

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Salmonella* sp. EM SUCO DE
CARNE DE SUÍNOS**

Nelise Juliane Triques

PORTO ALEGRE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Salmonella* sp. EM SUCO DE
CARNE DE SUÍNOS**

Autora: Nelise Juliane Triques*

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias Especialidade na área de Bacteriologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Co-orientadora: Dra. Jalusa Deon Kich.

PORTO ALEGRE

2008

*Bióloga

Nelise Juliane Triques

Detecção de anticorpos contra *Salmonella* sp. em suco de carne de suínos

Aprovada em 29 de fevereiro de 2008.

APROVADA POR

Profª. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Orientadora e Presidente da Comissão

Dra. Jalusa Deon Kich

Co-orientadora

APROVADA POR

Dra. Ana Paula Ravazzolo

Membro da Comissão

APROVADA POR

Dra. Marisa da Costa

Membro da Comissão

APROVADA POR

Dra. Virgínia Santiago Silva

Membro da Comissão

*Dedico essa vitória com gratidão, amor e carinho
à minha família e à minha co-orientadora.
Vocês que me impulsionam para um futuro ainda mais brilhante,
Obrigada!!!!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo carinho, exemplo e empenho. À minha irmã pela amizade acima de tudo, paciência, apoio incondicional e compreensão.

À minha orientadora Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso e à co-orientadora Jalusa Deon Kich pela confiança, paciência e orientação; pela amizade e ensinamentos.

Aos colegas de mestrado, doutorado, estagiários, bolsistas e funcionários do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva/UFRGS e da EMBRAPA Suínos e Aves pela constante ajuda e amizade.

Aos colegas com quem convivi e aos novos amigos que fiz por onde passei, pela luta, angústias e alegrias que passamos juntos nestes últimos meses.

Aos velhos amigos, que sempre apoiaram e estimularam nesta caminhada fazendo-se presente sempre.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes em mais esta fase do meu crescimento profissional e pessoal, o meu reconhecimento pela atenção e carinho.

*A vida é aquilo que acontece enquanto fazemos planos para o futuro.
John Lennon*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Isolamento de <i>Salmonella</i> sp. e soroprevalência em suínos amostrados no alojamento na terminação e ao abate.	25
Figura 2 - Coeficiente de correlação entre os resultados de teste de ELISA-LPS para o suco do diafragma e suco da sobrepaleta. Coeficiente de Correlação: 0,859	26
Figura 3 - Coeficiente de correlação entre os resultados de teste de ELISA-LPS para soro e suco de carne extraído de diafragma (A) e sobrepaleta (B).	27
Figura 4 - Sensibilidade, especificidade, coeficiente global e índice <i>Kappa</i> (X 100) para os resultados do suco de diafragma.....	28
Figura 5 - Sensibilidade, especificidade, coeficiente global e índice <i>Kappa</i> (X 100) para os resultados do suco da sobrepaleta.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sensibilidade, especificidade, coeficiente global e índice <i>Kappa</i> (X 100) para os resultados do diafragma e da sobrepaleta, utilizando o ponto de corte experimental (0,169) e os novos pontos de corte estabelecidos.	28
Tabela 2 - Nível descritivo de probabilidade para o modelo logístico para a concordância entre soro e suco de carne.	29

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	9
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1. A INFEÇÃO POR <i>SALMONELLA</i> NOS SUÍNOS	11
2. CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR <i>SALMONELLA</i> EM SUÍNOS	13
3. FERRAMENTAS DE DIAGNÓSTICO DE <i>SALMONELLA</i> EM LOTES DE SUÍNOS	14
CAPÍTULO 3: ARTIGO	19
Detecção de anticorpos contra <i>Salmonella</i> em suco de carne de suínos.....	19
RESUMO	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. Coleta de material.....	23
2.2. Isolamento de <i>Salmonella</i>	24
2.3. Técnica de ELISA (LPS)	24
2.4. Análise estatística	24
3. RESULTADOS.....	25
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	29
CAPÍTULO 4. PERSPECTIVAS.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
ANEXOS	42
ANEXO 1 – PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE <i>SALMONELLA</i> SEGUNDO MICHAEL, CARDOSO E COSTA (2003).	43
ANEXO 2 - PROTOCOLO DO TESTE DE ELISA	47
ANEXO 3 - RESULTADOS DA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, COEFICIENTE GLOBAL E ÍNDICE <i>KAPPA</i> (X100 PARA MANTER NA ESCALA) PARA OS RESULTADOS DO SUCO DE CARNE DOS DIFERENTES MÚSCULOS EM RELAÇÃO AO SORO.	48
ANEXO 4 - CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NO TESTE DE ELISA-LPS DAS AMOSTRAS DE SUCO DE CARNE (DIAFRAGMA E SOBREPALETA), UTILIZANDO O PONTO DE CORTE EXPERIMENTAL (OD=0,169).....	49

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A presença de *Salmonella* sp. na produção de suínos é importante por duas razões: a doença clínica causada pelos sorovares adaptados ao suíno que provocam septicemia e/ou enterocolite; e a presença de sorovares que não causam doença nos animais, mas que são fontes de contaminação da carcaça nos frigoríficos e podem infectar humanos. A *Salmonella* é mundialmente reconhecida como uma das principais causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA), sua presença em carcaças e derivados de suínos representa risco à saúde pública, além de gerar barreiras à comercialização da produção. O risco de desenvolver uma salmonelose pelo consumo de alimento contaminado é influenciado por diversos fatores: a presença qualitativa e quantitativa de *Salmonella*, a composição do alimento, manipulação e práticas no preparo do alimento e suscetibilidade do consumidor.

Com o objetivo de reduzir as DTA pelo consumo de produtos de origem suína contaminados, programas de controle de *Salmonella* têm sido desenvolvidos e implementados na cadeia produtiva de suínos em vários países. A execução dos mesmos exige metodologias rápidas, econômicas e eficientes para medir a intensidade da infecção dos rebanhos no abate como também a contaminação do produto final. Estas metodologias devem atender à necessidade da agroindústria, sendo eficientes na identificação e categorização das granjas de acordo com o nível da infecção por *Salmonella*, adaptando a estratégia de controle ao tipo de granja.

A prevalência de *Salmonella* pode ser medida por testes bacteriológicos e sorológicos, e pode ser avaliada em grupos de animais de diferentes idades.

O isolamento bacteriológico é específico, ou seja, o organismo de interesse é identificado. Entretanto, a intermitência da eliminação de *Salmonella* nas fezes, custos elevados e períodos longos de análise são fatores que comprometem a utilização do isolamento como técnica de rotina para o monitoramento em granjas suínas.

Em função disso, o teste sorológico de ELISA tem sido eleito para a caracterização/classificação dos lotes de suínos quanto à infecção por *Salmonella*. Como uma alternativa para o soro, o fluido recuperado (suco de carne) do congelamento de fragmentos de músculo (diafragma, sobrepaleta ou outros) pode ser utilizado para a detecção de anticorpos contra *Salmonella* por ELISA-LPS, como também em outras

doenças como: *Aujeszky*, *Trichinella*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína, *Yersinia* e *Sarcoptes scabiei*.

O Brasil ainda não possui um programa oficial de controle de *Salmonella* em suínos, embora as empresas, por exigência de compradores, estejam preocupadas e implementando programas internos de controle de qualidade. Disponibilizar produtos livres de patógenos ou com baixos níveis de contaminação tornou-se uma necessidade para entrar no mercado, uma vez que existe a demanda por produtos suínos seguros. Desta forma, agroindústrias que garantam ao mercado um alimento seguro (com nível reduzido ou não detectável de *Salmonella*) têm vantagens na comercialização. Além disso, a demanda de exportação para produtos suínos que tem baixo ou nenhum nível de patógenos tende a crescer.

Cientes do impacto econômico e relativo à saúde pública que a contaminação por *Salmonella* de produtos representa, surgiu parceria de pesquisa entre o Setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS e a EMBRAPA - Suínos e Aves para o desenvolvimento de ferramentas e de estudos epidemiológicos que caracterizassem o problema, as fontes de contaminação e a dinâmica de infecção em rebanhos da região sul do país. Dentro da linha de pesquisa, o objetivo desse estudo foi avaliar o suco de carne suína como substituto ao soro como material para detecção de anticorpos contra *Salmonella* por meio de ELISA-LPS desenvolvido no Brasil.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A infecção por *Salmonella* nos suínos

No que diz respeito à doença nos animais, segundo Griffith, Schwartz, Meyerholz (2006) a septicemia é usualmente causada pela *Salmonella Choleraesuis* e acomete principalmente leitões com menos de cinco meses de idade, embora possa ser observada em suínos adultos e leitões na maternidade, ocasionalmente. As primeiras evidências da doença são a relutância dos animais em se movimentar e cianose das extremidades e abdômen. Os animais apresentam inapetência, letargia, temperaturas de 40,5°C a 41,6°C, dispnéia e, dependendo da gravidade da doença, pode ocorrer mortalidade. Podem ainda apresentar hemorragia, broncopneumonia e icterícia. A diarreia ocorre normalmente no terceiro ou quarto dia após a infecção. A ocorrência da salmonelose clínica difere entre as regiões (van der HEIJDEN, 2001), pelos relatos de literatura *S. Choleraesuis* é mais importante em países como EUA segundo Foley, Lynne, Nayak (2008) e Taiwan (JEAN, WANG, HSUEH 2006) do que na Dinamarca (DAHL *et al.*, 1997; CHRISTENSEN *et al.*, 1999) e Suécia (ELD *et al.*, 1991).

S. Typhimurium é o sorovar mais encontrado nos casos de enterocolite. Dissemina-se rapidamente entre os suínos, mas a mortalidade é baixa, afetando principalmente animais em torno dos quatro meses de idade.

Conforme van der Gaag *et al.*, (2004) durante a vida produtiva, o suíno pode passar por diferentes estados relacionados à infecção por *Salmonella*: susceptível, infectado, excretor e portador. Estes estados relacionam-se com diferentes respostas sorológicas como segue:

*livre de *Salmonella* e sorologicamente negativo: aqueles que não tiveram contato com a bactéria;

*livre de *Salmonella* e sorologicamente positivo: aqueles que debelaram a infecção, mas ainda têm anticorpos;

*infectado e ou excretor com sorologia negativa: são aqueles recentemente infectados antes da soroconversão;

*infectado e ou excretor com sorologia positiva; infectado com sorologia positiva não excretor, conhecido como portador latente susceptível à reativação da excreção.

Fatores de estresse, tais como: mistura de lotes, transporte, baixa de espera e abate podem promover a excreção de *Salmonella*, bem como, levar à ativação ou reativação da infecção nestes animais (BERENDS *et al.*, 1996; WONG *et al.*, 2002).

As fontes de infecção de *Salmonella* para os suínos são numerosas, isso pode ser justificado pela diversidade e ecologia do gênero *Salmonella*. Em geral, as fontes de salmonelas adaptadas ao suíno estão relacionadas aos próprios suínos que excretam a bactéria nas fezes contaminando o ambiente e possibilitando a via fecal-oral de infecção. A *S. Choleraesuis* é isolada com maior frequência de suínos doentes e raramente de outras fontes. Sorovares, além do *Choleraesuis*, estão amplamente distribuídos nos sistemas de produção de suínos como: ambiente da granja, alimentos e vetores, uma vez que sobrevivem bem fora do hospedeiro (GRIFFITH, SCHWARTZ, MEYERHOLZ 2006).

A via fecal-oral é considerada o modo mais importante de transmissão de *Salmonella* em animais domésticos, no entanto a transmissão aerógena em curtas distâncias foi confirmada na espécie suína por Oliveira *et al.* (2007). Em condições experimentais, a *Salmonella* sp. infectou suínos expostos ao ambiente contaminado por um período de 3 horas (FEDORKA-CRAY *et al.*, 1995) e, em apenas 2 horas no estudo de Hurd *et al.* (2001).

Após a ingestão a *Salmonella* sp. invade as células epiteliais do intestino delgado (células M e enterócitos), região denominada por tecido linfóide associado (GALT – *gut-associated lymphoid tissue*) que inclui as Placas de Peyer e os linfonodos mesentéricos responsáveis pela defesa imune específica adquirida contra patógenos bacterianos (MOWAT 2003). Nessa invasão a *Salmonella* sp. induz a síntese de novas proteínas que provavelmente aumentam o seu tempo de sobrevivência intracelular nos macrófagos e neutrófilos da lâmina própria (GRIFFITH, SCHWARTZ, MEYERHOLZ 2006).

A *Salmonella* sp. induz a ativação de mediadores inflamatórios que resultam na secreção de IL-8 e outras proteínas que atuam como quimiocinas estimulando a migração dos neutrófilos para o lúmen intestinal onde ocorre uma massiva resposta inflamatória local (GRIFFITH, SCHWARTZ, MEYERHOLZ 2006). A liberação de proteases e outras mediadoras das células inflamatórias resulta em necrose da mucosa,

levando à diarreia e excreção da bactéria no ambiente (SANTOS *et al.*, 2003). Em seguida, as bactérias migram para o sistema reticulo-endotelial pelas vias linfática e sanguínea e voltam a ser excretadas quando o animal for submetido a fatores estressantes (EKPERIGIN, NAGAJARA, 1998; OHL, MILLER 2001).

Tanto a resposta humoral como a imunidade celular são importantes para a resistência do organismo contra *Salmonella sp.* Os anticorpos contra *Salmonella sp.* estão presentes no soro de animais expostos à ela no ambiente ou pela transferência dos anticorpos maternos (CLARKE, GYLES, 1993).

A secreção de IgA pode ser encontrada no intestino de animais que se recuperaram da doença ou que foram vacinados oralmente com vacina atenuada. Estes anticorpos no intestino constituem a primeira linha de defesa específica, eles interferem na aderência e invasão das células epiteliais intestinais pela bactéria (CLARKE, GYLES, 1993). O trato gastrointestinal dos suínos (TGI) conta também com mecanismos de resposta imune inata como a acidez estomacal, peptídeos antimicrobianos, o muco que recobre as microvilosidades do epitélio, a ação peristáltica do intestino e a exclusão competitiva decorrente da relação entre as bactérias da microbiota intestinal (TUCKER, PICKARD, 2004). Entretanto, a maior forma de proteção é representada pelas respostas imunes celular e humoral (KRAEHENBUHI, NEUTRA, 1992).

2. Controle da contaminação por *Salmonella* em suínos

Entre os programas de controle de *Salmonella*, o da Dinamarca foi intensamente discutido e serviu como base para elaboração e adaptação em outros países. A preocupação com salmonelose na suinocultura dinamarquesa veio à tona a partir de 1993, após um surto envolvendo 550 pessoas associado ao consumo de carne suína. Desde então, o governo iniciou a implantação do Programa de Monitoramento e Controle de *Salmonella* da Dinamarca, o qual abrange todas as fases da cadeia de produção e tem sido aplicado nacionalmente desde 1995 (MOUSING *et al.*, 1997; NIELSEN, WEGENER 1997). O elemento chave deste programa é a identificação rápida e correta dos lotes com alta soroprevalência (ALBAN, STEGE, DAHL 2002).

Após cinco anos de implantação, o programa foi avaliado incluindo informações sobre o *status* sorológico e bacteriológico de 1902 lotes de suínos abatidos. Durante esse período foi construído um banco de dados, *Database Salmonella Danish*, e sua

análise gerou informações para melhoria e adequação do programa. O sistema de classificação redefinido foi introduzido em agosto de 2001, com o limite entre os Níveis 1 e 2 estabelecido como $\geq 40\%$ de sororeagentes e entre Níveis 2 e 3 $\geq 70\%$ de sororeagentes em teste de ELISA adotado como base do programa (ALBAN, STEGE, DAHL 2002).

Nos frigoríficos, as informações sobre a soroprevalência do lote podem ser consideradas na organização da logística do abate. Lotes com altas prevalências, que representam maior risco deveriam ser abatidos no final do abate ou em dias específicos, para evitar a contaminação dos lotes de menor risco (lo fo WONG *et al.*, 2002). Lotes de suínos do nível 3, segundo Nielsen *et al.*, (2001) devem ser abatidos sob condições especiais de higiene sanitária e as carcaças também deverão ser submetidas ao tratamento térmico ou outro. O abate de lotes com baixa prevalência de *Salmonella*, separadamente de rebanhos infectados, pode ser útil para reduzir a contaminação de carcaças. Isto foi demonstrado por estudos em que suínos de rebanhos livres de *Salmonella* apresentaram níveis de contaminação pós-abate menores que aqueles oriundos de rebanhos infectados (SWANENBURG *et al.*, 2001).

Nos frigoríficos, os pontos críticos de contaminação podem ser identificados e monitorados como parte do Programa de APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) (lo fo WONG *et al.*, 2002). O chamuscamento contribui para o controle de contaminação superficial de carcaças, enquanto que a etapa subsequente de evisceração pode determinar a recontaminação da mesma. Assim, o conhecimento do impacto desses e outros pontos na linha de processamento, possibilita que se identifiquem aqueles que mais contribuem para a contaminação do produto final (BERENDS *et al.*, 1996, BOTTELDOORN *et al.*, 2004).

3. Ferramentas de diagnóstico de *Salmonella* em lotes de suínos

A prevalência de *Salmonella* pode ser medida por testes bacteriológicos e sorológicos (van der GAAG *et al.*, 2004), e pode ser avaliada em grupos de animais de diferentes idades (STEGE *et al.*, 2000). Para identificar rebanhos positivos, segundo Ehlers (2002), a maneira adequada é a pesquisa de *Salmonella* em pool de fezes de suínos. As amostras de fezes agrupadas em *pool* apresentam uma maior sensibilidade na avaliação do lote, além de representar um número maior de animais o que reduz custo e

mão-de-obra (DAVIES *et al.*, 2003). O isolamento bacteriológico é específico, ou seja, o organismo de interesse é identificado (FUNK, DAVIES, NICHOLS 2000), e constitui uma ferramenta valiosa e, até o momento, insubstituível, considerada a importância das informações epidemiológicas baseadas em características fenotípicas e genotípicas da bactéria. Entretanto, a intermitência da eliminação de *Salmonella* nas fezes, custos elevados e períodos longos de análise são os fatores que comprometem a utilização do isolamento como técnica de rotina para o monitoramento em granjas suínas.

Diferenças podem ser causadas, ainda, pelo local da amostragem (granja ou frigorífico), delineamento de amostragem (volume e número de coletas), e procedimentos de diagnóstico (pools e método de cultivo) (van der WOLF *et al.*, 2001). Segundo Hurd *et al.*, (2004), as amostras coletadas no frigorífico podem levar a uma prevalência superestimada devido às infecções que ocorrem durante o transporte e nas baias de espera do frigorífico. Por outro lado, a prevalência determinada com amostras coletadas na granja pode ser subestimada devido à excreção intermitente de *Salmonella*. Ocorre, ainda, que a presença de bactérias interferentes nas amostras, pode mascarar a presença de *Salmonella*, reduzindo a sensibilidade da técnica (FIERENS, HUYGHEBAERT 1996).

Em estudo desenvolvido por Funk, Davies, Nichols (2000) foi demonstrado o efeito da quantidade de fezes na sensibilidade da detecção de *Salmonella* de suínos infectados naturalmente. A sensibilidade aumentou de 9% em suabes retais para 78% em 25 gramas de fezes. Apesar do efeito da quantidade de amostra na sensibilidade do isolamento bacteriológico, a salmonela não se distribui de forma homogênea nas fezes (ou outros materiais), principalmente se oriundas de suínos com excreção intermitente, o que possibilita a ocorrência de falsos negativos no isolamento bacteriológico. É importante que seja escolhida uma técnica sensível, uma vez que a excreção é intermitente e com baixo número de bactérias, principalmente por aqueles suínos classificados como portadores (KORSAK *et al.*, 2006).

Para a obtenção de melhores resultados de isolamento bacteriológico é recomendada uma metodologia que consiste de três estágios: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e isolamento seletivo. O pré-enriquecimento tem o objetivo de aumentar a população e recuperar as células lesadas. O enriquecimento seletivo visa inibir a microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial da população de *Salmonella* enquanto o isolamento seletivo tem por objetivo promover o desenvolvimento diferencial de colônias de *Salmonella* para posterior confirmação

bioquímica e sorológica (VARNAM, EVANS 1991; MICHAEL, CARDOSO, COSTA 2003). Algumas possibilidades para aumentar a sensibilidade do isolamento bacteriológico incluem a utilização de múltiplos caldos de enriquecimento (com tempo e temperaturas de enriquecimento) e meios sólidos seletivos indicadores, recuperação de múltiplos isolados por suíno ou aumento da amostragem de animais por lote (FUNK, DAVIES, NICHOLS 2000).

Embora o isolamento de *Salmonella* seja definitivo para o diagnóstico, o seu processamento é caro e demorado para avaliações massivas. Em função disso, testes sorológicos como o ELISA têm sido eleitos para a caracterização/classificação dos lotes de suínos quanto à infecção por *Salmonella*. O ELISA utiliza as propriedades de duas moléculas biológicas, o anticorpo e o antígeno. O seu princípio básico é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto o outro reagente pode ser ligado a uma enzima. Esta é catalisadora de reações químicas e pode ser detectada pela adição de um substrato. É necessário determinar o limiar de reatividade ou *cut-off*, valores acima dele são considerado positivos para o teste (FERREIRA, ÁVILA 2001).

Por suas características, o ELISA se destaca como ferramenta para a implementação dos programas de controle de *Salmonella*, sendo ser mais rápido e barato, passível de automatização, se comparado ao isolamento bacteriano. No mercado mundial existem dois kits comerciais para o diagnóstico sorológico da infecção por *Salmonella* com indicação para soro, plasma e suco de carne. O europeu SALMOTYPE® Pig Screen ELISA baseado no mix-ELISA da Dinamarca desenvolvido por Nielsen *et al.* (1995) que utiliza antígenos lipopolissacarídeos (LPS) de parede celular dos sorovares Choleraesuis (O: 6,7) e Typhimurium (O: 1, 4, 5, 12) (sorogrupos C₁ e B, respectivamente) e o norte-americano IDEXX HerdChek* Swine *Salmonella* que detecta anticorpos contra os sorogrupos B, C₁ e D isolados na Europa, Ásia e América. Para Proux *et al.* (2000) cada país tem a necessidade de desenvolver um ELISA que contemple os sorovares prevalentes na sua região de interesse.

No Brasil, em 1999, foi proposto por Vidal *et al.* um ELISA contendo antígenos lipopolissacarídeos (LPS) dos sorovares Anatum, Choleraesuis e Thyphimurium (sorogrupos E₁, C₁ e B, respectivamente), pela abrangência antigênica. Posteriormente, estudos realizados no Rio Grande do Sul demonstraram que os sorovares mais comuns eram Typhimurium, Bredeney e Panama (BESSA, COSTA, CARDOSO 2004; CASTAGNA *et al.* 2004; BANDEIRA 2003). Como esses sorotipos possuem pelo menos dois antígenos LPS comuns ao Typhimurium (O: 1, 4, 5 e 12), Kich *et al.* (2007)

desenvolveram um teste de ELISA baseado em antígeno LPS a partir de extração fenólica da *Salmonella* Typhimurium (sorogrupo B), para medir a prevalência sorológica de rebanhos no sul do Brasil.

A principal desvantagem do teste sorológico aplicado ao indivíduo é que o mesmo não corresponde exatamente ao estado de portador/excretor da bactéria, uma vez que é necessário um período para soroconversão e alguns animais podem não soroconverter. Nielsen *et al.* (1995) demonstraram que a soroconversão iniciou no sétimo dia após inoculação (dpi). No 22º dpi, 86% dos suínos eram sorologicamente positivos enquanto 3% dos animais não soroconverteram. Em outro trabalho, os animais passaram a apresentar sorologia positiva 14 dpi, mas não reagiram homoganeamente frente a dois testes de ELISA (van WINSEN *et al.*, 2001). No trabalho realizado por Kich *et al.* (2007) os suínos inoculados soroconverteram 7 dpi e os sentinelas 21 dpi. Por outro lado, diferente da excreção intermitente de *Salmonella* nas fezes, os níveis de anticorpos no soro não flutuam diariamente (GALLAND *et al.*, 2000), de forma que essa resposta prolongada auxilia na detecção dos animais portadores de *Salmonella* pelo teste de ELISA (NIELSEN *et al.*, 1995).

Existe a possibilidade de encontrar suínos soronegativos, que são positivos no isolamento bacteriológico, e outros negativos no isolamento e que são soropositivos (FARZAN, FRIENDSHIP, DEWEY 2007). Tanto o isolamento bacteriológico como a detecção de anticorpos através de ELISA não representa um diagnóstico “perfeito” para *Salmonella*, e a interpretação dos resultados tem demonstrado as vantagens e limitações de ambos. A seleção do teste de diagnóstico não depende apenas das suas características (especificidade e sensibilidade), mas também do propósito de sua aplicação (triagem de populações, avaliação da eficácia de intervenções, identificação de agente de surtos, monitoramento de processos de controle, entre outros). A definição do objetivo do diagnóstico de *Salmonella* deve ser estabelecido antes do início de qualquer investigação (FUNK, HARRIS, DAVIES 2005).

O uso de ELISA para estabelecer a soroprevalência de *Salmonella* em granjas de suínos apresenta várias vantagens. Estas incluem desde a fácil comparação entre estudos e países, maior sensibilidade e ausência de risco de contaminação cruzada dos suínos no transporte, baia de espera ou linha de abate, isso quando amostrado para o isolamento bacteriológico em frigorífico (van der WOLF *et al.*, 2001).

Embora a relação entre bacteriologia e sorologia não seja perfeita, ou seja, que todo animal com sorologia positiva esteja excretando *Salmonella* nas fezes pelas

características da relação agente-hospedeiro, já mencionadas anteriormente, a escolha de um teste sorológico deve ser baseada na relação entre a soroprevalência e o risco de contaminação bacteriana na linha de abate. Em estudo realizado no sul do Brasil, por Kich *et al.* (2007) em 75 lotes terminados, foi possível estimar que a cada 25% a mais de soroprevalência o lote tem 1,5 vezes mais chance de ter o isolamento bacteriológico positivo.

Como uma alternativa para o soro, o fluido recuperado (suco de carne) do congelamento de fragmentos de músculo (diafragma, sobrepaleta ou outros) pode ser utilizado para a detecção de anticorpos contra *Salmonella* por ELISA-LPS. Como este suco de carne é uma mistura de soro, linfa e líquidos intracelulares, já constituindo uma diluição fisiológica do soro, as amostras devem ser diluídas até 1:30, comparado com a diluição do soro de 1:400 (NIELSEN *et al.*, 1998). A coleta do suco de carne é menos trabalhosa que a coleta de sangue na granja. Outra vantagem é que a coleta das amostras pode ser realizada após a identificação das carcaças no frigorífico (KICH *et al.*, 2004a). Uma desvantagem é que grandes variações no volume do líquido por grama do tecido podem ser observadas, influenciadas por restos de sangue no fragmento, nível de estresse pré-abate dos animais, efeitos do glicogênio no músculo, pH *post mortem*, período de congelamento e descongelamento das amostras (NIELSEN *et al.*, 1998).

Em trabalho desenvolvido por Nielsen *et al.*, (1998) comparando os resultados do ELISA com suco de carne aos obtidos do soro, a sensibilidade foi 80-89% e a especificidade 91-100%, dependendo do valor de corte utilizado. Enquanto que para Kich *et al.*, (2004a) foram de 88,12% e 70,43%, respectivamente.

CAPÍTULO 3: ARTIGO

Detecção de anticorpos contra *Salmonella* sp. em suco de carne de suínos

Nelise Juliane Triques^a; Mariana Gomes Nogueira^a; Remídio Vizzotto^b; Luziane Francison^b; Arlei Coldebella^b; Marisa Cardoso^a; Jalusa Deon Kich^{b*}

^a Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Av.

Bento Gonçalves 9090, 90540-000 Porto Alegre, RS, Brasil

^b Embrapa-Suínos e Aves, Caixa Postal 21, CEP 89700-000, 89700-000 Concórdia, SC,

Brasil

*jalusa@cnpsa.embrapa.br

Artigo a ser submetido no periódico *Research in Veterinary Science*.

Resumo

Programas de controle de *Salmonella sp.* têm sido desenvolvidos e implementados na cadeia produtiva de suínos em vários países. Estes exigem metodologias rápidas, eficientes e de baixo custo para classificar os rebanhos quanto ao risco de introduzir o patógeno na linha de abate e contaminar o produto final. Neste sentido, foi avaliado o suco de carne suíno como substituto ao soro na detecção de anticorpos contra *Salmonella* por meio de ELISA-LPS desenvolvido no Brasil. Foram comparados os resultados do teste de ELISA obtidos de 671 suínos ao abate, paralelamente, foi avaliado o estado de portador destes animais pelo isolamento de *Salmonella sp.* a partir de linfonodos mesentéricos. Os resultados bacteriológicos e sorológicos demonstraram uma amplificação esperada da infecção no período de crescimento e terminação. Quando comparados os resultados dos dois tipos de músculos (diafragma e sobrepaleta) a correlação foi $R=0,859$ e o índice *Kappa* foi 0,689, sendo essa considerada uma boa concordância. O coeficiente de correlação entre os resultados do soro e do suco de carne observados foi baixo, $R=0,42$ para diafragma e $R=0,33$ para sobrepaleta, e a concordância foi fraca, com índice *Kappa* 0,28 e 0,22, respectivamente. Os melhores índices *Kappa* observados foram 0,377 para diafragma e 0,363 para sobrepaleta que correspondem aos novos pontos de corte $OD=0,100$ e $OD=0,090$, respectivamente. Na avaliação do teste, observou-se que este se tornou mais sensível e menos específico em relação ao ponto de corte experimental $OD=0,169$, a concordância melhorou (0,280 e 0,228), porém ainda permaneceu em nível de concordância fraca. A partir disso, a substituição do soro pelo suco de carne como material para detecção de anticorpos contra *Salmonella* usando o teste de ELISA-LPS desenvolvido no Brasil não pode ser indicada.

Palavras Chave: *Salmonella* em suínos, ELISA-LPS, suco de carne.

Abstract

Salmonella control programs have been implemented in the pig industry by several countries. These programs require rapid, efficient and low cost methods in order to classify herds according to the risk of slaughter line and carcass contamination. In this sense, ELISA-LPS tests to detect antibodies against *Salmonella* sp. in serum or meat-juice samples are valuable tools for the herd monitoring. In this study, the meat-juice was evaluated as a substitute of serum in the ELISA-LPS test developed in Brazil, by comparing the results obtained with both kinds of sample collected from 671 slaughter pigs. In parallel, the carrier status at slaughter was evaluated by the isolation of *Salmonella* sp. from mesenteric lymph nodes. The expected amplification of the infection during the finish period was confirmed by seroconversion and *Salmonella* isolation. The comparison of results obtained with both types of muscles tested (diaphragm muscle and pork shoulder) demonstrated a correlation $R = 0.859$ and Kappa = 0.689, considered a good agreement. The correlation coefficient between the results of serum and the meat-juice tests was low, $R = 0.42$ for diaphragm muscle and $R = 0.33$ for pork shoulder. Similarly, the agreement was weak, with Kappa = 0.28 and 0.22, respectively. Adjusting the ELISA cut-off to obtain a better agreement between tests, improved Kappa indexes of 0.377 for diaphragm muscle and 0.363 for the pork shoulder, in $OD = 0.100$ and $OD = 0.090$, respectively, were achieved. The adoption of those new cut-off results resulted in a better sensitivity, but in a lower specificity of the meat-juice tests. The correlation between serum and meat-juice tests was also improved, but the agreement between tests remained still at low level. Therefore, the adoption of meat-juice as samples for antibodies detection against *Salmonella* using the ELISA-LPS test developed in Brazil can not be indicated.

Keywords: *Salmonella* in swine, ELISA-LPS, meat-juice.

1. Introdução

A *Salmonella* é mundialmente reconhecida como uma das principais causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA), sua presença em carcaças e derivados de suínos representa risco à saúde pública, além de gerar barreiras à comercialização da produção. Com o objetivo de reduzir as DTA pelo consumo de produtos de origem suína contaminados, programas de controle de *Salmonella* têm sido desenvolvidos e implementados na cadeia produtiva de suínos em vários países. A execução dos mesmos exige metodologias para classificar os rebanhos quanto ao risco de introduzir o patógeno na linha de abate e contaminar o produto final. Estas metodologias devem atender à necessidade da agroindústria, em eficiência e economia, e gerar informações para orientar programas de controle de *Salmonella*.

A prevalência de *Salmonella* pode ser medida por testes bacteriológicos e sorológicos, e pode ser avaliada em grupos de animais de diferentes idades. O isolamento bacteriológico é específico, ou seja, o organismo de interesse é identificado. Entretanto, a intermitência da eliminação de *Salmonella* nas fezes, custo elevado e períodos longos de análise são os fatores que comprometem a utilização do isolamento como técnica de rotina para o monitoramento em granjas. Em função disso, testes sorológicos (ELISA) estão sendo eleitos para a caracterização e classificação dos lotes de suínos quanto à infecção por *Salmonella* no rebanho. Pela abrangência destes programas, a quantidade de animais amostrados, a coleta e processamento do sangue, os mesmos tornam-se muito dispendiosos. Por isso, Nielsen *et al* (1998) sugeriram a utilização do suco de carne como uma alternativa para o soro na detecção de anticorpos contra *Salmonella* por ELISA-LPS. O suco de carne é constituído pelo fluido recuperado do congelamento e descongelamento de fragmentos de músculo como diafragma, sobrepaleta entre outros (Nielsen *et al.*, 1998; Mousing *et al.*, 1997; Feld *et al.*, 2005).

Na Dinamarca, onde o programa de controle iniciou em 1995, o Mix-ELISA desenvolvido por Nielsen *et al.* (1995) utilizava antígenos lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular dos sorovares Choleraesuis (O: 6,7) pela sua importância clínica e similaridade antigênica com *S. Infantis* causadora de surtos naquele país, e Typhimurium (O: 1, 4, 5, 12) por ser muito difundido entre os rebanhos de suínos na

maioria dos países. Proux *et al.* (2000) propõem que cada país desenvolva um ELISA que contemple os sorovares prevalentes na região de interesse. Nesse sentido, o ELISA-LPS desenvolvido na França inclui os sorovares Typhimurium, Anatum, Hadar, Infantis e Enteritidis.

No Brasil, em 1999, foi proposto por Vidal *et al.* um ELISA contendo antígenos lipopolissacarídeos (LPS) dos sorovares Anatum, Choleraesuis e Typhimurium (sorogrupos E₁, C₁ e B, respectivamente), pela abrangência antigênica. Posteriormente, estudos realizados no Rio Grande do Sul demonstraram que os sorovares mais comuns eram Typhimurium, Agona, Derby, Bredeney e Panama (sorogrupos B e D), (Bessa *et al.*, 2004; Castagna *et al.* 2004). Como esses sorotipos possuem pelo menos dois antígenos LPS comuns ao Typhimurium (O: 1, 4, 5 e 12), Kich *et al.* (2007) desenvolveram um teste de ELISA baseado em antígeno LPS a partir de extração fenólica da *Salmonella* Typhimurium (sorogrupo B) para medir a prevalência sorológica em rebanhos no sul do Brasil.

Seguindo essa linha de pesquisa, o objetivo foi avaliar o suco de carne suína como substituto ao soro como material para detecção de anticorpos contra *Salmonella* por meio de ELISA-LPS desenvolvido no Brasil.

2. Material e Métodos

Para testar a hipótese da substituição do soro pelo suco de carne foram comparados os resultados do teste de ELISA obtidos de 671 suínos ao abate. Paralelamente, foi avaliado o estado de portador destes animais pelo isolamento de *Salmonella* sp. a partir de linfonodos mesentéricos. A infecção natural por *Salmonella* sp. foi demonstrada no alojamento do lote, por testes bacteriológicos e sorológicos realizados em todos os animais.

2.1. Coleta de material

Avaliaram-se os suínos nas fases de crescimento e terminação criados em cinco lotes consecutivos em sistema de cama sobreposta. Foram coletadas amostras de sangue e suabe retal no alojamento dos lotes, sangue no pré-abate e linfonodos mesentéricos e fragmentos de músculo (diafragma e sobrepaleta) na linha de abate. Os suabes retais e

linfonodos mesentéricos foram submetidos a protocolo de isolamento de *Salmonella* sp. e os soros e sucos de carne à pesquisa de anticorpos pelo teste de ELISA-LPS.

O suco de carne foi obtido por congelamento e descongelamento de fragmento de aproximadamente de 10 gramas de músculo (diafragma e sobrepaleta), armazenado em saco plástico (5 x 5 cm) à - 20°C. Após a extração, o suco de carne foi acondicionado em microtubos plásticos e mantido a - 20°C até o momento da realização do teste.

2.2. Isolamento de *Salmonella*

A pesquisa bacteriológica de *Salmonella* foi realizada em 1392 amostras, compostas por 702 suabes retais e 690 linfonodos mesentéricos. Para tanto, foi seguido o protocolo descrito por Michael *et al.* (2003), que consiste de etapas de pré-enriquecimento da amostra em Água Peptonada Tamponada (1:10), enriquecimento seletivo em Caldo Tetracionato de Müller Kauffmann e em Caldo Rappaport-Vassiliadis, e isolamento em Ágar Verde Brilhante-Lactose-Sacarose (BPLS) e Ágar Xilose Lisina-Tergitol 4 (XLT4). Os isolados foram confirmados por caracterização bioquímica e enviadas para a sorotipificação, na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ.

2.3. Técnica de ELISA (LPS)

Foram submetidas ao teste sorológico 2655 amostras, compostas por soros coletados no alojamento (n= 671) e no pré-abate (n= 671), suco de diafragma (n= 667) e suco do músculo da sobrepaleta (n= 646). Foi utilizado o teste de ELISA constituído de antígenos lipopolissacarídeos (LPS) purificados de *Salmonella* Typhimurium (antígenos O: 1, 4, 5 e 12) desenvolvido pela EMBRAPA Suínos e Aves (Kich *et al.*, 2004a; Kich *et al.*, 2007).

2.4. Análise estatística

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória da distribuição dos dados, calculado o coeficiente linear de correlação de Pearson (r) entre as amostras de suco de carne (diafragma e sobrepaleta) e soro. Utilizando diferentes pontos de corte, foram calculados a sensibilidade ($a/a+c \rightarrow$ positivos verdadeiros/total de positivos), especificidade ($d/b+d \rightarrow$ negativos verdadeiros/total de negativos), coeficiente global ($a+d/\text{total da amostra} \rightarrow$ positivos verdadeiros + negativos verdadeiros/total da amostra)

e índice *Kappa* entre os resultados sorológicos de suco de carne e soro. O efeito das seguintes características do suco: coloração, quantidade e tipo de músculo sobre a concordância entre soro e suco de carne foi testado por regressão logística. Para tanto, os resultados foram categorizados em positivos e negativos usando para o soro o ponto de corte experimental (0,169) proposto por Kich *et al.* (2007) e para o suco de diafragma e sobrepaleta, os pontos de corte correspondentes ao melhor índice *Kappa* observado na análise anterior. A análise estatística foi realizada com os procedimentos do programa SAS e R.

3. Resultados

No alojamento 9,3% (65/702) dos suínos estavam excretando *Salmonella* sp., enquanto que ao abate a prevalência encontrada a partir da análise dos linfonodos mesentéricos foi de 14,3% (99/690). A sorologia demonstrou que ocorreu soroconversão no período de crescimento e terminação, pois no alojamento a soroprevalência foi de 15,4% (103/671) enquanto que ao abate 41,7% (280/671) dos suínos eram positivos no teste de ELISA-LPS (Figura 1).

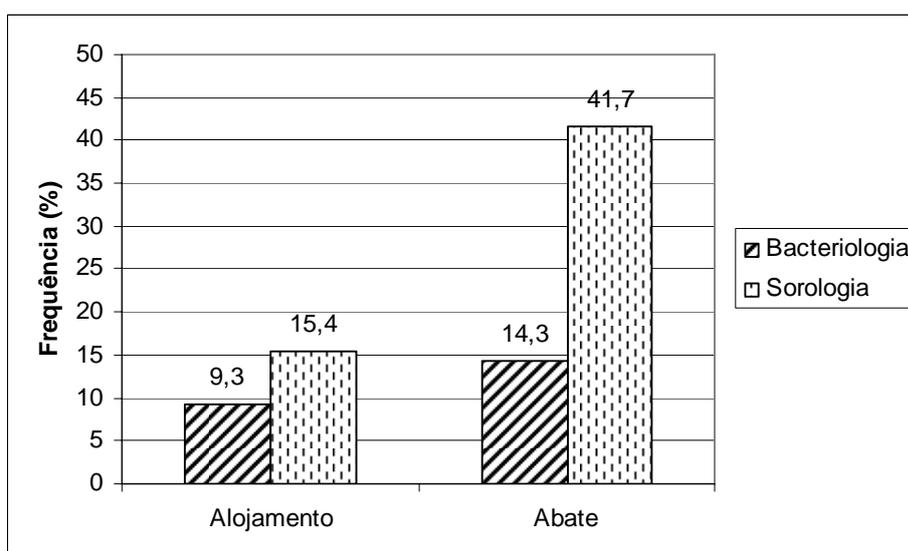


Figura 1 - Isolamento de *Salmonella* sp. e soroprevalência em suínos amostrados no alojamento na terminação e ao abate.

No alojamento 98,5% (64/65) dos suínos positivos apresentaram isolamento apenas do sorovar Typhimurium e 1,5% (1/65) tinham a presença concomitante de *S.*

Typhimurium e *S. Senftenberg*. Ao abate, nos 94 animais positivos, além do sorovar Typhimurium (61,7%) foram encontrados os sorovares Panama (26,6%), Cerro (3,2%) e *S. Enterica* subsp *enterica* (2,1%), além de isolamentos concomitantes dos sorovares Typhimurium/Panama (2,1%) e Typhimurium/*S. enterica*.

As amostras de músculo coletadas pesaram em média 9,1 gramas para o diafragma e 10 gramas para a sobrepaleta. De 3,1% (20/646) das amostras do músculo de sobrepaleta não foi possível extrair suco de carne suficiente para a realização do ELISA-LPS. A produção média de suco do diafragma foi 0,120 g/gramas e sobrepaleta 0,079 g/gramas. A soroprevalência encontrada foi 21,4% (143/667) nos testes que empregaram suco de diafragma e 17,5% (113/646) para aqueles com suco extraído da sobrepaleta.

Primeiramente os resultados dos dois tipos de sucos testados (diafragma e sobrepaleta) foram comparados, apresentando um coeficiente de correlação $R=0,859$ (Figura 2). A avaliação da concordância entre os resultados obtidos com os dois tipos de suco (Anexo 3) resultou em um índice *Kappa* de 0,689.

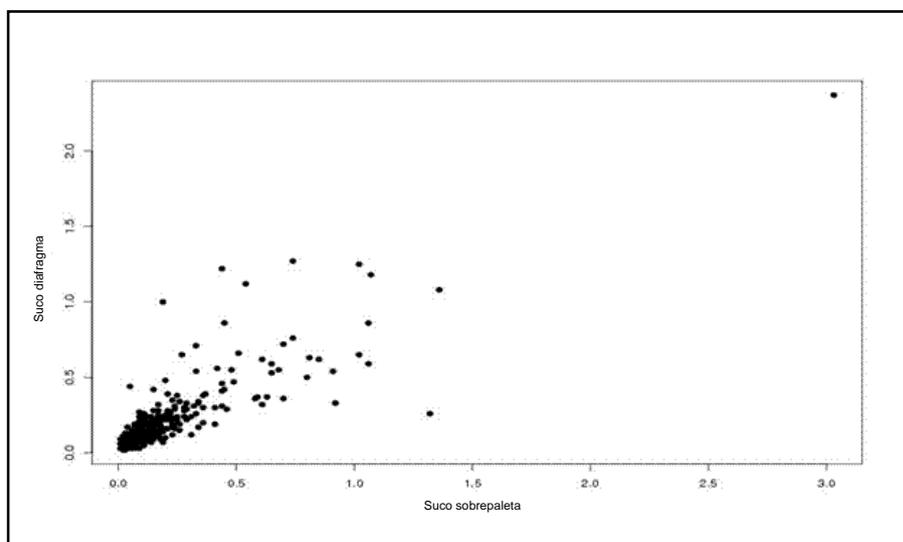


Figura 2 - Coeficiente de correlação entre os resultados de teste de ELISA-LPS para o suco do diafragma e suco da sobrepaleta. Coeficiente de Correlação: 0,859

Quando comparados os resultados obtidos com o soro e com o suco de carne, o coeficiente de correlação observado foi $R=0,42$ para diafragma e $R=0,33$ para a sobrepaleta conforme demonstrado na Figura 3.

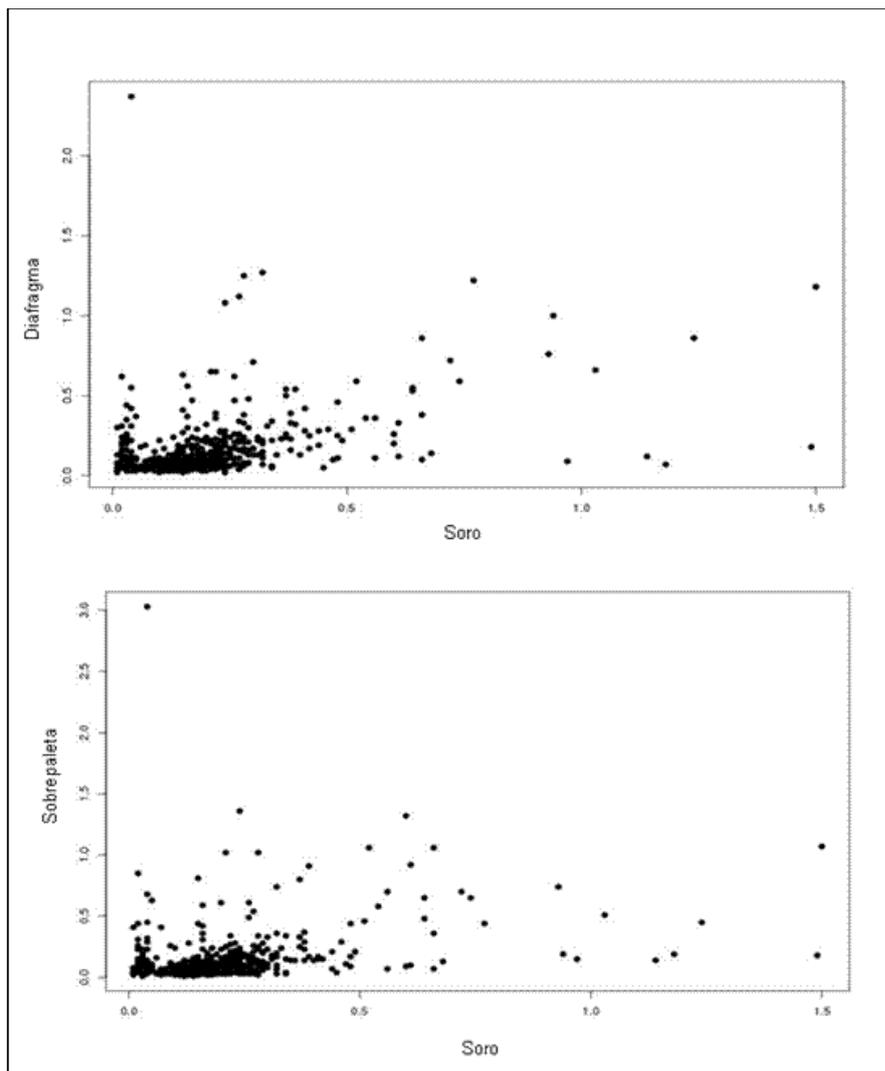


Figura 3 - Coeficiente de correlação entre os resultados de teste de ELISA-LPS para soro e suco de carne extraído de diafragma (A) e sobrepaleta (B).

A concordância entre os resultados obtidos com soro e suco de diafragma resultou em índices *Kappa* de 0,280, enquanto um índice *Kappa* de 0,228 foi encontrado entre soro e o suco da sobrepaleta. Os resultados da especificidade, sensibilidade e coeficiente global geral do ELISA para suco de carne comparado ao soro, utilizando o ponto de corte experimental (0,169), estão demonstrados na Tabela 1.

Os resultados da sensibilidade, especificidade, coeficiente global e índice *Kappa* para os resultados do suco de carne dos diferentes músculos em relação ao soro em diferentes pontos de corte do teste foram também comparados. Estes pontos de corte foram utilizados para uma nova análise de sensibilidade, especificidade e coeficiente global do teste, observando-se que houve um aumento da sensibilidade, mas uma perda de especificidade do teste (Figuras 4 e 5). Os melhores índices *Kappa* observados foram

0,377 para diafragma e 0,363 para sobrepaleta, os quais correspondem aos pontos de corte OD=0,100 e OD=0,090, respectivamente (Anexo 3 e Tabela 1).

Tabela 1 - Sensibilidade, especificidade, coeficiente global e índice *Kappa* ($\times 100$) para os resultados do diafragma e da sobrepaleta, utilizando o ponto de corte experimental (0,169) e os novos pontos de corte estabelecidos.

	Diafragma		Sobrepaleta	
	DO* 0,169	DO 0,100	DO 0,169	DO 0,09
Sensibilidade	36,08	58,96	28,77	55,83
Especificidade	90,18	78,23	91,64	79,78
Coeficiente Global	66,46	69,97	64,32	69,33
<i>Kappa</i>	0,280	0,377	0,228	0,363

DO= Densidade ótica adotada como ponto de corte

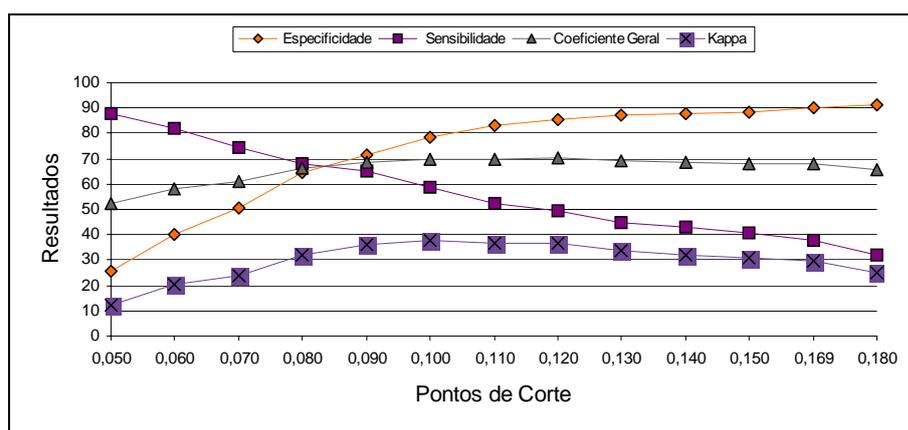


Figura 4 - Sensibilidade, especificidade, coeficiente global e índice *Kappa* ($\times 100$) para os resultados do suco de diafragma.

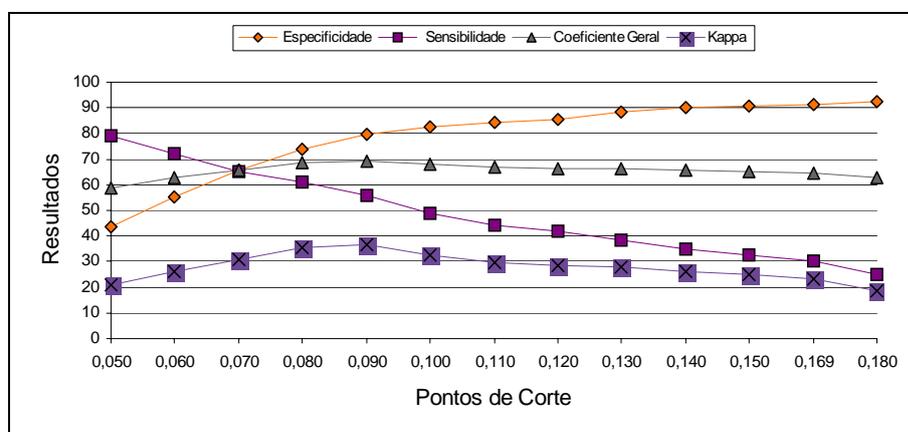


Figura 5 - Sensibilidade, especificidade, coeficiente global e índice *Kappa* ($\times 100$) para os resultados do suco da sobrepaleta.

O efeito das características do suco, como: tipo de músculo, coloração e quantidade de suco, bem como a interação entre estas variáveis, sobre o nível de concordância entre suco e soro foi analisado (Tabela 2), observando-se que não houve efeito significativo ($p>0,05$) para nenhuma variável estudada. Ou seja, essas variáveis não influenciaram na concordância dos resultados do teste sorológico para soro e suco de carne.

Tabela 2 - Nível descritivo de probabilidade para o modelo logístico para a concordância entre soro e suco de carne.

Causas de Variação	Nível descritivo
Tipo de músculo	0,183
Coloração	0,541
Quantidade de suco	0,654
Tipo de músculo x Coloração	0,143
Tipo de músculo x Quantidade de suco	0,314
Coloração x Quantidade de suco	0,337

4. Discussão e Conclusão

Considerando todas as análises realizadas, os resultados bacteriológicos e sorológicos demonstraram (Figura 1) uma amplificação esperada da infecção por *Salmonella* no período de crescimento e terminação. No alojamento 9,3% dos suínos apresentaram isolamento positivo, enquanto que ao abate a prevalência obtida a partir dos linfonodos mesentéricos foi de 14,3%. Estes resultados foram confirmados pelos resultados sorológicos, onde no alojamento foram encontrados 15,4% de soropositivos e ao abate 41,7% de soropositivos.

As prevalências, tanto de isolamento como sorológicas ao abate, foram inferiores às reportadas em estudos anteriores no sul do Brasil (Bessa *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2006) que encontraram índices entre 55 e 77%. Se forem comparados os dados sorológicos, também as soroprevalências foram inferiores aos índices anteriores: 88,42% (Schwarz *et al.*, 2007) e entre 60 e 100% (Kich *et al.*, 2007).

Diferenças podem ser encontradas entre granjas localizadas em diferentes regiões e mesmo entre lotes de uma mesma granja avaliados ao longo do tempo (Funk

et al., 2001; Rajic *et al.*, 2005). Da mesma forma, a fase zootécnica de importância para a amplificação do número de portadores pode variar. Nesse sentido, os resultados obtidos por Silva *et al.* (2006); Muller (2005) e Schwarz *et al.* (2006) indicaram que a terminação é uma fase crítica na maioria dos rebanhos do sul do Brasil, enquanto observa-se que em alguns sistemas integrados os animais sofrem infecção já na fase de creche (Kich *et al.*, 2004b).

No alojamento 98,5% dos suínos positivos apresentaram isolamento apenas do sorovar Typhimurium, este sorovar se mantém entre os predominantes na região Sul do Brasil em vários estudos anteriores (Bessa *et al.*, 2004, Castagna *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006; Kich *et al.*, 2007). Ao abate houve uma variabilidade maior dos sorovares presentes, aparecendo *S. Panama* (26,6%) e *S. Cerro* (3,2%) entre os isolados obtidos. Este fato pode estar relacionado com infecções recentes ocorridas no pré-abate, uma vez que a presença de *Salmonella* nas baias de espera do frigorífico já foi amplamente demonstrada (Swanenburg *et al.*, 2001; Nowak *et al.*, 2007). O tempo de descanso pré-abate dos suínos avaliados neste trabalho foi em média 6 horas, tempo suficiente para ocorrer à infecção, segundo demonstrado em estudos anteriormente conduzidos. Em condições experimentais, *Salmonella* sp. infectou suínos expostos ao ambiente contaminado após um período de três horas (Fedorka-Cray *et al.*, 1995) e, após apenas duas horas no estudo de Hurd *et al.* (2001).

Embora as análises bacteriológicas discutidas anteriormente tenham sido realizadas para demonstrar que ocorreu a infecção natural dos lotes, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade de substituir o soro pelo suco de carne na análise sorológica de lotes suínos em idade de abate. Para tanto, inicialmente foi comparado o suco dos dois músculos. O diafragma já havia sido indicado em trabalhos anteriores, principalmente pela facilidade de coleta e pelo seu baixo valor econômico em relação ao produto final (Nielsen *et al.*, 1998). Como alternativa avaliou-se a extração de suco a partir de músculos da região da sobrepaleta, uma vez que o uso do diafragma foi questionado por produzir, em algumas amostras, suco de coloração escura, que poderia aumentar o número de resultados falso-positivos no teste de ELISA (Feld *et al.*, 2005).

Quando comparados os resultados dos dois tipos de músculos (diafragma e sobrepaleta) a correlação foi $R=0,859$ e o índice *Kappa* foi 0,689, sendo esta considerada uma concordância forte, porém não perfeita (Jekel *et al.*, 1999). Embora o suco seja considerado uma diluição fisiológica do soro, o qual apresenta até 10 vezes mais anticorpos (Nielsen *et al.*, 1998), a quantidade produzida e as condições de abate,

como presença de sangue e água, podem alterar suas características e explicar a discordância entre amostras de músculos diferentes originadas do mesmo animal.

A qualidade e liberação do suco de carne são influenciadas por alguns fatores, como: local de amostragem, o tamanho de amostra, a presença de sangue e fascias, o nível de estresse pré-abate, os efeitos associados ao glicogênio muscular e o pH *post-mortem*. Da mesma forma, amostras de músculo coletadas logo após o abate podem conter mais sangue do que aquelas coletadas depois de decorrido um longo intervalo desde o abate (Nielsen *et al.*, 1998; Leyk and Seiffert, 2003), o que não deve ter influenciado estes resultados, uma vez que a coleta foi imediata. No entanto a caracterização bioquímica dos componentes do suco de carne ainda não é totalmente conhecida (Gutiérrez *et al.*, 2008), dificultando a construção de hipóteses sobre a variabilidade dos resultados obtidos em diferentes amostras.

O coeficiente de correlação entre os resultados do soro e do suco de carne observados foi baixo, $R=0,42$ para diafragma e $R=0,33$ para sobrepaleta, bem como a concordância foi fraca, com índice *Kappa* 0,28 e 0,22, respectivamente. Estes resultados foram piores do que os encontrados anteriormente por Kich *et al.* (2004a). No trabalho anterior, foi feito um plano de amostragem representando as categorias de DO de 0,0 à 1,3, enquanto no presente trabalho a amostragem foi aleatória. Talvez isto explique parcialmente a diferença de resultados, uma vez que numa situação real de amostragem de animais a maioria dos soros tendem a concentrar-se em DOs próximas ao ponto de corte, zona mais crítica para o estabelecimento de um resultado positivo/negativo para o teste. Porém, se a proposta é substituir o soro pelo suco, as correlações precisam ser melhores.

Novos pontos de corte para o suco de carne no intervalo entre $OD=0,050$ a $OD=0,180$ foram avaliados quanto a influência exercida sobre a sensibilidade, especificidade, coeficiente global e índice *Kappa* do teste (Anexo 3). Os melhores índices *Kappa* observados foram 0,377 para diafragma e 0,363 para sobrepaleta que correspondem aos pontos de corte $OD=0,100$ e $OD=0,090$, respectivamente. Na avaliação do teste, observou-se que este se tornou mais sensível e menos específico em relação ao ponto de corte experimental $OD=0,169$, a concordância melhorou (0,280 e 0,228), porém ainda permaneceu em nível de concordância fraca, segundo a classificação de Landis and Koch (1977).

Observou-se que não houve efeito significativo ($p>0,05$) sobre o nível de concordância entre suco de carne e soro em nenhuma das variáveis pesquisadas (tipo de

músculo, coloração e quantidade de suco), indicando que a baixa concordância não está relacionada com a qualidade do suco extraído.

A partir disso, a substituição do soro pelo suco de carne como material para detecção de anticorpos contra *Salmonella* usando o teste de ELISA-LPS desenvolvido por Kich *et al.* (2007) não pode ser indicada.

5. Referências

- Bessa, M. C., Costa, M., Cardoso, M., 2004. Prevalência de *Salmonella* sp em Suínos Abatidos em Frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 24, 80-84.
- Castagña, S.M.F., Schwarz, P., Canal, C.W., Cardoso, M.R.I., 2004. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32, 141-147.
- Fedorka-Cray, P.J., Kelley, L.C., Stabel, T.J., J T Gray, Laufer, J.A., 1995. Alternative routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. **Infect. Immun.**, 63, 2658-2664.
- Feld, N.C., Ekeroth, L., Møgelmoose, V., Nielsen, B., 2005. Correlation between color of meat juice samples and *Salmonella* antibody levels in the Danish mix-ELISA. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS IN PORK. 6, 2005, California. **Proceedings.**, 92-94.
- Funk, J.A., Davies, P.R., Nichols, M.A., 2001. Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-sites swine production systems. **Veterinary Microbiology**, 83, 45-60.
- Guti'Errez, A.M., Martinez-Subiela, S., Montes, A., Parra, M.D., Cer'On, J.J., 2008. C-reactive protein measurements in meat juice of pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 122, 250-255.
- Hurd, H.S., Mckean, J.D., Wesley, I.V., Karriker, L.A., 2001. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. **Journal Food Protection**, 64, 7, 939-944.
- Jekel, J.F., Katz, D.L., Elmore, J.G., 1999. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 328 p.
- Kich, J. D., Schwarz, P., Silva, L.E., Coldebella, A., Piffer, I.A., Vizzotto, R., Cardoso, M.R.I., 2007. Development and application of an ELISA to detect antibodies against prevalent *Salmonella* serovars in swine in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 19, 5, 510-517.

- Kich, J.D., Bordin, L.C., Mores, N., Coldebella, A., Triques, N.; Klein, E., Ramenzoni, M.L., Silva, L.E., 2004b. Excreção e soroprevalência de *Salmonella* no alojamento de leitões em granjas de terminação. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2., CONGRESSO DE SUINOCULTURA DO MERCOSUL, 4., 2004, Foz do Iguaçu, PR. **Anais**. Campinas: Editora AnimalWorld, p. 470-471.
- Kich, J.D.; Cardoso, M.; Coldebella, A.; Piffer, I.A.; Vizzoto, R.; Silva, L.E., 2004a. O uso de suco de carne para detecção de anticorpos contra *Salmonella* em suínos. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2, CONGRESSO DE SUINOCULTURA DO MERCOSUL, 4., 2004a, Foz do Iguaçu, PR. **Anais**. Campinas: Editora AnimalWorld, p. 474-475.
- Leyk, W.; Seiffert, B., 2003. *Salmonella* serology – which samples should be used: comparison of meat juice and serum samples of the same pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS IN PORK, 5, 2003, Grécia. **Proceedings**., p. 271-273.
- Michael, G.B.; Cardoso, M.; Costa, M., 2003. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. **Brazilian Journal of Microbiol.**, 34, 138-42.
- Mousing, J., P. Thode Jensen, C. Halgaard, F. Bager, N. Feld, B. Nielsen, J. P. Nielsen, S., Bech-Nielsen., 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. **Preventive Veterinary Medicine**, 29, 247-261.
- Muller, M. Perfil Sorológico e de Isolamento de *Salmonella* sp. em Suínos no Início da Terminação e ao Abate, 2005. 166 f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, 2005.
- Nielsen, B., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J., Lind, P., 1995. 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**, 47, 205-218.
- Nielsen, B., Ekerøth, L., Bager, E., Lind, P., 1998. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 10, 158-163.
- Nowak, B., Von Muffling, T., Chauncohm, S., Hartung, J., 2007. *Salmonella* contamination in pigs at slaughter and on the farm: A field study using an antibody ELISA test and a PCR technique. **International Journal of Food Microbiology**, 115, 3, 259-267.
- Proux, K., Houdayer, C., Humbert, F., Cariolet, R., Rose, V., Eveno, E., Madec, F., 2000. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing the detection of all infected pigs. **Veterinary Research**, 31, 481-490.
- Rajic, A., Keenlside, J., Mcfall, M.E., Deckert, A.E., Muckle, A.C., O'connor, B.P., Manninen, K., Dewey, C.E., Mcewen, S.A., 2005. Longitudinal study of *Salmonella* species in 90 Alberta swine finishing farms. **Veterinary Microbiology**, 105, 47-56.

Schwarz, P., Calveyra, J.C., Kich, J.D., Borowsky, L.M., Hirose, F., Kolb, J., Barcellos, D. E. S. N., Cardoso, M., 2007. Estudo longitudinal da infecção por *Salmonella enterica* em rebanho suíno no sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13, 2007, Florianópolis. **Anais**. Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 291-293.

Schwarz, P.; *Et Al.* 2006. Estudo Longitudinal da Infecção por *Salmonella enterica* em Rebanho Suíno no Sul do Brasil. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006. Foz do Iguaçu. **Anais**, 457-460.

Silva, L.E., Gotardi, C.P., Vizzotto, R., Kich, J.D., Cardoso, M.R.I., 2006. Infecção por *Salmonella enterica* em Suínos Criados em um Sistema Integrado de Produção do Sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58, 455-461.

Swanenburg, M., Urlings, H.A., Snijders, J.M., Keuzenkamp, D.A., Van Knapen, F., 2001. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, 70, 243-254.

Vidal, C.E.S., Piffer, I.A., Guidoni, A.L., Vieira, N.D., Fávero, M.B.B., Bernardi, L.A., 1999. Teste de ELISA para o diagnóstico da infecção por *Salmonella* em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999 Belo Horizonte, MG. **Anais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 209-210.

CAPÍTULO 4. PERSPECTIVAS

No estudo conduzido por Kich *et al.*, (2007) para desenvolvimento do ELISA-LPS foram realizadas análises de correlação com os *kits* que estão no mercado internacional para a detecção de anticorpos contra *Salmonella* em soro, plasma e suco de carne: o europeu SALMOTYPE® Pig Screen ELISA e o norte-americano IDEXX HerdChek* Swine *Salmonella*. Um estudo similar poderia ser realizado para comparar os resultados a partir de suco de carne submetido a diferentes testes de ELISA disponíveis. Paralelamente um estudo aprofundado dos componentes do soro e do suco de carne, buscando otimizar o desempenho do teste pode ser conduzido.

Outro encaminhamento a ser dado na seqüência da linha de pesquisa é o registro do ELISA-LPS desenvolvido por Kich *et al.*, (2007) junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Até o momento, tem sido uma das importantes ferramentas utilizada nos trabalhos do grupo de pesquisa entre o Setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS e a Embrapa Suínos e Aves, porém ainda deve ser disponibilizado ao setor produtivo.

REFERÊNCIAS

- ALBAN, L., STEGE, H., DAHL, J. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 53, p. 133-146, 2002.
- BANDEIRA, R. Presença de *Salmonella* sp. em suínos ao abate e em cortes de pernil processados em frigorífico do Rio Grande do Sul. 2003. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- BERENDS, B.R., URLINGS, H.A, SNIJDERS, J.M., VAN KNAPEN, F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* sp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, n. 30, p. 37-53, 1996.
- BESSA, M. C., COSTA, M., CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp em Suínos Abatidos em Frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 80-84, 2004.
- BOTTELDOORN, N., HERMAN, L., RIJSENS, N., HEYNDRICKX, M. Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. **Applied Environmental Mycrobology**, v. 70, p. 5305-5314, 2004.
- CASTAGÑA, S.M.F., **SCHWARZ, P., CANAL, C.W., CARDOSO, M.R.I.** Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 141-147, 2004.
- CHRISTENSEN, J., BAGGESEN, D.L., SOERENSEN, V., SVENSMARK, B. *Salmonella* level of Danish swine herds based on serological examination of meat-juice samples and salmonella occurrence measured by bacteriological follow-up. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, p. 277-292, 1999.
- CLARKE, R.C.; GYLES, C.L. *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; CHARLES, O.T. **Pathogenesis of bacterial infections in animals** 2nd ed. Ames: Iowa State University, 1993. p. 133-153.
- DAHL, J., WINGSTRAND, B., NIELSEN, B. Elimination of *Salmonella* Typhimurium infection by the strategic movement of pigs. **The Veterinary Record**, v. 140, n. 26, p. 679-681, 1997.
- DAVIES, R.H., HEATH, P.J., COXON, S.M., SAYERS, A.R. Evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for *Salmonella*. **Journal of Applied Microbiology**, n. 95, p. 1016-1025, 2003.
- EHLERS, J. **Results of the *Salmonella* monitoring program in Lower Saxony - a review over the last 3 years.** 21st Jenaer Symp.: Zoonoses of Pigs, 2002.

EKPERIGIN H. E.; NAGARAJA K. V. *Salmonella*. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 14, p. 17-29, 1998.

ELD, K. *et al.* *Salmonella* isolated from animals and feedstuffs in Sweden during 1983-1987. **Acta Veterinaria Scand**, v.32, n. 2, p. 261-277, 1991.

FARZAN, A.; FRIENDSHIP, R.M.; DEWEY, C.E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests and culture for determining *Salmonella* status of a pig herd. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 2, p. 238-244, 2007.

FEDORKA-CRAY, P.J., KELLEY, L.C., STABEL, T.J., J T GRAY, LAUFER, J.A. Alternative routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. **Infection and Immunity**, n. 63, p. 2658-2664, 1995.

FELD. N.C., EKEROOTH, L., MØGELMOSE, V., NIELSEN, B. Correlation between color of meat juice samples and *Salmonella* antibody levels in the Danish mix-ELISA. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS IN PORK. 6, 2005, California. **Proceedings**. 2005, p. 92-94.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes**. 2.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2001, 443 p.

FIERENS, H.; HUYGHEBAERT, A. Screening of *Salmonella* in naturally contaminated feeds with rapid methods. **International Journal of Food Microbiology**, n. 31, p. 301-309, 1996.

FOLEY, S.L., LYNNE, AM., NAYAK, R. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. **Journal of Animal Science**, n. 86 (14 suppl), p. 149-162, 2008.

FUNK, J. A.; HARRIS, I. T.; DAVIES, P. R. Comparison of fecal culture and Danish Mix-ELISA for determination of *Salmonella* enterica subsp. Enterica prevalence in growing swine. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 115-126, 2005.

FUNK, J.A., DAVIES, P.R., NICHOLS, M.A. Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-sites swine production systems. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 45-60, 2001.

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**, n. 12, p. 412-418, 2000.

GALLAND, J.C., HOUSE, J.K., HYATT, D.R., HAWKINS, L.L., ANDERSON, N.V., IRWIN, C.K., SMITH, B.P. Prevalence of *Salmonella* in beef feeder steers as determined by bacterial culture and ELISA serology. **Veterinary Microbiology**, n. 76, p. 143-151, 2000.

GRIFFITH, R.W.; SCHWARTZ, K.J; MEYERHOLZ, D.K. Salmonellosis. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. *et al.* (Eds.). **Diseases of Swine**. 8th ed., Ames: Iowa State University Press, 2006. cap.45, p. 739-754.

GUTIÉRREZ, A.M., MARTINEZ-SUBIELA, S., MONTES, A., PARRA, M.D., CERÓN, J.J. C-reactive protein measurements in meat juice of pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 122, p. 250-255, 2008.

HURD, H.S., McKEAN, J.D., GRIFFITH, R.D., ROSTAGNO, M.H. Estimation of the *Salmonella* enterica prevalence in finish swine. **Epidemiology and Infection**, v. 132, p. 127-135, 2004.

HURD, H.S., McKEAN, J.D., WESLEY, I.V., KARRIKER, L.A. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. **Journal Food Protect**, v. 64, n. 7, p. 939-944, 2001.

JEAN, S.S.; WANG, J.Y.; HSUEH, P.R. Bacteremia caused by *Salmonella* enterica serotype Choleraesuis in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 39, n. 5, p. 358-365, 2006.

JEKEL, J.F., KATZ, D.L., ELMORE, J.G. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999, 328 p.

KICH, J. D., SCHWARZ, P., SILVA, L.E., COLDEBELLA, A., PIFFER, I.A., VIZZOTTO, R., CARDOSO, M.R.I. Development and application of an ELISA to detect antibodies against prevalent *Salmonella* serovars in swine in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 5, p. 510-517, 2007.

KICH, J.D., BORDIN, L.C., MORES, N., COLDEBELLA, A., TRIQUES, N.; KLEIN, E., RAMENZONI, M.L., SILVA, L.E. Excreção e soroprevalência de *Salmonella* no alojamento de leitões em granjas de terminação. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2., CONGRESSO DE SUINOCULTURA DO MERCOSUL, 4., 2004, Foz do Iguaçu, PR. **Anais**. Campinas: Editora AnimalWorld, 2004b. p. 470-471.

KICH, J.D.; CARDOSO, M.; COLDEBELLA, A.; PIFFER, I.A.; VIZZOTO, R.; SILVA, L.E. O uso de suco de carne para detecção de anticorpos contra *Salmonella* em suínos. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2., CONGRESSO DE SUINOCULTURA DO MERCOSUL, 4., 2004, Foz do Iguaçu, PR. **Anais**. Campinas: Editora AnimalWorld, 2004a. p. 474-475.

KORSAK, N., DEGEYE, J.N., ETIENNE, G., BEDUIN, J.M., CHINA, B., GHAFIR, Y., DAUBE, G. Use of a serological approach for prediction of *Salmonella* status in an integrated pig production system. **International Journal of Food Microbiology**, n.108, p 246–254, 2006.

KRAEHENBUHL, J.P.; NEUTRA, M.R. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. **Physiological Reviews**, v. 72, p. 853-879, 1992.

LEYK, W.; SEIFFERT, B. *Salmonella* serology – which samples should be used: comparison of meat juice and serum samples of the same pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS IN PORK, 5, 2003, Grécia. **Proceedings**. 2003, p. 271-273.

lo fo WONG, D.M.A., HALD, T., VAN DER WOLF, P.J., SWANENBURG, M. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Production Science**, n. 76, p. 215-222, 2002.

MICHAEL, G.B.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Comparison of diferent seletive enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 138-142, 2003.

MOUSING, J., P. THODE JENSEN, C. HALGAARD, F. BAGER, N. FELD, B. NIELSEN, J. P.NIELSEN, S., BECH-NIELSEN. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 29, p. 247-261, 1997.

MOWAT, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, n. 3, p. 331–341, 2003

MULLER, M. Perfil Sorológico e de Isolamento de *Salmonella* sp. em Suínos no Início da Terminação e ao Abate, 2005. 166 f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, 2005.

NIELSEN, B., ALBAN, L., STEGE, H., SØRENSEN, L.L., MØGELMOSE, V., BAGGER, J., DAHL, J., BAGGESEN, D.L. A new *Salmonella* surveillance and control programme in Danish pig herds and slaughterhouses. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 4, 2001, Leipzig, Germany. **Proccedings**. Leipzig, 2001. p 14-24.

NIELSEN, B., BAGGESEN, D., BAGER, F., HAUGEGAARD, J., LIND, P. 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**, n. 47, p. 205-218, 1995.

NIELSEN, B., EKEROTH, L., BAGER, E., LIND, P. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 158-163, 1998.

NIELSEN, B., WEGENER, H.C. Public health and pork and pork products: regional perspectives of Denmark. **Rev. Sci. Tech.**, v. 16, p. 513-524, 1997.

NOWAK, B., von MUFFLING, T., CHAUNCOHM, S., HARTUNG, J. *Salmonella* contamination in pigs at slaughter and on the farm: A field study using an antibody ELISA test and a PCR technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 259-267, 2007.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Review Medicine**, v.52, p. 259-274, 2001.

OLIVEIRA, C.J.B., GARCIA, T.B., CARVALHO L.F.O.S., GIVISIEZ, P.E.N. Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 125, p. 355-361, dec. 2007.

- PROUX, K., HOUDAYER, C., HUMBERT, F., CARIOLET, R., ROSE, V., EVENO, E., MADEC, F. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing the detection of all infected pigs. **Veterinary Research**, n. 31, p.481–490, 2000.
- RAJIC, A., KEENLISIDE, J., McFALL, M.E., DECKERT, A.E., MUCKLE, A.C., O'CONNOR, B.P., MANNINEN, K., DEWEY, C.E., McEWEN, S.A. Longitudinal study of *Salmonella* species in 90 Alberta swine finishing farms. **Veterinary Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 47-56, 2005.
- SANTOS, R. L. *et al.* Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis: a review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Ribeirão Preto, v. 36, n. 1, p. 2-13, 2003.
- SCHWARZ, P., CALVEYRA, J.C., KICH, J.D., BOROWSKY, L.M., HIROSE, F., KOLB, J., BARCELLOS, D. E. S. N., CARDOSO, M. Estudo longitudinal da infecção por *Salmonella enterica* em rebanho suíno no sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13, 2007, Florianópolis. **Anais**. Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 2007. p. 291-293.
- SCHWARZ, P.; *et al.* Estudo Longitudinal da Infecção por *Salmonella enterica* em Rebanho Suíno no Sul do Brasil. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3, 2006. Foz do Iguaçu. **Anais**. Anais, 2006. p. 457-460.
- SILVA, L.E., GOTARDI, C.P., VIZZOTTO, R., KICH, J.D., CARDOSO, M.R.I. Infecção por *Salmonella enterica* em Suínos Criados em um Sistema Integrado de Produção do Sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 455-461, 2006.
- STEGE, H., CHRISTENSEN, J., NIELSEN, J. P., BAGGESEN, D. L., ENØE, C., WILLEBERG, P. Prevalence of subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish finishing pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 44, p. 175–188, 2000.
- SWANENBURG, M., URLINGS, H.A., SNIJDERS, J.M., KEUZENKAMP, D.A., van KNAPEN, F. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, n. 70, p. 243-254, 2001.
- TUCKER L. A.; PICKARD T. **Interfacing immunity, gut health and performance**. Local: Nottingham University Press, 2004. p. 15-48.
- van der GAAG, M.A., VOS, F., SAATKAMP, H.W., van BOVEN, M., van BEEK, P., HUIRNE, R.B.M. A state-transition simulation model for the spread of *Salmonella* in the pork supply chain. **European Journal of Operational Research**, v. 156, n. 3, p. 782-798, 2004.
- van der HEIJDEN, H.M.J.F. First international ring trial of ELISAs for *Salmonella*-antibody detection in swine. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 114, p. 389-392, 2001.
- van der WOLF, P. J., WOLBERS, W. B., ELBERS, A. R. W., VAN DER HEIJDEN, H. M. J. F., KOPPEN, J. M. C. C., HUNNEMAN, W. A., VAN SCHIE, F. W.,

TIELEN, M. J. M. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, n. 78, p. 205-219, 2001.

van WINSEN, R.L., VAN NES, A., KEUZENKAMP, D., URLINGS, H.A.P., LIPMAN, L.J.A., BIESTERVELD, S., SNIJDERS, J.M.A., VERHEIJDEN, J.H.M., VAN KNAPEN, F. Monitoring of transmission of *Salmonella* enterica serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. **Veterinary Microbiology**, n. 80, p. 267-274, 2001.

VARNAM, A H.; EVANS, M. G. *Salmonella*. In: _____. Foodborne Pathogens an Illustrated Text. cap. 4 Aylesbury, England: Wolf, 1991 p. 51 – 462.

VIDAL, C.E.S., PIFFER, I.A., GUIDONI, A.L., VIEIRA, N.D., FÁVERO. M,B.B., BERNARDI, L.A. Teste de ELISA para o diagnóstico da infecção por Salmonela em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9, 1999 Belo Horizonte, MG. **Anais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. 1999, 209-210.

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

ANEXOS

ANEXO 1 – Protocolo de Isolamento de *Salmonella* segundo Michael, Cardoso e Costa (2003).

Pré-enriquecimento da amostra

Para linfonodos:

Pesar 25 g da amostra, adicionar 225 mL de água peptonada tamponada e triturar no STOMACKER 260 rpm por 1 minuto e incubar a 37°C por 18-24 horas.

Para suabes retais:

Colocar os suabes retais em tubo de ensaio com 10 mL de água peptonada tamponada, agitar em vortex e incubar a 37°C por 18-24 horas.

Enriquecimento seletivo

Pipetar 100µL da cultura pré-enriquecida e transferir para tubos de ensaio contendo 9,9mL de Caldo Rappaport Vassiliadis. Pipetar 1mL da cultura pré-enriquecida e transferir para tubos de ensaio contendo 9mL de caldo tetrionato. Incubar em banho-maria a 42°C por 24 horas.

Isolamento e identificação de colônias

Semear aproximadamente 20mL ou uma alçada, da cultura submetida ao isolamento seletivo, em placas de Ágar VB e de Ágar XLT4 e incubar à 37°C por 24-48 horas.

Fazer a leitura prévia para identificação de colônias com morfologia compatível com *Salmonella* e manter as culturas em temperatura ambiente por mais 24h para a leitura definitiva.

Nota:

As colônias de *Salmonella* ficam de cor rosa claro com halo de cor vermelha no Ágar VB e incolores com um ponto central de cor preta em Ágar XLT4.

As colônias com morfologia compatível com *Salmonella* devem ser isoladas por inoculação em uma placa de Ágar VB ou XLT4. Confirmando-se as características morfo-fisiológicas, deve-se preparar culturas em Ágar TSA para provas de identificação antigênica e bioquímica.

Identificação morfo-fisiológica

Sorologia:

Suspender 3 colônias, obtidas por cultivo em Ágar TSA por 48h a 37°C, em 100mL de PBS. Sobre uma lâmina de vidro, mesclar 25µL de soro polivalente e 25µL da suspensão de colônias e homogeneizar movimentando a lâmina por dois minutos.

Interpretação:

A formação de grumos indica resultado positivo.

Ágar tríplice açúcar ferro (TSI):

A partir de uma colônia isolada em Ágar TSA, inocular o tubo de TSI, com uma agulha de platina, estriando a rampa e picando o fundo. Incubar a 37°C por 18 a 24h com as tampas desrosqueadas, para garantir a presença de oxigênio na rampa.

Interpretação:

O escurecimento do ágar no fundo dos tubos, indica produção de H₂S.

Bolhas, trincas ou deslocamento do ágar indicam produção de gás.

Viragem do indicador na rampa para vermelho (alcalino) e no fundo para amarelo (ácido) indicam que a bactéria é anaeróbia facultativa, fermenta glicose, não fermenta lactose e sacarose.

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela coloração amarela na base e vermelha na rampa, formação de gás e de H₂S.

Teste SIM

A partir de uma colônia isolada, inocular o tubo de SIM, com uma agulha de platina, picando o fundo. Colocar no interior do tubo, uma fita para indicação de indol, de forma que não atinja o ágar. Incubar a 37°C por 18-24h.

Interpretação:

A turvação do meio além da linha de inoculação indica motilidade positiva.

O escurecimento do ágar no fundo dos tubos, indica produção de H₂S positiva.

A formação de coloração rosa nas fitas de indol indica resultado positivo.

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela presença de motilidade, exceto para os sorovares Pullorum e Gallinarum, produção de H₂S e indol negativo.

Teste de fenilalanina desaminase

Inocular a cultura com a alça de platina em tubos com fenilalanina desaminase, estriando a rampa. Incubar a 37°C por 18 a 24h. Após a incubação, adicionar sobre a cultura de 4 a 5 gotas da solução de cloreto férrico, movimentando o reagente por toda a rampa. Aguardar por aproximadamente 5 minutos.

Interpretação:

O aparecimento de cor verde indica resultado positivo.

A não alteração da cor indica resultado negativo.

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela não alteração da cor.

Ágar Ferro Lisina (LIA)

A partir de uma colônia isolada em Ágar TSA, inocular o tubo de LIA, com uma agulha de platina, estriando a rampa e picando o fundo. Incubar a 37°C por 18 a 24h.

Interpretação:

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela coloração púrpura na base e na rampa, com produção de H₂S (base escura).

Ágar Citrato de Simmons

A partir de uma colônia isolada em Ágar TSA, inocular o tubo de citrato, com uma agulha de platina, estriando uma linha central na rampa. Incubar a 37°C por 18 a 24h.

Interpretação:

Alteração da coloração do meio para azul indica resultado positivo.

Para *Salmonella* a reação é variável de acordo com o sorovar.

ONPG

A partir de uma colônia isolada em Ágar TSA, inocular o tubo de ONPG, com uma alça de platina. Incubar a 37°C por 18 a 24h.

Interpretação:

A alteração da cor do meio para amarelo, indica resultado positivo.

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela não alteração da cor.

Caldo Uréia

A partir de uma colônia isolada em Ágar TSA, inocular o tubo com caldo uréia, com uma alça de platina. Incubar a 37°C por 18 a 24h.

Interpretação:

A alteração da cor do meio para rosa escuro, indica resultado positivo.

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela não alteração da cor.

ANEXO 2 - Protocolo do Teste de ELISA

Impregnar placas DYNEX IMMULON 2 HB com 100 μ L, por cavidade, do antígeno diluído 1:1000 em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 – 0,05M. Deixar em repouso por 24 horas over-night a 4° C, a seguir congelar por, no mínimo, uma hora a – 70°C. No momento do uso, após o descongelamento em temperatura ambiente, lavar a placa 3 vezes por 3 minutos com tampão fosfato, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), pH 7,4. Diluir os soros 1:400 e os sucos de carne 1:30 em PBS-T contendo 1% de albumina bovina (PBS-TA). Adicionar em triplicata a placa teste. Incubar a placa contendo os soros a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Após lavar a placa novamente como descrito acima. Bater a placa sobre uma superfície macia e absorvente afim de retirar o máximo possível da solução de lavagem. Distribuir em cada cavidade 100 μ L do soro conjugado com peroxidase (Anti-pig) na diluição 1:3000 em PBS -TA. Incubar em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, lavar a placa e colocar 100 μ L do revelador por cavidade. Preparar o revelador no momento do uso, adicionando 100 μ L do substrato e 3,5 μ L de H₂O₂ e 230 μ L de NaOH 10N para cada 10 mL de tampão revelador (solução reveladora). Deixar por 15 minutos em temperatura ambiente. Bloquear a intensificação da cor com acréscimo de 50 μ L por cavidade de ácido sulfúrico 2M (H₂SO₄). Agitar levemente e ler em espectrofotômetro com filtro 450nm e DO correspondente (ICN -TiterteK Multiskan). A leitura é realizada no programa ELISUAVE com padrões já definidos e instalados na máquina (computador) Magitronic, patrimônio número1205057 da Bacteriologia no Laboratório de Sanidade.

Anexo 3 - Resultados da sensibilidade, especificidade, coeficiente global e índice *Kappa* (X100 para manter na escala) para os resultados do suco de carne dos diferentes músculos em relação ao soro.

Diafragma

Ponto de corte	Especificidade	Sensibilidade	Coeficiente Geral	<i>Kappa</i>
0,050	25,64767	87,93103	52,36686	12,25
0,060	40,15544	81,72414	57,98817	20,33
0,070	50,7772	74,48276	60,94675	24,06
0,080	64,50777	68,27586	66,12426	32,16
0,090	71,50259	64,82759	68,63905	36,21
0,100	78,23834	58,96552	69,97041	37,77
0,110	83,16062	52,41379	69,97041	36,72
0,120	85,7513	49,31034	70,11834	36,5
0,130	87,3057	44,82759	69,08284	33,74
0,140	87,56477	42,75862	68,3432	31,94
0,150	88,60104	40,68966	68,04734	30,99
0,169	90,15	37,93	67,75	29,91
0,180	91,19	32,07	65,83	25,01

Sobrepaleta

Ponto de corte	Especificidade	Sensibilidade	Coeficiente Geral	<i>Kappa</i>
0,050	43,44262	78,79859	58,85978	21
0,060	55,19126	72,08481	62,55778	26,38
0,070	65,84699	65,37102	65,63945	30,88
0,080	74,04372	61,13074	68,41294	35,39
0,090	79,78142	55,83039	69,33744	36,35
0,100	82,78689	48,76325	67,95069	32,61
0,110	84,15301	44,16961	66,71803	29,5
0,120	85,51913	41,69611	66,40986	28,49
0,130	88,25137	38,16254	66,40986	27,9
0,140	89,89071	34,98233	65,94761	26,43
0,150	90,71038	32,50883	65,33128	24,78
0,169	91,53	30,04	64,71	23,11
0,180	92,35	24,73	62,87	18,45

ANEXO 4 - Concordância entre os resultados obtidos no teste de ELISA-LPS das amostras de suco de carne (diafragma e sobrepaleta), utilizando o ponto de corte experimental (OD=0,169).

Suco Sobrepaleta	Suco do Diafragma		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	95	18	113
Negativo	46	501	547
Total	141	519	660