SOLANGE ROSA TEIXEIRA

**Detecção de *Salmonella* spp. em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de
suínos no momento do abate**

São Paulo

2006

SOLANGE ROSA TEIXEIRA

Deteccção de *Salmonella* spp. em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de suínos no momento do abate

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andréa Micke Moreno

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1824
FMVZ

Teixeira, Solange Rosa

Detecção de *Salmonella* spp. em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de suínos no momento do abate / Solange Rosa Teixeira. — São Paulo : S. R. Teixeira, 2006.
50 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Patologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andréa Micke Moreno.

1. Fezes. 2. Linfonodos. 3. Carcaças. 4. Técnicas de diagnóstico animal. 5. Técnicas imunoenzimáticas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção de Salmonella spp. Em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de suínos no momento do abate", protocolo nº673/2005, utilizando peças de abatedouro de suínos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Detection of Salmonella spp. In feces, lymph nodes and carcass of pigs at slaughter house", protocol number 673/2005, utilizing parts from slaughterhouse (swine), under the responsibility of Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 06 de outubro de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TEIXEIRA, Solange Rosa

Título: Detecção de *Salmonella* spp. em amostras de fezes, linfonodos e carcaças
de suínos no momento do abate

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Isac e Jovelina, por me darem a vida e me ensinarem a vivê-la com dignidade, pela liberdade de escolher meus caminhos e por respeitar e apoiar todas as minhas escolhas.

A minha irmã Vanessa, grande amiga e companheira, por todas as formas de apoio.

Ao meu marido, meu grande amor, Denizard, por sua paciência e dedicação, por seu carinho e atenção, por fazer todos os nossos momentos especiais, por me fazer tão feliz.

A Deus, por tornar tudo isso possível.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Andréa Micke Moreno, pela orientação e apoio.

À equipe do Laboratório de Sanidade Suína da FMVZ/USP, pelo apoio na colheita e processamento das amostras.

À equipe do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução do Instituto Biológico, Dra. Margareth Genovez, Dra. Lília Paulin, Vanessa Castro, Wanessa Pacheco, Tatiana Gotti, Maria Antera, Maria Franco e às estagiárias Carolina, Nathália, Jéssica e Aline, pelo carinho e amizade e por todo apoio.

À Médica Veterinária Simone Miyashiro, pelas aulas de Biologia Molecular.

À Dra. Eliana Scarcelli Pinheiro e à Dra. Rosa Maria Piatti, por seus valiosos ensinamentos, pelo carinho e enorme apoio.

À Biomédica Fabíola Ribeiro Campos por dividir momentos de alegria e tristeza nessa jornada, pelos “toques” sempre importantes, pelo carinho, amizade e apoio.

À Dra. Maristela Vasconcellos Cardoso, pela paciência e confiança, pelas oportunidades tão importantes na minha vida profissional, por todo apoio e amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

Ao Instituto Biológico, por ser minha segunda casa.

RESUMO

TEIXEIRA, S. R. **Deteção de *Salmonella* spp. em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de suínos no momento do abate.** [Detection of *Salmonella* spp. in samples of faeces, lymph nodes and carcasses of swine in the moment of the slaughter] 2006. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Microrganismos do gênero *Salmonella* são eliminados em maior número por ocasião do abate, em função do estresse a que são submetidos os animais, pelo transporte da granja ao frigorífico e pelo reagrupamento anterior ao abate. Por este motivo, o estudo da presença de *Salmonella* spp. na linha de abate de suínos tem fundamental importância para o entendimento da epidemiologia deste agente e posterior melhoria no controle higiênico-sanitário, com conseqüente oferecimento ao consumidor de um produto de melhor qualidade. O presente trabalho teve como objetivo comparar o método tradicional de isolamento com o teste imunoenzimático (Assurance *Salmonella* EIA Gold - BioControl) a partir de amostras de fezes, linfonodos mesentéricos e carcaças de suínos abatidos no estado de São Paulo. Foram analisadas 92 amostras de fezes, 92 de linfonodos mesentéricos e 91 de suabes de carcaça. O teste imunoenzimático apresentou positividade de: fezes – 18,47% (17), linfonodos mesentéricos – 17,39% (16) e “swabs” de carcaça – 12,08% (11). Ao isolamento, foram observadas porcentagens de positivos em: fezes – 13,04% (12), linfonodos mesentéricos – 10,86% (10) e “swabs” de carcaça – 2,19% (2). A concordância entre os resultados obtidos através dos dois métodos foi fraca. O teste imunoenzimático se mostrou mais eficiente na pesquisa direta do agente quando comparado ao isolamento bacteriano, o que pode ser justificado pela alta sensibilidade das técnicas imunoenzimáticas e pela dependência da viabilidade das estirpes bacterianas para que as mesmas sejam isoladas em meios de cultura. A necessidade de métodos mais rápidos e menos laboriosos de detecção tem levado a avanços significativos no desenvolvimento de pesquisas e comercialização de kits de diagnóstico baseados em técnicas sorológicas, imunoabsorção enzimática e hibridização de ácidos nucleicos.

Palavras-chave: Fezes. Linfonodos. Carcaças. Técnicas de diagnóstico animal. Técnicas imunoenzimáticas.

ABSTRACT

TEIXEIRA, S. R. **Detection of *Salmonella* spp. in samples of faeces, lymph nodes and carcasses of swine in the moment of the slaughter** [Detecção de *Salmonella* spp. em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de suínos no momento do abate]. 2006. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Microorganisms of the *Salmonella* genera are eliminated in major number by occasion of the slaughter, in function of the stress that the animals are submitted for the transport of the farm to the slaughterhouse and for the reassemblage previous to the slaughter. For this reason, the study of the presence of *Salmonella* spp. in swine line of slaughter has fundamental importance for the understanding of epidemiology of this agent and subsequent improvement in the hygienic-sanitarium control, with consequent offer to the consumer of a product with better quality. The present study had as objective to compare the traditional method for isolation with immunoenzymatic assay (Assurance *Salmonella* EIA Gold - BioControl) from faeces samples, mesenteric lymph nodes and carcasses of slaughtered swine in São Paulo State. Ninety two faeces samples, 92 mesenteric lymph nodes and 91 carcass swabs were analyzed. The immunoenzymatic assay presented positivity of: faeces – 18,47% (17/92), mesenteric lymph nodes – 17,39% (16/92) and “swabs” of carcass – 12,08% (11/91). The isolation showed: faeces – 13,04% (12/92) of positives samples, mesenteric lymph nodes – 10,86% (10/92) of positive samples and “swabs” of carcass – 2,19% (2/91) of positive samples. The agreement among the results obtained by the two methods was weak. The immunoenzymatic assay was shown more efficient when compared to the bacterial isolation, what can be justified for the high sensibility of immunoenzymatics techniques and the dependence of the bacterial sample viability for the isolation. The need of faster and less laborious methods of detection has been taking to significant progresses in the development of researches and commercialization of diagnosis kits based on sorological techniques, enzymatic immunoabsorbent and nucleic acid hybridization.

Word-key: Faeces. Lymph nodes. Carcasses. Techniques of animal diagnosis. Techniques immunoenzymatics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre os valores de kappa e os graus de concordância	31
Tabela 2 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro A.....	32
Tabela 3 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro B	33
Tabela 4 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro C	33
Tabela 5 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas nos abatedouros A, B e C	33
Tabela 6 - Frequência dos sorotipos de <i>Salmonella</i> identificados nos diferentes tipos de amostras provenientes dos abatedouros A, B e C	37
Tabela 7 - Valor de kappa obtido a partir da comparação entre os resultados obtidos nas duas técnicas utilizadas	38
Tabela 8 - Valor de kappa obtido a partir da comparação entre os resultados obtidos nas duas técnicas utilizadas de acordo com o tipo de amostra analisada	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro A	34
Gráfico 2 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro B	34
Gráfico 3 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro C	35
Gráfico 4 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas nos abatedouros A, B e C	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo da leitura dos resultados do teste imunoenzimático (Assurance <i>Salmonella</i> EIA Gold)	36
Figura 2 - Exemplo da leitura dos resultados do teste imunoenzimático (Assurance <i>Salmonella</i> EIA Gold)	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
3 OBJETIVOS	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Amostras	25
4.2 Isolamento bacteriano	25
4.3 Sorotipagem dos isolados	26
4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase	27
4.4.1 Extração do DNA bacteriano	27
4.4.2 Amplificação do DNA bacteriano	28
4.4.3 Detecção do produto amplificado	29
4.5 Realização do teste imunoenzimático (Assurance <i>Salmonella</i> EIA Gold) ..	29
4.5.1 Preparação das amostras e enriquecimento	29
4.5.2 Realização do teste	30
4.6 Análise estatística dos resultados	31
5 RESULTADOS	32
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, a suinocultura brasileira vem se comparando aos grandes centros produtores da América do Norte e da Europa, com rápidas modernização e profissionalização que resultam em produção de carne de altíssima qualidade, destinada a atender aos mais exigentes mercados nacionais e internacionais. Por este motivo, a importância da presença ou ausência de determinadas enfermidades nas unidades de produção tem se tornado cada vez maior, uma vez que as doenças diminuem a produtividade e a lucratividade do sistema (SOBESTIANSKY et al., 2001).

Os clássicos agentes infecciosos, vírus, bactérias, fungos, espiroquetas, protozoários e helmintos ainda estão presentes e são motivos de preocupação na exploração moderna dos animais, principalmente quando se está aumentando, cada vez mais, a densidade animal por área. A densidade da população animal deve ser vista em todo o território nacional e não só na propriedade. Os países com uma população animal altamente concentrada possuem condições favoráveis para a propagação desses agentes, desencadeando epidemias de grande porte e longa duração. Outro aspecto a considerar é a transformação, em escala mundial, de um maior número de rebanhos pequenos em um número menor de propriedades com grandes rebanhos, o que favorece a manutenção de determinadas doenças transmissíveis, principalmente as respiratórias, digestivas e por contato direto (MOREIRA, 2003).

A incidência global de doenças causadas por alimentos é de difícil estimativa. No entanto, no ano de 2000 cerca de 2,1 milhões de pessoas morreram por doenças diarréicas e em uma alta proporção destes casos a causa é atribuída à água e alimentos contaminados (WHO, 2002).

A demanda por alimentos seguros tem sido um processo crescente no mercado. A ausência de microrganismos patogênicos, principalmente aqueles causadores de zoonoses, nos produtos de origem animal, é uma exigência de regulamentos nacionais e internacionais. Entre esses microrganismos, a *Salmonella* tem sido uma preocupação, ao longo dos anos, na indústria de produtos avícolas e vem ganhando importância também na cadeia de produção de suínos. A partir da crescente ênfase na segurança de produtos cárneos que chegam ao consumidor, tem-se estimulado a identificação de meios para reduzir ou eliminar *Salmonella* spp. antes do abate, uma vez que a redução das taxas de infecção pré-abate resulta em aumento na segurança dos produtos suínos (FUNK et al., 2001).

Além da sua importância em saúde pública, verifica-se que, a *Salmonella* pode levar a perdas econômicas também no sistema de produção de suínos. Dados indicam que a infecção pelo agente pode aumentar o custo de produção, devido, principalmente, a redução no ganho de peso e conversão alimentar, aumento no uso de antibióticos e aumento na mortalidade (GORTON et al., 1996).

A salmonelose é uma doença infecciosa que atinge, principalmente, animais jovens. Manifesta-se por septicemia aguda, por enterite aguda ou crônica, ou por forma clínica inaparente. A maioria dos surtos naturais é conseqüência de uma debilitação do animal, por doença intercorrente ou por situações estressantes (SOBESTIANSKY et al., 1999).

A necessidade de métodos mais rápidos e menos laboriosos de detecção tem levado a avanços significativos no desenvolvimento de pesquisa e comercialização de kits de diagnóstico baseados em técnicas sorológicas, imunoabsorção enzimática, hibridização de ácidos nucleicos, entre outras (D'ÁOUST et al., 1990).

O controle das infecções depende cada vez mais de um incremento na velocidade e precisão dos testes diagnósticos, principalmente para monitorização da produção animal, fabricação de alimentos e produto final. Para este fim, uma série de novas técnicas têm sido desenvolvidas, destacando-se a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). A PCR vem sendo empregada com êxito para detecção de vários microrganismos em diferentes matrizes, como carnes e leite (SANTOS et al., 2001).

Por este motivo, o estudo da presença de *Salmonella* spp. na linha de abate de suínos tem fundamental importância para o entendimento da epidemiologia destes agentes e posterior melhoria no controle higiênico-sanitário e, conseqüentemente, oferecimento ao consumidor de um produto de melhor qualidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As bactérias do gênero *Salmonella* são patógenos de destacada importância em saúde pública, pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são gram-negativas, anaeróbias facultativas e habitam o trato intestinal de seres humanos e animais (HOLT et al., 1994; VARNAM; EVANS, 1991) são móveis ou não, positivas à catalase e negativas à oxidase, produzem ácidos e podem formar gases na fermentação da glicose, reduzem nitrato a nitrito (HAJMEER, 2005). São isoladas de uma grande variedade de hospedeiros, especialmente aves e suínos, mas também de seres humanos, alimentos e do meio ambiente. Assim, essas bactérias são potencialmente patogênicas aos animais domésticos e selvagens e também aos seres humanos (HOLT et al., 1994).

A classificação atual do gênero *Salmonella*, que é baseada em características bioquímicas, divide o gênero em duas espécies: *Salmonella enterica*, que está subdividida em seis subespécies, e *Salmonella bongori*. Na rotina, utiliza-se um esquema de identificação denominado esquema de Kauffmann & White, que divide o gênero em sorotipos, tendo por base a composição antigênica das salmonelas com relação aos seus antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar) (TRABULSI et al., 1999).

O gênero é de grande importância, estando envolvido em processos tóxicos e infecciosos. É altamente patogênico e virulento, e tem enorme facilidade de se relacionar com o organismo hospedeiro (CCA/UFES, 2005).

As doenças causadas por *Salmonella* spp. dividem-se em dois grupos, segundo a divisão proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), utilizada em

seu sistema de estatísticas sanitárias: o primeiro composto pela febre tifóide, causada por *Salmonella* Typhi, e as febres entéricas, causadas por *Salmonella* Paratyphi (A, B e C); o segundo composto pelas enterocolites ou salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas, que são agentes mais freqüentemente veiculados por alimentos (ICMSF, 2000).

O estabelecimento dos sintomas de salmonelose depende do sorotipo de *Salmonella* spp. envolvido, da competência dos sistemas de defesa inespecíficos e específicos do indivíduo afetado e das características do alimento envolvido (LANDGRAF; FRANCO, 1996).

Existem atualmente 2.324 sorotipos de *Salmonella*, entre os quais 1.367 pertencem à subespécie *entérica*. Dentro desta subespécie estão contidos cerca de 99,5% dos sorotipos mais comumente isolados (TRABULSI et al., 1999).

Salmonella Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são os sorotipos de *Salmonella* spp. mais freqüente em nosso meio e causam enfermidade de distribuição mundial (ACHA; SZYFRES, 1986; FURTADO et al., 1998; GIL-SETAS et al., 2002; SKIRROW; BLASER, 1995).

A incidência real de salmonelas nas toxinfecções alimentares é desconhecida, uma vez que, freqüentemente, pequenos surtos não são relatados às autoridades de Saúde Pública.

Os surtos de salmonelose humana podem ter um custo bastante elevado, pois devem ser computados os custos médicos e as perdas de produtividade, de modo que a legislação proíbe a existência deste microrganismo em 25g ou ml de alimento (BRASIL, 1993)

O agente sobrevive durante meses no ambiente, suporta dessecação e congelamento, mas é bastante sensível à luz solar e à maioria dos desinfetantes (SOBESTIANSKY et al., 1999).

As salmonelas distribuem-se por todo o mundo. A multiplicação do agente fora do organismo hospedeiro é facilitada pelas altas temperaturas e pelos materiais protéicos. Portanto, os pontos-chave dos contágios por salmonelas são as regiões tropicais e subtropicais, assim como os lugares com grandes concentrações de animais e de pessoas (CCA/UFES, 2005).

Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais freqüentemente encontrados em surtos de toxinfecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (ACHA; SZYFRES, 1986).

Em trabalho conduzido do Rio Grande do Sul, foi verificada a ocorrência de surtos de salmonelose em 99 relatórios de investigação; a salmonelose correspondeu a 74,7% (NADVORNY et al., 2004). No Estado do Rio de Janeiro, em estudo de 53 surtos que acometeram 461 pessoas, a *Salmonella* spp. foi responsável por 7% e atingiu maior número de indivíduos (15,8%), inclusive um óbito (FERNANDEZ et al., 2001). Zhao et al. (2001) relatam a ocorrência de 1,4 milhões de casos de salmonelose em seres humanos nos Estados Unidos.

Em pesquisa com diversos alimentos enviados para um laboratório na cidade de São Paulo/SP, nas 140 amostras isoladas de *Salmonella* spp. havia 17 sorotipos, onde *S. Enteritidis* esteve presente em dez dos 12 tipos de alimentos pesquisados (LÍRIO et al., 1997).

Estudo reunindo casos em 15 países da Europa notificou 59.965 isolados de *Salmonella* spp, em 1993, e 55.911, em 1995 (ROWE; BARTLETT, 1997). Os

autores ainda ressaltam que a infecção por *S. Typhimurium* é um problema emergente.

O suíno pode sofrer infecção por uma grande variedade de sorotipos. Entretanto, a doença clínica tem sido descrita, principalmente, nas infecções pelas espécies *S. Choleraesuis* e *S. Enteritidis* sorotipo *Typhimurium*. Ocasionalmente, outros sorotipos da espécie *S. Enteritidis*, tais como *S. Thyphimurium*, *S. Dublin*, *S. Derby*, *S. Anatum* e *S. Newport*, podem provocar a doença (SOBESTIANSKY et al., 1999).

A entrada da *Salmonella* spp. na granja é quase sempre explicada pela introdução de animais portadores que, em situações de estresse, passam a excretá-la (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Além dessa fonte de infecção, a ocorrência de contaminação de matérias-primas e rações representa uma fonte importante da difusão do agente. Nesse caso, as principais fontes de infecção são as proteínas de origem animal (farinha de carne e osso) (SOBESTIANSKY et al., 1999).

As salmonelas presentes em rações e ingredientes, mesmo em pequeno número, podem estabelecer infecção, tanto no homem como em suínos. O suíno, por sua vez, é reconhecido como reservatório de salmonelas e funciona na cadeia epidemiológica como fonte de infecção para o ser humano, tanto pela eliminação de salmonelas nas fezes, como através da contaminação de carcaças e produtos derivados (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Suínos portadores assintomáticos constituem um ponto crítico na cadeia epidemiológica da infecção por *Salmonella*, pois elimina o microrganismo intermitentemente, através das fezes, no ambiente (SWANENBURG, 2000). Estes

animais podem, ainda, chegar até a linha de abate e, desta forma, contaminar o produto de forma cruzada durante o processamento (ANDERSON et al., 2001).

Existe um aumento na excreção da *Salmonella* spp. por ocasião do abate, relacionado com a liberação e excreção de bactérias por animais portadores, em função do estresse a que são submetidos pelo transporte da granja ao frigorífico e pelo reagrupamento antes do abate (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Os sorotipos de *Salmonella* importantes para a segurança alimentar estão associados a um grande número de hospedeiros, tornando importante a disseminação da infecção entre diferentes espécies.

A introdução e subsequente transmissão da infecção dentro do rebanho e entre rebanhos são os fatores mais importantes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* em suínos (LO FO WONG et al., 2002). Isto indica que o contato entre animais provenientes de diferentes granjas, desde o agrupamento dos animais até o abate e resfriamento de carcaças, é a chave para a introdução e disseminação de *Salmonella* na cadeia de produção, já que uma granja com alta prevalência de *Salmonella* pode ser fonte de contaminação para várias granjas no estágio seguinte (VAN DER GAAG et al., 2003).

Vários fatores de estresse, manejo, estado imunológico ou nutricional e outras doenças intercorrentes influenciam no desenvolvimento da salmonelose.

A taxa de morbidade nos surtos de salmonelose geralmente é alta em suínos, ovinos e bovinos, algumas vezes alcançando 50% ou mais. Em todas as espécies a taxa de mortalidade pode chegar a 100% se o tratamento não for instituído (CCA/UFES, 2005).

Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais freqüentemente encontrados em

surtos de toxinfecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento (CCA/UFES, 2005).

No que diz respeito aos riscos à saúde, nos países desenvolvidos as diarreias agudas causadas por água ou alimentos contaminados, constituem a principal síndrome das febres tifóide, paratifóide e das salmoneloses, que têm sido responsáveis por elevada taxa de morbidade e mortalidade infantil (CCA/UFES, 2005).

Em seres humanos, a febre tifóide é a forma clássica de salmonelose, e permanece ainda hoje com um grande problema de saúde mundial. A apresentação mais branda da salmonelose em humanos é a intoxicação alimentar resultante da ingestão de alimentos contaminados. Em animais, as infecções são frequentemente conhecidas como paratifóides. A salmonelose é uma doença bacteriana que afeta todas as espécies animais, mas com maior frequência, bovinos, eqüinos e suínos. É uma zoonose, e animais infectados servem de reservatório para a infecção em humanos (CCA/UFES, 2005).

O diagnóstico baseia-se no isolamento da *Salmonella* spp. Através de exames bacteriológicos. No animal vivo, o exame pode ser realizado a partir de “swabs” retais. Quando se trata de um grupo de animais, pode-se fazer um “pool” de fezes frescas (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Por ocasião da necropsia, o material a ser coletado inclui fezes, de preferência do íleo e fragmentos do baço (uma vez que, na forma septicêmica é comum o isolamento da *Salmonella* do baço e a negatividade de isolamento a partir do intestino ou de seu conteúdo) (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Verifica-se que a cultura de fezes tem sido considerada a técnica de referência para definir o “status” de infecção por *Salmonella* em animais (GALLAND

et al., 2000). No entanto, os testes bacteriológicos de fezes indicam apenas se a bactéria está sendo excretada pelo suíno no momento da amostragem. Tal limitação pode ser agravada pela baixa sensibilidade do método de cultura (NIELSEN et al., 1995), pela baixa sensibilidade de uma única amostra para detectar *Salmonella* (VAN WINSEN et al., 2001) e pela excreção fecal intermitente de baixo número de *Salmonella* spp. por portadores sem sinais clínicos (GALLAND et al., 2000).

Para pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos, o método recomendado pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM), American Public Health Association (APHA), Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o método clássico de cultivo, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção deste microrganismo, mesmo em alimentos com microbiota competidora muito maior que a população de *Salmonella* spp., alimentos em que as células se encontrem em número muito reduzido e/ou alimentos em que as células se encontrem injuriadas pela técnica de preservação, como a aplicação de calor, congelamento, secagem, salga, cura, entre outros (ECKNER et al., 1992).

O isolamento clássico de *Salmonella* spp. divide-se em quatro etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento em caldo seletivo, plaqueamento seletivo diferencial e confirmação. Portanto, os procedimentos de cultivo padrão para o isolamento em alimentos são trabalhosos e requerem um mínimo de quatro dias para se obter evidências presuntivas de contaminação (D'ÁOUST et al., 1990).

Nos últimos anos vários testes rápidos para detecção de *Salmonella* têm sido descritos. No site da "Association of Analytical Communities," (AOAC INTERNATIONAL, <http://www.aoac.org>) são descritos mais de 40 kits comerciais

destinados a detecção do agente. Dentre estes testes 11 foram testados por laboratórios associados e recebem o título de “*AOAC Official Method*”.

O ensaio imunoenzimático (Assurance *Salmonella* Gold EIA) empregado no presente estudo é certificado pela AOAC como um método oficial (registro 999.08) para detecção de *Salmonella* em amostras de alimentos, seus ingredientes e amostras ambientais. O ensaio imunoenzimático emprega um anticorpo específico para o agente, ligado a uma enzima. Esta enzima catalisa uma reação colorimétrica quando exposta ao substrato adequado. O teste em questão foi formulado para permitir a avaliação visual do resultado ou avaliação através de espectrofotômetro (FELDSINE et al., 2000). Relatos na literatura da utilização deste ensaio imunoenzimático em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de suínos são raros.

3 OBJETIVOS

- Isolar *Salmonella* spp. a partir de fezes, linfonodos mesentéricos e carcaças de suínos abatidos no Estado de São Paulo.
- Identificar os sorotipos de *Salmonella* spp. Isolados nos animais abatidos.
- Detectar *Salmonella* spp. através do teste imunoenzimático (Assurance *Salmonella* EIA Gold) a partir das amostras acima citadas.
- Comparar os dois métodos para detecção do agente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados três abatedouros do Estado de São Paulo para colheita de amostras no momento do abate.

4.1 Amostras

Foram examinadas 92 amostras de fezes, 92 amostras de linfonodo mesentérico e 91 “swabs” de carcaça, totalizando 275 amostras colhidas em três abatedouros do Estado de São Paulo, entre março e agosto de 2005.

As amostras de fezes e linfonodos mesentéricos, colhidas na linha de abate, foram acondicionadas em coletores plásticos estéreis, mantidos sob refrigeração até o momento do processamento.

Os “swabs” foram realizados na região dorsal da carcaça, acondicionados em meio de transporte e mantido sob refrigeração até o processamento.

4.2 Isolamento bacteriano

Para o isolamento de *Salmonella* spp. 1g de fezes, tecido do linfonodo ou o “swab” de carcaça foi adicionado em 9ml de caldo peptonado tamponado e incubado

a 37°C por seis a oito horas. Após este período, 1ml deste caldo foi semeado em 9ml de caldo Tetrationato e incubado a 37°C por 24 horas.

Após o enriquecimento seletivo, uma alçada do caldo foi semeada em ágar McConkey e meio XLT4 e incubados a 37°C por 24 horas. As colônias que apresentaram características morfológicas sugestivas de pertencerem ao gênero *Salmonella* foram submetidas às provas bioquímicas e à PCR, e foram enviadas para sorotipagem na FIOCRUZ- RJ.

4.3 Sorotipagem dos isolados

As amostras estocadas em ágar nutriente foram enviadas ao Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro) para realização da sorotipagem. Este método se caracteriza pela determinação das estruturas antigênicas somáticas e flagelares, através do processo de soro-aglutinação rápida (COSTA; HOFER, 1972). Nesta etapa foram utilizados antissoros polivalentes e monovalentes, somáticos e flagelares, produzidos pelo Laboratório de Enterobactérias, IOC/FIOCRUZ.

4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase

As colônias que apresentaram características morfológicas e bioquímicas sugestivas de pertencerem ao gênero *Salmonella* foram submetidas à PCR.

4.4.1 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizada a partir de água peptonada tamponada incubada a 37°C por seis a oito horas. O protocolo para extração de DNA detalhado a seguir foi realizado segundo descrito por Boom et al. (1990).

Foram adicionados 200µl do meio de enriquecimento a um microtubo contendo 1ml do tampão de lise (Tiocianato de Guanidina 120g; Triton 100X 1ml; Tris-HCl 0,1M [pH 6,4] 111,2ml; EDTA 0,5M 8,8ml) e 40µl da suspensão carreadora (Terra Diatomácea 1gr; HCl 50µl; água ultrapura 5ml).

O microtubo contendo a amostra foi agitado por um minuto e deixado sobre a bancada por dez minutos. Passado este período o microtubo foi centrifugado por dois minutos a 14.000rpm. O sobrenadante obtido foi descartado e ao pélete formado foi adicionado 1ml do tampão de lavagem (Tiocianato de Guanidina 120g, Tris-HCl 0,1M [pH 6,4] 100ml). O microtubo foi então agitado por 30 segundos e centrifugado por dois minutos, o sobrenadante obtido foi descartado e o pélete novamente submetido a este procedimento. O pélete obtido após esta etapa foi submetido a duas lavagens com 500µl de etanol 70% (dois minutos a 14.000rpm) e

uma lavagem com 500µl de acetona (dois minutos a 14.000rpm). Os microtubos contendo o pélete tratado com acetona foram mantidos em estufa a 37°C por 20 minutos. Após a completa secagem do pélete foram adicionados 100µl de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]) ao microtubo e este, agitado por um minuto e mantido a 56°C por dez minutos. Passado este tempo o microtubo foi centrifugado por cinco minutos a 14.000rpm e o sobrenadante contendo o DNA, armazenado em tubos limpos e numerados. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até sua utilização na PCR.

4.4.2 Amplificação do DNA bacteriano

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos para *Salmonella* spp. descritos por Stone et al. (1994).

Para a reação em cadeia da polimerase foi adicionado a um microtubo 40pmoles de cada primer, 0,5 unidade de Taq polimerase, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0.001% gelatina, 200µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 5µl da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 25µl Para amplificação do DNA de *Salmonella* spp. o termociclador foi programado para um ciclo a 95°C por cinco minutos, 35 ciclos de 95°C por um minuto, 55°C por um minuto, 72°C por um minuto e um ciclo final de 72°C por cinco minutos.

A cada amplificação realizada foram adicionados um controle positivo (contendo o DNA do agente) e um controle negativo.

4.4.3 Detecção do produto amplificado

Os produtos de PCR (10µl) foram separados por eletroforese em gel de Agarose 1,5%, corados com Brometo de Etídio (10µg/ml) e fotografados sob luz ultravioleta. O marcador de pares de bases utilizado foi o 100bp DNA ladder.

4.5 Realização do teste imunoenzimático (Assurance *Salmonella* EIA Gold)

O Assurance *Salmonella* EIA Gold (BioControl) é um método qualitativo para detecção de espécies móveis e não móveis de *Salmonella* spp. Trata-se de um método oficial aprovado pela AOAC INTERNATIONAL (Association of Official Analytical Communities) para utilização em todos os tipos de alimentos, ingredientes e amostras ambientais.

4.5.1 Preparação da amostra e enriquecimento

a) Pré-enriquecimento: Foi adicionada 1g da amostra em 9ml de água peptonada tamponada com Novobiocina e incubado por 24 horas a 35-37°C.

b) Enriquecimento seletivo: 1,0ml deste pré-enriquecimento foi transferido para 10ml de caldo Tetrationato (TT) e 0,1ml para 10ml de Rappaport Vassiliadis (RV).

Os caldos TT e RV foram incubados por cinco a oito horas a 42 °C em banho-maria.

c) Pós-enriquecimento: Após a incubação, 0,5ml de RV e 1ml de TT foram transferidos para um único tubo contendo 10ml de caldo Trypticase Soja com Novobiocina e este, incubado por 16 a 20 horas a 42 °C em banho-maria.

d) Extração: 1ml do caldo foi transferido para um tubo limpo onde foi acrescentado 0,1ml do reagente de extração. O caldo foi agitado e inativado a 100°C por dez minutos.

4.5.2 Realização do teste

1. Foi selecionado o número de cavidades necessárias para as amostras, controle positivo e branco, posicionando-as na bandeja suporte.
2. 100µl de cada amostra pré-enriquecida nas condições do protocolo e 100µl do controle positivo foram adicionados em cada cavidade da microplaca, deixando a cavidade do branco vazia.
3. As microplacas foram incubadas em estufa a 35-37°C durante 30 minutos.
4. Após o período de incubação, as microplacas foram enxaguadas três vezes com a solução de lavagem, para retirar o excesso da amostra.
5. Foram adicionados 100µl do conjugado em cada cavidade das microplacas.
6. As microplacas foram incubadas em estufa a 35-37°C durante 30 minutos.

7. As microplacas foram enxaguadas três vezes com a solução de lavagem, para retirar o excesso do conjugado.
8. Foram adicionados 100µl do substrato em cada cavidade das microplacas.
9. A leitura visual das microplacas foi efetuada utilizando o padrão de cores que acompanha o kit. Amostras positivas apresentaram coloração azul (Figuras 1 e 2).

4.6 Análise estatística dos resultados

A concordância entre o isolamento bacteriano e o teste imunoenzimático foi analisada através do teste de kappa (programa SPSS 9.0 para Windows - SPSS Inc). O resultado foi analisado segundo os critérios descritos por Pereira (1995) e apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Relação entre os valores de kappa e os graus de concordância

VALOR DE KAPPA	CONCORDÂNCIA
< 0,00	Ruim
0,00 - 0,20	Fraca
0,21 - 0,40	Sofrível
0,41 - 0,60	Regular
0,61 - 0,80	Boa
0,81 - 0,99	Ótima
1	Perfeita

Fonte: Pereira – Rio de Janeiro - 1995

5 RESULTADOS

Dentre as amostras de fezes, linfonodos e “swabs” de carcaça examinadas, 24/275 (8,72%) foram positivas para o isolamento de *Salmonella* spp. e 44/275 (16%) foram positivas no teste imunoenzimático (Assurance *Salmonella* EIA Gold). Os 26 isolados selecionados para sorotipagem foram classificados em seis sorotipos: *S. Typhimurium* – 30,76%, *S. London* – 26,92%, *S. Anatum* – 23,07%, *S. Agona* – 3,84%, *S. Enteritidis* – 3,84%, *S. enterica* subsp. *enterica* (04,5;1.2) – 7,60%.

Os resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático nos três abatedouros examinados, são apresentados nas tabelas 2 a 5 e gráficos 1 a 4.

Tabela 2 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro A - São Paulo - 2005

AMOSTRA	AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Salmonella</i> spp.	
	Isolamento bacteriano N (%)	EIA N (%)
Fezes	4/30 (13,33)	7/30 (23,33%)
Suabe de carcaça	1/30 (3,33)	6/30 (20%)
Linfonodo mesentérico	5/30 (16,66)	2/30 (6,66%)

Tabela 3 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro B - São Paulo - 2005

AMOSTRA	AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Salmonella</i> spp.	
	Isolamento N (%)	EIA N (%)
Fezes	5/31 (16,12)	4/31 (12,90)
Suabe de carcaça	0/31 (0)	1/31 (3,22)
Linfonodo mesentérico	4/31 (12,90)	8/31 (25,80)

Tabela 4 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro C - São Paulo - 2005

AMOSTRA	AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Salmonella</i> spp.	
	Isolamento bacteriano N (%)	EIA N (%)
Fezes	3/31 (9,67)	6/31 (19,35)
Suabe de carcaça	1/30 (3,33)	4/30 (13,33)
Linfonodo mesentérico	1/31 (3,22)	6/31 (19,35)

Tabela 5 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas nos abatedouros A, B e C - São Paulo - 2005

AMOSTRA	AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Salmonella</i> spp.	
	Isolamento bacteriano N (%)	EIA N (%)
Fezes	12/92 (13,04)	17/92 (18,47)
Suabe de carcaça	2/91 (2,19)	11/91 (12,08)
Linfonodo mesentérico	10/92 (10,86)	16/92 (17,39)

Gráfico 1 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro A

Gráfico 2 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro B

Gráfico 3 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas no abatedouro C

Gráfico 4 - Resultados obtidos através do isolamento bacteriano e do teste imunoenzimático, nos diferentes tipos de amostras examinadas nos abatedouros A, B e C

Figura 1 - Exemplo da leitura dos resultados do teste imunoenzimático (Assurance *Salmonella* EIA Gold)

Figura 2 - Exemplo da leitura dos resultados do teste imunoenzimático (Assurance *Salmonella* EIA Gold)

Os sorotipos identificados nos diferentes tipos de amostras examinadas são descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Frequência dos sorotipos de *Salmonella* identificados nos diferentes tipos de amostras provenientes dos abatedouros A, B e C - São Paulo - 2005

SOROTIPOS	FEZES	CARCAÇA	LINFONODO	TOTAL N (%)
S. Typhimurium	3	2	3	8/26 (30,76)
S. London	3	0	4	7/26 (26,92)
S. Anatum	3	0	3	6/26 (23,07)
S. Angona	1	0	0	1/26 (3,84)
S. Enteritidis	1	0	0	1/26 (3,84)
<i>S. entérica</i> (04,5::1.2)	2	0	0	2/26 (7,69)
Amostra rugosa	1	0	0	1/26 (3,84)

Na tabela 7, são comparados os resultados obtidos no isolamento bacteriano e no teste imunoenzimático para os três tipos de amostras examinadas, nos três abatedouros. A tabela 8 apresenta esta comparação de acordo com o tipo de material avaliado.

Tabela 7 - Valor de kappa obtido a partir da comparação entre os resultados obtidos nas duas técnicas utilizadas considerando o total de amostras - São Paulo - 2005

AMOSTRAS	ISOLAMENTO +	ISOLAMENTO -	VALOR DE K (kappa)
ELISA +	10/275	34/275	0,20
ELISA -	14/275	217/275	

Tabela 8 - Valor de kappa obtido a partir da comparação entre os resultados obtidos nas duas técnicas utilizadas de acordo com o tipo de amostra analisada - São Paulo - 2005

AMOSTRAS	ISOLAMENTO +	ISOLAMENTO -	VALOR DE K (kappa)
Fezes			
EIA +	5/92	12/92	0,23
EIA -	7/92	68/92	
Suabe de carcaça			
EIA +	1/91	10/91	0,12
EIA -	1/91	79/91	
Linfonodo mesentérico			
EIA +	4/92	15/92	0,22
EIA -	3/92	70/92	

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos reportam a freqüência ou em alguns casos a prevalência de suínos portadores de diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. De forma geral, constata-se uma grande variação nos resultados descritos, sendo observadas frequências de 3,5% até 67,6% (BESSA et al., 2001). Esta variabilidade nos dados pode estar relacionada a diferenças nos índices de portadores devido ao tipo de criação, alimentação e fatores regionais, assim como pela influência do método de amostragem realizada nos referidos estudos e técnica de isolamento ou detecção empregada.

Em estudo conduzido com suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul, entre setembro de 1999 e julho de 2000, Bessa et al. (2001), analisaram amostras de conteúdo intestinal e de linfonodos mesentéricos de 300 suínos. Foi possível isolar *Salmonella* spp. em 167 animais, resultando numa prevalência de 55,56% de animais positivos no momento do abate. Também no Rio Grande do Sul, Castagna et al. (2003), encontraram uma frequência média de suínos positivos para *Salmonella* em linfonodos submandibulares/tonsilas e conteúdo intestinal de 75% (60/80). Jayarao et al. (1990), em Budapeste, e Damman et al. (1999), nos Estados Unidos, relatam 48% e 67,6% dos animais examinados positivos para *Salmonella* spp., respectivamente.

Os valores descritos nos referidos estudos são superiores à freqüência obtida nos abatedouros avaliados no Estado de São Paulo no presente trabalho. Considerando-se os resultados aqui descritos através do isolamento bacteriano em

fezes, carcaça e linfonodo, foram identificados 23,91% (22/92) dos animais positivos para o agente. Através da EIA obtiveram-se 44,56% (41/92) animais positivos.

Estes valores relativamente baixos podem refletir as condições sanitárias dos rebanhos avaliados, condições higiênicas das linhas de abate, curtos períodos em baias de espera, assim como o baixo número de animais abatidos por dia nestes estabelecimentos, quando comparados aos abatedouros da região sul do país, amostrados por Bessa et al. (2001).

Em pesquisa realizada na Holanda, analisando a presença de *Salmonella* spp. em 406 rebanhos de terminação, constataram que 9% dos rebanhos apresentaram-se negativos, 69,7% apresentaram baixa prevalência, 21,7% prevalência moderada e 8,6% alta prevalência (WOLF et al., 2001). Não foi objeto do presente estudo avaliar os níveis de contaminação dos rebanhos suínos pelo agente, no entanto pode-se sugerir que a frequência de animais eliminando o agente nos rebanhos amostrados no Estado de São Paulo, através dos resultados obtidos nos abatedouros foi relativamente baixa.

Na literatura consultada é possível observar que os estudos de prevalência têm sido realizados freqüentemente, com resultados obtidos a partir do isolamento em linfonodos mesentéricos, uma vez que esses são considerados indicadores do estado de portador do animal. Por outro lado, as fezes têm sido amostradas, principalmente em estudos conduzidos em granjas, e demonstram o grau de eliminação do agente pelos animais. No frigorífico, o conteúdo intestinal pode ser uma importante fonte de contaminação das carcaças (BESSA et al., 2004). A presença do agente na carcaça indicaria o risco de contaminação do consumidor e pode estar sendo ocasionada por amostras de *Salmonella* presentes em fezes, linfonodo ou ambiente. Por estas razões, optou-se no presente estudo pela coleta,

tanto de linfonodos mesentéricos, como de conteúdo intestinal e esfregaço de carcaça para determinação da presença de *Salmonella* spp. em animais ao abate.

Bessa et al. (2001), relatam frequências de 17,6% (53/300) apenas nos linfonodos mesentéricos, 18,3% (55/300) apenas no conteúdo intestinal e 19,6% (59/300) em ambos os materiais colhidos. Ainda, considerando separadamente os dois materiais analisados os autores relatam que 37,3% dos animais apresentavam *Salmonella* spp. nos linfonodos mesentéricos e 37,9% nas fezes. Castagna et al., em 2003, relatam uma frequência de isolamento de *Salmonella* em linfonodos submandibulares/tonsilas (LT) e conteúdo intestinal (CI) de 62,5% e 87,5% respectivamente. Destes animais, 27 (45%) apresentaram *Salmonella* spp. simultaneamente em LT e CI. Em 23 (38%) animais foi isolada *Salmonella* spp. apenas de LT e em dez (17%) animais apenas em CI.

Em estudo conduzido na Holanda, analisando-se amostras de fezes de suínos, linfonodos mesentéricos e tonsilas, no momento do abate, foram detectadas, respectivamente, 25,6%, 9,3% e 19,6% das amostras contaminadas (SWANENBURG et al., 2001).

No presente estudo observou-se 13% e 10,8% das amostras de fezes e linfonodo positivas para o isolamento do agente. No EIA a frequência de positividade foi de 18,5% e 17,4% em fezes e linfonodos respectivamente. Estes dados confirmam a tendência de resultados similares entre fezes e linfonodo mesentérico observada nos estudos nacionais citados.

Poucos estudos reportam a frequência do agente em carcaças examinadas ao abate. No Rio Grande do Sul, Bandeira et al. (2003), analisando 33 amostras de pernil de suínos ao abate, descrevem a presença do agente em 49,6% das amostras. Os resultados obtidos nos abatedouros avaliados em São Paulo

revelaram uma baixa frequência do agente considerando-se o isolamento tradicional (2%), no entanto este número elevou-se para 12% quando foi empregado o EIA.

Bandeira et al. (2003), identificaram dez sorotipos diferentes de *Salmonella* spp., sendo os mais isolados Panamá e Bredeney, tanto no conteúdo intestinal (21% e 16,7%, respectivamente) como nos cortes de pernil (38,7% e 30%, respectivamente).

Com relação à diversidade de sorotipos de *Salmonella* spp., foram identificados, neste trabalho, sete diferentes, sendo os mais isolados Typhimurium (30,76%) e London (26,92%). Esta diversidade de sorotipos encontrada pode estar relacionada a diferentes fontes de contaminação, que podem ter sido originadas na granja, no transporte, no frigorífico durante a espera, ou por contaminação cruzada durante o abate. Alguns dos sorotipos encontrados no presente trabalho são amplamente associados a casos de salmonelose em humanos e animais (MICHAEL, 2000), o que demonstra sua importância para a indústria suinícola e para saúde pública.

Rostagno et al. (2002) utilizando o Assurance *Salmonella* EIA Gold, paralelamente ao isolamento bacteriológico no diagnóstico de *Salmonella* spp. em teste realizado com 100 amostras de fezes suínas, descreve 98,85% de sensibilidade do teste e concordância de 0,96 (índice Kappa). O EIA identificou 1% de falso negativo e não identificou nenhuma amostra falso positiva.

No presente estudo a concordância observada entre o isolamento e o teste Assurance *Salmonella* EIA Gold foi fraca considerando-se o total de amostras e variou de fraca a sofrível considerando-se cada tipo de amostra avaliada. De maneira geral o EIA apresentou frequência de positividade aumentando o número de amostras positivas de 23,91% (22/92) dos animais para 44,56% (41/92). O método

de isolamento utilizado ou o volume de amostra podem estar relacionados com esta baixa concordância.

Nas amostras de carcaça a maior frequência de positivos do EIA foi mais visível, passando de 2% de positivos no isolamento para 12% no EIA. Esta variação pode estar relacionada a menor viabilidade da célula bacteriana na carcaça, mas que mesmo em baixa concentração foi detectada no EIA.

Em relação ao total de amostras observou-se 3,6% positivas nas duas técnicas, 5% positivas apenas no isolamento e 12,3% positivas apenas no EIA. A ocorrência de amostras negativas no EIA e positivas para o isolamento sugere que a sensibilidade da prova também não foi das melhores nestes ensaios, este fato pode estar relacionado à alta contaminação de amostras como as de fezes, por exemplo.

O teste avaliado tem sido empregado e é recomendado para pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos e ambiente, sua aplicação em larga escala em amostras com alta contaminação como as avaliadas deve ser precedida de novas avaliações e talvez algumas alterações no método de enriquecimento.

A leitura do resultado no método escolhido pode ser feita visualmente ou por espectrofotometria, no presente estudo optou-se pela avaliação visual, pois este método permite que o teste seja realizado em laboratórios mais simples, sem leitores de microplaca, no entanto, a baixa concordância dos resultados sugere que em próximos trabalhos seja avaliada também a leitura através de espectrofotômetro.

A aplicação de provas rápidas e sensíveis na pesquisa de agentes zoonóticos como *Salmonella* spp em produtos de origem animal tem se tornado cada vez mais importante. O investimento das agroindústrias no controle de qualidade do alimento produzido, principalmente das grandes empresas exportadoras justifica a utilização de métodos mais rápidos e seguros, mesmo que o custo da análise por amostra seja

superior. Torna-se importante neste contexto a validação dos testes para aplicação em diferentes tipos de amostras. Os dados aqui obtidos sugerem a necessidade de algumas alterações na metodologia proposta para sua implantação em estudos epidemiológicos envolvendo a pesquisa de *Salmonella* spp em fezes, linfonodos e carcaças de suínos.

7 CONCLUSÕES

- *Salmonella* spp. está presente em uma percentagem considerável de animais abatidos em abatedouros independentes do Estado de São Paulo.
- sorotipo mais frequente foi Typhimurium (30,76%) seguido por London (26,92%).
- O ensaio imunoenzimático (EIA) testado apresentou, de maneira geral, maior sensibilidade em relação ao isolamento do agente.
- A concordância entre o resultado do EIA e do isolamento foi fraca.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1986. p. 989.

ANDERSON, R. C.; BUCKLEY, S. A.; CALLAWAY, T. R.; GENOVESE, K. J.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; NISBET, D. J. Effect of sodium chlorate on *Salmonella* Typhimurium concentrations in the weaned pig gut. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 2, p. 255-258, 2001.

BANDEIRA, R. M.; NADVORNY, A.; COSTA, M.; CARDOSO, M. R. I. Prevalência de *Salmonella* spp. em suínos ao abate e em cortes de pernil produzidos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003. **Anais...** (S.l.), p. 71-72, 2003.

BESSA, M. C. **Prevalência de *Salmonella* spp. em suínos abatidos no Rio Grande do Sul**. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado) – programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* spp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 24, p. 80-84, 2004.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal Clinical Microbiology**. v. 3, n. 8, p. 495-503, 1990.

BRASIL. Portaria nº 100, de 10 de agosto de 1993. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1993, Seção I, n.156, p.11950.

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. Associação da prevalência de suínos portadores de *Salmonella* spp. ao abate e a contaminação de embutidos tipo frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIO ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003. **Anais...** (S.l.), p. 65-66, 2003.

CCA/UFES. **Salmonella**. Disponível em:
<<http://www.cca.ufes.br/cakc/salmonella.htm>>. Acesso em: 17 mar. 2005.

COSTA, G. A.; HOFER, E. **Isolamento e identificação de enterobactérias**. Rio de Janeiro: Monografia, Inst. Oswaldo Cruz, 1972, p. 120.

D'AOUST, J. Y.; SWWELL, A.; JEAN, A. Limited sensitivity of short (6h) selective enrichment for detection of foodborne *Salmonella*. **Journal of Food Protect**, Des Moines, v. 53, p. 562-565, 1990.

DAMMAN, D.; BAHNSON, P. B.; WEIGEL, R. M. An estimate of *Salmonella* prevalence on Illinois swine farms using mesenteric lymph node cultures. In: **International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, 3., 1999, Washington, DC, p. 23-125.

ECKNER, K. F.; DUSTMAN, W. A.; CURIALE, M. S. Use of an elevated temperature and novobiocin in modified enzyme-linked immunoabsorbent assay for the improved recovery of *Salmonella* from foods. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 55, p. 758-762, 1992.

FERNANDEZ, A. T.; FORTES, M. L. M.; ALEXANDRE, M. H. S.; BASTOS, C. S. P.; VIANNA, E. P. L. **Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade do Rio de Janeiro**. 2001. Disponível em: http://www.unigranrio.br/veterinaria/surtosnaidade_rj.doc. Acesso em: 25 abr. 2005.

FELDSINE, P. T.; MUI, L. A.; FORGEY, R. L.; KERR, D. E. Equivalence of assurance Gold Enzyme Immunoassay for visual or instrumental detection of motile and nonmotile *Salmonella* in all foods to AOAC culture method: collaborative study. **Journal of Association of Analytical Communities International**, n. 83, p. 871-187, 2000.

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

FURTADO, C.; ADAK, G. C.; STUART, J. M.; WALL, P. G.; EVANS, H. S.; CASEMORE, D. P. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales 1992-1995. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 121, p. 109-119, 1998.

GALLAND, J. C.; HOUSE, J. K.; HYATTL, D. R.; HAWKINS, L. L.; ANDERSON, N. V.; IRVIN, 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.

GIL-SETAS, A.; RAMOS, A. M.; SALAS, C. M.; DOMÍNGUEZ, M. U.; ELIA, M. E. Salmonellosis no tifoidea em un área de salud de Navarra, España. **Revista Española de Salud Publica**, Madrid, v. 76, n. 1, p. 49-56, 2002.

GORTON, S. J.; KLIEBENSTEIN, J. B.; BERAN, G. W. Cost of on-farm microbial testing for *Salmonella*: An application by farm size and prevalence level. **ISU Swine Research Report**, 1996. Disponível em: <http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports/asl-1413.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2003.

HAJMEER, M. **Salmonella spp.** 2005. Disponível em: <http://www.vetmed.udavis.edu/PHD/PHR150/2005/1505B6-Salm-MH.PDF>. Acesso em: 15 nov. 2005.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; WILLIAMS, S. T. **Bergery's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 787.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. **Microorganismos de los alimentos**. 1: su significado y métodos de enumeración. 2nd ed. Zaragoza: Acribia: editora, 2000, p. 439.

JAYARAO, B. M.; LÁSZLO, V. G.; CSÁK, K. MILCH, H. KOSTYÁK, A.; KOVÁCS, S.; DOMJÁN, H.; BIRÓ, G. Epidemiology of *Salmonella* Derby strains isolated from swine, pork and pork products. **Acta Veterinaria**. Hung., v. 1, n. 38, p. 25-32, 1990.

LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Doenças microbianas de origem alimentar provocadas por enteropatógenos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 17, p. 77-113, 1996.

LÍRIO, V. S.; SILVA, E. A.; STEFORI, S.; CAMARGO, D.; RECCO, E. A. P.; MALUF, Y.; MIYAZAWA, T. T.; NEVES, D. V. A.; OLIVEIRA, V. M. R. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados de alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 36-42, 1997.

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

MICHAEL, G. B. **Comparação de diferentes etapas de enriquecimento seletivo no isolamento de *Salmonella* spp. a partir de fezes de suínos de terminação**. Porto Alegre. 2000. 114f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação e Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

MOREIRA, E. C. **Importância do controle da sanidade animal sobre produtos de origem animal**. Disponível em: <http://www.saudeanimal.org.br/trabcientifico/sincorte/sincorte.pdf>. Acesso em: 14 maio 2003.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* spp em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2004.

NIELSEN, B.; BAGGENSEN, D.; BAGER, F.; HAUGEGAARD, J.; LIND, P. The sorological 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.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia. Teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

ROSTAGNO, M. H.; HURD, H. S.; GAILEY, J. K.; MCKEAN, J. D.; LEITE, R. C. Comparative evaluation of *Salmonella* detection assays on swine fecal samples, In: IPVS COGRESS, 17., 2002, IOWA. **Proccedings...**, Iowa: IPVS, 2002. p. 311.

ROWE, B.; BARTLETT, R. L. *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium na Europa Ocidental, de 1993 a 1995: relatório da vigilância da Salm-Net. **Euro Surveillance Monthly**, Oslo, v. 2, n. 2, p. 4-6, 1997.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. I.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos Faculdade Veterinária Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 29, p. 87-92, 2001.

SKIRROW, M. B.; BLASER, M. J. *Campylobacter jejuni*. In: BLASER, M. J. **Infectious of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, 1995. p. 123-138.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORENO, A. M.; CARVALHO, L. F. O. S. **Clínica Veterinária em Sistemas Intensivos de Produção de Suínos e Relatos de Casos Clínicos**, Goiânia: J. Sobestiansky e D. Barcellos, 2001, p. 10.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S. J.; CARVALHO, L. F. O. S.; MORENO, A. M. **Clínica e Patologia suína**, Goiânia: J. Sobestiansky et. al., 1999, p. 383-384.

STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; MCVEY, S.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation – PCR procedure. **Journal Clinical Microbiology**, v. 7, n. 32, p. 1742-1749, 1994.

SWANENBURG, M. ***Salmonella* in the pork production chain sources of *Salmonella* on pork**. 2000, 16 f. Tese (Doutorado) – Department of the Science of Foods of Animal Origin Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht and Institute of Animal Science and Health, Utrecht, 2000.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A.; KEUENKAMP, D. A.; VAN KNAPEN, F. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. In: **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 243-254, 2001.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Salmonelose. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: L.R. Trabulsi et al., 1999, p. 229-230.

VAN DER GAAG, M. A.; VOS, F.; SAATKAMP, H. W.; VAN BOVAR, 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**, 2003. Disponível em: <<http://www.scirus.com>>. Acesso em: 10 mar. 2003.

VAN WINSEN, R. L.; VAN NES, A.; KEUZENKAMP, D.; URLINGS, H. A.; LIMPMAN, L. J.; BIESTERVELD, S.; SNIJDERS, J. M.; VERHEIJDEN, J. H.; 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. **Foodborne pathogens**: an illustrated text. St. Louis: Moby-Year Book, 1991, p. 209-234.

WOLF, P. J. V. D.; ELBERS, A. R. W.; HEIJDEN, H. M. J. F. V. D.; SCHIE, F. W. V.; HUNNEMAN, W. A.; TIELEN, M. J. M. *Salmonella* soroprevalence at the population and herd level in pigs in the Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 80, p. 171-184, 2001.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness**. 2002. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.htm>>. Acesso em: 30 jan. 2006.

ZHAO, C.; GE, B.; VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D.; MENG, J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork and beef from the greater Washington, D.C. area. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 12, p. 5431-5436, 2001.