pareceu ser uma ótima escolha de amostra, pois o(s) melhor(es) método(s) poderá(ão) ser também aplicado(s) para estudos que utilizem outro tipo de amostras, tais como; conteúdo do trato gastrointestinal e linfonodos.

Atualmente, o laboratório onde foi realizado este estudo vem utilizando os métodos de cultivo A e B para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de diversos tipos de amostras de suínos, incluindo fezes. Já há algum tempo notou-se a superioridade do método B, mas o método A tem sido recomendado para o isolamento de *Salmonella* Choleraesuis (Anderson et al.,1999). Apesar de aceito pela maioria dos investigadores, esta ainda não foi provada ser a melhor opção, além de ser questionável, quando o objetivo é de se isolar *Salmonella* sp. outras, que não sejam do sorovar Choleraesuis, como é comum nos estudos relacionados à segurança alimentar. A combinação de duas passagens pelo caldo Rappaport-Vassiliadis (enriquecimento primário e secundário), como no método C, constitui uma nova perspectiva a ser explorada, baseando-se no fato de que este meio tem provado ser eficiente na inibição de bactérias competidoras (Rhodes et al.,1985), bem como tem apresentado uma alta sensibilidade para o isolamento de *Salmonella* sp. em comparação com outros meios (Bager e Petersen,1991).

Obviamente, mais estudos ainda são necessários sobre a eficiência de meios para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras clínicas, mas com base em estudos anteriores (Rhodes et al.,1985; Bager e Petersen,1991), bem como nos resultados obtidos neste estudo, o uso na rotina do método de cultivo C constitui uma alternativa atraente.

A maioria dos estudos que isolaram *Salmonella* sp. a partir de diferentes tipos de amostras, incluindo fezes, estavam concentrados na seleção para identificação de uma única colônia suspeita por amostra. Neste estudo, ao selecionar até três colônias suspeitas por placa para identificação, observou-se que 67.3% das amostras apresentavam apenas um sorovar de *Salmonella* sp., enquanto o restante das amostras (32.7%) apresentavam dois ou três sorovares simultaneamente. Se apenas uma única colônia suspeita tivesse sido selecionada para identificação, uma imagem distorcida seria apresentada sobre a distribuição de frequência de sorovares, com sérias implicações para uma investigação epidemiológica. Neste caso em particular, mesclas de amostras foram analisadas, aumentando a probabilidade de se encontrar múltiplos sorovares. Entretanto, outros estudos publicados apoiam esta importante discussão. Um estudo anterior (Kampelmacher et al.,1962) relatou mais de um sorovar em 70 das 545 (12.8%) amostras de suíno positivas. Estes resultados, entretanto, foram obtidos com o cultivo de múltiplas amostras de um mesmo animal. Mais recentemente, O'Carroll et al.(1999) encontraram mais de um sorovar de *Salmonella* sp. em nove dos 37 (24%) suínos, onde pelo menos dois isolados foram obtidos. Funk et al.(2000) também relataram em seu estudo, ter observado que 18.8% dos suínos positivos excretavam mais de um sorovar nas fezes. Diversas abordagens para se identificar a presença de múltiplos sorovares em uma amostra são possíveis de se adotar. Algumas possibilidades incluem a sorotipagem de

múltiplos isolados por amostra, a utilização de múltiplos caldos de enriquecimento (bem como, de diferentes tempos e temperaturas de incubação) e meios de isolamento, o cultivo de múltiplas amostras por animal, ou simplesmente a amostragem de um maior número de animais. De acordo com Funk et al.(2000), a amostragem de mais animais, em oposição à sorotipagem de mais colônias por amostra positiva, é provavelmente a abordagem mais eficiente, porque maximiza a diversidade da fonte de material, enquanto também favorece uma estimativa mais precisa da prevalência. Entretanto, apesar de lógico, esta ainda não foi provada cientificamente como sendo a melhor opção. Mais estudos são necessários sobre este importante e crítico ponto do diagnóstico das infecções por *Salmonella* sp. em suínos, a fim de melhor se entender a sua epidemiologia e ecologia. Laboratórios de diagnóstico e de pesquisa precisam avaliar os custos de se aumentar os esforços de diagnóstico, seja através de uma amostragem mais intensiva, ou do uso de múltiplos meios e métodos, frente aos ganhos esperados na sensibilidade do isolamento de *Salmonella* sp., em relação aos seus objetivos.

6.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R. A. ; HARVEY, R. B.; GENOVESE, K.J. et al. Comparison of two enrichment schemes for qualitative recovery of *Salmonella* serovar Choleraesuis from rectal swabs collected from neonatal and early weaned pigs. In: 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington: 1999. p.13-15.
- BAGER, F.; PETERSEN, J. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.32, p.473-481, 1991.
- ENOE, C.; GEORGIADIS, M. P.; JOHNSON, W.O. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease status is unknown. *Preventive Veterinary Medicine*, v.45, p.61-81, 2000.
- FRICKER, C. R. The isolation of *Salmonellas* and *Campylobacters*. *Journal of Applied Bacteriology*, v.63, p.99-116, 1987.
- FUNK, J. A.; DAVIES, P. R.; NICHOLS, M.A. The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.12, p.412-418, 2000.
- GORDIS, L. Epidemiology. W.B. Saunders Company, Philadelphia: 1996. p.58-76.
- GREINER, M. ; GARDNER, I. A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine*, v.45, p.3-22, 2000.
- KAMPELMACHER, E. H. ; GUINEE, P.A.M.; VAN KEULEN, A. Further studies on *Salmonella* in slaughterhouses and in normal slaughter pigs. *Zentralbl. Veterinarmed [B]*, v.10, p.1-27, 1962.
- MARTIN, S. W. Estimating disease prevalence and the interpretation of screening test results. *Preventive Veterinary Medicine*, v.2, p.463-472, 1984.
- NIELSEN, B.; BAGGESEN, D.L. Update on laboratory diagnosis of subclinical salmonella infections in pigs. In: 2nd International Symposium on the Epidemiology and Control of

Salmonella in Pork, 1997, Copenhagen.
Proceedings... Copenhagen: 1997. p19-31.

O'CARROLL, J. M. ; DAVIES, P. R. ;
CORREA, M. T. et al. Effect of sample
storage and delayed secondary
enrichment on detection of *Salmonella*
spp. in swine feces. *American Journal
of Veterinary Research*, v.60, p.359-
362, 1999.

RHODES, P. ; QUESNEL, L. B. ;
COLLARD, P. Growth kinetics of
mixed culture in *Salmonella* enrichment
media. *Journal of Applied Bacteriology*,
v.59, p.231-237, 1985.

WALTMAN, W. D. Methods for cultural
isolation of *Salmonella*. In: WRAY, C. ;
WRAY, A. *Salmonella* in Domestic
Animals. CABI Publishing,
Wallingford: 2000. p.355-405.

7. CAPÍTULO 4

Avaliação comparativa de ensaios de detecção de *Salmonella* sp. em amostras fecais de suínos.

7.1. INTRODUÇÃO

Devido à crescente ênfase dada à segurança alimentar no mercado suíno, diversos estudos sobre a epidemiologia de *Salmonella* sp. em populações de suínos têm sido realizados durante os últimos anos. Estas investigações requerem meios precisos para discriminar entre animais infectados e não-infectados, o que é dependente da detecção de evidência do agente em amostras clínicas, usualmente fezes. Esta detecção pode ser um problema importante no caso específico de *Salmonella* sp., pois estudos epidemiológicos geralmente requerem a análise um grande número de amostras ou animais, e os métodos bacteriológicos convencionais para o seu isolamento e identificação consomem tempo e demandam trabalho.

Atualmente, diversos ensaios de detecção de *Salmonella* sp., utilizando diferentes princípios de detecção, estão comercialmente disponíveis. Estes ensaios foram originalmente desenvolvidos para serem aplicados na indústria de alimentos. Entretanto, podem ter aplicação em investigações de segurança alimentar na porção anterior ao abate dos animais da cadeia de produção de suínos e seus produtos. É interessante notar que apenas poucos estudos foram realizados explorando esta possibilidade (Cherrington e Huis in't Veld, 1993a, b; Harvey et al., 1999; Wegener e Baggesen, 1997).

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente 4 ensaios de detecção de *Salmonella* sp. comercialmente disponíveis, originalmente desenvolvidos para serem utilizados em amostras de alimentos, para a

detecção de *Salmonella* sp. em amostras de fezes de suínos.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1. Amostras:

As amostras utilizadas neste estudo consistiram de fezes de suínos (10g/amostra e n=100 amostras). Com o objetivo de obter a maior diversidade de sorovares possível, as amostras utilizadas consistiram de mesclas de fezes originárias de 10 baias de descanso pré-abate de um frigorífico de alta capacidade (aproximadamente 16.000 suínos abatidos/dia), por onde haviam passado diversos grupos de suínos, provenientes de diversos rebanhos (amostragem: 10 amostras/baia x 10 baias).

7.2.2. Processamento bacteriológico:

Todas as amostras de fezes (10g) foram individualmente analisadas através de dois métodos de cultivo bacteriológico para o isolamento de *Salmonella* sp.. Ambos os métodos incluíram um enriquecimento primário (Método A: 100ml de caldo Tetrationsato; Método B: 100ml de caldo Rappaport-Vassiliadis) por 24 horas (a 37°C e 42°C, respectivamente), seguido de enriquecimento secundário em 10ml de caldo Rappaport-Vassiliadis por 24 horas a 37°C e 42°C, respectivamente para os métodos A e B, e subsequente isolamento em placas contendo ágar Xilose-Lisina-Tergitol-4 (XLT-4), incubadas a 37°C por 24 horas. Colônias suspeitas (até 3 colônias por placa) foram identificadas através de reações bioquímicas como *Salmonella* sp. ou não-*Salmonella* sp., utilizando-se o sistema de identificação bioquímica BBL-Crystal Enteric/Nonfermenter (Becton,

Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Estados Unidos).

Todos os meios de cultivo bacteriológico utilizados neste estudo foram adquiridos de Becton, Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Estados Unidos.

7.2.3. Ensaios de detecção avaliados:

Os ensaios de detecção avaliados neste estudo incluíram dois ensaios imunoenzimáticos de captura de antígeno (ELISA 1: TECRA *Salmonella* Visual Immunoassay, TECRA International Pty Ltd., Willoughby, Austrália; e ELISA 2: Assurance Gold *Salmonella* EIA, BioControl Systems Inc., Bellevue, Estados Unidos), um ensaio de hibridização de DNA (Gene-Trak, Gene-Trak Systems, Hopkinton, Estados Unidos), e um ensaio imunocromatográfico (Path-Stik, Biomedix, Diamond Bar, Estados Unidos). Todos os ensaios de detecção avaliados são considerados oficiais pela AOAC, para a sua utilização em amostras de alimentos. Os ensaios imunoenzimáticos e imunocromatográfico utilizam anticorpos policlonais contra antígenos somáticos e flagelares de *Salmonella* sp., sendo que ambos ensaios imunoenzimáticos apresentavam-se no formato sanduíche. O ensaio de hibridização de DNA consiste de um ensaio colorimétrico, apresentando-se também no formato sanduíche, tendo como "alvo" o RNA ribossomal (rRNA) de *Salmonella* sp.. Para a execução dos ensaios de detecção avaliados, seguiu-se os protocolos recomendados pelos respectivos fabricantes, que acompanhavam os ensaios, por ocasião de sua aquisição.

Os ensaios imunoenzimáticos e o ensaio de hibridização de DNA foram aplicados após o enriquecimento secundário, diretamente sobre alíquotas extraídas do caldo Rappaport-Vassiliadis. O ensaio imunocromatográfico foi aplicado sobre alíquotas extraídas após seis horas de pós-enriquecimento em água peptonada 1%.

Os valores utilizados como ponto-de-corte aplicados para os ensaios imunoenzimáticos foram: 0.3 para o ELISA 1 (405nm) e a média de dois controles positivos multiplicada por 0.25 para o ELISA 2 (450nm), conforme recomendado pelos respectivos fabricantes. Também seguindo a recomendação do fabricante, utilizou-se o ponto-de-corte de 0.1 para o ensaio de hibridização de DNA (450nm).

7.2.4. Delineamento experimental:

O delineamento experimental aplicado foi o de amostras pareadas individualmente, e como padrão-ouro definiu-se a combinação de resultados dos dois métodos de cultivo aplicados, onde amostras identificadas como positivas em qualquer dos métodos, ou em ambos, foram consideradas positivas. A análise dos dados incluiu análises de distribuições de frequência (qui-quadrado) e o cálculo da sensibilidade relativa e do valor preditivo (positivo e negativo) para cada um dos ensaios de detecção avaliados, bem como a concordância entre os ensaios (Estatística Kappa), e a comparação de proporções (teste de McNemar). O nível de significância estatística aplicado foi de $p < 0.05$. A sensibilidade relativa e o valor preditivo de cada ensaio de detecção avaliado foram determinados de acordo com Gordis (1996).

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras de fezes utilizadas neste estudo ($n=100$), 78 foram positivas para o isolamento de *Salmonella* sp. pelo método A e 75 foram positivas pelo método B. A combinação dos resultados de ambos os métodos de cultivo utilizados resultou em 87 amostras positivas para *Salmonella* sp.. Este resultado combinado foi utilizado como padrão-ouro para a avaliação comparativa dos ensaios de detecção.

A sensibilidade relativa e a concordância com o padrão-ouro para cada

um dos ensaios de detecção avaliados estão apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Sensibilidade relativa e concordância com o padrão-ouro de quatro ensaios de detecção de *Salmonella* sp., utilizando-se amostras fecais de suínos.

Ensaio de detecção	Sensibilidade relativa ¹	Concordância c/ padrão-ouro ²
ELISA 1	87.36%(a)	0.64
ELISA 2	98.85%(b)	0.96
Hibridização de DNA	97.70%(b)	0.92
Imunocromatográfico	80.46%(a)	0.48

¹Comparação de proporções: letras diferentes definem diferença estatística ($p < 0.05$).

²Padrão-ouro = combinação de resultados obtidos através da utilização de dois métodos de cultivo bacteriológico. Concordância determinada através da estatística Kappa.

Os resultados falso-negativos para cada ensaio avaliado foram: 11% para o ELISA 1; 1% para o ELISA 2; 2% para o ensaio de hibridização de DNA, e 18% para o ensaio imunocromatográfico.

Todos os ensaios de detecção, com exceção do imunocromatográfico, não detectaram amostras falso-positivas. O ensaio imunocromatográfico detectou 1% de amostras falso-positivas. O baixo número de falso-positivos detectado por todos os ensaios avaliados indica a sua elevada especificidade, apesar do número de amostras negativas (13/100) ter sido pequeno para possibilitar conclusões definitivas com relação a este parâmetro de desempenho.

O valor preditivo positivo para os ensaios ELISA 1, ELISA 2 e de hibridização de DNA foi de 100%, enquanto o valor preditivo negativo destes ensaios foi de 54.17%, 92.86% e 86.67%, respectivamente. Os valores preditivos positivo e negativo para o ensaio imunocromatográfico foram de 98.59% e 41.38%, respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo, bem como em outros já publicados (Cherrington e Huis in't Veld, 1993a e b; Harvey et al., 1999; Wagener e Baggesen, 1997), demonstram que existem ensaios de detecção de *Salmonella* sp. disponíveis para a indústria de alimentos com potencial para aplicação em amostras clínicas de suínos. Estes ensaios poderiam

ser úteis em investigações epidemiológicas utilizando amostras clínicas, possibilitando o processamento de grande número de amostras, geralmente exigido em estudos epidemiológicos de infecções por *Salmonella* sp. em populações de suínos.

O ELISA 2 e o ensaio de hibridização de DNA apresentaram os melhores desempenhos na avaliação comparativa realizada neste estudo, com 98.85% e 97.7% de sensibilidade relativa, e 96% e 92% de concordância com o padrão-ouro, respectivamente. Ambos ensaios provaram ser altamente sensíveis e específicos (ausência de resultados falso-positivos) para a detecção de *Salmonella* sp. em amostras de fezes de suínos, após o seu enriquecimento secundário em caldo Rappaport-Vassiliadis. Entretanto, o pequeno número de amostras negativas encontrado neste estudo (13/100) tornam a avaliação da especificidade inadequada.

O ELISA 2 apresentou-se como um teste mais fácil e rápido de ser executado, em comparação ao ensaio de hibridização de DNA, mas ambos resultaram em economia de tempo, quando comparados aos métodos de cultivo aplicados. Em ambos os casos, resultados confiáveis foram obtidos após 48 horas da inoculação das amostras nos caldos de enriquecimento primário.

Torna-se necessário ressaltar, que a economia de tempo com relação aos métodos de cultivo convencionais é

possível. Entretanto, de acordo com Blackburn (1993), os enriquecimentos primário e secundário (ou pré-enriquecimento e enriquecimento, em alguns casos) são ainda necessários para se obter o número mínimo necessário de *Salmonella* sp. para que os ensaios sejam capazes de detectá-las.

Neste estudo, amostras de fezes foram utilizadas, entretanto, o efeito que o tipo de amostra clínica e o meio de enriquecimento podem ter sobre o desempenho dos ensaios de detecção é uma importante variável a ser considerada. Além disso, o custo dos ensaios deve ser considerado, i.e., o preço dos ensaios e o custo do trabalho por amostra testada. O custo dos ensaios de detecção rápida comercialmente disponíveis é dependente do distribuidor e do volume de compra. No caso específico deste estudo, o custo por amostra testada (principalmente no caso do ELISA 2) foi menor do que ambos os métodos de cultivo para o isolamento e identificação de *Salmonella* sp. utilizados. O custo por amostra para o ELISA 2 foi de 5 dólares, enquanto para os métodos de cultivo aplicados este custo variou entre 8 e 10 dólares.

Infecções subclínicas por *Salmonella* sp. em suínos estão associadas a problemas de saúde pública, e conseqüentemente são importantes para o mercado nacional e internacional de produtos suínos. Devido a essa importância, diversos países iniciaram a implementação de programas nacionais de vigilância, visando controlar a ocorrência de *Salmonella* sp. em suínos e seus produtos. A identificação de animais infectados na cadeia de produção anterior ao abate é um passo crítico na redução desta ocorrência, e usualmente inclui a análise de amostras de fezes dos animais ainda vivos. A aplicação de ensaios de detecção rápida, como o ELISA 2 e o ensaio de hibridização de DNA avaliados neste estudo, possibilitaria o processamento de um grande número de

amostras, obtendo resultados confiáveis com economia de tempo e dinheiro.

O isolamento de *Salmonella* sp. sempre será necessário para a identificação de sorovares e a análise do perfil de resistência/sensibilidade a agentes antimicrobianos. Entretanto, deve-se levar em conta que uma ampla variedade de abordagens alternativas tem sido desenvolvida e aplicada para a detecção de *Salmonella* sp. em amostras de alimentos, tornando diversos ensaios correntemente disponíveis. Estes ensaios de detecção rápida podem ter diversas aplicações em investigações epidemiológicas, tais como: 1) triagem de amostras para subseqüente isolamento e/ou ajustes de amostragem; 2) monitoria de rebanhos através da medida direta do estado de infecção; e 3) avaliação de medidas de intervenção visando a redução do número de animais infectados. Para investigações de rotina de grandes números de amostras, usualmente com uma baixa proporção de positivos (o que é a situação mais freqüente de *Salmonella* sp. em rebanhos suínos), métodos rápidos de triagem são de grande valia.

Entretanto, é interessante notar que apenas poucos estudos foram conduzidos para a avaliação destes ensaios para a detecção de *Salmonella* sp. em amostras clínicas de suínos (Cherrington e Huis in't Veld, 1993a, b; Harvey et al., 1999; Wagener e Baggesen, 1997), e todos incluindo ensaios imunoenzimáticos. Nenhum destes estudos incluiu os ensaios de detecção avaliados neste experimento. Deve-se destacar esta como uma importante e promissora área no diagnóstico de infecções por *Salmonella* sp. em suínos.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o ELISA 2 e o ensaio de hibridização de DNA são equivalentes e apresentaram desempenho superior aos demais ensaios avaliados, para a detecção de *Salmonella* sp. em amostras de fezes de suínos. Além disso, pode-se concluir que o uso destes dois ensaios de detecção de *Salmonella* sp. em amostras de

fezes de suínos constitui uma alternativa confiável e útil, além de ser menos trabalhoso e caro do que os métodos de cultivo bacteriológico utilizados neste estudo.

7.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLACKBURN, C.W. Rapid and alternative methods for the detection of Salmonellas in foods. *Journal Applied Bacteriology*, v.75, p.199-214, 1993.
- CHERRINGTON, C.A.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Development of a 24 h screen to detect viable Salmonellas in faeces. *Journal of Applied Bacteriology*, v.75, p.58-64, 1993a.
- CHERRINGTON, C.A.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Comparison of classical isolation protocols with a 24 h screen to detect viable Salmonellas in faeces. *Journal of Applied Bacteriology*, v.75, p.65-68, 1993b.
- GORDIS, L. Epidemiology. W.B. Saunders Company, Philadelphia: 1996. p.58-76.
- HARVEY, R.B.; FARRINGTON, L.A.; DROLESKEY, R.E. et al. Evaluation of two commercially available ELISA kits for detection of Salmonellae in swine lymph nodes and cecal and fecal contents. In: 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington: 1999. p.53-56.
- WEGENER, H. C.; BAGGESEN, D. L. Comparison of conventional culture methods and two commercial enzyme linked immunoassays for detection of *Salmonella* in porcine fecal samples and cecal contents. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.9, p.352-356, 1997.

8. DISCUSSÃO GERAL

A segurança alimentar é um ponto de definição no mercado global de produtos suínos, sendo que *Salmonella* sp. está rapidamente se tornando uma preocupação crescente para a indústria suinícola mundial (Davies,1997). Em diversos países, os patógenos de origem alimentar estão sendo considerados como uma nova medida de qualidade para os produtos alimentares. A União Européia, por exemplo, atualmente exige que todos os países membros iniciem programas de monitoramento para *Salmonella* sp. em suínos (Kaesbohrer,1999). Nos Estados Unidos, o investimento em pesquisas e levantamentos epidemiológicos é intenso, sendo que em breve, um programa de monitoramento deverá ser implementado (Davies,1997).

Para que a indústria suinícola seja capaz de responder a este novo desafio, um sólido conhecimento sobre a epidemiologia dos patógenos alimentares em geral, e *Salmonella* sp. em particular, é essencial. Com este objetivo, diversas pesquisas têm sido realizadas em diversos países durante os últimos anos, e informações preliminares estão surgindo, ressaltando a complexidade da epidemiologia das infecções por *Salmonella* sp., além da necessidade de uma melhor compreensão de como estes microrganismos são introduzidos, disseminados e mantidos nas populações suínas.

Historicamente, aceitou-se que a transmissão de *Salmonella* sp. entre suínos ocorreria através da via fecal-oral. Entretanto, experimentos utilizando aves e camundongos demonstraram que infecções por *Salmonella* sp. podem ser regularmente obtidas via aerossóis (Clemmer et al.,1960; Darlow et al.,1960), sugerindo que esta via pode também representar um papel importante na transmissão e disseminação de *Salmonella* sp. em outros hospedeiros. Estudos mais recentes também indicam que o trato respiratório pode ser importante na transmissão e que tonsilas e pulmões

podem constituir focos importantes para invasão e disseminação de *Salmonella* sp. em suínos (Fedorka-Cray et al.,1995; Gray et al.,1996; Fedorka-Cray et al.,2000).

Enquanto infecções por um grande número de *Salmonella* sp. podem ser necessárias para iniciar doença clínica, Fedorka-Cray et al.(1994) demonstraram que suínos infectados com 10^4 unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Salmonella* Typhimurium desenvolvem um estado de portador de curta duração, e Gray et al.(1995) demonstraram que uma dose de 10^8 UFCs resultou em infecção persistente por pelo menos 12 semanas, após a resolução dos sinais clínicos iniciais. Além destes, outros estudos também demonstraram que suínos excretam *Salmonella* Typhimurium por vários meses, após uma infecção induzida experimentalmente, com doses de 10^8 a 10^{10} UFCs (Nielsen et al.,1995; Wilcock e Olander,1978; Wood et al.,1989). É importante observar que todos estes estudos foram realizados utilizando infecções artificiais (inoculações) dos animais estudados com amostras das bactérias cultivadas *in vitro*. Além disso, estes estudos utilizaram suínos jovens (leitões de 4 a 8 semanas de idade). Entretanto, o primeiro experimento componente deste trabalho, onde suínos maiores e mais velhos foram utilizados, demonstra que infecções naturais com organismos excretados por outros animais (bactérias cultivadas *in vivo*) e em doses menores (10^3 UFCs) são possíveis. É importante ressaltar que, de acordo com Smith (1998), a virulência bacteriana somente é completamente manifestada *in vivo*, onde as condições ambientais diferem das encontradas nos cultivos laboratoriais (*in vitro*). A observação de infecções rápidas em suínos expostos a baixos níveis de contaminação por *Salmonella* sp. confirma estas características, diferenciando o modelo de infecção experimental adotado neste experimento dos demais utilizados em outros estudos (Blaha et al.,1997; Fedorka-

Cray et al.,1995; Gray et al.,1996; Wood et al.,1989).

Diversos estudos têm demonstrado que um número substancial de suínos são portadores de *Salmonella* sp. ao chegarem aos frigoríficos e que o trato intestinal e os seus linfonodos associados estão freqüentemente infectados, constituindo uma fonte a partir da qual *Salmonella* sp. pode ser disseminada no frigorífico, contaminando carcaças e outros produtos alimentares (Kampelmacher et al.,1962; Riley,1970; Harvey et al.,1977; Craven e Hurst,1982; Morgan et al.,1987). De acordo com Morgan et al.(1987) a fonte de contaminação das carcaças consiste primariamente nas infecções intestinais por *Salmonella* sp., sendo que o grau de contaminação é determinado pelo número de bactérias entrando no frigorífico no intestino dos animais abatidos. Estes estudos concluíram que os níveis de *Salmonella* sp. nas carcaças eram amplamente determinados pelos níveis de *Salmonella* sp. nos suínos entregues aos frigoríficos.

Apesar da maioria da contaminação por *Salmonella* sp. das carcaças suínas e seus produtos ocorrer dentro dos frigoríficos, durante as linhas de abate e processamento, os suínos infectados que entram no local constituem a fonte original das contaminações. De acordo com Berends et al.(1997), animais vivos portadores de *Salmonella* sp. apresentam uma probabilidade três a quatro vezes maior de resultarem em carcaças contaminadas pela bactéria do que os animais livres da mesma.

Fatores como a duração e as condições de transporte, bem como a restrição alimentar, a contaminação ambiental e a mistura de animais de diferentes origens podem afetar os níveis de infecção por *Salmonella* sp. em grupos de suínos destinados ao abate (Williams e Newell,1968). Em geral, assume-se que a excreção de *Salmonella* sp. por portadores inaparentes pode ser exacerbada por uma longa lista de fatores estressantes, incluindo

a manipulação e mistura de animais, transporte, doenças concorrentes e restrição alimentar. De acordo com Khansari et al.(1990), o estresse representa a reação do organismo a um estímulo que causa um distúrbio ao seu equilíbrio fisiológico normal (homeostase), o qual apresenta impacto significativo sobre o sistema imune. Durante a sua manipulação, transporte e mistura, os suínos são expostos a vários agentes estressantes antes do abate, incluindo ruídos, odores, vibrações, alterações de temperatura, quebra dos grupos sociais e restrição alimentar (Warriss et al.,1992). O estado do seu sistema imune dependerá do resultado destas alterações. Conseqüentemente, muitos acreditam que o número de suínos excretando *Salmonella* sp. aumentará após todos esses agentes estressantes, bem como a sua susceptibilidade a novas infecções. É importante considerar que o estresse afeta ao sistema imune (Khansari et al.,1990), e conseqüentemente o estado imunitário dos animais sujeitos aos estressantes. Entretanto, também deve-se ressaltar que até o momento, não há dados conclusivos demonstrando a associação direta entre estresse, ou estado imunitário, e aumento na excreção ou susceptibilidade a infecções por *Salmonella* sp. em suínos.

Williams e Newell (1970) demonstraram, em um pequeno grupo de suínos, que o transporte resultou em aumento na freqüência de excreção de *Salmonella* sp.. Entretanto, Isaacson et al.(1999a,b) obtiveram resultados conflitantes em estudos para determinar o efeito do transporte e da restrição alimentar sobre a excreção de *Salmonella* Typhimurium, em suínos experimentalmente infectados. Os resultados destes experimentos indicam que há uma interação entre transporte e restrição alimentar, que pode levar ao aumento da excreção de *Salmonella* sp., concluindo-se que seria melhor aplicar a restrição alimentar antes do transporte dos animais para o abate, o que já é

rotineiramente realizado. Morrow et al.(1999) conduziram um estudo para investigar o efeito da restrição alimentar sobre a prevalência de *Salmonella* sp. em amostras de conteúdo cecal ao abate. Os resultados deste estudo indicam que a restrição alimentar não aumentou a prevalência de *Salmonella* sp. nos grupos estudados, submetidos ou não a uma restrição alimentar de 12 ou 24 horas pré-abate. Segundo Craven e Hurst (1982) e Morgan et al.(1987), o período de tempo no descanso pré-abate pode afetar os níveis de infecção por *Salmonella* sp. em grupos de suínos, sendo que a prevalência de infecção em um grupo aumenta com o aumento do período de tempo que os animais permanecem nas baias de descanso pré-abate, com um incremento de aproximadamente 50% para cada 24 horas de descanso pré-abate.

Durante o descanso pré-abate, o contato com outros animais e a exposição ambiental podem também ser importantes determinantes da prevalência de *Salmonella* sp. em suínos ao abate. A elevada densidade populacional que normalmente ocorre nas baias de descanso pré-abate dos frigoríficos pode favorecer a ocorrência de infecções cruzadas (Morgan et al.,1987; Morrow et al.,1999). Um estudo sobre o efeito do tempo (duração) de descanso pré-abate sobre a presença de *Salmonella* sp. no ceco e sobre a pele de 450 suínos de abate, originários de um mesmo rebanho, foi realizado por Morgan et al.(1987). Os suínos foram amostrados em dois frigoríficos, após 18, 42 e 66 horas de descanso pré-abate. A taxa de isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de conteúdo cecal e da superfície das carcaças aumentou significativamente com o aumento do período de descanso pré-abate, isolando-se a bactéria do ceco de 18.5% dos animais submetidos ao descanso por menos de 24 horas, 24.1% dos animais submetidos ao descanso por mais 24 horas, e 47.7% dos animais submetidos ao descanso por 66 horas. A taxa de isolamento de *Salmonella*

sp. das carcaças foi de 9.3%, 12.8% e 27.3%, respectivamente. Este estudo foi conduzido em dois frigoríficos, onde um destes apresentou maior frequência de isolamento de *Salmonella* sp., em relação ao outro, de modo semelhante à observação realizada no segundo experimento componente deste trabalho (Capítulo 2). O número de suínos submetido ao descanso por 24 horas, que apresentou *Salmonella* sp. no conteúdo cecal foi significativamente diferente entre os frigoríficos (26.7% e 10.5%, respectivamente). Foi sugerido que esta diferença estaria provavelmente relacionada ao manejo da área de descanso pré-abate. Observações realizadas neste estudo sugerem que o tamanho das baias de descanso pré-abate e a higiene influenciam o aumento da prevalência de *Salmonella* sp. em suínos, durante o período de descanso. Esta sugestão condiz com as observações realizadas nos frigoríficos estudados, no segundo experimento componente deste trabalho, onde também ficou evidenciada uma diferença nas condições higiênicas dos frigoríficos estudados.

Obviamente, é possível que suínos apresentem-se infectados por *Salmonella* sp. enquanto ainda estão nos rebanhos de origem, mas não eliminem o organismo nas fezes. O estresse dos eventos prévios ao abate pode então induzir estes animais a iniciarem a sua excreção. Entretanto, é também provável que os animais se tornem infectados durante o seu transporte e descanso pré-abate.

Em um estudo realizado por Proescholdt et al.(1999), uma diferença significativa foi observada entre a prevalência de *Salmonella* sp. em suínos amostrados nos rebanhos de origem (3 a 6%) e os mesmos animais amostrados ao abate (38 a 39%). Hurd et al.(2001) também observaram uma grande diferença (3.4% versus 71%) na proporção de suínos positivos, respectivamente, no rebanho de origem e ao abate, nos mesmos animais. O interessante em ambos estudos, é que apenas um número restrito de sorovares foi

encontrado nas amostras coletadas quando os animais ainda estavam nos rebanhos de origem, mas uma variedade de sorovares foi encontrada nos mesmos animais, quando amostrados ao abate. Outra observação importante realizada no estudo relatado por Hurd et al.(2001), consiste no fato de que não houve diferença na frequência de isolamento de *Salmonella* sp. entre grupos de suínos submetidos a um descanso pré-abate de 18 horas em baias limpas e desinfetadas. A ausência de efeito do descanso pré-abate (em baias limpas e desinfetadas) e a variedade de sorovares normalmente observada ao abate, em comparação aos obtidos a partir das amostras coletadas no rebanho, fortemente sugerem que uma fonte externa de infecção é freqüentemente responsável pelo aumento da frequência de isolamento de *Salmonella* sp. em suínos ao abate. Neste sentido, o efeito do estresse sobre o sistema imune dos animais poderia favorecer a ocorrência destas infecções, por tornar os animais mais susceptíveis.

Atualmente, a maioria dos frigoríficos evita o descanso pré-abate por mais de seis a oito horas. Entretanto, um mínimo de duas horas é observado, considerando-se que este seja o período mínimo necessário para que os animais se recuperem do estresse associado ao seu transporte desde o rebanho de origem até o frigorífico (Warriss et al.,1992).

Os experimentos 1 e 2 componentes deste trabalho comprovam, respectivamente, que é possível para suínos serem infectados por *Salmonella* sp. quando expostos a um ambiente contaminado por um curto período de tempo (inferior a duas horas), e que este tipo de infecção (rápida) ocorre freqüentemente quando os animais são alojados nas baias de descanso pré-abate, aumentando o risco de contaminação da linha de abate nos frigoríficos.

Investigações epidemiológicas dependem da disponibilidade de meios precisos de discriminação entre animais infectados e não-infectados. Entretanto,

estas investigações são dificultadas por inúmeros fatores, incluindo a sensibilidade variável dos métodos microbiológicos correntemente disponíveis (Bager e Petersen,1991). Apesar dos avanços experimentados quanto aos métodos de diagnóstico, o cultivo bacteriológico convencional continua sendo fundamental nos estudos sobre a epidemiologia das infecções por *Salmonella* sp. em suínos (Waltman,2000). Um número elevado de métodos de cultivo para o isolamento de *Salmonella* sp. já foi descrito na literatura. Entretanto, é interessante notar, que apesar da diversidade de métodos publicados, um protocolo de isolamento relativamente padronizado foi estabelecido, sendo utilizado pela maioria dos laboratórios. Apesar disto, resultados confusos e conflitantes são freqüentemente encontrados na literatura, principalmente gerados pela multiplicidade de meios e métodos disponíveis para o isolamento de *Salmonella* sp., provavelmente mais do que para qualquer outra bactéria. Diversos artigos de revisão foram publicados, discutindo o isolamento de *Salmonella* sp., demonstrando a diversidade de meios e métodos utilizados para o seu isolamento a partir de diferentes tipos de amostras (Fricker,1987; Nielsen e Baggesen,1997; Waltman,2000).

Apesar de procedimentos unificados e padronizados serem desejáveis a fim de simplificar o trabalho e possibilitar comparações de resultados obtidos em diferentes laboratórios, provavelmente nenhum método será ótimo para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de todos os tipos de amostras existentes (Waltman,2000). Entretanto, considerando que um método é mais eficiente para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras altamente contaminadas por organismos competidores, é razoável assumir que este também será eficiente para amostras com baixos níveis de contaminação por competidores (Fricker,1987). Assim sendo, amostras

fecais são adequadas, ao nosso entender, para a avaliação de métodos de cultivo para o isolamento de *Salmonella* sp., visto apresentarem uma complexa flora microbiana competidora. Em função disto, esta foi a amostra clínica escolhida para ser utilizada na avaliação comparativa de quatro métodos de cultivo bacteriológico, visando o isolamento de *Salmonella* sp., realizada no experimento 3 deste trabalho.

Davies et al.(2000) avaliaram dois métodos de cultivo bacteriológico, visando o isolamento de *Salmonella* sp. de amostras fecais de suínos. Os métodos avaliados consistiam dos mais freqüentemente utilizados nas investigações epidemiológicas de infecções por *Salmonella* sp. em suínos, nos Estados Unidos. Esta avaliação comparativa revelou o desempenho semelhante dos métodos avaliados, sendo que um destes era composto pelos métodos A e B (em conjunto), incluídos na avaliação realizada no experimento 3 componente deste trabalho (Capítulo 3). A inovação deste experimento consistiu na proposição da utilização individualizada do método B (eliminando-se o método A da rotina), e a apresentação de uma nova proposta de método a ser utilizada. Este método consiste na utilização de duas passagens (enriquecimentos primário e secundário) em caldo Rappaport-Vassiliadis, antes do isolamento em ágar XLT-4. Este método revelou-se como o de melhor desempenho, sendo então recomendado para estudos epidemiológicos de infecções por *Salmonella* sp. em suínos, por apresentar boa sensibilidade. Apesar deste resultado, ficou evidenciado que ainda há a necessidade de aprimoramento dos métodos de isolamento de *Salmonella* sp. a partir de espécimes clínicos.

Curiosamente, apesar da sensibilidade dos métodos de cultivo bacteriológico apresentarem um impacto direto sobre os resultados de estudos epidemiológicos, esta discussão

freqüentemente não é destacada na literatura publicada.

O isolamento e a identificação de *Salmonella* sp. constitui um processo trabalhoso, demorado e relativamente caro. Conseqüentemente, métodos rápidos de detecção foram desenvolvidos, utilizando diversos princípios para a identificação de *Salmonella* sp. nas amostras utilizadas. Entretanto, estes métodos rápidos, ou ensaios de detecção, foram desenvolvidos objetivando a sua aplicação na indústria de alimentos. Apesar disto, estes ensaios poderiam ser muito úteis, encontrando variadas aplicações em investigações epidemiológicas de infecções por *Salmonella* sp. em suínos. Curiosamente, poucos foram os estudos realizados, visando esta aplicação (Cherrington e Huis in't Veld,1993a,b; Harvey et al.,1999; Wegener e Baggesen,1997), e todos utilizando ensaios imunoenzimáticos, contrastando com a diversidade de ensaios disponíveis no mercado. Resultados satisfatórios foram relatados em todos estes estudos, que em conjunto com os resultados obtidos no experimento 4 deste trabalho (Capítulo 4), demonstram claramente a existência de ensaios de detecção de *Salmonella* sp. disponíveis comercialmente, com desempenho adequado e boa aplicabilidade, quanto à sua utilização sobre amostras clínicas, visando investigações epidemiológicas.

É interessante observar que contrastando com a indiscutível relevância do tema, são escassas as informações disponíveis que detalham a ocorrência de sorovares de *Salmonella* sp. em suínos, em diferentes situações clínicas e epidemiológicas, em especial no Brasil. O conhecimento obtido até o momento sobre o assunto está sedimentado em estudos realizados em outras regiões do mundo, que apresentam sistemas de produção e variáveis epidemiológicas diferentes às nossas, colocando-nos em uma condição de total dependência de informações, que provavelmente não condizem com a nossa

realidade. Dentre os poucos estudos realizados no Brasil, podemos citar os realizados por Costa et al.(1972), Giorgi (1982), Langenegger et al.(1983) e Lázaro et al.(1997), os quais foram realizados em suínos abatidos, em áreas restritas e com amostragens deficientes. Apesar da indiscutível relevância das informações obtidas, não há informações quanto a ocorrência de animais portadores em rebanhos de produção comercial e nem mesmo sobre a epidemiologia da infecção por bactérias do gênero *Salmonella*, sob as condições nacionais de produção comercial de suínos. Neste sentido, é importante ressaltar que segundo diversos pesquisadores, e após analisar a literatura pertinente, nota-se claramente que infecções por *Salmonella* sp. ocorrem em todo o mundo. Entretanto, o perfil de distribuição, e conseqüentemente a epidemiologia das mesmas, normalmente difere de região para região, para os diferentes sorovares de *Salmonella* sp.. No Brasil, este ainda é um campo vasto a ser explorado. Pesquisas pontuais começaram a ser realizadas recentemente sobre o assunto, demonstrando uma tendência de maior atenção ao tema. Entretanto, estes estudos são ainda preliminares, tendo sido realizados nos estados do Rio Grande do Sul (Bessa et al.,2001; Castagna e Cardoso,2001; Kich et al.,2001) e São Paulo (Oliveira et al.,2001). Em Minas Gerais, um estado com tradição e impacto na produção suinícola nacional, há também uma necessidade premente para se iniciar o estudo do problema, uma vez que ainda não dispomos de informações locais.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dois primeiros estudos componentes deste trabalho (Capítulos 1 e 2) visaram determinar a possibilidade da ocorrência de um fenômeno, sob condições controladas inerentes aos ensaios científicos, bem como a comprovação da sua ocorrência sob condições naturais, onde as variáveis biológicas não estão sob controle do investigador. A repetição dos experimentos observada em ambos os estudos objetivou aumentar a probabilidade de observação do fenômeno (infecções rápidas por *Salmonella* sp. em suínos de abate), bem como minimizar a possibilidade de falhas durante os procedimentos experimentais, que poderiam comprometer os resultados finais. Os resultados obtidos em ambos os experimentos apresentam implicações significativas para o controle de infecções por *Salmonella* sp. em suínos, complementando estudos anteriormente publicados sobre a epidemiologia e patogenia das infecções por *Salmonella* sp. em suínos, identificando uma importante fonte de infecções e um ponto crítico de contaminações na cadeia de produção de carne suína, bem como, possibilitando novos avanços na compreensão das infecções que ocorrem nos rebanhos de produção comercial de suínos.

Entretanto, ao iniciarmos este trabalho, evidenciamos a necessidade e a dificuldade de se trabalhar com grandes amostragens, sejam estas decorrentes do número de animais amostrados, bem como do número de amostras coletadas por animal, a fim de possibilitar a obtenção de dados mais precisos, e conseqüentemente confiáveis, que representassem adequadamente as populações estudadas, geralmente de grande porte. Isto gera um desafio direto, que consiste no custo, seja este financeiro ou de carga de trabalho, a fim processar todas estas amostras no laboratório, o que obviamente aumenta a probabilidade de falhas no decorrer do

processo. Assim, este trabalho sofreu um redirecionamento, que pode ser observado nos dois últimos estudos, passando-se a buscar avanços no campo do diagnóstico de infecções por *Salmonella* sp. em suínos, que possibilitassem uma redução de trabalho e custo, bem como incrementassem a sua precisão e conseqüente confiabilidade. O primeiro destes experimentos (apresentado no Capítulo 3), visou buscar uma melhoria no isolamento de *Salmonella* sp., visto que grande parte dos estudos epidemiológicos sobre as infecções por estas bactérias exige a obtenção de isolados, seja para a caracterização do perfil de excreção de sorovares, ou para a caracterização do seu perfil de sensibilidade/resistência a agentes antimicrobianos. Entretanto, outros experimentos não apresentam esta necessidade de isolamento da bactéria, bastando apenas a identificação qualitativa das amostras estudadas (positivas ou negativas). Além disso, mesmo nos casos onde o objetivo é isolar as bactérias, a utilização de ensaios rápidos de detecção possibilitaria um ajuste da amostragem a ser coletada e analisada, bem como a economia no descarte de amostras negativas e a concentração de maiores esforços na análise de amostras positivas. Assim, no último experimento deste trabalho (Capítulo 4), buscou-se avaliar alguns ensaios de detecção de *Salmonella* sp. comercialmente disponíveis, visando a sua utilização, conforme descrito.

Avanços vêm ocorrendo durante os últimos anos na compreensão da epidemiologia das infecções por *Salmonella* sp. em suínos, entretanto, grandes desafios e lacunas a serem preenchidas persistem. A obtenção de conhecimentos sólidos sobre este tema depende de metodologias eficientes e precisas, as quais ainda não estão sendo utilizadas de modo rotineiro, nem padronizado. Novos estudos são ainda necessários sobre a melhoria das técnicas e dos métodos de diagnóstico, com destaque para a adequação das técnicas de

amostragem e para a melhoria dos métodos de cultivo bacteriológico e da padronização de ensaios de detecção de *Salmonella* sp. em espécimes clínicos.

No Brasil, estudos são necessários a fim de conhecer a nossa real situação quanto ao problema da contaminação por *Salmonella* sp. em suínos, devido ao grande potencial de produção e exportação da indústria suinícola nacional, a qual corre sério risco de encontrar obstáculos, caso não haja investimentos nesta importante área.

10. CONCLUSÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nos experimentos componentes deste trabalho, conclui-se que:

1. Suínos à idade e peso de abate podem ser rapidamente infectados por *Salmonella* sp., a partir de sua exposição por um curto período de tempo a um ambiente contaminado com baixos níveis da bactéria;
2. As baias de descanso pré-abate dos frigoríficos que abatem suínos estão freqüentemente contaminadas por uma variedade de sorovares de *Salmonella* sp., constituindo importante fonte de infecções para os suínos, e conseqüente risco de contaminação da linha de abate;
3. Os métodos de cultivo bacteriológico que incluem um enriquecimento primário em caldo Tetrionato ou Rappaport-Vassiliadis, seguidos de enriquecimento secundário em caldo Rappaport-Vassiliadis e isolamento em ágar XLT-4 apresentaram alta sensibilidade relativa para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras fecais de suínos;
4. Os ensaios de detecção de *Salmonella* sp. comercialmente disponíveis, ELISA 2 (Assurance Gold EIA *Salmonella*) e de hibridização de DNA (Gene-Trak) apresentaram alta sensibilidade e especificidade para a detecção de *Salmonella* sp. em amostras fecais de suínos, podendo ter aplicação em investigações epidemiológicas de infecções por *Salmonella* sp. em suínos.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGER, F.; PETERSEN, J. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.32, p.473-481, 1991.
- BERENDS, B. R.; VAN KNAPEN, F.; SNIJDERS, J.M. et al. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, v.20, p.199-206, 1997.
- BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos durante o descanso pré-abate. In: X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: 2001. p.121-122.
- BLAHA, T.; SOLANO - AGUIAR, G.; PIJOAN, C. The early colonization pattern of *S. Typhimurium* in pigs after oral intake. In: 2nd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 1997, Copenhagen. *Proceedings...* Copenhagen: 1997. p.71-73.
- BRENNER, F. W. ; VILLAR, R. G. ; ANGULO, F. J. et al. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.2465-2467, 2000.
- CASTAGNA, S. M. F. ; CARDOSO, M. Associação do isolamento de *Salmonella* sp. de linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal com a contaminação de tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. In: X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: 2001. p.123-124.
- CHERRINGTON, C.A.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Development of a 24 h screen to detect viable *Salmonellas* in faeces. *Journal of Applied Bacteriology*, v.75, p.58-64, 1993a.
- CHERRINGTON, C.A.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Comparison of classical isolation protocols with a 24 h screen to detect viable *Salmonellas* in faeces. *Journal of Applied Bacteriology*, v.75, p.65-68, 1993b.
- CLEMMER, D. I. ; HICKEY, J. L. S. ; BRIDGES, J.F. et al. Bacteriologic studies of experimental air-borne salmonellosis in chicks. *Journal of Infectious Diseases*, v.106, p.197-210, 1960.
- COSTA, G. A.; HOFER, E.; COSTA, M.D.M. et al. Sobre o isolamento de salmonellas de gânglios linfáticos de suínos abatidos no matadouro da cidade de Salvador - Bahia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.70, p.417-431, 1972.
- CRAVEN, J.A.; HURST, D.B. The effect of time in lairage on the frequency of *Salmonella* infection in slaughtered pigs. *Journal of Hygiene*, v.88, p.107-111, 1982.
- DARLOW, H.M.; BALE, W.R.; CARTER, G.B. Infection of mice by respiratory route with *Salmonella typhimurium*. *Journal of Hygiene*, v.59, p.303-308, 1961.
- DAVIES, P. Food safety and its impact on domestic and export markets. *Swine Health and Production*, v.5, p.13-20, 1997.
- DAVIES, P.R.; FUNK, J.A. ; MORROW, W.E.M. Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to

- a swine breeding farm. *Swine Health and Production*, v.8, p.25-29, 2000.
- FEDORKA-CRAY, P.J. ; KELLEY, L.C. ; STABEL, T.J. et al. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. *Infection and Immunity*, v.63, p.2658-2664, 1995.
- FEDORKA-CRAY, P. J. ; WHIPP, S. C. ; ISAACSON, R.E. et al. Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. *Veterinary Microbiology*, v.41, p.333-344, 1994.
- FEDORKA - CRAY, P. ; GRAY, J.T. ; WRAY, C. *Salmonella* Infections in Pigs. In: WRAY, C. ; WRAY, A. *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing, Wallingford: 2000. p.191-207.
- FRENZEN, P.D. ; BUZBY, J.C. ; ROBERTS, T. An updated estimate of the economic costs of human illness due to foodborne *Salmonella* in the United States. In: 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington: 1999. p.215-218.
- FRICKER, C. R. The isolation of *Salmonellas* and *Campylobacters*. *Journal of Applied Bacteriology*, v.63, p.99-116, 1987.
- GIORGI, W. Animais domésticos como portadores de *Salmonelas*: significado epidemiológico e sua relação com a saúde pública. *Higiene Alimentar*, v.1, p.177-193, 1982.
- GRAY, J.T. ; FEDORKA-CRAY, P.J. ; STABEL, T.J. et al. Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Veterinary Microbiology*, v.47, p.43-59, 1995.
- GRAY, J. T. ; FEDORKA - CRAY, P. J. ; STABEL, T. J. et al. Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.141-146, 1996.
- HARVEY, R. W. S. ; PRICE, T. H. ; MORGAN, J. *Salmonella* surveillance with reference to pigs – Cardiff abattoir. *Journal of Hygiene*, v.78, p.439, 1977.
- HARVEY, R. B. ; FARRINGTON, L. A. ; DROLESKEY, R.E. et al. Evaluation of two commercially available ELISA kits for detection of *Salmonellae* in swine lymph nodes and cecal and fecal contents. In: 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington: 1999. p.53-56.
- HURD, H.S. ; MCKEAN, J.D. ; WESLEY, I.V. et al. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *Journal of Food Protection*, v.64, p.939-944, 2001.
- ISAACSON, R. E. ; WEIGEL, R. M. ; FIRKINS, L.D. et al. The effect of feed withdrawal on the shedding of *Salmonella Typhimurium* by swine. In: 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington: 1999(a). p.296-298.
- ISAACSON, R. E. ; FIRKINS, L. D. ; WEIGEL, R. M. et al. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella Typhimurium* among experimentally infected pigs. *American Journal of Veterinary Research*, v.60, p.1155-1158, 1999b.

- KAESBOHRER, A. Control strategies for *Salmonella* in the pig to pork chain in the European Union. In: 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington: 1999. p.358.
- KAMPELMACHER, E. H. ; GUINEE, P.A.M.; VAN KEULEN, A. Further studies on *Salmonella* in slaughterhouses and in normal slaughter pigs. *Zentralbl. Veterinarmed [B]*, v.10, p.1-27, 1962.
- KHANSARI, D.N.; MURGO, A.J.; FAITH, R.E. Effects of stress on the immune system. *Immunology Today*, v.11, p.170-175, 1990.
- KICH, J.D.; MORES, N.; VIDAL, C.E. et al. Fatores de risco associados com a prevalência sorológica de *Salmonella* em granjas comerciais de suínos do Sul do Brasil. In: X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: 2001. p.115-116.
- LANGENEGGER, C.H.; ALFINITO, J.; LANGENEGGER, J. *Salmonelas* isoladas de suínos de abate no Estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.3, p.91-94, 1983.
- LÁZARO, N.S.; TIBANA, A.; HOFER, E. *Salmonella* spp. In healthy swine and in abattoir environments in Brazil. *Journal of Food Protection*, v.60, p.1029-1033, 1997.
- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V. et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, p.607-625, 1999.
- MORGAN, I.R.; KRAUTIL, F.L.; CRAVEN, J.A. Effect of time in lairage on caecal and carcass *Salmonella* contamination of slaughter pigs. *Epidemiology and Infection*, v.98, p.323-330, 1987.
- MORROW, W.E.M.; DAVIES, P.R.; SEE, T. et al. Prevalence of *Salmonella* spp. in the feces on farm and ceca at slaughter for a cohort of finishing pigs. In: 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington: 1999. p.155-157.
- NIELSEN, B.; BAGGESEN, D.; BAGER, F. et al. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology*, v.47, p.205-218, 1995.
- NIELSEN, B.; BAGGESEN, D.L. Update on laboratory diagnosis of subclinical salmonella infections in pigs. In: 2nd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 1997, Copenhagen. *Proceedings...* Copenhagen: 1997. p.19-31.
- OLIVEIRA, C.J.B.; CARVALHO, L.F.O.S.; FERNANDES, S.A. et al. Importância da lâmina d'água, em galpões de terminação, sobre a prevalência de sorotipos de *Salmonella* em suínos destinados ao abate. In: X Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: 2001. p.117-118.
- PROESCHOLDT, T. ; TURKSON, P. ; MCKEAN, J. et al. *Salmonella* in commercial swine from weaning through slaughter. In: 3rd International Symposium on the Epidemiology and

- Control of Salmonella in Pork, 1999, Washington. *Proceedings...* Washington: 1999. p.161-164.
- RILEY, M.G.I. The incidence of *Salmonella* in normal slaughtered pigs. *Australian Veterinary Journal*, v.46, p.40, 1970.
- SMITH, H. What happens to bacterial pathogens *in vivo*? *Trends in Microbiology*, v.6, p.239-243, 1998.
- WALTMAN, W.D. Methods for cultural isolation of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella* in Domestic Animals. CABI Publishing, Wallingford: 2000. p.355-405.
- WARRISS, P. D. ; BROWN, S. N. ; EDWARDS, J.E. et al. Time in lairage needed by pigs to recover from the stress of transport. *Veterinary Record*, v.131, p.194-196, 1992.
- WEGENER, H. C. ; BAGGESEN, D. L. Comparison of conventional culture methods and two commercial enzyme linked immunoassays for detection of *Salmonella* in porcine fecal samples and cecal contents. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.9, p.352-356, 1997.
- WILCOCK, B.; OLANDER, H. Influence of oral antibiotic feeding on the duration and severity of clinical disease, growth performance and pattern of shedding in swine inoculated with *Salmonella typhimurium*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.172, p.472-477, 1978.
- WILLIAMS, L.P.; NEWELL, K.W. Sources of *Salmonella* in market swine. *Journal of Hygiene*, v.66, p.281-293, 1968.
- WILLIAMS, L. P. ; NEWELL, K. W. *Salmonella* excretion in joy-riding pigs. *American Journal of Public Health*, v.50, p.926-929, 1970.
- WOOD, R.L.; POSPISCHIL, A.; ROSE, R. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *American Journal of Veterinary Research*, v.50, p.1015-1021, 1989.