

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

Desenvolvimento de um teste de ELISA-LPS para *Salmonella* e sua aplicação em rebanhos suínos na identificação de fatores de risco associados à infecção.

Jalusa Deon Kich\*

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias Especialidade na área de Bacteriologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

PORTO ALEGRE  
2004

---

Médica Veterinária Msc.

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

**Desenvolvimento de um teste de ELISA-LPS para *Salmonella* e sua aplicação em rebanhos suínos na identificação de fatores de risco associados à infecção.**

Jalusa Deon Kich\*

Tese apresentada como  
requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutor  
em Ciências Veterinárias  
Especialidade na área de  
Bacteriologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

PORTO ALEGRE  
2004

---

Médica Veterinária Msc.

Jalusa Deon Kich

**Desenvolvimento de um teste de ELISA-LPS para *Salmonella* e sua aplicação em rebanhos suínos na identificação de fatores de risco associados à infecção.**

Aprovada em de março de 2004.

APROVADA POR

---

Profa. Dra. Marisa R. I. Cardoso  
Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADA POR

---

Profa. Dra. Marisa da Costa  
Membro da Comissão

APROVADO POR

---

Prof. Dr. David E. S. N. Barcellos  
Membro da Comissão

APROVADO POR

---

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto  
Membro da Comissão

*Dedico este trabalho ao queridíssimo amigo e colega Morés, para dizer-lhe que maior que o aperto em nossos corações, desses dias, há de ser a alegria de recebê-lo em nossa companhia nos próximos dias...*

*Os meus agradecimentos vão todos para Dra. Marisa Cardoso, por ser muito  
mais do que doutora....*

## RESUMO

A implementação de programas de controle de salmonela em suínos, com objetivo de diminuir os riscos de infecção alimentar em humanos, exige métodos rápidos e baratos para medir a intensidade da infecção, bem como reduzir seus fatores de risco. A partir disso, desenvolveu-se um teste de ELISA, utilizando antígeno lipopolissacarídeo do sorovar Typhimurium, pela sua similaridade antigênica com os sorovares prevalentes em suínos no Rio Grande do Sul. O teste padronizado foi utilizado na determinação da soroprevalência em 65 rebanhos suínos, os quais participaram de estudo para identificação de fatores de risco. As granjas foram classificadas em três categorias de soroprevalência, baixa (até 40%), média (40-70%) e alta (mais de 70%) prevalência, estabelecidas como variável explicada. As respostas do questionário contituíram as variáveis explicativas. Aquelas associadas à variável explicada pelo teste de  $\chi^2$  ( $p \leq 0,1$ ) foram submetidas à análise fatorial de correspondência múltipla (AFCM). Paralelamente, foram avaliados seis desinfetantes (amônia quaternária, glutaraldeído, iodóforo, hipoclorito de sódio (1 e 0,1%), fenol e ácido peracético) frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. Os produtos foram testados na presença e ausência de matéria orgânica, sob duas diferentes temperaturas e, posteriormente, frente a 8 isolados com diferentes perfis de resistência antimicrobiana, por um tempo de contato de 5 minutos. O teste de ELISA identificou a soroconversão nos animais inoculados (7 dias p.i.) e contatos (21 dias p.i.), bem como o aumento no número de animais positivos após infecção natural (28,6% para 76,9%). A sensibilidade e a especificidade do teste foram respectivamente de 92 e 100%. Após adaptações para suco de carne, estabelecendo o soro como referência, a sensibilidade do teste para suco de carne foi de 88,12% e a especificidade 70,43%. Em análise de concordância entre os testes, o índice kappa foi de 5,78, com  $p=0,002$  no teste *MacNemar*. A AFCM identificou a associação da maior soroprevalência com o seguinte grupo de variáveis: nas granjas terminadoras, uso de ração peletizada, distribuição de dejetos a menos de 100m do local de captação de água, não utilização de comedouro do modelo comedouro/bebedouro, transporte com freteiro misturando animais de várias granjas; enquanto nas granjas de ciclo completo apareceram ingredientes de ração desprotegidos de outros animais, ausência de controle de roedores, ração seca, ausência de cerca, não uso da pintura com cal após lavagem e desinfecção e a entrada de outras pessoas além do técnico na granja. Todos os desinfetantes foram eficazes na ausência de matéria orgânica, nas duas temperaturas testadas. Entretanto, quando na presença de matéria orgânica ou após cinco minutos de contato, somente o hipoclorito de sódio (1%), fenol e o ácido peracético foram eficazes. Dessa forma, ao estabelecer uma ferramenta sorológica para medir a infecção pelos principais sorovares de *Salmonella* que afetam os suínos no sul do Brasil e identificar fatores de risco associados à alta soroprevalência, será possível dar início à implementação e validação de protocolos de controle da infecção em rebanhos.

**Palavras Chave:** *Salmonella*, ELISA, fatores de risco, desinfetantes, suínos

## **ABSTRACT**

*The implementation of salmonella control programs in swine, with objective to reduce the risks of foodborne diseases in humans, demands for cheap and fast methods to measure the intensity of the infection, as well as for reducing its risk factors.*

*An ELISA test was developed based on lipopolysaccharides (LPS) antigens from *S. Typhimurium*, this serovar have at least two common LPS antigens with serovars prevalent in swine in the state of Rio Grande do Sul. The standardized test was used in the seroprevalence determination in 65 swine herds, which participated of the study for risk factors identification.*

*Herds were classified in one of three categories according to the seroprevalence, being low (less than 40% of positive animals), medium (between 40 and 70% positive animals) or high (more than 70% positive animals). Seroprevalence was used as the explained variable and the questionnaire answers were used as explanatory variables. Initially, attempts of association between explanatory and explained variables were performed using the qui-square test. When associated ( $p \leq 0.1$ ), the two variables underwent multiple correspondence analysis*

*The effectiveness of six disinfectants (quaternary ammonium, glutaraldehyde, iodophor, sodium hypochlorite, phenol and peracetic acid ) was also tested against strains of *Salmonella* sp. isolated from pigs. The products were tested in presence or in absence of organic matter and under two different temperatures. Later, they were tested against 8 porcine *Salmonella* Typhimurium strains, presenting different antibiotic resistance profiles, with a contact time of 5 minutes.*

*The ELISA test identified the seroconversion in inoculated pigs (7 days p.i.) and sentinels (21 days p.i.), as well as the increase in the number of positive animals after natural infection (28.6% to 76,9%). The sensitivity and the specificity of the test have been respectively 92 and 100%. After adaptations for meat juice, establishing the serum as reference, the sensitivity of the test for meat juice was of 88,12% and specificity 70,43%. In agreement analysis between the tests, the kappa index was of 5,78, with  $p=0,002$  in the MacNemar test.*

*The factors associated with herds having high seroprevalence were: in finishing herds, pelleted feed, swine manure disposal less than 100m from surface water, feeder not provided with water drinker, swine from several herds transported together to slaughterhouse; in the farrow-to-finish herds, feed ingredients exposure to other animals, no active rodent control, dry feed, absence of fence, no whitewashing facilities after cleaning and disinfecting and permission for other people's entrance to the herd. All disinfectants were effective in the absence of organic matter at both tested temperatures. However, when organic matter were included on the assay or after five minutes of contact, only sodium hypochlorite (1%), phenol and peracetic acid were effective.*

*The establishment of serological tool to detect the swine *Salmonella* infection from serovars prevalent in southern Brazil and the identification of risk factors associated with the high seroprevalence conducted in the present study, has made it possible to implement and validate infection control protocols in swine herds.*

**Keywords:** *Salmonella, ELISA, risk factors disinfectants, swine*

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2:

- TABELA 1 Resultados obtidos no teste de ELISA baseado em LPS de *S. Typhimurium* obtido a partir do teste de amostras de soro de uma população positiva (inoculada) e negativa (SPF) para *Salmonella* sp. 48
- TABELA 2 Resultados obtidos no teste de ELISA baseado em LPS de *S. Typhimurium* de amostras de soro e suco de carne provenientes de 216 suínos. 49

### CAPÍTULO 3:

- TABELA 1 Relação das variáveis explicativas, indicadas pela análise preliminar ( $\chi^2$ ) submetidas a análise fatorial de correspondência múltipla, segundo categorias, frequência e prevalência sorológica média encontrada em 32 granjas de terminação de suínos. 63
- TABELA 2 Relação das variáveis explicativas, indicadas pela análise preliminar ( $\chi^2$ ) submetidas a análise fatorial de correspondência múltipla, segundo categorias, frequência e prevalência sorológica média encontrada em 33 granjas de suínos de ciclo completo. 64

### CAPÍTULO 4

- TABELA 1 Número de repetições em que houve redução decimal mínima de 4 Log (RD>4) no número de unidades formadoras de colônia de uma amostra de *Salmonella* Typhimurium padrão após contato de 15 min, a 10 ou 30°C, com seis desinfetantes comerciais, na presença e ausência de matéria orgânica. 79
- TABELA 2 Número de amostras de *Salmonella* Typhimurium que apresentaram redução decimal mínima de 4 Log (RD>4) no crescimento bacteriano, ao contato de 5 minutos com seis desinfetantes comerciais. 80

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2:

- FIGURA 1 Resultados de Densidade Ótica (DO) obtidos em teste de ELISA-LPS com duas amostras de soro provenientes de animais positivos para *Salmonella* sp. , diluídos seriadamente. **45**
- FIGURA 2 Resultados obtidos no teste de ELISA-LPS de *S. Typhimurium* com amostras de soro provenientes de leitões inoculados via oral com *S.Typhimurium* e animais contato. **46**
- FIGURA 3 Resultados obtidos no teste de ELISA-LPS de *S. Typhimurium* com amostras de soro provenientes de leitões inoculados via intramuscular com bacterinas produzidas com os sorovares *Typhimurium*, *Agona*, *Derby*, *Panama* e *Bredeney*. **47**

### CAPÍTULO 3

- FIGURA 1 Mapa dos fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* sp. em 32 granjas de terminação de suínos na análise fatorial de correspondência múltipla. Salmonela1 = granjas com até 40% de soroprevalência, Salmonela 2 = entre 40 e 70%) e Salmonela 3 mais de 70%. A descrição das variáveis contam na Tabela 1. **65**
- FIGURA 2 Mapa dos fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* sp. em 33 granjas de de suínos de ciclo completo na análise fatorial de correspondência múltipla. Salmonela1 = granjas com até 40% de soroprevalência, Salmonela 2 = entre 40 e 70%) e Salmonela 3 mais de 70%. A descrição das variáveis contam na Tabela 1. **66**

### CAPÍTULO 4

- QUADRO 1 Identificação e composição dos desinfetantes utilizados no presente estudo, respectivos desinibidores e diluição de uso recomendada pelo fabricante: **78**

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A	Histograma da distribuição das soroprevalências dos 65 rebanhos estudados. As setas indicam os limites das categorias utilizadas no estudo de fatores de risco (capítulo 3).	94
APÊNDICE B	Histograma da distribuição das leituras de densidade ótica observadas no soro da população de suínos submetidos ao ELISA-LPS com soro e suco de carne (capítulo 2).	95
APÊNDICE C	Sensibilidade e especificidade do teste de ELISA aplicado ao suco de carne em relação ao soro de acordo com o ponto de corte do teste aplicado ao suco de carne.	96
APÊNDICE D	Questionário aplicado aos rebanhos de ciclo completo, nos rebanhos terminadores foi aplicado o mesmo protocolo retirando as informações que são exclusivas do ciclo completo.	97
APÊNDICE E	Resultados do teste de $\chi^2$ utilizado na análise preliminar entre variáveis explicativas e resposta para os 65 rebanhos.	106
APÊNDICE F	Relação das variáveis explicativas, indicadas pela análise preliminar ( $\chi^2$ ) submetidas a análise fatorial de correspondência múltipla, segundo categorias, frequências e prevalência sorológica média encontrada nos rebanhos.	109
APÊNDICE G	Mapa dos fatores associados à soroprevalência de <i>Salmonella</i> sp. em 65 granjas suínos na análise fatorial de correspondência múltipla. Salmonela1 = granjas com até 40% de soroprevalência, Salmonela 2 = entre 40 e 70% e Salmonela 3 mais de 70%.	110
APÊNDICE H	Resultados de colimetria, número mais provável (NMP) em 100 ml água e em uma grama de ração por granja, coletadas no dia da visita às granjas que compuseram o estudo de fatores de risco (capítulo 3).	111

## **SUMÁRIO**

<b>1. RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>3. LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>8</b>
<b>4. LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>5. LISTA DE APÊNDICES.....</b>	<b>10</b>
<b>6. CAPÍTULO 1</b>	
<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>33</b>
<b>7. CAPÍTULO 2</b>	
<b>TESTE DE ELISA PARA MONITORAMENTO DA INFECÇÃO POR <i>SALMONELLA</i> EM SUÍNOS.....</b>	<b>51</b>
<b>8. CAPÍTULO 3</b>	
<b>FATORES ASSOCIADOS À SOROPREVALÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> EM REBANHOS COMERCIAIS DE SUÍNOS.....</b>	<b>67</b>
<b>9. CAPÍTULO 4</b>	
<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SEIS DESINFETANTES COMERCIAIS FRENTE A AMOSTRAS DE <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM ISOLADAS DE SUÍNOS.....</b>	<b>84</b>
<b>10. CAPÍTULO 5</b>	
<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>95</b>
<b>12. CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>13. APÊNDICES.....</b>	<b>96</b>

## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas décadas, a participação da suinocultura brasileira no mercado mundial passou de 1,71% em 1973 para 2,16% no ano 2000, sendo que o abate de suínos no Brasil, em equivalentes carcaças, entre os anos de 1990 e 2000 apresentou um crescimento de 36%. O consumo interno de carne suína (kg/habitante/ano), que permanecia inalterado em 8kg na década de 80, aumentou consideravelmente na década de 90, chegando a 9,23kg em 1995 e 12,09kg no ano 2000 (GIROTTI, A., 2002). As exportações de carne suína brasileira, no ano de 2001, aumentaram na ordem de 110% em relação ao ano de 2000, correspondendo a aproximadamente 250 mil toneladas comparadas às 166.232 toneladas exportadas em 2000. No ano de 2002 houve um crescimento de 32,7% desse volume, permitindo ao Brasil assumir a quarta posição mundial de exportação. A qualidade e preço competitivo da carne brasileira, somados à crise sanitária que assolou a Europa (Encefalopatia Espongiforme Bovina, Febre Aftosa e Peste Suína Clássica) contribuíram para o desempenho da carne suína brasileira no mercado mundial segundo a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIPECS, 2002).

Os destaques nas exportações brasileiras em 2001 foram países como a Rússia e a África do Sul que aumentaram, respectivamente, em 632,61% e 116,3% a compra de carne suína brasileira, comparado ao ano anterior. O faturamento com exportações de carne suína em 2000 foi de 171.851 milhões de dólares, sendo que em 2001 saltou para 358.966 milhões e em 2002 fechou em 481.435 milhões. A Abipecs especula a abertura de novos mercados, como o italiano e japonês, entre outros, para os próximos anos. A proposta é dobrar esforços para aumentar as exportações da carne suína brasileira. As empresas de alimentação animal também, praticamente, dobraram sua taxa de crescimento, impulsionadas pelo aumento das exportações (SUPERANDO..., 2002). Esta performance do produto brasileiro está ancorada na produtividade, competitividade, qualidade de carcaça e nos parâmetros higiênico-sanitários. Neste sentido, desde já o Brasil deve preocupar-se com patógenos que possam representar barreiras à comercialização, como é o caso da presença de *Salmonella* sp. nos produtos de origem animal.

A presença de qualquer sorovar em alimentos é motivo para classificar os mesmos como impróprios para consumo. Esse parâmetro tem sido utilizado internacionalmente, ou seja, a presença de *Salmonella* sp. em 25g de produto, condena o mesmo. Situações de devolução de cargas de produtos, em que havia presença de *Salmonella* sp., têm preocupado as agroindústrias e estimulado as mesmas a buscar soluções tecnológicas para o problema.

### **1.1 Características da *Salmonella* sp.**

A *Salmonella* sp. é um bacilo Gram-negativo, não esporulado, móvel e anaeróbio facultativo da família *Enterobacteriaceae* que possui três diferentes tipos de antígenos. Os antígenos somáticos (O), compostos por lipopolissacarídeos e associados com a parede celular estão divididos em maiores, que são os discriminatórios, e menores. Os antígenos flagelares (H), compostos por proteínas termolábeis, dividem-se em monofásico (1) e difásico (2) sendo que a maioria dos sorovares podem elaborar, alternativamente, os dois antígenos. O terceiro tipo é o antígeno capsular único (Vi), presente na *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin* (D'AOUST, J., 1994; GRIMONT, P.; GRIMONT, F.; BOUVET, P., 2000).

Apesar de ser dividida em espécies como os demais gêneros bacterianos, é a classificação antigênica que determina e denomina os diferentes sorovares, a mais utilizada. Já foram identificados aproximadamente 2.400 sorovares distintos, os quais não podem ser diferenciados bioquimicamente, sendo classificados de acordo com seus antígenos somáticos e flagelares. Os grupos antigênicos são nomeados pelas letras do alfabeto (A-Z) e por números arábicos. Os sorovares da *Salmonella enterica*, espécie que alberga as linhagens patogênicas do gênero, recebem nomes muitas vezes relacionados com a espécie ou região geográfica onde foram encontrados. Aproximadamente 100 sorovares já foram isolados do homem, animais e alimentos (GRIMONT, P.; GRIMONT, F.; BOUVET, P., 2000). Os sorovares de maior prevalência nos surtos de toxinfecções no Rio Grande do Sul têm sido Enteritidis (GEIMBA, M. P. et al., 2004) porém o Typhimurium, mais comumente isolado de suínos ocupa, freqüentemente, a segunda posição nos isolados humanos (HUMPHREY, T. 2000).

A *Salmonella* sp. cresce bem a 35°-37°C e em pH 6,5-7,5, sobrevive ao congelamento por longos períodos e não compete bem com outros microrganismos contaminantes de alimentos. São conhecidas amostras adaptadas a variação maior de pH (4,5 a 9,5) e temperatura (2°C a 54°C) (D'AOUST, J., 1997). No laboratório, para recuperação da *Salmonella* sp., salvo em casos clínicos agudos, são necessárias fases de pré-enriquecimento não seletivo, enriquecimento seletivo e plaqueamento em meio seletivo. Essas fases são necessárias porque nas infecções crônicas e no meio ambiente a bactéria se encontra, normalmente, em baixo número, com a presença marcante de outras bactérias competidoras (WALTMAN, W. D., 2000).

### **1.2 *Salmonella* sp. em Humanos**

São registrados anualmente entre 40.000 a 60.000 casos de salmonelose humana nos EUA, mas estimativas do número de casos reais chegam a alcançar 3 milhões, demandando, por sua frequência, elevado volume de recursos aos sistemas de saúde. Roberts, T. (1989) estimou um custo de US\$ 700 por caso clínico humano registrado nos Estados Unidos. Conforme Hald, T.; Wegener, H. C. (1999), entre as fontes de infecções humanas, 40-45% são provenientes de ovos e 10-15% de produtos suínos. Este tipo de relação foi observada por Maguire, H. C. F. et al. (1993) num surto de infecção humana por *S. Typhimurium* afetando 206 indivíduos na Dinamarca, em que a fonte de infecção foi precisamente relacionada à ingestão de carne suína contaminada.

Existe uma demanda, principalmente entre os consumidores dos países industrializados, quanto à segurança dos produtos de origem animal produzidos (BLAHA, T., 2001). A possibilidade de contaminação dos produtos por *Salmonella* sp., e os riscos associados a este fato, tendem a ser muito conhecidos por parte dos consumidores, gerando uma maior expectativa de controle. Associa-se a isto, o fato de países como a Dinamarca terem lançado com sucesso programas de controle de *Salmonella* sp. em rebanhos suínos, desencadeando uma pressão em outros países produtores para a implementação de medidas semelhantes. Desta forma, já existe uma expectativa da comprovação de controle de *Salmonella* sp., ou pelo menos do estabelecimento de programas de monitoramento e controle, como pré-requisito para produtores que desejem ser competitivos no mercado.

As carnes e seus derivados são alimentos bastante susceptíveis à contaminação por *Salmonella* sp. (FSIS, 1998). Esse fato está relacionado à dificuldade de manter os lotes livres de *Salmonella* sp. no sistema vertical de produção e distribuição dos animais. O crescimento da participação de vegetais como fonte de infecção para humanos está sendo atribuída ao manejo das culturas, a exemplo da utilização de fertilizantes contaminados, ao processamento do produto e ao modelo globalizado de circulação dos alimentos entre os países (D'AOUST, J., 1997).

Pequena quantidade de bactérias viáveis podem causar a infecção, uma vez que as condições de armazenagem, distribuição e preparação dos alimentos podem favorecer a multiplicação do agente, permitindo que seja alcançada a dose infectante para os humanos. A manipulação do alimento e os hábitos alimentares, como a ingestão de produtos de origem animal mal cozidos, aumentam as chances de contaminação. A dose infectante depende do *status* imunológico do hospedeiro, da virulência do agente e da composição química do alimento contaminado. Composto a população de maior risco estão os neonatos, crianças, idosos e imunodeprimidos. Essa população apresenta uma resposta imunológica fraca em função da imaturidade ou debilitação do sistema imunológico, somada à baixa produção de ácido clorídrico no estômago que favorece a colonização intestinal. Doses abaixo de  $10^1$ , em alimentos com alto teor de gordura, estão descritas como dose infectante para humanos (D'AOUST, J., 1994). A dose infectante é estimada pelo rastreamento do alimento, após o reconhecimento do surto, portanto está sujeita a variações de acordo com o tipo de alimento, tempo de exposição, dose contaminante inicial, condições de armazenamento e susceptibilidade do hospedeiro. A dose mais comumente citada fica em torno de  $10^5$  células (VARNAM, A. S., 1991).

O período de incubação em humanos, para amostras de *Salmonella* sp. não tifóides é de 12-72 horas e os sintomas mais comuns são cefaléia, náusea, vômito, cólica abdominal, diarréia e febre moderada. A diarréia pode durar até duas semanas, porém a fase aguda dura de 2 a 7 dias. Na maioria dos casos a recuperação é espontânea, a maioria dos registros de hospitalizações e letalidade são referentes à população de risco, crianças, idosos e imunodeprimidos (CDC, 2003).

### 1.3 *Salmonella* sp. em Suínos

Duas preocupações estão relacionadas com a infecção por *Salmonella* sp. em suínos: uma, com a manifestação clínica e outra, pela presença desse agente em carcaças e produtos que podem levar a toxinfecções em humanos (EKPERIGIN, H. E.; NAGAJARA, K. U., 1998). Os animais portadores de sorovares de *Salmonella* sp. que comumente não causam infecção clínica em suínos são os mais importantes do ponto de vista da saúde pública, pois são as principais fontes de contaminação das carcaças nos abatedouros e passam despercebidos enquanto estão na propriedade. A contaminação por *Salmonella* sp., por sua vez, possui um grande potencial de amplificação ao longo da cadeia produtiva, uma vez que animais portadores contaminam o lote, os companheiros de transporte ao abate e os novos grupos de animais no local de espera no abatedouro (ROSTAGNO, M., 2001).

A salmonelose pode se apresentar clinicamente nos animais na forma entérica (localizada) com diarreia ou na forma generalizada, afetando vários sistemas, resultado de septicemia. Os sorovares normalmente associados são o Typhimurium para as enterites e o Choleraesuis para as septicemias, entretanto existem registros de outros sorovares associados à doença. O animal infectado pode ou não desenvolver sintomas clínicos da doença, entretanto o estado de portador e conseqüente disseminador de salmonela é a forma mais importante de manutenção do agente nos rebanhos e de sua entrada nos frigoríficos (SCHWARTZ, K. J., 1999).

A principal via de infecção é fecal-oral, porém a salmonela pode se alojar nos linfonodos, carregada por macrófagos e neutrófilos, e ser excretada quando o animal for submetido a um fator estressante (EKPERIGIN, H. E. e NAGAJARA, K. U., 1998). Para alcançar os linfonodos, a *Salmonella* sp. resiste ao ácido clorídrico do estômago, à motilidade intestinal e ação da microbiota local e invade a mucosa intestinal. A comunicação entre as placas de Payer (células M), concentradas no íleo, e a mucosa intestinal serve de porta de entrada para *Salmonella* sp. que, utilizando a fímbria polar, alcança os folículos linfóides. A colonização desse tecido contribui para desenvolvimento da doença localizada e sistêmica (BÄUMLER, A. J., 2000).

Embora a *Salmonella* sp. tenha a capacidade de sobreviver e se multiplicar dentro de fagócitos mononucleares, estes são a primeira defesa celular contra a invasão.

Previamente à invasão, a IgA protege a superfície da mucosa, porém, os resultados obtidos por Gray, J. et al. (1996) para demonstrar a concentração de IgA intestinal em suínos desafiados com *S. Choleraesuis* não foram conclusivos, uma vez que foi observada grande variação na quantidade da IgA em relação ao período pós inoculação (p.i.). A resposta humoral pode ser observada após uma semana de inoculação e a reinfeção resulta num rápido aumento na quantidade de anticorpos. O pico do nível sérico de IgM de acordo com a rota de infecção por *S. Choleraesuis*, intranasal ou gástrica, foi observado na segunda e terceira semana p.i., respectivamente. Na sexta semana p.i., os níveis de IgM detectados foram muito baixos, independente da rota de inoculação, enquanto os níveis de IgG, que já demonstravam aumento nas primeiras semanas p.i., mantiveram-se até o final das observações (12 semanas). Essas observações indicam uma resposta humoral clássica à infecção bacteriana (GRAY, J. et al., 1995). Resposta sorológica, em suínos, induzida pela inoculação de *S. Typhimurium* e *S. Infantis* foi observada por Nielsen, B. et al., (1995).

A doença ocorre em um número variável de animais, em geral abaixo de 15%, com mortalidade entre 4 a 6%, normalmente em leitões com menos de 5 meses de idade (SOBESTIANSKY, J. et al., 1999). Estes animais se contaminam pela entrada de suínos portadores no rebanho, os quais excretam o microrganismo que se torna amplamente disseminado. A utilização de rações contaminadas, principalmente por ingredientes de origem animal, também é considerada uma importante fonte de contaminação (FIALHO, E. T. et al., 1985).

O período de incubação é de 24-48 horas. Na forma localizada, os leitões apresentam diarreia aquosa, amarelada, fétida durante 3 a 7 dias, podendo ser sanguinolenta e com a presença de estrias de tecido necrótico. O quadro pode ser acompanhado de hipertermia moderada, anorexia e desidratação. É observada a perda progressiva de peso. A mortalidade normalmente é baixa e ocorre após alguns dias de diarreia e desidratação. Na forma generalizada podem ser observados morte súbita e animais com hipertermia (40,5°C-41,6°C), relutância em se movimentar, tosse úmida, enfraquecimento, podendo ocorrer diarreia. Observam-se áreas cianóticas nas extremidades (orelhas, patas e cauda, barriga e região inguinal). A mortalidade é alta e ocorre em 2 a 4 dias. Os animais que se recuperam tornam-se portadores e excretadores intermitentes de *Salmonella* no rebanho. Na necropsia é observado um quadro de lesões

característico de septicemia com esplenomegalia, hepatomegalia, linfonodos mesentéricos aumentados, hemorragias e petéquias em vários órgãos (mucosa estomacal, bexiga, rins, epicárdio, pulmões), pulmões firmes com congestão difusa, edema interlobular, e secreção purulenta. Na forma entérica são observadas áreas circulares de tecido necrosado, de tamanho variável, com mucosa espessada e de coloração alterada (SCHWARTZ, K. J., 1999).

#### **1.4 Controle de *Salmonella* sp. na Cadeia Produtiva de Suínos**

O programa da Dinamarca é o maior sistema integrado *feed to food* de controle de *Salmonella* sp. O mesmo foi introduzido em 1995 e o objetivo principal era identificar granjas com alta prevalência de *Salmonella* sp. Após cinco anos, os resultados foram avaliados e algumas alterações realizadas, seguindo as seguintes demandas: identificação rápida do aumento da soroprevalência, um ponto de corte na sorologia com alta associação com os resultados de bacteriologia e um modelo de amostragem simples. A avaliação do programa é animador, com redução nos resultados bacteriológicos em torno de 50% de 1993 para 1998, especificamente de 14,7% para 7,2% em granjas grandes e de 22,2% para 10,4% em granjas pequenas (CHRISTENSEN, J. et al., 2002). O sistema oficial de monitoramento bacteriológico nas carcaças registra a redução de 3% para 1% de amostras positivas (WEGENER, H. C. et al., 2003).

As condições para conseguir implementar esses programas dependem de algumas atitudes como: atenção a todos os estágios da cadeia produtiva; uso de dados gerados pela pesquisa que possam ser aplicados como ferramentas para alcançar um controle de *Salmonella* sp. no produto final, os quais devem ser eficientes e de custo razoável. Exemplos dessas tecnologias incluem métodos de diagnóstico rápido, vacinas, probióticos, produtos de exclusão competitiva, estratégias de limpeza e desinfecção, correção dos fatores de risco, produção em lotes e métodos avançados de monitoramento.

#### **1.5 Uso do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) nos Programas de Controle de *Salmonella* sp.**

O grande objetivo de um programa de controle é diminuir o risco de contaminação do produto final com *Salmonella* sp. (MOUSING et al., 1996). Sendo consenso que o animal portador e/ou excretor da bactéria no abate é a maior fonte de contaminação da carne e seus derivados (BERENDS, B. R. et al., 1997), as ferramentas escolhidas para o monitoramento e controle da infecção devem estimar este risco.

A infecção pode ser monitorada pela pesquisa direta do agente por testes bacteriológicos ou indiretamente pela observação da presença de anticorpos como marcadores da infecção.

Entre os testes sorológicos disponíveis, os avanços na técnica de ELISA, como a miniaturização, mecanização e qualidade dos reagentes, ampliaram sua utilização em muitas espécies animais (BARROW, P. A., 2000).

Como ferramenta de implementação de programas de controle de *Salmonella* sp. destaca-se a sorologia usando o teste de ELISA, conforme descrito por Nielsen, B. et al. (1995). No teste desenvolvido por esses autores foram utilizados antígenos lipopolissacarídeos (LPS) de parede celular dos sorovares Cholerasuis e Typhimurium, por serem capazes de atender as necessidades do programa dinamarquês.

Os ensaios imunoenzimáticos utilizam as propriedades de duas moléculas biológicas, o anticorpo e a enzima. O anticorpo reconhece e se liga a antígenos específicos, e a enzima é catalizadora de reações químicas, podendo ser detectada pela adição de substrato. A estratégia do ensaio é conjugar uma enzima apropriada a um imuno-reagente e, através da adição do substrato, determinar o produto da reação. A quantidade do produto reflete a quantidade da enzima que foi incorporada ao complexo.

Os passos básicos do teste de ELISA conforme Voller, A. et al. (1979), com seus princípios e vantagens, são os seguintes:

a) fase sólida, local onde os imuno-reagentes são ligados, os plásticos são os mais populares a exemplo das placas de microtitulação (96 poços) de poliestireno. As vantagens desse material são a simplicidade da separação entre os componentes ligados à placa daqueles livres, a quantidade baixa de produtos utilizados na reação e a transparência ótica que facilita a leitura através da placa. Ao lado disso, contribui a boa condutividade para as ligações covalentes entre os imuno-reagentes e o plástico. No teste de ELISA indireto, a placa é sensibilizada por adsorção passiva do antígeno

específico, que diluído em tampão com detergente, após um período de incubação, adere quimicamente à placa.

b) sistema de lavagens, todos os testes de ELISA consistem numa série de incubações entre os diferentes reagentes, separadas por lavagens. O objetivo da lavagem é desprezar todo material que sobra da reação para que não influencie no passo seguinte do teste. A placa é lavada três vezes, em tampão com detergente, e deve ser secada antes da introdução do novo reagente.

c) tratamento da amostra, a utilização do soro ou outra amostra, com componentes de alto peso molecular, exige a adição de agente detergente para evitar a ligação inespecífica na fase sólida. A adição de uma fonte extra de proteína, como a albumina ou leite em pó, reduz as reações inespecíficas para níveis aceitáveis.

d) o conjugado é uma enzima, altamente reativa disponível na forma purificada, ligada estavelmente a um anticorpo ou antígeno. No teste de ELISA indireto para medir anticorpos específicos, é utilizada uma enzima ligada a um anticorpo contra a IgG da espécie em questão produzida em outra espécie animal. Em suínos, a peroxidase ligada a IgG-anti-IgG de suíno é amplamente utilizada (NIELSEN et al., 1995; MACHADO, E. et al., 2001; PROUX, K. et al. 2000), sendo o substrato à base de peróxido.

No caso da *Salmonella* sp. em suínos, principalmente nas infecções sub-clínicas, importantes na segurança alimentar, a associação entre resultados bacteriológicos e sorológicos é limitada por fatos inerentes à relação agente-hospedeiro. O animal pode estar excretando a *Salmonella* sp. e ainda não ter apresentado a soroconversão, uma vez que existe variação no tempo entre a infecção e início da detecção de anticorpos. Van Winsen, R. L. et al. (2001) observaram início da soroconversão 14 dias p.i., anteriormente Nielsen. B. et al (1995) tinham observado aos 7 dias p.i. sendo que 3% dos animais não soroconverteram até o final do experimento. Também, podem ser encontrados leitões soropositivos na fase de crescimento que se tornam negativos no final da terminação, como registrado por Van der Wolf, P. J. (1999). A soroconversão também é influenciada pela rota da infecção. A via gástrica produz títulos de IgG, contra antígeno LPS, mais altos do que a intranasal (GRAY, J. T. et al., 1995). As infecções ocorridas no pré-abate, transporte e baias de espera no frigorífico, resultam em bacteriologia positiva e sorologia negativa. Portanto, é inadequada a utilização do teste sorológico para identificar as infecções precoces (HURD, H. S., 2002).

A outra situação é aquela onde os animais permanecem soropositivos porém negativos na bacteriologia. Isso ocorre, porque, nem todos suínos permanecem portadores da bactéria até o abate. Acredita-se que até 30% dos suínos provenientes de granjas cronicamente infectadas permanecem portadores e que um terço desses torna-se excretoras (STÄRK, K. et al., 2002). Nessa situação são encontrados resultados como os de Fedorka-Cray, P.; McKean, J.D.; Beran, G.W. (1997) onde 52% (24/46) dos suínos testados foram sorologicamente positivos contra 9% (4/46) positivos na bacteriologia. Soma-se o fato de que mesmo com a bactéria presente nos linfonodos, a excreção ocorre de forma intermitente, resultando em ausência da bactéria nas fezes ao longo da permanência dos suínos na granja (GRAY, J. T. et al., 1995).

Além das relações agente-hospedeiro, devem ser consideradas as características das técnicas utilizadas, seu poder de detecção (sensibilidade) e sua especificidade. O ELISA, por exemplo, acusa a reação para aqueles antígenos que compõe o teste, sorovares exóticos podem ser isolados na bacteriologia e não ser detectados na sorologia (KJAERGAARD, H. D., et al., 2002). Também, um número de bactérias muito baixo e células lesadas podem ser irrecuperáveis no teste bacteriológico (WALTMAN, W. D., 2000).

A vantagem do uso de teste sorológico sobre o bacteriológico é a persistência das imunoglobulinas séricas comparada a excreção intermitente da *Salmonella* sp. O uso da sorologia diminui os problemas de logística pela amostragem freqüente de grande quantidade de animais. Entretanto, o baixo nível sérico das imunoglobulinas no início da infecção, justamente quando a excreção da bactéria é maior, é considerado a maior desvantagem do uso da sorologia.

Apesar disso, a associação positiva entre sorologia e bacteriologia para *Salmonella* sp. em rebanhos suínos, foi demonstrada por Stege, H. et al., (2000). Posteriormente, Alban, L.; Stege, H.; Dahl (2002), J. associaram ( $r^2 = 85\%$ ) níveis de soroprevalência com a proporção de granjas positivas no isolamento de *Salmonella* sp. a partir do conteúdo cecal. Esses autores assumiram a utilização dos resultados de soroprevalência para constituir o índice de infecção por *Salmonella* da granja e o risco que esta granja oferece de contaminação ao abate. Dada a variabilidade na dinâmica da infecção, são utilizados três lotes para classificar o rebanho.

Considerando, ainda, características como a fácil padronização do teste de ELISA e sua adaptabilidade aos sorovares de interesse (VAN DER WOLF P. J., 2001), justifica-se sua adoção como ferramenta básica para classificação de rebanhos nos programas de controle em grande escala. É importante salientar que a bacteriologia é utilizada de forma complementar à sorologia nos programas de controle (ALBAN, L.; STEGE, H.; DAHL, 2002), e continua sendo utilizada no monitoramento da contaminação das carcaças nos abatedouros (SORENSEN, L. L., 2003).

Posteriormente, para a otimização dos programas de controle de salmonela, foi realizado um estudo de concordância entre o uso do soro e suco de carne frente a um ELISA composto com LPS dos sorovares Typhimurium e Cholerasuis, concluindo-se que o suco de carne é uma alternativa pós-mortem de fonte de material para detecção de anticorpos (NIELSEN, B. et al., 1998). Este teste sorológico tem sido a base do programa de controle usado extensivamente na Dinamarca e em outros países. O teste de suco de carne é facilmente adotado pela agroindústria, possibilita a amostragem de muitos lotes e produz informações úteis sobre a necessidade da implementação de medidas de controle nos rebanhos. Mais recentemente, Proux, K. et al. (2000) propuseram o uso do teste de ELISA “completo”, baseado em quatro sorovares (Typhimurium, Anatum, Hadar e Infantis), justificados pela representatividade das amostras isoladas de granjas francesas de terminação de suínos. Como a distribuição dos sorovares difere regionalmente, os testes devem ser padronizados com antígenos que contemplem aqueles prevalentes na região de controle. Para tanto, são necessárias investigações dos sorovares presentes, a adoção de um teste que inclua os mesmos e a validação local do teste escolhido.

Foram identificados por Bessa, M. C.; Costa, M; Cardoso, M. (2001) os sorovares Typhimurium (24,3%), Agona (19,9%), Derby (13,2%), Bredeney (12%) e Panama (5,7%) como os mais prevalentes em suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate, no Rio Grande do Sul. Como estes sorotipos possuem pelo menos dois antígenos LPS comuns ao Typhimurium (O: 1, 4, 5 e 12), o primeiro objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um teste de ELISA baseado em antígeno LPS de *Salmonella* Typhimurium, que possa ser utilizado para testar soro e suco de carne.

## **1.6 Fatores Associados a Infecção por *Salmonella* sp. em Rebanhos Suínos**

A coordenação das atividades em todas estas fases é um fator preponderante no sucesso de programas de controle. Tomando os princípios de programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, e considerando-se que a contaminação de carcaças e produtos industrializados está relacionada diretamente com a presença de portadores e excretadores sadios entre os suínos, estes constituem-se no primeiro ponto crítico para a agroindústria. O controle desses portadores passa pelo monitoramento de fatores como a qualidade da ração fornecida, do manejo e fatores de risco na granja e pela limpeza e desinfecção de baias de espera no frigorífico.

Conforme Wilcock, B. P.; Schwartz, K. L. (1992), os fatores de risco para a apresentação clínica da salmonelose suína, são: a exposição a roedores, alimentos e suínos contaminados; fatores estressantes como o transporte e superlotação, entre outros. No entanto, o esclarecimento dos fatores de risco associados à excreção da *Salmonella* sp., sem apresentação clínica, tem desafiado os pesquisadores. Baggesen, D. L. et al. (1996) isolaram *Salmonella* sp. nos dejetos (34%), fezes (25%) baias (24%), equipamentos (19%) e sistema de ventilação (12%), comprovando que a disseminação deste agente pode ser grande em uma propriedade, principalmente onde a infecção é clínica.

Em 1968 Herard, T. W. (1969) observou que os fatores mais relevantes para infecção de *Salmonella* sp. no rebanho eram o movimento e mistura de lotes. Especificamente, valas com esterco comuns a várias baias, mistura de lotes livres e infectados, movimento de suínos em áreas de pesagem contaminadas, desinfecção inadequada antes da entrada de novos lotes e infecções durante a cobertura.

O *stress* do transporte e jejum pré-abate tem sido registrado como fator desencadeante da excreção da *Salmonella* sp. pelos seus portadores (ISACCCSON, R. E. et al.,1999). Desta forma, podendo contaminar os animais em contato no meio de transporte e nos currais de espera, incrementando o número de animais infectados que adentram o frigorífico.

Entre os fatores estudados por Bush, E. J.; Wegener, B.; Fedorka-Cray, P. J. (1999), granjas que usavam ração não farelada e misturavam a ração fora da granja apresentaram um risco maior de ocorrência de *Salmonella* sp. A discussão desses resultados considera a possibilidade de recontaminação das rações, as diferenças entre

os produtos utilizados nas diferentes granjas, bem como o efeito do agrupamento dos animais.

A mistura de animais de diferentes origens, conforme observações de Quessy, S.; Lotellier, A.; Nadeau E. (1999), está correlacionada com a presença da *Salmonella* sp. Da mesma forma a utilização de ração peletizada demonstrou associação positiva com soro-positividade nos estudos de Lo Fo Wong, D. M. A. et al. (1999). Dahl, J.; Skranker S.; Wingstrand A. (2000) comprovaram que leitões portadores de *Salmonella* sp. no período de creche (7-30kg) aumentam os riscos de introdução do agente nas granjas de terminação.

Como anteriormente observado por Nielsen, B. et al. (1996) é rara a infecção em fêmeas e leitões novos, o problema parece se restringir à difusão horizontal nas terminações. Principalmente nos sistemas de criação em múltiplos sítios, a infecção em fase precoce dos animais não colabora com mais de 10% do total de casos observados na terminação (DAVIES, P. R.; FUNK, J. A., 1999). Dahl, J. et al. (1996) observaram que o isolamento de leitões a partir dos 30 kg funcionava como meio de prevenir a transmissão da *S. Typhimurium*. Por outro lado, a partição sólida entre baias é uma medida que pode inibir a difusão da infecção nas diferentes fases da criação (DAHL, J. et al., 1996). Estes mesmos autores, em outro trabalho, conseguiram reposicionar rebanhos classificados como altamente ou moderadamente infectados para níveis de ausência de infecção ou prevalência muito baixa. Para isto, utilizaram boa higiene, manejo dos dejetos e utilização de partição sólida. Foi também utilizado o sistema todos dentro e todos fora (tanto para o rebanho como um todo, como limitado às baias dentro de instalações). Esta condição foi alcançada, principalmente, quando não havia diarreia nas terminações, que pode ser obtido com a adição de ácido fórmico na água ou preparações orgânicas ácidas (DAHL, J. et al., 1997).

Analisando 353 rebanhos holandeses, Van Der Wolf, P. J. et al. (2001) identificaram seis fatores de risco associados com a prevalência de animais soropositivos. Esta prevalência foi determinada através de Elisa polivalente para *S. Typhimurium* e *S. Livingstone*. Alguns fatores como alimentação líquida com produtos fermentados, que reduzem o pH da ração, já foram descritos anteriormente como possíveis inibidores do crescimento das *Salmonella* sp. Também foi associado ao aumento da prevalência, o diagnóstico prévio de salmonelose clínica.

No Brasil, aparentemente, não há ocorrência clínica freqüente de *S. Choleraesuis*, sendo registrados casos esporádicos de diarreias associadas a *S. Typhimurium* (Embrapa Suínos e Aves, dados não publicados). Entretanto, a presença de animais portadores assintomáticos ao abate tem sido relatada, bem como a importância desse achado para a contaminação do produto final. Bessa, M. C.; Costa, M.; Cardoso, M. (2001) encontraram 55 % de suínos positivos ao abate, em três frigoríficos sob Inspeção Federal do Rio Grande do Sul. Castagna, S. M. F. et al. (2003) encontraram uma prevalência média de 83,33% dos suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate, enquanto que 93,94% das amostras de massa de embutimento produzidas com a matéria-prima proveniente desses animais foram positivas. Isso demonstra a alta correlação entre a presença de animais positivos ao abate e a contaminação do produto final.

Estudos epidemiológicos são importantes para gerar informações regionais que permitam o controle do problema nas granjas, e neste sentido, o segundo objetivo deste trabalho foi, utilizando o teste de ELISA como ferramenta, determinar os fatores relacionados com o nível de infecção em granjas de terminação de suínos nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE SUÍNOS. Disponível em:

<http://www.abipecs.com.br/relatorios.php>. Acesso em 01 fev 2004.

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.

BAGGESEN, D. L. et al. Critical control points (CPC) in pig herds in relation to subclinical *Salmonella* infection. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14, 1996, Bologna. *Proceedings*, Bologna: IPVS p. 171, 1996.

BARROW, P. A. Diagnosis of *Salmonella* by ELISA and other tests. In: WRAY, C, WRAY, A. *Salmonella in domestic animals*. New York, CABI, 2000. Cap.24 p. 407-429.

BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis. In: WRAY, C, WRAY, A. *Salmonella in domestic animals*. New York, CABI, 2000. Cap.4 p.57-72.

BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pigs carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.36, p. 199-206, 1997.

BESSA, M. C.; COSTA, M; CARDOSO, M., Prevalence of *Salmonella* in slaughtered pigs in Rio Grande do Sul. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* AND OTHER FOOD BORNE PATHOGENS IN PORK, 4, 2001, Leipzig, *Proceedings...*, Deventer: Animal Health Service, 2001, p189-194.

BLAHA, T. Pre- harvest food safety and *Salmonella* reduction in the pork chain. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre, *Anais....* Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2001, v.1: p. 39-42.

BUSH, E. J.; WEGENER, B; FEDORKA-CRAY, P. J. Risk factors associated with shedding of *Salmonella* by U.S. finishing hogs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY E CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington, *Proceedings...*, Urbana-Champaign: University of Illinois, 1999, p. 106-108.

CASTAGNA, S.M.F. et al. Associação da prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e a contaminação de embutidos tipo frescal. In: CONGRESSO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. *Anais...* Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003, 483p. p.65-66.

CDC- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PROTECTION. Disponível em: <http://www.cdc.gov/incidod/dbmd/diseaseinfo.htm>). Acesso em 23 dez 2003.

CHRISTENSEN, J. et al. Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish pig herds after implementation of the Danish *Salmonella* Control Program with reference to a pre-implentation study 2002. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 88, p. 175-188, 2002.

DAHL, J. et al. Elimination of *Salmonella* Typhimurium infection by strategia movement of pigs. *Veterinary Record*, London, v.140 p.679-681, 1997.

DAHL, J. et al. Eradication of *Salmonella thyphimurium* by strategic removal of pigs in infected herds. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY. SOCIETY CONGRESS, 14, 1996, Bologna. *Proceedings*, Bologna: IPVS, 1996, p. 173.

DAHL, J.; SKRANKER S; WINGSTRAND A. A risk factors for high *Salmonella*-seroprevalence in finishing pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY. SOCIETY CONGRESS, 16, 2000, Melbourne. *Proceedings*, Melbourne: IPVS, 2000, p.203.

D'AOUST, J. *Salmonella* and the international food trade. *International Journal of food Microbiology*, Amsterdam, v. 24 p.11-31,1994.

D'AOUST, J. *Salmonella* species In: DOYLE M. P.; BEUCHAT L. R.; MONTVILLE T. J. *Food microbiology*. Washington, ASM Press,1997. Cap.8 p.129-158.

DAVIES, P. R., FUNK, J. A., Epidemiology and control of *Salmonella* in pork - some of the questions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington, *Proceedings...*, Urbana-Champaing: University of Illinois, 1999, p. 1-11, 1999.

EKPERIGIN, H. E.; NAGAJARA, K.U. *Salmonella*. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Prattice*, Philadelphia, v.14 n.1 p.17-29, 1998

EMBRAPA SUÍNOS E AVES. Registro interno de diagnóstico do setor de bacteriologia do Laboratório de Sanidade Animal.

FEDORKA-CRAY, P.; McKEAN, J.D.; BERAN, G.W. Prevalence of *Salmonella* in swine and pork: A farm to consumer study. *ISU Swine Research Report*, 1997. Disponível em: <http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports/asl-1507.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2004.

FIALHO, E.T. et al. Composição química e ocorrência de *Salmonelas* em alimentos e concentrados utilizados em rações suínas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília v.20: 377-384, 1985.

FSIS, FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. Progress report on *Salmonella* testing of raw meat and puoltry products, 1998-2002. Disponível em: [www.fsis.usda.gov/OPHS/haccp/salm5year.htm](http://www.fsis.usda.gov/OPHS/haccp/salm5year.htm). Acesso em 01 dez 2003.

GEIMBA, M. P. et al. Serological Characterization and Prevalence of *spvR* Genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *Journal Food Protection*, Ames, v.67, n.6, in press, 2004.

GIROTTO, A. F. Análise e perspectiva da suinocultura brasileira. Anuário 2002 da Suinocultura Industrial, 1:10-16, 2002.

GRAY J. et al. Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.47 p.43-59,1995.

GRAY, J. et al. Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.62 n.1 p.141-146, 1996

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: WRAY, C, WRAY, A. *Salmonella in domestic animals*. New York, CABI, 2000. Cap.1 p.1-18.

HALD, T.; WEGENER, H. C. Quantitative assessment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY E CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington, *Proceedings...*, Urbana-Champaign: University of Illinois, 1999, p.200-205.

HERARD, T. W. *Salmonella typhimurium* in pigs. *Veterinary Record*, London, v.76 p.1506, 1969.

HUMPHREY, T. Public-health aspects of *Salmonella* infection. In: WRAY, C, WRAY, A. *Salmonella in domestic animals*. New York, CABI, 2000. Cap.15 p. 245-263.

HURD, S. et al. Measuring *Salmonella* prevalence in finish swine; evaluation of three methods In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15.,1998, Iowa. *Proceedings...* Iowa, IPVS, 2002. p.313.

ISAACSON, R. E. et al. The effect of feed withdrawal on the shedding of *Salmonella Typhimurium* by swine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY E CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, 1999, Washington, *Proceedings...*, Urbana-Champaign: University of Illinois, 1999, p. 296-298.

KJAERGAARD, H.D. et al. Effect of meal feed or pelleted feed on *Salmonella* prevalence in sows In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15.,1998, Iowa. *Proceedings...* Iowa, IPVS, 2002. p.318.

LO FO WONG, D. M. A. et al. Herd- level risk factors for the introduction and spread of *Salmonella* in Pigs Herds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY E CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 4, 1999, Washington, *Proceedings...* Urbana-Champaign: University of Illinois, 1999, p. 151-154.

MACHADO, H. G. et al. Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico sorológico de infecções pelos sorotipos 3, 5 e 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.53 n.5, p.513-522, 2001.

- MAGUIRE, H. C. F. et al. A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. *Epidemiology and Infection*, Cambridge, v.1 n.10, p. 239-246, 1993.
- MOUSING, J. et al., 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 53, p. 247-261, 1997.
- NIELSEN, B. et al. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 47, p. 205 - 218, 1995.
- NIELSEN, B.; EKEROTH, L.; BAGER, F.; LIND, P. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughterpig herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Columbia, 10:158-163, 1998.
- NIELSEN, J.P. et al. *Salmonella* surveillance and control in danish finishing units. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 14, 1996, Bologna. *Proceedings*, Bologna: IPVS, 1996, p.168
- PROUX, K. et al. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infected pigs. *Veterinary Research*, Ploufragan, v.31 p. 481-490, 2000
- QUESSY, S.; LOTELLIER, A.; NADEAU, E. Risk factors associated with the presence of *Salmonella* in swine herds in Quebec. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 4, 1999, Washington. *Proceedings...* Urbana-Champaign: University of Illinois, 1999, 381 p.165-168.
- ROBERTS, T. Human illness costs of food borne bacteria. *American Journal of Agricultural Economics*, Lexington, v.71, p.468-474, 1989.
- ROSTAGNO, M. Infecção por *Salmonella* spp em suínos durante o descanso pré-abate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto alegre, *Anais....* Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2001, v.1 p 119-120.
- SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. et al. (Eds.). *Diseases of Swine*. 8<sup>th</sup> ed., Ames: Iowa State University Press, 1999. cap.39, p. 535-551.
- SOBESTIANSKY, J. et al. *Clínica e Patologia Suína*, 2<sup>a</sup> ed., Goiânia, Art3 Impressos Especiais, 1999. 464p.
- STEGE, H. et al. Prevalence of subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish finishing pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v.44, p. 175-188, 2000.

- SORENSEN, L. L. The intensified control programme for Salmonella at Danish swine slaughterhouses In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS IN PORK, 5. 2003a, Heraklion, *Proceedings...* School of Veterinary Medicine, University of Tessaly, Karditsa, 2003, 331p. p.169-170.
- STÄRK, K D.C. et al. Differences and similarities among experts' opinions on Salmonella enteric dynamics in swine pre-harvest. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, n. 53, p. 7–20, 2002.
- SUPERANDO AS EXPECTATIVAS. *Anuário 2002 da Suinocultura Industrial*. Porto Feliz, SP, n.157 p.63-64, 2002.
- VAN DER WOLF, P. et al. Results of a longitudinal study of Salmonella enterica infections in 5 sero-positive and sero-negative finishing swine herds in The Netherlands. In: 3th International Symposium on the Epidemiology e Control of *Salmonella* in Pork, 3, *Proceedings*. Washington, p. 175-179, 1999
- VAN DER WOLF, P. J. et al. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Nertherlands. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.78, p. 205-219, 2001.
- VAN WINSEN, R.L. et al. Monitoring of transmission of Salmonella enterica serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam n. 80, p. 267 – 274, 2001.
- VARNAM, A.S. Salmonella In: *Foodborne pathogens*. London, Wolfe Publishing 1991, cap. 4, 462 p.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D. E. ; BARTLETT, A. *The enzyme linked immunosorbent assay*. A guide with abstracts of microplate applications. Nuffield laboratories of Comparative Medicine, 1979, London, 128p.
- WALTMAN, W. D. Methods for the cultural isolation of *Salmonella* In: WRAY, C, WRAY, A. *Salmonella in domestic animals*. New York, CABI, 2000. Cap.21 p. 355-372.
- WEGENER, H. C. et al., *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v.9 n.7 p. 774-780, 2003.
- WILCOCK, B. P.; SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: LEMAN, A.D.; Straw, B. E.; Mengeling, S. D; Taylor, D. J. *Diseases of Swine*. 7<sup>a</sup> ed. Iowa, Iowa State University Press, p. 570-583, 1992.

**CAPÍTULO 2: TESTE DE ELISA PARA MONITORAMENTO DA  
INFECCÃO POR *SALMONELLA* EM SUÍNOS**

## TESTE DE ELISA PARA MONITORAMENTO DA INFECÇÃO POR *SALMONELLA* EM SUÍNOS.

**Kich, J. D.<sup>1\*</sup>; Silva, L. E<sup>2</sup>; Coldebella, A<sup>1</sup>, Piffer, I.<sup>1</sup>; Vizzoto, R<sup>1</sup>; Cardoso, M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Embrapa Suínos e Aves - Caixa Postal 21, CEP 89700-000, Concórdia, SC,*

*jalusa@cnpesa.embrapa.br*

<sup>2</sup> *Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – FAVET - UFRGS, Av. Bento*

*Gonçalves 9090, CEP 91 540-000, POA-RS*

### RESUMO

A implementação de programas de controle de salmonela em suínos, com objetivo de diminuir os riscos de infecção alimentar em humanos, exige métodos rápidos e baratos para medir a intensidade da infecção nos rebanhos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um teste de ELISA para uso, com soro e suco de carne, como ferramenta para medir a intensidade da infecção por salmonela em rebanhos suínos. O antígeno foi produzido, por extração fenólica, a partir do sorovar Typhimurium pela sua homologia antigênica com os sorovares prevalentes em suínos no Rio Grande do Sul. Após a determinação de suas condições intrínsecas, o teste foi aplicado em várias categorias de animais para validação: inoculados oralmente com *S. Typhimurium*, contatos, infectados naturalmente, privados de colostro e imunizados com bacterinas. O teste identificou a soroconversão nos animais inoculados (7 dias p.i.) e nos contatos (21 dias p.i.) e o aumento no número de animais positivos após infecção natural (28,6% para 76,9%). O teste detectou apenas uma reação inespecífica (média de DO=0,012) em soro de animais privados de colostro. A reação cruzada em animais imunizados com bacterinas dos sorovares Agona, Derby e Panama foi claramente detectada pelo teste, porém com o sorovar Bredeney apenas um animal soroconverteu. A sensibilidade e a especificidade do teste foram respectivamente de 92 e 100%. Após a adaptação para o suco de carne, 216 amostras de soro e suco foram testadas paralelamente. Estabelecendo o soro como referência, a sensibilidade do teste para o suco de carne foi de 88,12% e a especificidade 70,43%. Em análise de concordância entre os testes, o índice *kappa* foi de 5,78 e  $p=0,002$  no teste *MacNemar*. Desta forma, o teste de ELISA desenvolvido pode ser usado como ferramenta para determinar a intensidade da infecção por *Salmonella* sp. em rebanhos suínos.

## INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é reconhecida mundialmente como causa comum de doença de origem alimentar em humanos. Os produtos de origem suína são considerados importante fonte de infecção, sendo superados apenas por produtos de origem avícola. No sul do Brasil já existem evidências da ampla disseminação da infecção nos rebanhos suínos (BESSA, M. C.; COSTA, M; CARDOSO, M., 2001). Essa observação assume importância, uma vez que a diminuição da entrada de animais portadores no abatedouro é uma das mais importantes medidas de controle da contaminação dos produtos cárneos. Países como a Dinamarca vêm desenvolvendo programas intensivos de controle de *Salmonella*, baseados em monitoramento sorológico de lotes terminados e classificação de granjas de acordo com o nível da infecção (ALBAN, L.; STEGE H.; DAHL J., 2002). A intensidade da infecção vem sendo medida por pesquisa de anticorpos em soro ou suco de carne através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) que usam uma combinação de antígenos lipopolissacarídeos (LPS) de sorovares prevalentes na região (NIELSEN, S. B. et al., 1995; NIELSEN S. B. et al., 1998; PROUX, K. et al., 2000). No Brasil, foi proposto, anteriormente (VIDAL, C. E. S. et al., 1999), um ELISA baseado em lipopolissacarídeos (LPS) dos sorovares Anatum, Choleraesuis e Typhimurium, pela sua abrangência antigênica. Posteriormente, foram identificados os sorovares Typhimurium (24,3%), Agona (19,9%), Derby (13,2%), Bredeney (12%) e Panama (5,7%) como os mais prevalentes em suínos portadores ao abate no Rio Grande do Sul (BESSA, M. C.; COSTA, M; CARDOSO, M., 2001). Como esses sorotipos possuem pelo menos dois antígenos LPS comuns ao Typhimurium (O: 1, 4, 5 e 12), este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um teste de ELISA baseado em antígeno LPS de *Salmonella* Typhimurium, para ser empregado tanto em soro como em suco de carne, disponibilizando uma ferramenta para programas de controle da infecção em suínos.

## MATERIAL E MÉTODOS

1. Produção do antígeno: a extração do LPS da *Salmonella* Typhimurium seguiu descrição anterior (VIDAL, C. E. S. et al., 1999), onde culturas contendo  $10^{10}$  UFC/mL foram submetidas à fervura (1h) e centrifugadas a 12.000g por 45min; o sobrenadante

obtido foi filtrado (22 $\mu$ m). A extração fenólica foi realizada pelo acréscimo de igual volume de fenol (90%) ao produto filtrado, homogeneizado por 30min em temperatura ambiente, centrifugado a 12.000g por 45min, sendo a fase fenólica descartada. Esse procedimento foi repetido até desaparecer a precipitação entre as fases fenólica e aquosa. A fase aquosa foi dialisada por três dias e congelada até o momento do uso.

2. Inoculação: foram utilizados leitões de 95 dias de idade, provenientes de sistema de produção *Specific Patogen Free* (SPF). Esse sistema é livre das doenças previstas na instrução normativa nº19 da Secretaria de Defesa Animal (DOU, 2002): peste suína clássica, doença de Aujeszky, brucelose, tuberculose, sarna, leptospirose, rinite atrófica progressiva, pneumonia micoplásmica, pleuropneumonia suína e disenteria suína. Dois leitões foram inoculados oralmente com  $3,5 \times 10^8$  UFC de *S. Typhimurium*, sendo outros dois animais colocados como contatos na mesma baia, dois dias após a inoculação (p.i.). A amostra utilizada era proveniente de um surto de diarreia, havia sido isolada na Embrapa Suínos e Aves e sorotipada pelo FIOCRUZ sob nº IOC 3485. O soro dos animais apresentaram densidade ótica (DO) baixa (0,070 a 0,129) antes da inoculação. A soroconversão foi observada pelo aumento da DO obtida no período até seis semanas p.i.

3. Condições do teste: as concentrações preliminares dos componentes do teste foram estabelecidas através da avaliação das DOs obtidas para um soro positivo (animal inoculado) e um soro negativo (animal SPF). Os componentes foram testados nas seguintes diluições: soro (1:50 até 1:1.200); antígeno (1:500 até 1:7.000) e conjugado (1:10.000 até 1:45.000). Os resultados que permitiram uma maior discriminação entre os soros positivo e negativo foram escolhidos para continuar a padronização.

A seguir, com o objetivo de formar o grupo de soros controle, 276 amostras de soro provenientes de animais SPF, inoculados e naturalmente infectados foram testadas, nas condições estabelecidas preliminarmente, sendo escolhidos os soros que apresentavam DOs consideradas adequadas: 0,100 (controle negativo=CO); 0,250 (controle positivo fraco=C1); 0,600 (controle positivo intermediário=C2); 1,000 (controle positivo forte=C3). As condições finais do teste foram estabelecidas por análise multifatorial dos resultados obtidos com os soros controles nas condições preliminarmente estabelecidas.

4. Protocolo do teste de ELISA: placas (DYNEX IMMULON 2 HB) foram impregnadas com 100 $\mu$ L, por cavidade, do antígeno diluído (1:2.000) em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6 – 0,5M), permanecendo durante a noite a 4°C e, a seguir, congelada por, no mínimo, uma hora a –70°C. No momento do uso, após descongelamento em temperatura ambiente, a placa era lavada 3 vezes por 3min com tampão fosfato, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), pH 7,4. Os soros, diluídos 1:400 em PBS-T contendo 1% de albumina bovina (PBS-TA), foram adicionados em triplicata à placa, a qual foi incubada a 37°C por 30 min, em câmara úmida. Após lavagem, como já descrito, colocou-se, em cada cavidade, 100 $\mu$ L do soro contra IgG de suíno conjugado com peroxidase na diluição de 1:25.000 em PBS-TA. Após incubação em câmara úmida a 37°C por 30min, procedeu-se a lavagem e colocou-se 100 $\mu$ L do revelador por cavidade. O revelador foi preparado no momento do uso, através da adição de 100 $\mu$ L do substrato (3,5 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 230 $\mu$ L de NaOH 10N) para cada 10mL de tampão 3,3',5,5' *tetramethyl-benzidine* (TMB). Após 15min de incubação em temperatura ambiente, a intensificação da cor foi bloqueada com o acréscimo de 50 $\mu$ L de ácido sulfúrico (2M) por cavidade. A DO foi lida em espectrofotômetro com filtro 450 nm (ICN-TITERTEK MULTISKAN).

5. Controle interno e externo teste: para testar a hipótese de utilização da regressão linear, proposto por Jacobson, R. H.; Downing, D. R (1991) para a correção diária dos resultados, confirmou-se, primeiramente, a tendência linear das DOs obtidas no teste em crescentes concentrações de anticorpos em dois soros sabidamente positivos. Posteriormente, ao longo de 56 dias, os soros controles foram igualmente submetidos, em triplicata, ao teste, sendo que as medianas dos resultados obtidos constituíram a reta padrão do teste desenvolvido.

Como controle interno do teste foram estabelecidos dois critérios: um coeficiente de correlação (r) mínimo, > 90%, entre as retas padrão e diária, e um coeficiente de variação menor que 10% entre as triplicatas de todos os soros testados.

6. Ponto de corte: foi determinado pela análise da distribuição dos resultados de DO de uma população de 155 leitões negativos para *Salmonella* sp. A partir dos resultados obtidos, foi calculada a média das medianas que, acrescida de quatro desvios padrão, constituiu o ponto de corte.

## 7. Aplicação do teste:

Animais naturalmente infectados: o teste foi aplicado em rebanho comercial positivo para *Salmonella* sp. Foram amostrados sangue e fezes de 56 leitões aos 80 dias de idade. Ao abate, de 26 leitões desse grupo foram coletados sangue, conteúdo intestinal e linfonodos. As amostras foram submetidas a pesquisa de *Salmonella* sp., conforme Michael, G. B.; Cardoso, M.; Costa, M. (2003), e o soro ao teste de ELISA.

Leitões privados de colostro: foi coletado sangue de 30 leitões logo após ao nascimento, com o objetivo de avaliar o desempenho do teste com soro sem a presença de anticorpos.

Observação da reação cruzada em animais imunizados com bacterinas: grupos de cinco leitões, com idade entre 50 e 60 dias e peso médio de 19kg, foram vacinados com bacterinas produzidas, individualmente, com os sorovares Typhimurium, Agona, Derby, Bredeney e Panama. A bacterina foi produzida a partir do cultivo de 18h da amostra em ágar nutritivo a 37°C, que foi colhido em salina estéril e padronizado em 0,32 DO por espectrofotometria (540nm). A suspensão obtida foi fervida por duas horas. A bacterina final foi composta de 22mL de hidróxido de alumínio, 59,5mL de salina estéril, 18mL da bacterina concentrada e 0,5mL de formol. O teste de esterilidade foi realizado após a fervura e homogeneização. O dia zero do experimento foi estabelecido como sendo o da primeira coleta de sangue. No dias 5 e 19 foi aplicado 1mL da bacterina, por via intramuscular. O sangue dos animais foi coletado, semanalmente, até o dia 49.

8. Padronização do teste de Elisa para suco de carne: o protocolo utilizado para o teste com o suco de carne foi o mesmo determinado para o soro. Após testar diferentes diluições do suco de carne em um grupo de 28 animais, que apresentou DO sérica próxima ao ponto de corte, a diluição 1:30 demonstrou o maior índice de concordância (70%). A seguir, o teste padronizado foi aplicado, paralelamente, em amostras de suco de carne e soro de 216 animais coletados aleatoriamente ao abate.

A extração do suco de carne realizou-se pelo congelamento e descongelamento de um fragmento de, no mínimo, 3x1x1cm de diafragma, armazenado em bisnaga plástica. O

transudato, colhido em microtubos plásticos, foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do teste.

9. Determinação da sensibilidade e especificidade do teste: para determinação da sensibilidade foram testadas 25 amostras de soro coletadas de três suínos inoculados oralmente com  $3,5 \times 10^8$  UFC *S. Typhimurium* e dois animais mantidos como contatos. A especificidade foi avaliada através de avaliação de 155 animais negativos para *Salmonella* sp.

A sensibilidade, especificidade e coeficiente global do teste de ELISA com suco de carne foram determinados utilizando o teste com o soro como referência

10. Análise estatística: A análise estatística foi realizada utilizando diferentes procedimentos do programa SAS (1989). O grau de concordância entre os testes foi medido pelo índice *Kappa* e o grau de significância pelo teste de *MacNemar*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de ELISA-LPS apresentou o desempenho esperado nas diferentes categorias de animais testadas, identificando a soroconversão em animais inoculados, naturalmente infectados e desafiados com bacterinas a partir de sorovares com similaridade antigênica.

A tendência linear em concentrações crescentes de anticorpos foi observada como demonstram as retas e equações da Figura 1. As retas estão altamente correlacionadas,  $r = 0,992$  e  $r = 0,989$ , portanto a regressão linear foi adotada como correção diária do teste.

A determinação do ponto de corte é sempre um momento crítico da padronização de um teste. No presente estudo o ponto de corte foi estabelecido, arbitrariamente, após análise de dispersão de uma população negativa. Para chegar ao ponto de corte, somou-se a média dessa população (0,065) a 4 desvios padrão (0,1037), o que exclui estatisticamente da população negativa as DO's acima de 0,169. A comparação com pontos de corte proposto por outros testes não é possível uma vez que dependem das condições internas, da população alvo e dos soros de referência.

Os resultados que permanecem próximos ao ponto de corte, constituem um aspecto crítico em testes de ELISA. Entretanto a existência desse grupo numa

população é inevitável, resultando tanto de reações inespecíficas como de animais que estão iniciando a soroconversão. Entretanto, o ELISA-LPS para *Salmonella* sp. não pretende ser uma ferramenta de diagnóstico individual, visando apenas a determinação da intensidade da infecção no rebanho avaliado. Sendo assim, o ponto de corte deve ser discutido e adaptado ao propósito do teste, considerando alterações de sensibilidade e especificidade (BARAJAS-ROJAS, J. A., RIEMANN, H. P.; FRANTI, C. E., 1993), e a evolução do programa de controle no qual o teste está sendo utilizado.

Na Dinamarca, onde o programa de controle iniciou a ser implantado em 1995, era utilizado um ponto de corte alto (40% de DO), que admitia uma quantidade maior de falsos negativos. Cinco anos após, ao reavaliar o programa e constatar que, tanto o número de granjas infectadas, como a intensidade da infecção diminuía, o ponto de corte foi ajustado para 20% da DO (ALBAN, L.; STEGE H.; DAHL J., 2002). Também na Alemanha, o programa de controle ao ser iniciado utilizava o ponto de corte em 40% da DO (BLAHA, TH., 2003). A influência do ponto de corte no resultado foi demonstrado por Camitz, A. et al. (2001), ao avaliarem dois testes comerciais com pontos de corte distintos (40% e 10% da DO). Aplicado numa mesma população, o teste com ponto de corte mais baixo, apresentou um número maior de animais positivos, estas diferenças são esperadas e demonstram que o ponto de corte pode e deve ser ajustado, dependendo do avanço do programa de controle.

Foi possível observar a soroconversão em animais inoculados com *Salmonella* Typhimurium, como demonstra a Figura 2, sete dias após o desafio. Esse mesmo tempo de soroconversão foi observado por Wood, R. L.; Pospischil, A.; Rose, R. (1989), porém é possível existir variação de acordo com o delineamento experimental. Nielsen, S. B. et al. (1995) observaram a soroconversão 21 dias p.i. com anticorpos persistindo até o final do estudo (110 dias p.i.). Enquanto Baum, D. H.; Harris, D. L.; Nielsen, S. B. (1999) detectaram o aumento de DO precocemente, aos três dias p.i., com o pico aos 10 dias em leitões inoculados com os sorovares Typhimurium, Choleraesuis e Infantis.

Os leitões mantidos em contato com os inoculados iniciaram a soroconversão 21 dias após a inoculação (Figura 1). O teste de ELISA foi capaz de identificar a infecção, demonstrando o aumento da concentração de anticorpos no período observado. Todos os animais mantiveram DOs elevadas até o final do período de observação. Uma vez que os animais inoculados foram submetidos ao manejo normal da granja, o qual

permitiu o contato com as fezes, provavelmente tiveram seu sistema imune continuamente estimulado pela presença do agente no ambiente. Esse ciclo de infecção fecal-oral foi também a responsável pela infecção e soroconversão nos animais contato.

Quando o teste foi aplicado num rebanho onde estava ocorrendo um surto de infecção, observou-se que, na primeira visita, 73,2% (41/56) dos leitões estavam excretando *Salmonella* Typhimurium nas fezes, enquanto 28,6% (16/56) eram soropositivos. Na segunda observação, 113 dias após, a percentagem de soropositivos havia subido para 76,9% (20/26), enquanto cinco (19,2%) desses animais continuavam portadores de *Salmonella* sp. no conteúdo intestinal e/ou linfonodos mesentéricos. Ou seja, foi possível observar o pico de excreção de *Salmonella* Typhimurium após a infecção natural seguida pelo aumento, na segunda amostragem, da prevalência de soropositivos. Nesse caso, o teste de ELISA detectou o aumento do número de animais soropositivos após uma comprovada infecção e excreção natural de *Salmonella* Typhimurium na granja. No momento do abate, a quantidade de animais portadores foi menor que o número de soropositivos, o que já havia sido observado, anteriormente, por Kranker et al. (2003), uma vez que nem todos os animais que sofreram infecção permanecem portadores e/ou excretadores ao abate (BERENDS, B. R. et al., 1996). Por outro lado, animais que se contaminam no pré-abate e são testados antes da soroconversão serão portadores de *Salmonella* sp., porém soronegativos (HURD, H. S. et al., 2001). Sendo assim, são esperadas discordâncias entre os resultados de pesquisa bacteriológica e sorologia. O uso da bacteriologia como base de programas de controle é limitado economicamente. Isso favorece a adoção da sorologia como ferramenta, uma vez que a soroprevalência está correlacionada com a pressão de infecção na granja (VAN der WOLF, P. J. et al., 2001). Dessa forma, o teste de ELISA pode ser útil para discriminar os rebanhos quanto à infecção, permitindo criar regras para intervenção em granjas, organização da logística de abate e monitoramento do programa de controle (ALBAN, L.; STEGE H.; DAHL J., 2002).

A média de DO dos leitões privados de colostro foi 0,012 com desvio padrão de 0,006, variando de 0,001 a 0,022. Esses resultados comprovam a reação extremamente baixa quando testado soro sem anticorpos. Na população escolhida para determinar o ponto de corte, a média de DO foi 0,065 e o desvio padrão 0,026, mais altos do que o obtido com o soro de leitões privados de colostro. Essa diferença de DOs pode ser

atribuída às reações inespecíficas originadas do contato dos leitões com antígenos de outros membros da família *Enterobacteriaceae*, o que retrata mais fielmente as condições de campo.

O teste de ELISA-LPS da *S. Typhimurium* possui os antígenos O 1, 4, 5 e 12, portanto deve ser capaz de detectar anticorpos em animais submetidos ao desafio por sorovares que possuam similaridade antigênica. A soroconversão, como esperado, foi observada no grupo de leitões inoculados com os sorovares Typhimurium, Agona, Derby e Panama (Figura 3) com alguma diferença no tempo de soroconversão e intensidade de resposta.

O grupo desafiado com *S. Bredeney* não respondeu como esperado, sendo que apenas um leitão demonstrou soroconversão no período estudado. Embora possa ser visualizado, na Figura 3, um discreto aumento nas DOs referentes às últimas coletas, em nenhum momento foi ultrapassado o ponto de corte de 0,169 de DO. O sorovar Bredeney possui três antígenos somáticos (1, 4 e 12) comuns ao Typhimurium, portanto esperava-se o perfil de soroconversão semelhante aos sorovares anteriores. Diferenças individuais na capacidade e tempo de soroconversão no grupo de animais desafiados já foram observadas nesse tipo de estudo (WOOD, R. L.; POSPISCHIL, A.; ROSE, R., 1989; NIELSEN, S. B. et al., 1995). Sendo assim, é possível supor que o restante dos animais do grupo pudesse vir a soroconverter após o período de observação.

O teste de ELISA com soro resultou numa sensibilidade de 92%, e especificidade de 100% e coeficiente global de 98% (Tabela 1). Já quando utilizado com suco de carne (Tabela 2), obteve-se uma sensibilidade de 88,12%, especificidade de 70,43% e coeficiente global do teste de 78,90 %. Houve concordância significativa ( $p=0,002$ ) entre os testes com soro e suco de carne, embora o índice kappa tenha sido de 5,78 classificado entre moderado e substancial. Os índices encontrados foram inferiores àqueles relatados por Nielsen, S. B. et al. (1998), que, avaliando 103 animais, obtiveram uma sensibilidade entre 80 a 89% e especificidade entre 91 a 100%, dependendo do ponto de corte, estabelecido.

A DO das amostras de soro com resultados discordantes do suco de carne ficaram no intervalo de 0,98 a 0,266, próximo ao ponto de corte (0,169). Como a maioria dos resultados discordantes (34/46) foi positiva no suco de carne e negativa no soro, poderia se supor que o suco estivesse concentrado. Porém, diluições próximas

(1:20 até 1:40) foram testadas e geraram resultados semelhantes no teste. Desta forma, as reações falso positivas podem estar ocorrendo devido a componentes no suco que reajam inespecificamente, necessitando uma maior harmonização entre os testes. De acordo Greiner M.; Bohring D. (1994) esta harmonização pode ser alcançada estabelecendo um dos testes como padrão e analisando a sensibilidade e especificidade do outro teste após alteração do ponto de corte.

### CONCLUSÕES

O teste de ELISA desenvolvido para soro foi capaz de identificar suínos infectados por *Salmonella* sp. apresentando uma sensibilidade de 92% e especificidade de 100% podendo ser adaptado para o uso com suco de carne.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BARAJAS-ROJAS, J. A., RIEMANN, H. P.; FRANTI, C. E. Notes about determining the cut-off value in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v.15, p.231-233, 1993.

BAUM, D. H.; HARRIS, D. L., NIELSEN, B. Serological and bacteriological responses of pig infected with three serotypes of Salmonella in: 3th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 3, *Proceedings*. Washington, p. 22-23, 1999.

BERENDS, B. R.; URLINGS, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A.; VAN KNAPEN, F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food Microbiology*. v.30, p. 37-53, 1996.

BESSA, M. C. COSTA, M; CARDOSO, M., Prevalence of *Salmonella* in slaughtered pigs in Rio Grande do Sul. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* AND OTHER FOOD BORNE PATHOGENS IN PORK, 4, 2001, Leipzig, *Proceedings...*, Deventer: Animal Health Service, 2001, p189-194.

BLAHA TH. Proficiency test of four *Salmonella* antibody ELISA-test for their harmonization. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *FOODBORNE PATHOGENS IN PORK*, 5. 2003, Heraklion, *Proceedings...* Karditsa: School of Veterinary Medicine, University of Tessaly, 2003b, 331p. p.105-107.

CAMITZ, A. HerdChek salmonella antibody ELISA for the serological monitoring of Salmonella infection in swine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* AND OTHER FOOD BORNE PATHOGENS IN PORK, 4, 2001, Leipzig, *Proceedings...*, Deventer: Animal Health Service, 2001, p.505-508.

DOU- Diário Oficial da União, nº41, secção 1, 01/03/2002.

GREINER M.; BOHRING D. Notes about determining the cut-off value in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v.20 p.307-310, 1994.

HURD, H.S. et al. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a Salmonella Typhimurium – contaminated environment. *American Journal Veterinary Research*, Schaumburg, v. 62, n 8,. p. 1197 – 1194, 2001.

JACOBSOM, R. H.; DOWNING, D. R. KELA: Acquisition, management and analysis of ELISA data. Ithaca: Cornell University Research Foundation, 1991, 71p.

KRANKER, S. et al. Longitudinal study of *Salmoella* enterica serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.41 n.6 p. 2282-2288, 2003.

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

NIELSEN S. B., WINGSTRAND, A.; NIELSEN, N.; DAHL, J.; Lind, P. Detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 biotype 4 in rats, mice, cats, dogs and from water and feed sources on swine farms. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15.,1998, Birmingham. *Proceedings...* Birmingham, IPVS, 1998. p.83.

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*, Amsterdam, v.47, p. 205-218, 1995.

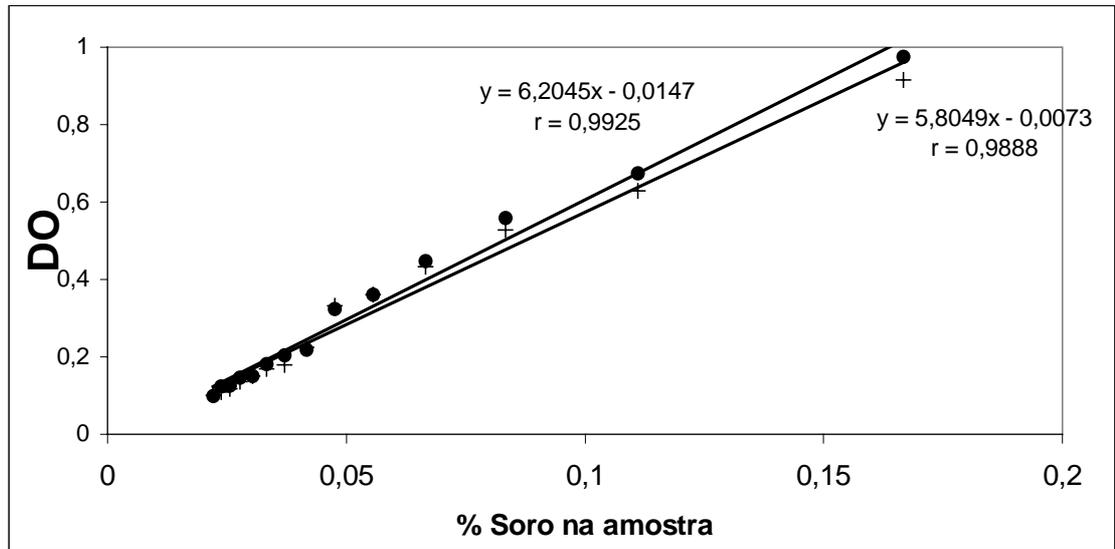
PROUX, K. et al. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infected pigs. *Veterinary Research*, Ploufragan, v.31 p. 481-490, 2000.

SAS, User' guide, version 6.4 ed., Cary: 1989.1, 943p.

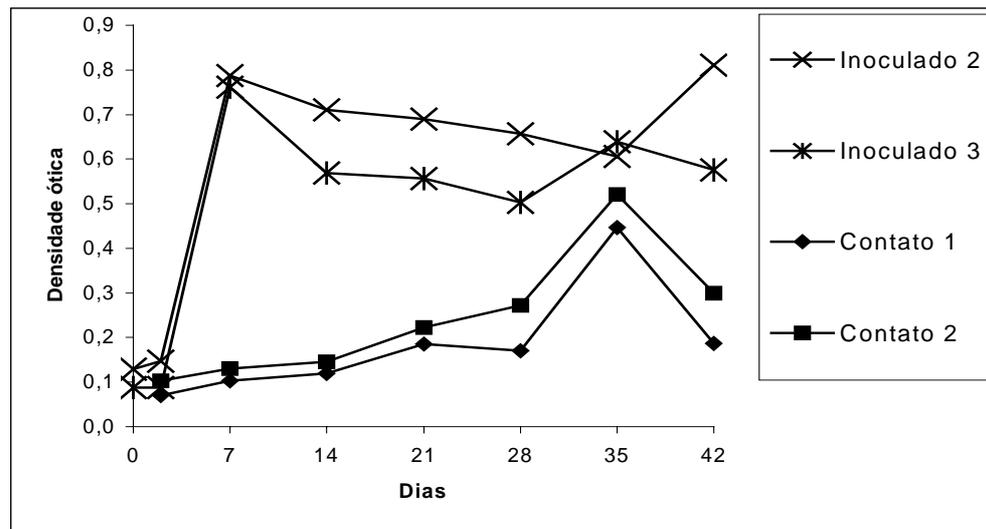
VAN DER WOLF, P. J., WOLBERS, A.R., ELBERS, H.M.J.F, VAN DER HEIJDEN, KOPPEN, W. A., HUNNEMAN, F. W., VAN SCHIE, TIELEN, M.J.M. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, v.78, p. 205-219, 2001.

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

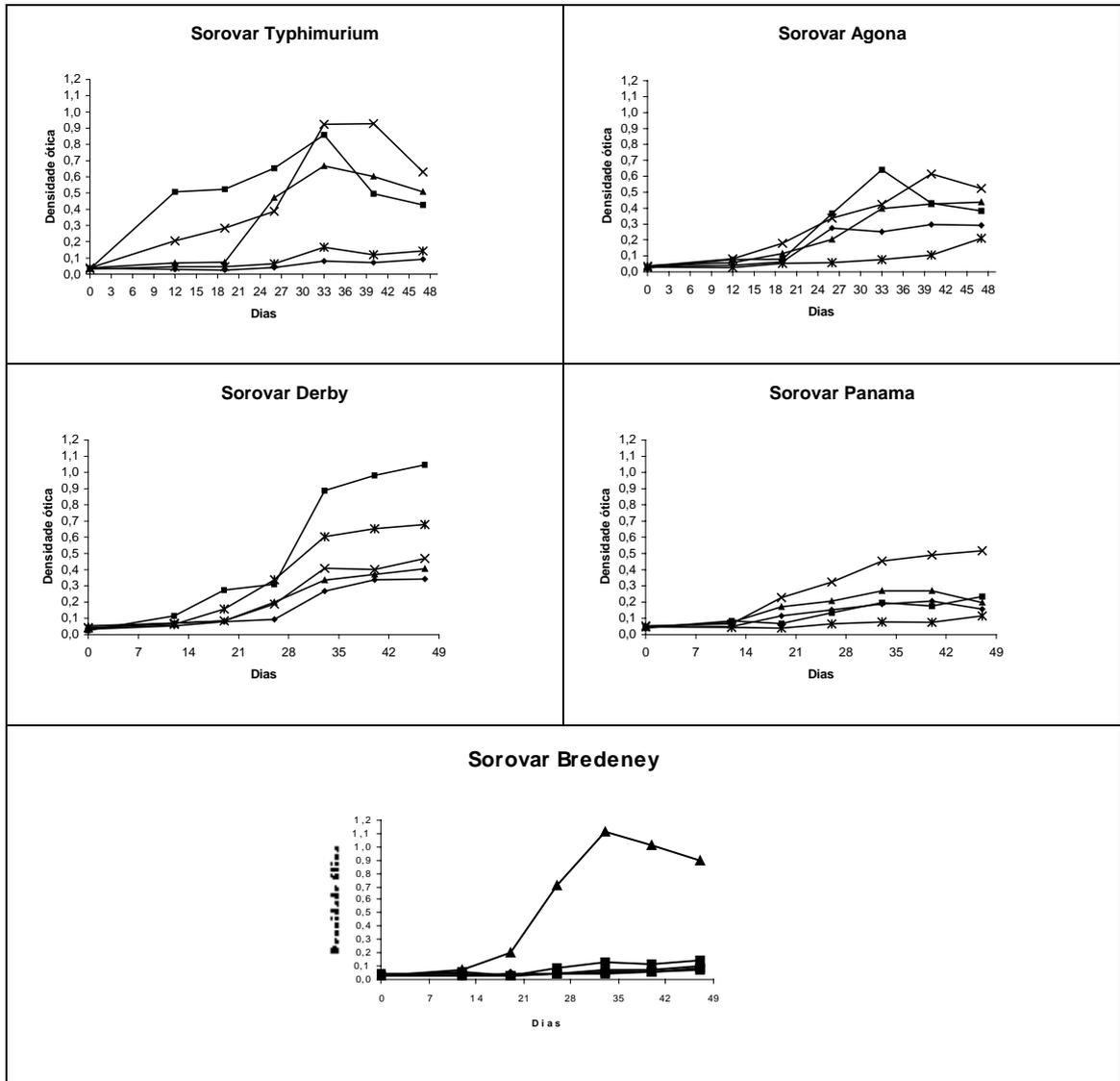
WOOD, R. L.; POSPISCHIL, A.; ROSE, R. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *American Journal Veterinary Research*, Schaumburg, v.50 p. 1015-1021, 1989.



**Figura 1** : Resultados de Densidade Ótica (DO) obtidos em teste de ELISA-LPS com duas amostras de soro provenientes de animais positivos para *Salmonella* sp. diluídos seriadamente.



**Figura 2:** Resultados obtidos no teste de ELISA-LPS de *S. Typhimurium* com amostras de soro provenientes de leitões inoculados via oral com *S. Typhimurium* e animais contato.



**Figura 3:** Resultados obtidos no teste de ELISA-LPS de *S. Typhimurium* com amostras de soro provenientes de leitões inoculados via intramuscular com bacterinas produzidas com os sorovares Typhimurium, Agona, Derby, Panama e Bredeney.

**Tabela 1:** Resultados obtidos no teste de ELISA baseado em LPS de *S. Typhimurium* obtido a partir do teste de amostras de soro de uma população positiva e negativa para *Salmonella* sp.

<b>Resultado no ELISA</b>	<b>Condição para <i>Salmonella</i></b>		<b>Total</b>
	Positivo	Negativo	
Positivo	23	000	23
Negativo	02	155	157
<b>Total</b>	25	155	180

Sensibilidade =  $23/25 * 100 = 92\%$

Especificidade =  $155/155 * 100 = 100\%$

Coefficiente global do teste =  $(23+155)/180 * 100 = 98,8\%$

**Tabela 2:** Resultados obtidos no teste de ELISA baseado em LPS de *S. Typhimurium* de amostras de soro e suco de carne provenientes de 216 suínos.

Suco de carne	Soro		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	89	34	123
Negativo	12	81	93
<b>Total</b>	101	115	216

Índice  $\kappa=0,578$

Sensibilidade= $89/101*100=88,12\%$

Especificidade= $155/155*100=100\%$

Coefficiente global=  $(81+89)/216*100=78,70\%$

**CAPÍTULO 3: FATORES ASSOCIADOS À SOROPREVALÊNCIA  
DE *SALMONELLA* EM REBANHOS COMERCIAIS DE SUÍNOS**

CIÊNCIA RURAL v.35, n.2, 2005

**Fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos****Factors associated with seroprevalence of *Salmonella* in commercial pig herds****Jalusa Deon Kich<sup>1</sup>; Nelson Mores<sup>2</sup>; Itamar Antonio Piffer<sup>3</sup>; Arlei Coldebella<sup>4</sup>; Armando Amaral<sup>5</sup>; Lucas Ramminger<sup>6</sup>; Marisa Cardoso<sup>7</sup>**

## RESUMO

*Um estudo transversal foi utilizado para identificar fatores associados à prevalência de suínos sorologicamente positivos para **Salmonella** nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Sessenta e cinco granjas foram visitadas uma semana antes do abate dos animais para aplicação de questionário e coletas de ração, água e sangue. A ração foi submetida à pesquisa de **Salmonella** por isolamento e PCR. Foram testados soros de aproximadamente 40 leitões de cada propriedade utilizando ELISA com antígeno do sorovar Typhimurium. Após a análise de distribuição da prevalência, as granjas foram classificadas em três categorias, baixa (até 40%), média (40-70%) e alta (mais de 70%). Estas categorias constituíram a variável explicada e a pesquisa de **Salmonella** na ração, colimetria da água e as respostas do questionário, as variáveis explicativas. Inicialmente, a associação entre as variáveis explicativas e a explicada foi estudada pelo teste de  $\chi^2$ . As variáveis associadas ( $p \leq 0,1$ ) foram submetidas à análise fatorial de correspondência múltipla, com a qual foi possível identificar a associação da maior soroprevalência com o seguinte conjunto de variáveis: nas granjas terminadoras, uso de ração peletizada, distribuição de dejetos a menos de 100m do local de captação de água, não utilização de comedouro do modelo comedouro/bebedouro, transporte com freteiro misturando animais de várias granjas; nas granjas de ciclo completo, ingredientes de ração desprotegidos*

---

<sup>1</sup> Médico Veterinário, MSc., Embrapa Suínos e Aves - Caixa Postal 21, CEP 89700-000, Concórdia, SC, Brasil

<sup>2</sup> Médico Veterinário, MSc., Embrapa Suínos e Aves

<sup>3</sup> Médico Veterinário, DSc., Embrapa Suínos e Aves

<sup>4</sup> Médico Veterinário, DSc., Embrapa Suínos e Aves

<sup>5</sup> Biólogo, MSc., Embrapa Suínos e Aves

<sup>6</sup> Acadêmico Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>7</sup> Médico Veterinário, DSc., Setor de Preventiva, Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*de outros animais, ausência de controle de roedores, ração seca, ausência de cerca, não uso da pintura com cal após lavagem e desinfecção e a entrada de outras pessoas, além do técnico, na granja. Das 65 granjas visitadas, 98,5% foram ELISA positivas com soroprevalência 57,6% (intervalo de confiança entre 56-60%).*

**Palavras-chave:** *suíno, Salmonella, prevalência, análise de correspondência, estudo transversal.*

#### ABSTRACT

*A cross-sectional study was conducted with 65 finishing pig herds from the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, Brazil, in order to identify factors associated with seroprevalence for **Salmonella**. Pig farms were visited one week prior to slaughtering of animals when personnel were asked to answer a questionnaire. Feed was also sampled for attempts of **Salmonella** isolation, water for colimetrics analysis and around 40 pigs were bled. Feed samples were subjected to **Salmonella** isolation in selective media and sera were tested in an ELISA, plates were coated with antigens of serovar Typhimurium. Herds were classified in one of three categories according to the prevalence of ELISA positive sera, being low (less than 40% of positive sera), medium (between 40 and 70% positive sera) or high (more than 70% positive sera). Seroprevalence was used as the explanatory variable and results obtained from the attempts to isolate **Salmonella** from feed, water colimetrics results and the questionnaire answers were used as explanatory variables. Initially, attempts of association between explanatory and explained variables were performed using the chi-square test. When associated ( $p \leq 0.1$ ), the two variables underwent multiple correspondence analysis. Factors associated with herds having high seroprevalence were: in finishing herds, pelleted feed, swine manure disposal less than 100m from surface water, feeder not provided with water drinker, swine from several herds transported together to slaughterhouse; in the farrow-to-finish herds, feed ingredients exposure to other animals, no active rodent control, dry feed, absence of fence, whitewashing of facilities after cleaning and disinfecting and permission for other people*

---

entrance to the herd. Among the 65 pig herds visited, 98.5% were ELISA-positive, with seroprevalence of 57.6% (confidence interval 56 to 60%).

**Key words:** swine, *Salmonella*, ELISA, prevalence, correspondence analysis, cross-sectional study.

## INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos acometem cerca de 76 milhões de pessoas, causando 325.000 hospitalizações e 5.000 óbitos, anualmente, nos Estados Unidos da América. Baseados nessa ocorrência, FRENZEN et al. (1999) estimaram em 2,3 bilhões de dólares o custo anual da salmonelose humana. Estando 6 a 9% dos casos humanos associados a produtos suínos contaminados, a contribuição desses no custo da salmonelose humana resultaria entre 100 a 200 bilhões de dólares.

Os produtos suínos foram considerados fonte de infecção em 10 a 19% dos casos de salmonelose em humanos na Dinamarca e Holanda (SALINPORK, 2001). Os suínos portadores dos sorovares de *Salmonella* causadores de gastroenterite em humanos, na maioria das vezes, não apresentam sinais clínicos, passando despercebidos na granja e no abatedouro. Na avaliação de BERENDS et al. (1997), 70% das carcaças contaminadas são dos próprios animais portadores e as demais (30%) são de contaminação cruzada, o animal portador apresentou 3 a 4 vezes mais risco de ter a carcaça positiva.

Segundo *CODEX Alimentaris* a presença de qualquer sorovar de *Salmonella* em alimentos é motivo para classificá-los como impróprios para consumo, tanto no mercado nacional como internacional. Isto tem levado a indústria de produtos de origem animal a implementar estratégias de controle com a finalidade de garantir a segurança dos alimentos. Conforme demonstrado por BARBER et al. (2002), a *Salmonella* pode estar amplamente distribuída nos sistemas de produção, desta forma, estudos observacionais regionais que indiquem quais são os fatores de risco que mais favorecem a infecção são fundamentais para orientar os programas de controle nas granjas.

Este trabalho objetivou identificar os fatores associados com o nível de infecção por *Salmonella* em suínos de terminação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

De janeiro a julho de 2000, foi realizado estudo transversal em 65 granjas de suínos nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina; 33 granjas de ciclo completo (CCs) e 32 unidades de terminação (UTs), o tamanho da amostra foi definido por conveniência a partir da ponderação entre a análise estatística e recursos disponíveis. Após contato com as agroindústrias, foram sorteadas granjas que possuíam mais de 100 leitões em terminação, porque representam a maior quantidade de animais abatidos. As mesmas estavam localizadas nas principais regiões produtoras: Região Sul, Vale do Itajaí e Oeste em Santa Catarina; Região da Serra, Alto Uruguai, Vale do Taquari e Missões no Rio Grande do Sul.

As granjas foram visitadas uma semana antes do abate para aplicação de um questionário. Na versão final, após estudo piloto em duas granjas, constavam 171 variáveis agrupadas nos seguintes temas: informações gerais da granja; características da água, rações e manejo alimentar; detalhes do manejo das criações, com ênfase em limpeza e desinfecção; medidas de biossegurança e vulnerabilidade da granja.

Durante a visita, foi coletado sangue de aproximadamente 40 suínos por granja para determinação da soroprevalência. O tamanho da amostra, para esta determinação, foi calculado considerando uma prevalência esperada de 20%, precisão de 10% e nível de confiança de 90%. O soro foi congelado até ser testado pelo ELISA constituído de antígeno lipopolissacarídeos (LPS) purificados de *Salmonella* sorovares Typhimurium (Grupo B, antígenos O: 1, 4, 5 e 12) desenvolvido na Embrapa Suínos e Aves (KICH et al., 2003). As granjas foram categorizadas de acordo com a distribuição da soroprevalência da seguinte forma: Salmonela=1 prevalência baixa, menor ou igual a 40%; Salmonela=2 prevalência intermediária entre 40 e 70%; Salmonela=3 prevalência alta, igual ou maior que 70%.

Na mesma ocasião, foram amostradas a ração de terminação, armazenada no silo da granja, e a água de consumo dos animais. A ração foi submetida à pesquisa de *Salmonella* por

isolamento (MICHAEL et al., 2003) e pela técnica da reação em cadeia da polimerase (OLIVEIRA et al., 2002), sendo também analisada quanto a sua granulometria pela metodologia descrita por ZANOTTO & BELLAVAR (1996). A contaminação microbiológica da ração e água foi estimada por colimetria utilizando a técnica de tubos múltiplos para ração e cromogênico para água (SILVA et al., 1997).

As respostas do questionário, bem como os resultados das análises de ração e água, constituíram as variáveis explicativas, enquanto as categorias da soroprevalência, a variável explicada. As variáveis quantitativas foram categorizadas de acordo com justificativas técnicas e frequência dos dados. Inicialmente, utilizou-se o teste de  $\chi^2$ , através do programa SAS (1989), para verificar a associação entre variáveis explicativas e explicada. As variáveis explicativas que apresentaram associação com valor de  $p \leq 0,1$  foram submetidas à análise fatorial de correspondência múltipla (AFCM) utilizando o programa SPADN (SPADN, 1991), sendo a granja a unidade de análise.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 65 granjas avaliadas, 98% (64/65) apresentaram animais positivos no teste de ELISA, sendo que a soroprevalência total foi de 57,6% (intervalo de confiança entre 56-60%). As frequências de UTs nas categorias Salmonela=1, 2 e 3 foram de 8, 10 e 14 granjas respectivamente, com soroprevalências médias de 15%, 56% e 87% para cada categoria. Nas CCs, as frequências de granjas foram mais homogêneas, 10, 12 e 11 granjas para Salmonela=1, 2 e 3, respectivamente, com soroprevalências médias de 16%, 61% e 87%. Os limites entre as categorias Salmonela1, 2 e 3 estabelecidos nesse trabalho foram considerados adequados em função da distribuição da soroprevalência obtida nas granjas. Essas categorias estão de acordo com a classificação determinada por ALBAN et al. (2002), que estabeleceram três níveis de risco de contaminação por *Salmonella* ao abate conforme a soroprevalência encontrada na granja. São consideradas de risco baixo as granjas com até 40% de soroprevalência, médio entre 40 e 70% e alto se maior que 70%.

Nos exames complementares das granjas avaliadas, duas (2/65) amostras de ração foram positivas no isolamento de *Salmonella* sp. e no teste de PCR. Coliformes termotolerantes estavam presentes, em diferentes níveis, em 80% das amostras de ração. Em 48% das amostras de água (100ml), 23 NMP ou mais coliformes termotolerantes foram detectados, caracterizando-as como não potáveis. Os resultados de colimetria da água e ração foram categorizados e submetidos à análise de fatores de risco. O isolamento de *Salmonella* sp. da ração não ocorreu em frequência suficiente para mostrar associação no teste de  $\chi^2$ . A colimetria, embora tenha denunciado uma situação indesejável de contaminação fecal na ração e água, sendo um risco eminente de contaminação por agentes entéricos, não foi identificada como fator de risco neste trabalho.

As variáveis explicativas foram estudadas e categorizadas preliminarmente, sendo que 117 foram submetidas ao teste de associação por  $\chi^2$  com a variável explicada categorizada. Essa análise resultou em 18 variáveis com valor de  $p \leq 0,1$  para UT (Tabela 1) e 23 variáveis para CC (Tabela 2), as quais foram submetidas à AFCM. Nos mapas gerados pela AFCM (Figuras 1 e 2), estão ilustradas as diferentes categorias das variáveis explicada e explicativas. Observa-se que, tanto nas UTs (Figura 1) quanto nas CCs (Figura 2), no quadrante inferior esquerdo do mapa se localizam as granjas de alta soroprevalência (Salmonela=3). Os dois primeiros eixos que formam o mapa, contabilizam uma explicação de 48,53% e 48,16% nas granjas terminadoras e de ciclo completo, respectivamente, conforme indicado pelo somatório dos fatores 1 e 2 apresentados nas Figuras 1 e 2.

Nas UTs (Figura 1), essas granjas estiveram associadas ao uso de ração peletizada (FOR=2), à distribuição de dejetos a menos de 100m do local de captação de água (HDD=1), ao uso de mais de um tipo de comedouro (TCOC=3), ao transporte de animais com freteiro (TRA=2) misturando animais de várias granjas (CTA=2).

Em estudos anteriores, rações peletizadas (FOR=2) também foram identificadas como fator de risco, enquanto rações fareladas, sem tratamento térmico, foram associadas com menor ocorrência de *Salmonella* (JORGENSEN et al., 1999; LO FO WONG et al., 1999). Esse fato é controverso, uma vez que rações peletizadas são submetidas a tratamento térmico. Discute-se que a ração não peletizada, por manter uma microbiota mais abrangente, diminua a condição de

crescimento da *Salmonella* ou que o tratamento da ração peletizada interfira no ambiente intestinal dos animais.

A distribuição de dejetos próxima da fonte de água (HDD=1) representou outro risco de contaminação associado à soroprevalência elevada, o que pode ser explicado pelo fornecimento de água de bebida contaminada para os suínos. Entretanto, não foi observada associação entre a variável que mediu diretamente a potabilidade da água e a soroprevalência. Embora a análise não tenha identificado a associação complementar da potabilidade da água com as variáveis distribuição de dejetos próxima da fonte de água e soroprevalência, a água não deve ser descartada como veículo de transmissão de *Salmonella* sp. O ciclo que compreende a deposição de dejetos não tratados no solo e a contaminação dos mananciais de água deve ser evitado.

Uma das categorias da variável tipo de comedouro correspondeu ao modelo comedouro/bebedouro, semi-automático, que possui duas ou quatro aberturas permitindo acesso a poucos animais ao mesmo tempo, o que reduz a exposição da ração à contaminação fecal. A outra categoria da variável (TCOC=3), que apresentou associação com alta soroprevalência de *Salmonella* sp. corresponde aos outros modelos, menos tecnificados, encontrados nas granjas. Nestes comedouros, os animais conseguem pisar na ração, aumentando a contaminação. A presença de fezes dentro destes comedouros é freqüentemente observada. O habitat da *Salmonella* sp. é o trato digestivo e a sua presença em outros ambientes é explicada pela contaminação fecal (GRIMONT et al., 2000). Portanto, todas as medidas que minimizem o mecanismo de transmissão fecal-oral são importantes para diminuir a pressão de infecção nas granjas.

O transporte dos animais para o abate, neste caso, une duas situações, o frete terceirizado (TRA=2) e a mistura de animais de diferentes granjas (CTA=2). Esses caminhões, que entram em várias granjas carregados com animais, fazem o papel de carreadores de bioagentes patogênicos entre os rebanhos. Esse papel também pode ser atribuído às pessoas que entram em contato com o caminhão durante o carregamento dos suínos. Essa condição, sob o ponto de vista sanitário, retrata deficiências no sistema de logística e fluxo dos animais no setor produtivo.

Nas CCs (Figura 2), a categoria Salmonela=3 esteve associada à variável ingredientes da ração desprotegidos de animais (EPI3=2), à ausência de controle de roedores (PRC=2), ao uso de ração seca (RSUC=1), à permissão de entrada de pessoas na granja além do técnico

(QSP=2), à ausência de cerca (AGC=2) e ao não uso de caiação após lavagem e desinfecção (TCIC=2).

A estocagem de ingredientes de ração desprotegida de animais (EPI3=2) permite o acesso de qualquer espécie animal aos ingredientes da ração sendo risco eminente de contaminação, uma vez que os mesmos podem ser portadores de salmonelas (MURRAY, 2000). Destaca-se o papel das aves silvestres, que devem ser controladas por telas, as quais eram pouco utilizadas nas granjas de ciclo completo deste estudo (2/33).

O controle de roedores é prática importante tendo em vista que o *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus* são portadores de *Salmonella* Typhimurium (DAVIS & WRAY, 1997; WILCOCK & SCHAWARTZ, 1992), um dos sorovares mais isolados em humanos, suínos e produtos de origem suína (BESSA et al., 2001; WEGENER & BAGER, 1997). Portanto, a ausência de um programa de controle de roedores (PRC=2) resulta em grandes infestações, mantendo a transmissão da *Salmonella* sp. ativa entre os suínos e os rebanhos.

A ausência de cerca (AGC=2) e a permissão de entrada de outras pessoas na granja além do técnico (QSP=2) são falhas graves de biossegurança. FUNK et al. (2001) relataram situações como mais de uma pessoa na terminação e presença de outras espécies domésticas como fatores de risco associados ao aumento de excreção fecal de *Salmonella* sp. em suínos de terminação. Cabe ressaltar que regras de biossegurança são base de qualquer programa de controle de *Salmonella* em suínos.

A ração seca (RSUC=1) em relação à úmida foi associada à alta soroprevalência. A umidade favorece a acidificação da ração pela fermentação, a qual é discutida como uma forma de controle da infecção por *Salmonella* sp. A ração na forma líquida, contendo produtos fermentados, que originam grande quantidade de ácidos orgânicos, foi identificada como fator de proteção à infecção por VAN DER WOLF et al. (2001).

A associação do não uso da caiação (TCIC=2) com alta soroprevalência para *Salmonella* sp. retrata as condições de higiene da granja. A pintura com é prática associada ao manejo de limpeza e desinfecção adequados da propriedade, os quais são indispensáveis em qualquer programa de controle sanitário na suinocultura.

Os fatores de risco apontados no presente estudo necessitam de validação, por exemplo, com a realização de outras pesquisas que privilegiem diferentes delineamentos metodológicos.

A partir disso, será possível a elaboração de um protocolo de intervenção em granjas de suínos para o controle da infecção por *Salmonella*.

### CONCLUSÕES

A infecção por *Salmonella* está amplamente disseminada entre os rebanhos suínos amostrados. Os fatores associados à alta soroprevalência de *Salmonella* em suínos no pré-abate difere em granjas terminadoras e ciclo completo, sendo entretanto, em ambos os casos, relacionados, principalmente, a medidas de biossegurança adotadas pelas granjas. A combinação entre as categorias das variáveis resultantes no mapa de fatores de risco foi explicado em 48,53% e 48,16% nas granjas terminadoras e de ciclo completo, respectivamente.

### AGRADECIMENTOS

Aos produtores e empresas colaboradoras, ao funcionário Édio Klein. A Fundação Instituto Oswaldo Cruz pela sorotipagem das amostras de *Salmonella*.

### FONTES DE FINANCIAMENTO

Embrapa Suínos e Aves, CNPq, Fapergs e Capes

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAN, L. et al. 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.

BARBER, D. A. et al. Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems. **Journal Food Protection**, Ames, v.65, n.12, p.1861-1868, 2002.

BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pigs carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.36, p.199-206, 1997.

**BESSA, M. et al. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS**

**ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre. Anais... Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2001. v.2, 384p. p.119-120.**

DAVIS, R. H.; WRAY, C. Distribution of *Salmonella* on 23 pig farms in the UK. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 2, 1997, Copenhagen. **Proceedings...** Copenhagen: The Royal Veterinary and Agricultural University, 1997. p.137-141.

FRENZEN, P. D. et al. An update estimate of the economic cost of human illness due to foodborne *Salmonella* in the United States. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 4, 1999, Washington. **Proceedings...** Urbana-Champaign: University of Illinois, 1999. p. 215-218.

FUNK J. et al. 2001. Risk factors associated with *Salmonella enterica* prevalence in three-site swine production systems in North Carolina, USA. **Berliner Unmunchener Tierarztliche Wochenschrift**. Berlin, v.114 p.335-338.

GRIMONT, P. A. D. et al. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: WRAY, C, WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**. New York, CABI: 2000. Cap.1 p.1-18.

JORGENSEN, L. et al. The effect of feeding pellets, meal and heat treatment on the *Salmonella*-prevalence in finishing pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 4, 1999, Washington. **Proceedings...** Urbana-Champaign: University of Illinois, 1999. p. 308-312.

KICH, J. D. et al. Teste de ELISA para monitoramento da infecção por *Salmonella* em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. p.59-60.

LO FO WONG, D. M. A. et al. Herd- level risk factors for the introduction and spread of *Salmonella* in Pigs Herds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 4, 1999, Washington. **Proceedings...** Urbana-Champaign: University of Illinois, 1999. 381p. p. 151-154.

- MICHAEL, G.B. et al. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 34, p. 138 – 142, 2003
- MURRAY, C. V. Environmental aspects of *Salmonella*. In: WRAY, C, WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**. New York: CABI, 2000. Cap.16, p.265-300
- OLIVEIRA, S. D. et al. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.87, p.25-35, 2002.
- SALINPORK INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY E CONTROL OF *SALMONELLA* AND OTHER FOOD BORNE PATHOGENS IN PORK, 4, 2001, Leipzig **Proceedings...** Deventer: Animal Health Service, 2001 646p.
- SAS, **User' guide**, version 6.4 ed., Cary, 1989. 943p.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.
- SPADN, **Centre International De Statistique Et D'informatique Appliqués**. Version P.C. Saint-Mandé, France: Saint-Mandé, 1991, 215p.
- VAN DER WOLF P. J. et al.. Herd level husbandry factors associated with the serological salmonella prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.78, p.205-219, 2001.
- WEGENER, H. C.; BARGER, F. Pork as a source of human salmonellosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY E CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 2, 1997, Copenhagen **Proceedings...** Copenhagen: The Royal Veterinary and Agricultural University, 1997. p.3-8.
- WILCOCK, B. P.; SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, B. E. et al. **Diseases of swine 7** Iowa: Iowa State University, 1992. Cap. 47, p. 570-583.
- ZANOTTO, D.; BELLAVAR, C. **Método de determinação de granulometria de ingredientes para uso rações de suínos e aves**. Concórdia, Embrapa Suínos e Aves, n. 215, 1996, 5p. Comunicado Técnico.

**Tabela 1: Variáveis explicativas associadas à variável resposta\* com valor de  $p < 0,1$  ( $\chi^2$ ) indicadas para análise fatorial de correspondência múltipla. Frequência e soroprevalência de 32 granjas de terminação de suínos, conforme categoria da variável explicativa.**

Variável	Categorias	Frequência Absoluta	Soroprevalência média (%)	Valor de p
A granja é atingida por poeira de estrada próxima	Sim	21	48	0,0048
	Não	11	80	
Forma da ração	Farelada	20	46	0,0094
	Peletizada	12	81	
Outros animais têm acesso à fábrica de ração	Sim	12	39	0,0179
	Não tem fábrica de ração	20	70	
Distribui dejetos a menos de 100m do ponto de captação de água	Sim	5	87	0,0222
	Não	27	53	
Número médio de animais por baia	Até 12	11	79	0,0242
	12-18	12	52	
	Mais de 18	9	9	
Forma de venda dos animais	Lote inteiro	28	64	0,0364
	Mantém os refugos	4	21	
Duração da visita do técnico em minutos	Até 30 min	15	65	0,0395
	Entre 30 e 60 min	14	62	
	Mais de 60 min	3	13	
Tipo de piso utilizado	Compacto	30	62	0,0408
	Não compacto	2	15	
Presença de equinos na granja	Sim	4	35	0,0414
	Não	28	63	
Os sacos de ração entram na granja	Sim	13	42	0,0483
	Não	19	71	
Dias de vazio sanitário	Menos de um dia	15	68	0,0535
	Mais de um dia	15	56	
	Não faz vazio	2	10	
Transporte de animais	Caminhão próprio	5	30	0,0596
	Freteiro	27	65	
Limpeza do caminhão	Somente lavado	11	38	0,0655
	Lavado e desinfetado	21	71	
A água é tratada	Sim	11	63	0,0900
	Não	21	57	
Tempo do armazenamento do milho	Até 60 dias	9	35	0,0928
	Mais de 60 dias	3	63	
	Não armazena milho	20	69	
Tipo de comedouro	Comedouro/bebedouro	3	22	0,0952
	Com depósito de ração	18	57	
	Mais de um modelo	11	72	
Existem outros animais na granja	Sim	2	56	0,0957
	Não	30	59	
O caminhão só transporta animais dessa granja	Sim	5	43	0,0957
	Não	27	62	

\*soroprevalência de *Salmonella*: baixa (até 40%), média (40-70%) e alta (mais de 70%)

**Tabela 2: Variáveis explicativas associadas à variável resposta\* com valor de  $p < 0,1$  ( $\chi^2$ ) indicadas para análise fatorial de correspondência múltipla. Frequência e soroprevalência de 33 granjas de ciclo completo, conforme categoria da variável explicativa.**

Variável	Categorias	Frequência absoluta	Soroprevalência média (%)	Valor de p
A estocagem dos ingredientes da ração protegida de animais	Sim	15	47	0,0013
	Não	7	89	
	Não estoca ingredientes	11	47	
Realiza controle de roedores	Sim	26	50	0,0035
	Não	7	78	
Limpeza do piso das baias durante a visita	Limpo	6	78	0,0142
	Sujo	27	51	
Tempo de armazenamento do farelo de soja	Até 90 dias	18	23	0,0167
	Mais de 90 dias	15	27	
Proteção da fonte de captação de água	Floresta	5	88	0,0172
	Outra	25	50	
	Não é protegida	3	52	
Forma de estocagem do farelo de soja	Sacos	4	70	0,0244
	Granel	14	71	
	Não tem estoque	15	38	
Estocagem da ração pronta em sacos	Sim	16	31	0,0252
	Não	17	26	
Limpeza dos bebedouros durante a visita	Limpos	27	56	0,0254
	Sujos	6	54	
Estado de conservação das instalações	Boa	23	57	0,0259
	Ruim	10	53	
Tempo que a ração permanece úmida no comedouro	Uma hora	6	25	0,0355
	Mais de uma hora	4	60	
	Fornece ração seca	23	63	
A ração é fornecida seca ou úmida	Seca	23	63	0,035
	Úmida	10	39	
Pessoas que visitam a granja	Só os empregados e o técnico	26	51	0,0547
	Outras pessoas	7	74	
Os gatos têm acesso às instalações de suínos	Sim	23	52	0,0549
	Não	10	65	
Presença de bovinos na granja	Sim	30	56	0,0557
	Não	3	60	
Limpeza dos comedouros durante a visita	Limpos	25	59	0,0583
	Sujos	8	47	
Estocagem de produtos para ração em sacos	Abertos	6	80	0,0671
	Fechados	16	53	
	Não usa sacos	11	47	
Presença de cerca na granja	Sim	7	34	0,0751
	Não	26	62	
Presença de barreira física (árvores) entre as propriedades	Sim	24	55	0,0786
	Não	9	58	
Forma de venda dos animais	Lote inteiro	24	53	0,0786
	Mantém os refugos	9	63	
Transporte dos dejetos	Próprio	18	66	0,0839
	Terceiros	15	44	
Presença de outros animais na granja	Sim	4	35	0,0930
	Não	29	59	
Realiza pintura com cal nas instalações	Sim	23	51	0,0993
	Não	10	70	
Grau de escolaridade do responsável pela granja	Até quarta série primária	16	54	0,1004
	Primeiro grau	8	76	
	Segundo grau e superior	9	41	

\*soroprevalência de *Salmonella*: baixa (até 40%), média (40-70%) e alta (mais de 70%)

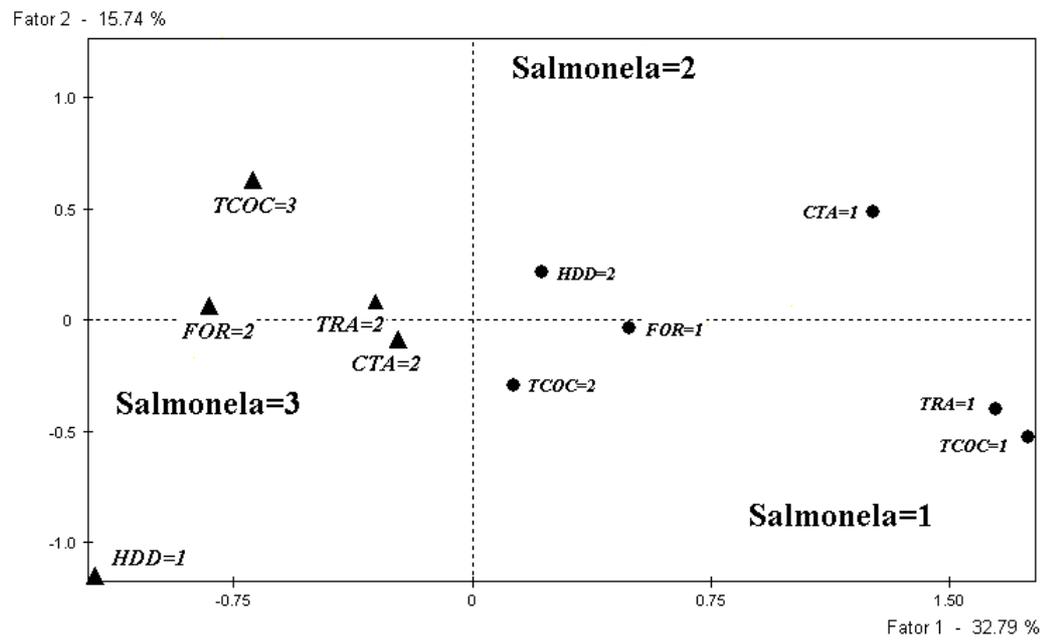


Figura 1: Mapa dos fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* sp. em 32 granjas de terminação de suínos (UT) na análise fatorial de correspondência múltipla.

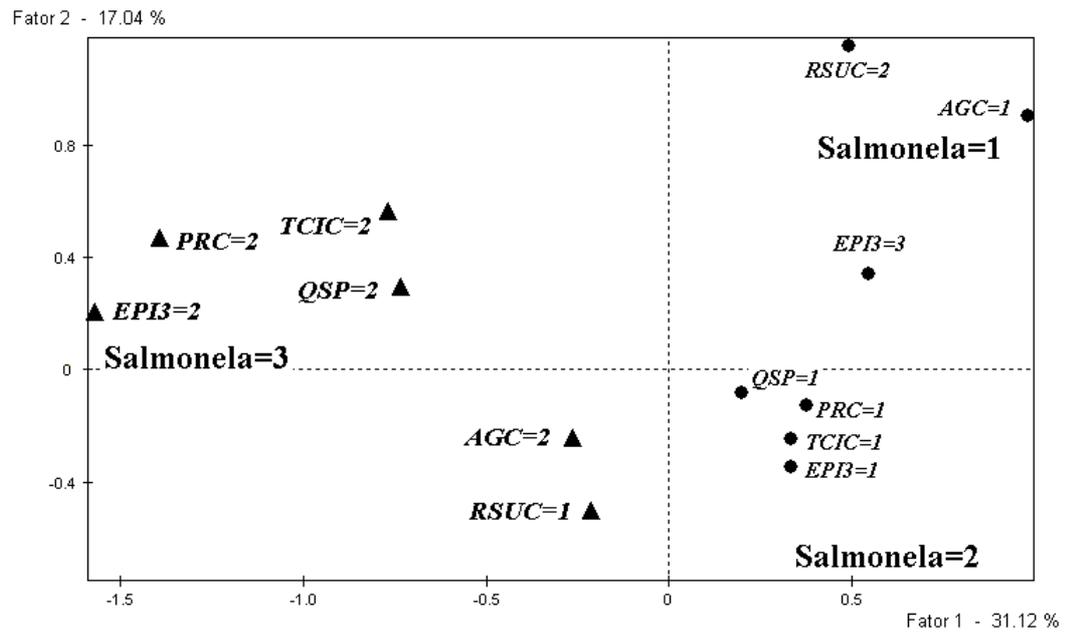


Figura 2: Mapa dos fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* sp. em 33 granjas de de suínos de ciclo completo (CC) na análise fatorial de correspondência múltipla.

**CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA  
DE SEIS DESINFETANTES COMERCIAIS FRENTE A  
AMOSTRAS DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM ISOLADAS DE  
SUÍNOS**

*Acta Scientiae Veterinariae* 32 (1):33-39, 2004

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SEIS  
DESINFETANTES COMERCIAIS FRENTE A AMOSTRAS DE *SALMONELLA*  
TYPHIMURIUM ISOLADAS DE SUÍNOS\***

EVALUATION Of The ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SIX COMMERCIAL Disinfectants against  
*SALMONELLA* TYPHIMURIUM strains isolated from swine

**Jalusa Deon Kich<sup>1</sup>, Luciane Martins Borowsky<sup>2</sup>, VÍrginia Santiago Silva<sup>1</sup>, Marni  
Ramenzoni<sup>1</sup>, Nelise Triques<sup>1</sup>, Felipe Leonardo Kooler e Marisa Cardoso<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Suínos e Aves, Concórdia/SC, <sup>2</sup>Setor de Medicina Veterinária Preventiva –  
FAVET - UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000, POA-RS, Brasil

\* Trabalho originado da Tese de doutorado da primeira autora, Programa de Pós-  
graduação em Ciências Veterinárias

Autor para correspondência: Jalusa Deon Kich - Embrapa Suínos e Aves - Caixa Postal 21, CEP  
89700-000, Concórdia, SC, Brasil, [jalusa@cnpsa.embrapa.br](mailto:jalusa@cnpsa.embrapa.br)

**RESUMO**

Os aspectos relacionados a biossegurança, limpeza e desinfecção são os principais componentes de programas de controle da infecção por *Salmonella* sp. em rebanhos suínos. Dessa forma, a eleição de um desinfetante eficaz deve ser a primeira etapa do protocolo de controle. A partir disso, esse trabalho teve por objetivo avaliar a atividade de seis desinfetantes comerciais (amônia quaternária, glutaraldeído, iodóforo, hipoclorito de sódio (1 e 0,1%), fenol e ácido peracético) frente a amostras de *Salmonella* sp. isoladas de suínos. O trabalho foi conduzido em duas etapas: na primeira, os desinfetantes foram testados frente a uma amostra

padrão de *Salmonella* Typhimurium, na presença e ausência de matéria orgânica, sob duas diferentes temperaturas, em tempo de contato de 15 minutos. Na segunda etapa os desinfetantes foram avaliados frente a 8 amostras de *Salmonella* Typhimurium, com diferentes perfis de resistência a antimicrobianos, por um tempo de contato de 5 minutos. Todos os desinfetantes foram eficazes na ausência de matéria orgânica e nas duas temperaturas testadas. Entretanto, quando na presença de matéria orgânica, somente o hipoclorito de sódio (1%), fenol e o ácido peracético foram eficazes. Da mesma forma, os desinfetantes a base de hipoclorito de sódio (1%), fenol e ácido peracético foram os mais eficazes frente a todas amostras testadas após cinco minutos de contato. As observações indicam que a eficácia dos desinfetantes frente às amostras de *Salmonella* sp. esteve mais relacionada com as condições de utilização, principalmente quanto à presença de matéria orgânica e tempo de exposição, do que com o perfil de resistência apresentado pelas diferentes linhagens.

Descritores: desinfetantes; *Salmonella* Typhimurium; programa de controle.

### **ABSTRACT**

Measures related to biosecurity and hygiene, are major components of control programs for *Salmonella* infection on swine farms. Thus, the first step of control programs is the adoption of effective disinfectants. In this study, the effectiveness of six disinfectants (quaternary ammonium, glutaraldehyde, iodophor, sodium hypochlorite, phenol and peracetic acid) was tested against strains of *Salmonella* sp. isolated from pigs. The test was conducted in two phases: on a first assay a *Salmonella* Typhimurium reference strain was submitted to a 15 minutes contact with each disinfectant, in presence or in absence of organic matter and under two different temperatures. On the second assay, disinfectants were evaluated against 8 porcine *Salmonella* Typhimurium strains, presenting different antibiotic resistance profiles, with a contact time of 5

minutes. All disinfectants were effective in the absence of organic matter at both tested temperatures. However, when organic matter were included on the assay, only sodium hypochlorite, phenol and peracetic acid were effective. Furthermore, sodium hypochlorite, phenol and peracetic acid were also the most effective against porcine *Salmonella* Typhimurium strains after five minutes of contact. These results indicate that the effectiveness of the tested disinfectants was more related to the presence of organic matter and exposure time than to the resistance profile presented by the tested strains.

Key words: disinfectants; *Salmonella* Typhimurium; control programs.

## INTRODUÇÃO

A *Salmonella* sp. é encontrada mundialmente, adaptada a diferentes espécies animais e é considerada uma das mais importantes causas de doença de origem alimentar em humanos, variando de severidade de acordo com as condições do paciente [6]. Entre as fontes de infecções humanas na Dinamarca em 1998, onde o consumo de carne suína é elevado, 40-45% foram proveniente de ovos e 10-15% de produtos suínos [10]. Ao lado disto, os sorovares de maior prevalência nos surtos de toxinfecções registrados, tanto no Brasil como no exterior, têm sido Enteritidis e Typhimurium [8, 13, 24].

A prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate no Rio Grande do Sul, nos anos de 1999/2000, foi estimada em 55% [2], tendo sido os sorovares Typhimurium e Derby os mais encontrados. Estes dados indicam que o animal abatido é o grande carreador de *Salmonella* sp. para a linha de abate e para a o produto final.

Inúmeros fatores de risco têm sido associados à ocorrência de infecção por salmonelas em suínos, entre os quais o tipo de ração [3,14]; mistura de animais de

diferentes origens na creche e terminação [19]; e o contato com o microrganismo em fases zootécnicas anteriores à terminação [4]. Entretanto, os aspectos relacionados à biossegurança, limpeza e desinfecção, controle de vetores e manejo pré-abate sempre são os principais componentes de programas de controle [9, 21].

O Código Zoosanitário Internacional, ao abordar medidas de higiene e segurança sanitária na produção animal, alerta sobre a existência de poucos desinfetantes universais e da necessidade do controle da atividade dos produtos existentes. Variáveis como a amostra do microrganismo de interesse e a concentração do produto recomendada pelo fabricante devem ser submetidas à avaliação para comprovar sua efetividade.

Vários princípios ativos estão disponíveis no mercado, sendo que os mais utilizados na suinocultura são os compostos de amônia quaternária, glutaraldeído, iodóforo e hipoclorito. Os derivados fenólicos têm experimentado utilização crescente por apresentarem ação sobre micobactérias [18] e o ácido peracético, embora exigente quanto a sua manipulação e transporte, tem a vantagem de ser biodegradável.

Uma vez que a eleição do desinfetante deve ser uma das etapas de um protocolo de controle de *Salmonella* sp., este estudo teve como objetivo avaliar a atividade de seis desinfetantes comerciais, amplamente utilizados em suinocultura, frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira, os desinfetantes foram testados frente a uma amostra padrão de *Salmonella* Typhimurium na presença e ausência de matéria orgânica e em duas diferentes temperaturas. Na segunda etapa os desinfetantes foram avaliados, numa só condição de teste, frente a diferentes amostras de *Salmonella* Typhimurium.

**Etapa 1:**

Amostra: foi adotada como padrão uma amostra de *Salmonella* Typhimurium isolada na Embrapa Suínos e Aves, estocada com a identificação 7430, e sorotipada pelo FIOCRUZ nº IOC 3485, originada de um surto de diarreia em suínos.

Desinfetantes: no Quadro 1 estão descritos os desinfetantes testados, seus respectivos desinibidores [12, 25] e recomendação de uso pelo fabricante.

Delineamento experimental: os tratamentos consistiram na utilização dos diferentes desinfetantes na diluição recomendada pelo fabricante, sob quatro diferentes condições.

Tratamento 1 (T1): 10°C, sem matéria orgânica; Tratamento 2 (T2): 30°C, sem matéria orgânica; Tratamento 3 (T3): 10°C, com matéria orgânica; Tratamento 4 (T4): 30°C, com matéria orgânica. O controle consistiu em submeter a amostra padrão às mesmas condições, porém na ausência do desinfetante. Todos os ensaios foram realizados em cinco repetições.

Protocolo do teste: a metodologia utilizada foi adaptada da diluição em tubos e inoculação em placas [15]. Foram preparados 28 tubos contendo 1mL de suspensão bacteriana (inóculo) contendo aproximadamente  $10^8$  unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Aos tubos pertencentes aos tratamentos com adição de matéria orgânica (CMO) foram adicionados 250µL de soro bovino estéril. Nos tubos correspondentes aos tratamentos sem matéria orgânica (SMO), foi adicionada a mesma quantidade de PBS. Esta mistura permaneceu em temperatura ambiente por 30 minutos, enquanto os desinfetantes eram diluídos conforme indicação do fabricante. A seguir, a esses tubos foi acrescido 1mL de desinfetante e foram incubados por 15 min a 10°C ou a 30°C, conforme o tratamento. Os tubos controles foram submetidos às mesmas condições, sendo acrescido 1mL de PBS ao invés de desinfetante. Após a incubação, foram adicionados 7,75mL do respectivo desinibidor aos tubos tratamento e a mesma quantidade de PBS, aos controles. Finalmente, foi determinado o número de UFC de *Salmonella* Typhimurium/mL nos tubos tratamento e controle, através da técnica de contagem em superfície [23].

A atividade desinfetante foi expressa através da redução decimal (DR) de 4 log ( $10^4$ ) das UFC [5] entre o controle (C) e o teste (T), calculado pela fórmula  $RD = \log C - \log T$ .

### **Etapa 2:**

Amostras: foram utilizadas 10 amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos, sendo 5 multi-resistentes (resistentes a >4 antimicrobianos) e 5 não multi-resistentes (resistentes a <4 antimicrobianos). A amostra padrão da primeira etapa foi testada paralelamente.

Protocolo do teste: foi adotado o método de diluições, descrito anteriormente [20], com modificações. A quantidade de 180µL do desinfetante a ser testado, na diluição recomendada pelo fabricante, foi pipetada no primeiro poço de cada linha de uma placa estéril de cultivo celular. Nos demais poços (3-12) foram colocados 180µL de BHI. A seguir, 20µL da amostra cultivada em BHI (18h), contendo aproximadamente  $10^8$ UFC/mL, foram acrescentados ao primeiro poço. Após 5 min de contato com o desinfetante, foram retirados 20µL da suspensão do primeiro poço ( $10^{-1}$ ) e adicionados ao poço 3 ( $10^{-2}$ ), seguindo-se deste modo sucessivamente nos demais poços até a diluição de  $10^{-8}$ . O segundo poço ficou vazio para facilitar a manipulação das diluições na placa. Todas as amostras testadas foram submetidas a um tratamento controle, o qual consistiu em contato com caldo BHI por 5 min, seguido de diluições geométricas. Após incubação a 37°C/18h a redução nas contagens foi determinada pela comparação da última diluição em que houve crescimento (turvação do caldo) nos tratamentos com o resultado do crescimento encontrado no controle. A atividade desinfetante foi expressa como descrito na primeira etapa.

## **RESULTADOS**

Na ausência de matéria orgânica, todos os desinfetantes foram eficazes nas duas temperaturas testadas, após 15 min de contato (Tabela 1). Dois produtos, hipoclorito de

sódio (1%) e ácido peracético, foram eficazes, independente das condições de matéria orgânica e temperaturas testadas. Por outro lado, na presença de matéria orgânica os produtos a base de amônia quaternária, hipoclorito de sódio (0,1%), glutaraldeído/cloreto de benzalcônio e iodóforo tiveram prejuízo em sua atividade. Em uma das observações, na presença de matéria orgânica a 10°C, o desinfetante a base de fenol não teve a atividade esperada, embora nas demais repetições tenha se mostrado eficaz.

Na segunda etapa, os desinfetantes a base de amônia quaternária, glutaraldeído/cloreto de benzalcônio e iodóforo que tiveram, anteriormente, sua atividade prejudicada pela matéria orgânica, quando colocados em contato com os inóculos por um tempo menor (5 min), também apresentaram menor eficácia (Tabela 2). Os demais desinfetantes, hipoclorito de sódio (1%), derivado de fenóis e ácido peracético, foram eficazes frente a todas as amostras testadas.

Não houve diferença de sensibilidade aos desinfetantes entre os grupos de amostras de *Salmonella* Typhimurium multi-resistente e não multi-resistente. A amostra padrão apresentou sensibilidade similar às demais amostras testadas.

## DISCUSSÃO

A perda da atividade antimicrobiana na presença de matéria orgânica é amplamente registrada na literatura [16, 20], variando com o princípio ativo do desinfetante e linhagem desafiadora, demonstrando a importância de testes específicos para a escolha de produtos a serem utilizados em programa de controle de certos agentes infecciosos. Especificamente em granjas de suínos, dada a dificuldade da eliminação total de resíduos e o efeito comprovado da matéria orgânica sobre a atividade de desinfetantes amplamente utilizados, a sobrevivência de *Salmonella* frente a

determinados produtos pode ser um fator importante da sua permanência no meio ambiente [17]. Este fato foi demonstrado anteriormente, ao comparar um grupo de granjas que utilizava desinfetantes com granjas sem programa de desinfecção. Neste estudo, os autores observaram que o grupo de granjas que apenas fazia uma lavagem com água sob pressão apresentava uma menor prevalência de animais positivos para *Salmonella* sp., quando comparado com o grupo que utilizava desinfetantes. Uma possível explicação apontada pelos autores seria o fato que a utilização de desinfetantes, muitas vezes, induz a um relaxamento das medidas de limpeza prévia, ocasionando um nível de matéria orgânica residual alto que acaba por interferir na ação do desinfetante. Desta forma, é possível afirmar que a implantação de um programa de desinfecção deve incluir procedimentos rigorosos de limpeza prévia para que seja eficaz [24].

Destaca-se o fato de que o produto a base de hipoclorito não perdeu sua atividade na presença de matéria orgânica quando testado na dose recomendada pelo fabricante (1%). Entretanto, foi inativado na concentração de 0,1%, comumente recomendada na suinocultura, pela sua economia. Os hipocloritos têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos, entre outras razões, pela sua boa efetividade contra uma grande variedade de microrganismos e por ser ativo mesmo em baixas concentrações [1].

Os resultados observados na segunda etapa deste estudo, que avaliou 11 amostras de *Salmonella* em condições de ausência de matéria orgânica, mostraram a influência do tempo de contato na eficácia de alguns desinfetantes. Ao lado disto, os resultados encontrados não apresentaram diferença frente às amostras testadas de *S. Typhimurium*, que apresentavam diferentes níveis de resistência frente a antimicrobianos e uma amostra proveniente de surto de diarreia em suínos. Observações semelhantes haviam

sido feitas anteriormente em amostras de *Salmonella* pertencentes a diferentes sorovares e isoladas em indústria de alimento [17] bem como amostras de *S.aureus* [20].

O mecanismo de resistência a desinfetantes mais comum em bactérias Gram negativas é intrínseco, porém já foi especulada a possibilidade de resistência adquirida, mediada por plasmídios [16]. Neste último caso, a resistência combinada a desinfetantes e antimicrobianos, carregada por um mesmo grupo de genes, seria esperada. Entretanto, apenas em estafilococos a associação entre resistência a desinfetantes e antissépticos pôde ser demonstrada, de forma conclusiva, geralmente codificada em elementos transponíveis, carregados por plasmídios [22]. Já no caso de bactérias Gram negativas, apesar de alguns estudos haverem constatado um alto nível de resistência a desinfetantes em amostras isoladas de ambiente hospitalar, não foi possível traçar uma correlação consistente com a presença de plasmídios ou de resistência a antimicrobianos [11]. Por outro lado, observa-se que bactérias Gram negativas que apresentam mutações em sua membrana externa podem tornar-se mais sensíveis a desinfetantes [7]. Esta maior sensibilidade está relacionada ao fato de que a membrana externa deste grupo de bactérias é responsável pela maior hidrofobicidade da célula bacteriana, o que dificulta a penetração dos desinfetantes. As células mutantes, por sua vez, tendem a ser menos hidrofóbicas, propiciando uma maior concentração do desinfetante no interior da célula [16].

Estas observações indicam que a eficácia dos desinfetantes frente a *Salmonella* esteve mais relacionada com as condições de utilização, principalmente quanto a presença de matéria orgânica e tempo de exposição, do que com o perfil de resistência apresentado por linhagens presentes nas granjas. Este fato deve ser considerado nos

protocolos de desinfecção a serem adotados em programas de controle de salmonela em granjas de suínos.

### CONCLUSÕES

Os desinfetantes a base de amônia quaternária, hipoclorito de sódio (0,1%) glutaraldeído/cloreto de benzalcônio e iodóforo tiveram sua atividade contra amostra de *Salmonella* Typhimurium prejudicada na presença de matéria orgânica. O tempo de contato destes desinfetantes, mesmo na ausência de matéria orgânica, afetou a eficácia do mesmo, porém não houve diferença de sensibilidade frente a diferentes amostras de *Salmonella* Typhimurium.

### REFERÊNCIAS

- 1. Andrade N. J. & Macedo J. A. 1996.** Agentes químicos para higienização. In: *Higienização na Indústria de Alimentos*. São Paulo: Varela. pp. 53-137.
- 2. Bessa M. C. , Costa M. & Cardoso M. 2001.** Prevalence of *Salmonella* sp. in slaughtered pigs in Rio grande do Sul. In: *Proceedings of 4<sup>rd</sup> International Symposium on the Epidemiology and control of Salmonella sp. in Pork.*( Leipzig,Germany) v.4: p.646.
- 3. Bush E. J., Wagner B. & Fedorka-Cray P. J. 1999.** Risk factors associated with shedding of *Salmonella* by US. finishing hogs. In: *Proceedings of 3<sup>rd</sup> International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork* ( Washigton, U.S.A), pp.106-108.
- 4. Dahl J., Wingstrand A., Nielsen B. & Baggesen D. L. 1997.** Elimination of *Salmonella* Typhimurium infection by strategia movement of pigs. *Veterinary Record*.140: 679-681.

5. DEFRA, Department for environment, food and rural affairs, UK. Disponível em [www.defra.gov.uk](http://www.defra.gov.uk). Acesso em 22/06/2003.
6. Ekperigin H. E. & Nagaraja K. V. 1998. Salmonella. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*.14: 17-29.
7. El Falaha B. M. A, Russel A. D & Furr J. R. 1985. Sensitive of wild-type and envelope-detestive strains of *E. coli* and *P. aeruginosa* to antibacterial agents. *Microbiology*. 38: 99-105.
8. Esper M. R. N. R., Freitas A. M., Fernandes S. A., Nere S. N., Tavechio A. T.; Romão M.M. & Café M. L. 1998. *Salmonella*: Sorotipos identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1997. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 57: 45-50.
9. Fedorka-Gray P. I., Whipp S. C., Isaacion R. E., Nord, N & Lager K. 1994. Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. *Veterinary Microbiology*. 41: 333-348.
10. Hald T. & Wegener H. C. 1999. Quantitative assessment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. In: *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork* ( Washinton, U.S.A.). pp.200-205.
11. Hammondd S. A., Morgan J. R. & Russel A. D. 1987. Comparative susceptibility of hospital isolates of gram-negative bacteria to antiseptic and disinfectants. *Journal of Hospital Infection*. 9: 255-264.
12. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 1997. *Manual de Qualidade*, POP nº 65.3210.007, Seção 10, Método da Diluição de Uso. p.17.

- 13. Jakabi M., Buzzo A. A., Ristori C. A. ,Tavechio A. T., Sakuma H., de PAULA A. M. R. & Gelli D. S. 1999.** Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 58: 47-51.
- 14. Lo Fo Wong D. M. A , Hald T., van der Wolf P. I. & Swanenburg, M. 2002.** Epidemiology and Control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Production Science*. 76: 215-222.
- 15. Martins S. C. S., Soares J. B., Matos J. H. G. & Andrade A. P. S.** Atividade esporicida e bactericida de desinfetantes comerciais. *Higiene Alimentar* 8:30:21-23.
- 16. McDonnell G. & Russell A. D. 1999.** Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 147-179.
- 17. Moretro T., Midtgaard E. S., Nesse L. L. & Langsrud S. 2003.** Susceptibility of *Salmonella* isolated from fish feed factories to disinfectants and air- drying at surfaces. *Veterinary Microbiology*. 94: 207-217.
- 18. Pinheiro S. R. 1999.** Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos sobre estirpes de *Mycobacterium avium*, isoladas de suínos abatidos no estado de Santa Catarina, no ano de 1999. São Paulo, SP. *Tese* (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Universidade de São Paulo.
- 19. Quessy S., Letellier A. & Nadeau E. 1999.** Risk factor associated with the presence of *Salmonella* in swine herds in Quebec. In: *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on Epidemiology and control of Salmonella in Pork* ( Washigton, U.S.A) pp. 165-169.

- 20. Rodgers J., McCullagh J. J., McNamee P. T., Smyth J. A. & Ball H. J. 2001.** A investigation into the efficacy of hatchery disinfectants against strains of *Staphylococcus aureus* associated with the poultry industry. *Veterinary Microbiology*. 82: 131-141.
- 21. Salin pork International. 2001.** IV Symposium on the epidemiology e control of *Salmonella* and other food borne pathogens in pork. (Leipzig Germany). Animal Health Service p.646.
- 22. Sasatsu M., Shirai Y., Hase M, Nogreshi, N., Kono M. ,Behr H, Frurey J.& Arai, T. 1995.** The origin of antiseptic-resistance gene *abr* in *S.aureus*. *Microbios*. 84: 161-169.
- 23. Silva N., Junqueira V. C. A & Silveira N. F. A. 1997.** *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Varela, 295p.
- 24. Van der Wolf P. J., Elhers A. R. W., Van der Heijden H. M. J. F., Van Schie F. W. Hunneman W. A. & Tielenn M. J. M. 2001.** *Salmonella* soroprevalence at the population and herd level in pigs in the netherlands. *Veterinary Microbiology*. 80: 171-184.
- 25. Vargas A. C. & Weiss R. D. N. 1994,** Avaliação da atividade antibacteriana "in vitro" do proxitane. *Informação Técnica PROXITANE* ® 1512.

Quadro 1: Identificação e composição dos desinfetantes utilizados no presente estudo, respectivos desinibidores e diluição de uso recomendada pelo fabricante:

<b>Produto</b>	<b>Composição</b>	<b>Desinibidor</b>	<b>Diluição de uso</b>
Amônia Quaternária	Cloreto de Alquil dimetil amônio (80g /100mL)	Caldo nutriente com 0,5% de tween 80 e lecitina 0,07%	1 :2000
Glutaraldeído + Cloreto de Benzalcônio	Glutaraldeído 42,5g Cloreto de Benzalcônio 7,5g	Caldo nutriente com 0,5% de tween 80 e 5% de soro de coelho	1 :1000
Iodóforos	Iodophor contendo 2,3% de iodo ativo	Caldo nutriente com 0,6% de tiosulfato de sódio	1 :500
Hipoclorito de Sódio 1%	Hipoclorito de sódio com 10 a 12% de cloro ativo	Caldo nutriente com 0,6% de tiosulfato de sódio	1 :10
*Hipoclorito de Sódio 0,1%	Hipoclorito de sódio com 10 a 12% de cloro ativo	Caldo nutriente com 0,6% de tiosulfato de sódio	1 :100
<b>Fenol</b>	Orto-fenilfenol 12% Orto-benzil paraclorofenol 10% Para-terciário amilfeno 4%	Caldo nutriente com 0,5% de tween 80	1:250
Ácido Peracético	Acido peracético 15% Peróxido de hidrogênio 23% Ácido acético 16%	Tiosulfato de sódio 2g/litro no meio de TSA	1 :3000

\* utilizado apenas na primeira etapa do trabalho

Tabela 1: Número de repetições em que houve redução decimal mínima de 4 log (RD>4) no número de unidades formadoras de colônia de uma amostra de *Salmonella* Typhimurium padrão após contato de 15 min, a 10 ou 30°C, com seis desinfetantes comerciais, na presença e ausência de matéria orgânica.

Desinfetante	SMO		CMO	
	10°C	30°	10°C	30°
Amônia quaternária	5/5	5/5	2/5	2/5
Glutaraldeído/cloreto de benzalcônio	5/5	5/5	0/5	0/5
Iodóforos	5/5	5/5	0/5	0/5
Hipoclorito de sódio (1%)	5/5	5/5	5/5	5/5
Hipoclorito de sódio (0,1%)	4/4	4/4	0/4	1/4
Derivado de fenol	5/5	5/5	4/5	5/5
D6: Ácido peracético	5/5	5/5	5/5	5/5

SMO: sem matéria orgânica; CMO: com matéria orgânica

Tabela 2: Número de amostras de *Salmonella* Typhimurium que apresentaram redução decimal mínima de 4 log (RD>4) no crescimento bacteriano, ao contato de 5 minutos com seis desinfetantes comerciais.

Desinfetante	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>
	MR	NMR	padrão
Amônia quaternária	0/5	0/5	-*
Glutaraldeído/cloreto de benzalcônio	0/5	0/5	-
Iodóforos	0/5	0/5	-
Hipoclorito de sódio 1%	5/5	5/5	+
Derivado de fenol	5/5	5/5	+
Ácido peracético	5/5	5/5	+

MR: multi-resistente (resistente a >4 antimicrobianos); NMR: não multi-resistente (resistente a <4 antimicrobianos); \* (-) sem redução/(+) com redução.

## **CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Mais de 90% dos casos humanos de doenças de origem alimentar no mundo são atribuídos a *Salmonella* e *Campylobacter*. Especificamente, em 1997, sobre 100.000 habitantes, a incidência de casos de *Salmonella* e *Campylobacter* registrada na Europa foi 73 e 30 e nos Estados Unidos de 14 e 25 respectivamente. Devido ao potencial de contaminação cruzada durante o processamento dos alimentos de origem animal, a redução desses patógenos nos rebanhos domésticos é um pré-requisito para melhoria da saúde humana (THORNS C. J., 2000). Em suínos, a correlação entre portadores de *Salmonella* sp. nas fezes e a contaminação da carcaça foi demonstrada por Berends B. et al (1997). Animais vivos, portadores de *Salmonella* sp., possuem três a quatro vezes mais chance de ter suas carcaças contaminadas do que os animais negativos.

Estimativas feitas na Dinamarca, no final da década de 80, apontavam a carne de frango como a fonte mais importante de salmonelose humana. Em 1990, os produtos suínos começaram a aumentar sua importância, chegando, no ano de 1993, a ser o principal envolvido em surtos na Dinamarca. Paralelamente, os ovos também cresceram em importância e, desde 1994, são o principal veiculador de salmonelose humana naquele país. Esses fatos, somados à diretiva da Comunidade Européia para implementação e harmonização de ferramentas para o controle de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, estimularam a Dinamarca a implementar um extensivo programa de controle de *Salmonella* dirigido, inicialmente, a frangos de corte, e após a suínos e ovos (WEGENER, H. C. et al., 2003).

Os métodos utilizados nos programas de controle devem retratar a intensidade da infecção nos lotes de animais, a qual está relacionada com o risco de introduzir a contaminação na linha de abate. Em frangos, o método de eleição é o bacteriológico tradicional (WEGENER, H. C. et al., 2003), sendo sua sensibilidade atribuída à alta e consistente excreção fecal da *Salmonella* sp. Em suínos, entretanto, possivelmente devido aos sorovares prevalentes serem ubiqüitários e a excreção ser intermitente, a performance do teste bacteriológico pode ser menor. Outro limitante é o custo de um programa de controle baseado em pesquisa bacteriológica, por demandar grande volume de material e envolvimento de pessoal.

Para incrementar o programa de controle em suínos, o serviço oficial da Dinamarca elegeu como base um teste de ELISA, cujo antígeno era constituído por lipopolissacarídeo extraído dos sorovares Cholerasuis e Typhimurium, aplicado na pesquisa de anticorpos em soro de animais de granjas núcleo e multiplicadoras e em suco de carne de animais terminados. O teste bacteriológico foi adotado no monitoramento de unidades produtoras de leitão e carcaças resfriadas. Nas demais categorias, o isolamento tem sido utilizado de forma complementar à sorologia. As granjas têm sido classificadas, mensalmente, em três níveis considerados, respectivamente, de baixo, médio e alto risco de contaminação ao abate, pela média de soroprevalência observada nos três últimos meses (MOUSING, J. et al., 1997). A associação entre os níveis (1, 2 e 3), determinados pelos resultados do ELISA, e a avaliação bacteriológica foi confirmada por Christensen, J. et al. (1999). Em fevereiro de 2003 a distribuição das granjas avaliadas na Dinamarca eram 97,4% no nível 1; 2,0% no nível 2 e 0,6% no nível 3 (NIELSEN, B. 2003).

A Alemanha, com adaptações ao seu sistema produtivo, também aderiu ao programa de controle de *Salmonella* sp. (BLAHA, Th. 2003a). Após avaliar quatro testes de ELISA disponíveis no país, submetendo amostras de soro e suco de carne aos testes, três desses testes foram considerados aptos para utilização no monitoramento e redução de salmonela e têm sido a base do programa de segurança alimentar (BLAHA, Th. 2003b).

A partir disso, a maioria dos países produtores de suínos iniciaram, em algum grau, o monitoramento e controle de *Salmonella* em rebanhos suínos, sendo já previsível que a existência de programas de controle venha a ser uma exigência por parte de países compradores de carne suína. Sendo assim, o Brasil também deve estar preparado para responder a essa demanda.

Embora os diferentes estudos encontrem um número limitado de sorovares, a variedade antigênica da *Salmonella* sp., mais de 2400 combinações entre antígenos somáticos (O-LPS), flagelar (H) e de superfície (Vi), possibilita diferentes distribuições de sorovares entre regiões e hospedeiros (GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P., 2000). O teste de ELISA utiliza antígeno LPS por ser o antígeno imunodominante das bactérias Gram negativas (RICROFT, A., 2000), ser de fácil extração e adaptável à fase sólida do teste (VOLLER, A. BIDWELL, D. E.;

BARTLETT, A. 1979). Nesse contexto, é necessário que o teste contenha a maioria dos antígenos LPS presentes na região de abrangência do programa de controle. O teste desenvolvido por Nielsen et al. (1995) contém LPS dos sorovares Typhimurium grupo B (O: 1, 4, 5 e 12) e Choleraesuis grupo C1 (O:1, 6). Em testes desenvolvidos posteriormente, foram acrescentados os sorotipos julgados importantes para as condições regionais (PROUX, K. et al.; 2000).

No sul do Brasil, a *S. Choleraesuis* não tem sido isolada de amostras de suínos portadores, nem de ambiente (BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M., 2001; SILVA, L. E. et al., 2003; CASTAGNA S. M. F. et al, 2003). Entretanto, os cinco sorovares mais isolados por Bessa M. C.; Costa, M.; Cardoso, M. (2001) no RS possuem antígenos LPS comuns, portanto nossa hipótese é que o teste com o sorovar Typhimurium possa medir a intensidade da infecção por *Salmonella* sp. nos rebanhos do sul do Brasil.

Adaptando metodologias de análises utilizadas pela Embrapa Suínos e Aves em outros testes ELISA-LPS dirigidos a diferentes doenças de suínos (MACHADO, H. G. et al., 2001), foi desenvolvido o teste para *Salmonella* sp (Capítulo 2). Esse demonstrou bom desempenho tanto em situações de infecção experimental como natural. Além disso, detectou as reações cruzadas esperadas entre os sorovares mais prevalentes, com exceção de *S. Bredeney*. O teste apresentou uma reação inespecífica muito discreta quando testado frente a soros sem anticorpos, resultado de resíduos de componentes dentro dos poços da placa. Nessa fase do trabalho, já foi possível observar que o teste consegue discriminar o espectro de anticorpos que vai, desde a ausência (leitões privados de colostro), até animais inoculados oralmente com o mesmo sorovar contido no teste ( $3,5 \times 10^8$  UFC de *S. Typhimurium*).

Quando o teste foi aplicado em leitões de 65 rebanhos comerciais de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, uma semana antes do abate, a prevalência de animais positivos variou de 0 a 100%. Observa-se no histograma do APÊNDICE A que a distribuição dos rebanhos quanto à soroprevalência apresenta três picos: 9 rebanhos entre 10 a 19%; 11 rebanhos entre 60 a 69% e 18 rebanhos entre 80 a 99%. Esses resultados demonstraram que a infecção está ampla e intensamente distribuída na nossa região, o que era esperado, uma vez que trabalhos anteriores registraram 55,6% de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate (BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO,

M., 2001). Comparando com estudos semelhantes conduzidos anteriormente, observa-se que os dados de soroprevalência variam de acordo com a região e o tipo de observação. A exemplo disso, Huysmans, K. et al. (2003) encontraram, na Bélgica, uma soroprevalência de 73%, enquanto Hamilton, D. R. (2003) encontrou 35,5% na Austrália.

O teste de ELISA, utilizando suco de carne, constitui-se numa adaptação com o objetivo de facilitar a coleta de dados dos rebanhos participantes dos programas de controle. A coleta de um fragmento de diafragma ao abate é uma alternativa mais barata e simples, se comparada ao deslocamento até a granja necessário para a coleta de sangue dos animais na semana anterior ao abate. Mesmo a coleta de sangue dos animais realizada no frigorífico é mais complexa que a coleta de um fragmento de tecido na linha de abate. Porém, para a utilização do suco de carne é necessário uma série de adaptações na diluição e ponto de corte do teste.

No presente trabalho, o teste aplicado em amostras de suco de carne apresentou, inicialmente, sensibilidade de 88,12% e especificidade de 70,43%, tomando como padrão-ouro os resultados obtidos com soro dos mesmos animais. Porém, é importante considerar que as maiores discrepâncias encontradas entre os resultados foram observadas nas amostras com densidade óptica próxima ao ponto de corte (0,169). A distribuição de DOs dos soros dessa população está apresentada no APÊNDICE B. Observa-se que 52,3% dos soros encontram-se na faixa mais crítica para a comparação. A harmonização entre os testes com soro e suco de carne poderá seguir a indicação de Greiner M. & Bohring, D. (1994), mudando-se o ponto de corte no teste aplicado ao suco de carne, até obter os melhores resultados de sensibilidade e especificidade em relação ao soro. Os resultados dessa harmonização matemática estão ilustrado no APÊNDICE C, observa-se que, onde linhas se encontram, a sensibilidade e especificidade são de 81% e o ponto de corte para o suco é 0,200. A proposta para continuidade do trabalho é dispor de uma população maior, proveniente de outros experimentos, e, através da análise de distribuição do resultado do soro, compor uma amostragem para o suco de carne que represente toda população. Posteriormente, realizar a harmonização pela mudança no ponto de corte para o suco de carne.

Outro desafio que se apresenta ao teste de ELISA, é a harmonização de resultados obtidos, utilizando diferentes testes realizados em diferentes laboratórios.

Heijden H. M. J. F. (2001) alertou que existem diferenças na sensibilidade dos testes de ELISA para detecção de anticorpos contra *Salmonella* sp. em suínos. O autor sugere, ainda, a necessidade da obtenção de soros de referência internacional para que diferentes laboratórios possam padronizar e monitorar os teste conduzidos. Em outra comparação, entre quatro testes de ELISA, realizada por Blaha T. et al. (2003b), observou-se 20% de inconformidades entre resultados positivos e negativos. Nesse caso, a amostra foi composta por 20% de soros com DO muito baixa e 20% com DO muito alta o que, automaticamente, aumentou o nível de concordância entre os testes. Mesmo assim, observa-se que para que uma comparação de resultados, obtidos em diferentes regiões ou países, seja possível é necessário haver uma harmonização dos testes desenvolvidos.

Outro aspecto que deve ser considerado na interpretação do teste de ELISA é o estabelecimento de um ponto de corte adequado. Muitas vezes o ponto de corte deve ser adaptado ao longo do programa de controle, após a análise de dados obtidos na sorologia e no isolamento.

A exemplo disso, pode-se analisar o programa dinamarquês, cujo objetivo inicial era identificar granjas com alta soroprevalência, medida por teste ELISA com suco de carne, sendo para isso utilizado um ponto de corte alto (40% de DO) (MOUSING, J. et al., 1997). Com o avanço do programa, houve a redução do nível de infecção dos rebanhos, sendo proposta a aproximação dos resultados sorológicos e bacteriológicos pela diminuição do ponto de corte para 20% de DO. Outras alterações, como um peso maior para o resultado de soroprevalência do último mês de abate, no intuito de identificar com maior rapidez o aumento da infecção na granja, foram implementadas. Após implementar essas modificações, das granjas que resultaram negativas em mais de três meses de acompanhamento, representando uma prevalência <5%, em apenas 5,6% dessas houve isolamento de *Salmonella*. Granjas do nível 1, com soroprevalência entre 1 a < 40%, tiveram índices de isolamento entre 5,6 e 50%. Já os índices de isolamento subiram para 50 - 70% e >74% nas granjas pertencentes ao nível 2 (soroprevalência de 40 a < 70) e nível 3 ( $\geq 70$ ), respectivamente (ALBAN L.; STEGE, H.; DAHL, J., 2002).

Já na Alemanha, granjas com soroprevalência < 20% têm sido consideradas de baixo risco, aquelas entre 20 e 40% como de risco intermediário e as com

soroprevalência > 40% de alto risco (BLAHA T., 2003a). Sobre essas categorias tem sido aplicadas as intervenções previstas no programa daquele país.

Como se observa, dentro dos programas de controle, o teste de ELISA, complementado pelo isolamento, serve para classificar e construir o histórico das granjas (ALBAN L.; STEGE, H.; DAHL, J., 2002). Os programas de intervenção, além de focarem o fluxo de informação e abate sob condições especiais, prevêm a correção dos fatores de risco, medidas de biossegurança e manejo sanitário. Nesse sentido, o teste de ELISA desenvolvido no presente estudo foi utilizado como variável resposta na análise de fatores de risco associados à infecção por *Salmonella* sp. (capítulo 3). Como análise preliminar, todas as variáveis explicativas foram testadas por  $\chi^2$  contra a variável resposta. O questionário utilizado nas granjas para obtenção das variáveis explicativas consta no APÊNDICE D e os resultados da análise preliminar no APÊNDICE E.

Quando analisados os 65 rebanhos conjuntamente (APÊNDICES F e G), dos quais 32 eram terminadores e 33 ciclos completos, os fatores associados ao nível mais alto de soroprevalência (>70%) foram: estocagem de ingredientes de ração desprotegida de outros animais, uso de ração peletizada, distribuição de dejetos a menos de 100m do local de captação de água, ausência de controle de roedores e ausência de portaria na granja. Podendo ser divididos em duas categorias, quatro agrupados no item biossegurança e um permanecendo como característica física da ração. Aspectos relacionados com biossegurança, como a ausência de toalete, presença de outros animais domésticos na granja e má higiene foram anteriormente relacionados com aumento da excreção fecal de *Salmonella* sp. (BERENDS, et al. 1996; FUNK et al. 2001).

Quando a análise foi separada por tipo de sistema de produção, nas granjas terminadoras, os fatores associados ao nível mais alto de soroprevalência foram: ração peletizada, distribuição de dejetos a menos de 100m do local de captação de água, não utilização de comedouro do modelo comedouro/bebedouro, transporte de animais com freteiro e o transporte de animais de mais de uma granja. Nas granjas de ciclo completo, os fatores encontrados foram: ingredientes de ração desprotegidos de outros animais, ausência de controle de roedores, ração seca, permissão para entrada de outras pessoas

na granja além do técnico, ausência de cerca, e o não uso da pintura com cal após lavagem e desinfecção.

Observa-se que dos cinco fatores identificados nos 65 rebanhos na análise conjunta, dois aparecem nos terminadores (forma da ração e distribuição de dejetos em relação à fonte de captação de água) e dois aparecem no ciclo completo (proteção dos ingredientes de ração e controle dos roedores). O fator presença de portaria na granja não permaneceu ativo na análise individual do tipo de sistema de produção. Esses resultados são esperados como consequência da frequência do fator na categoria.

Nos exames complementares das granjas avaliadas, duas (2/65) amostras de ração foram positivas no isolamento de *Salmonella* sp. e no teste de PCR, as metodologias utilizadas foram descritas por Michael G. B. (2003) e Oliveira S. D. (2002), respectivamente. O isolamento de *Salmonella* sp. da ração não ocorreu em frequência suficiente para mostrar associação no teste de  $\chi^2$ . Coliformes fecais estavam presentes, em diferentes níveis, em 80% das amostras de ração. Em 50,7% das amostras de água (100mL) 23 NMP ou mais coliformes fecais foram detectados, caracterizando-as como não potáveis. Os resultados de colimetria da água e ração, os quais se encontram no APÊNDICE H, foram categorizados e submetidos à análise de fatores de risco. A colimetria, embora tenha denunciado uma situação indesejável de contaminação fecal na ração e água, sendo um risco eminente de contaminação por agentes entéricos, não foi identificada como fator de risco nesse trabalho.

Embora a contaminação da ração não tenha sido identificada como fator associado à prevalência de *Salmonella* sp., deve-se ressaltar que, como este é um estudo transversal, houve apenas uma coleta de amostras nos rebanhos, refletindo a situação da ração utilizada no dia da visita à propriedade. O fato de existirem rações positivas evidencia o potencial dessa fonte de infecção para os rebanhos. Qualquer partida de ração contaminada fornecida aos animais, anteriormente à visita, poderia ter causado infecção, levando à soropositividade. Portanto, a ração deve ser sempre considerada como potencial fonte de contaminação (FEDORKA-CRAY et al., 2000).

A importância da ração no nível de infecção de suínos por *Salmonella* sp. tem sido discutida sob vários aspectos. O efeito de métodos de descontaminação da ração produzida fora da granja, a recontaminação nos silos e cochos, a sobrevivência da bactéria em ração seca sem tratamento ácido, a forma de apresentação da ração, a

utilização de ração líquida com produtos fermentados, entre outros têm sido avaliados (BERENDS B. et al., 1996; LO FO WONG D. et al., 1999; VAN DER WOLF P. et al., 2001). Na estimativa de Berends B. et al (1996), 15 a 30% das infecções do período de terminação podem ser atribuídas à contaminação ou recontaminação da ração. Objetivamente, em avaliação de fatores de risco no estudo de Lo Fo Wong D. et al. (1999), a ração de quatro categorias: peletizada seca, peletizada úmida, não peletizada seca e não peletizada úmida, resultaram, respectivamente, em *Odds Ratio* de 8,2; 10,4; 4,2 e 1. A ração não peletizada seca apresentou 4,2 vezes mais chance de estar associada a maior soroprevalência de *Salmonella* sp. do que a ração úmida; este fato vem ao encontro dos achados do presente estudo.

Os estudos de fatores de risco para a infecção por *Salmonella* sp. em suínos encontrados na literatura (LO FO WONG D. et al., 1999; FUNK J.; DAVIES P. R.; GEBREYES W. 2001; VAN DER WOLF P, J. et al., 2001) não utilizam a metodologia proposta no presente trabalho. A análise fatorial de correspondência múltipla (AFCM), preconizada por Madec, F.; Fourichon, C. (1990), busca as informações na granja, na forma de inquérito epidemiológico, que compõe as variáveis explicativas e compara com a variável resposta, também originada da granja. O estudo é realizado sem interferência externa e busca identificar o conjunto de fatores que melhor explicam a variável resposta, neste caso a alta soroprevalência para *Salmonella* sp. Primeiramente, os resultados do inquérito são avaliados quanto a sua consistência por análise da frequência e dispersão. Uma série de variáveis são, normalmente, abandonadas, algumas pela sobreposição das perguntas e outras pela dificuldade de se obter uma boa resposta, a exemplo da concentração de desinfetante utilizada na granja. Após categorização e análise de associação univariada, um conjunto de variáveis é submetido a AFCM, testando todas as combinações até que a melhor seja encontrada. A esse conjunto de variáveis é atribuída à condição da variável resposta. Estudos dessa natureza, avaliando outros problemas, foram desenvolvidos no Brasil por Mores, N. et al. (2000) e Amaral, A. L. (2000).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- AMARAL, A. L. et al. Fatores de risco associados ao desempenho reprodutivo da fêmea suína. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.5, p.479-486, 2000.
- BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.30, p. 37-53, 1996.
- BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pigs carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.36, p. 199-206, 1997.
- BESSA, M.; COSTA, M; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10. 2001 Porto Alegre, *Anais...* Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2001 v.2, 384p. p.119-120.
- BLAHA Th. Implementing a *Salmonella* monitoring programme for pork in Germany. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS IN PORK, 5. 2003a, Heraklion, *Proceedings...* School of Veterinary Medicine, University of Tessaly, Karditsa, 2003a, 331p. p.200-202.
- BLAHA Th. Proficiency test of four *Salmonella* antibody ELISA-test for their harmonization. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS IN PORK, 5. 2003b, Heraklion, *Proceedings...* Karditsa: School of Veterinary Medicine, University of Tessaly, 2003b, 331p. p.105-107.
- CASTAGNA, S.M.F. et al. Associação da prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e a contaminação de embutidos tipo frescal. In: CONGRESSO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. *Anais...* Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003, 483p. p.65-66.
- CHRISTENSEN, J. et al. Salmonella level of Danish herds based on serological examination of meat-juice samples and salmonella occurrence measured by bacteriological follow-up. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 40, p. 277-292, 1999.

FEDORKA-CRAY, P. J.; GRAY, J. T.; WRAY, C. *Salmonella* infection in pigs. In: WRAY, C, WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**. New York, CABI, 2000. Cap.11 p.191-208.

FUNK J.; DAVIES P. R.; GEBREYES W. 2001. Risk factors associated with *Salmonella enterica* prevalence in three-site swine production systems in North Carolina, USA. *Berliner Unmunchener Tierarztlliche Wochenschrift*. Berlin, 114:335-338

GREINER M.; BOHRING D. Notes about determining the cut-off value in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v.20 p.307-310, 1994.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT F.; BOUVETP. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: WRAY, C, WRAY, A. *Salmonella in domestic animals*. New York, CABI, 2000. Cap.1 p.1-18.

HAMILTON D. R. et al. Effect of pre-slaughter handling and serology on *Salmonella* in pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS IN PORK, 5. 2003b, Heraklion, *Proceedings...* Karditsa: School of Veterinary Medicine, University of Tessaly, 2003, 331p. p.180-183.

HEIJDEN, H. M. J. F. First international ring trial of ELISAs for *Salmonella*-antibody detection in swine. *Berliner Unmunchener Tierarztlliche Wochenschrift*. Berlin, 114:389-392, 2001.

HUYSMANS K. et al. Serological research of *Salmonella* on Belgian pig farms. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF FOODBORNE PATHOGENS IN PORK, 5. 2003b, Heraklion, *Proceedings...* Karditsa: School of Veterinary Medicine, University of Tessaly, 2003, 331p. p.70-71.

LO FO WONG, D. M. A. et al. Herd- level risk factors for the introduction and spread of *Salmonella* in Pigs Herds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 4, 1999, Washington, *Proceedings...* Urbana-Champaing: University of Illinois, 1999, 381p. p. 151-154.

MACHADO, H. G. et al. Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico sorológico de infecções pelos sorotipos 3, 5 e 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.53 n.5, p.513-522, 2001.

MADEC, F.; FOURICHON, C. Les facteurs de risque en epidemiologie animale. *Epidemiological Sante Animal*, Ploufragram, n.18, p.31-43, 1990.

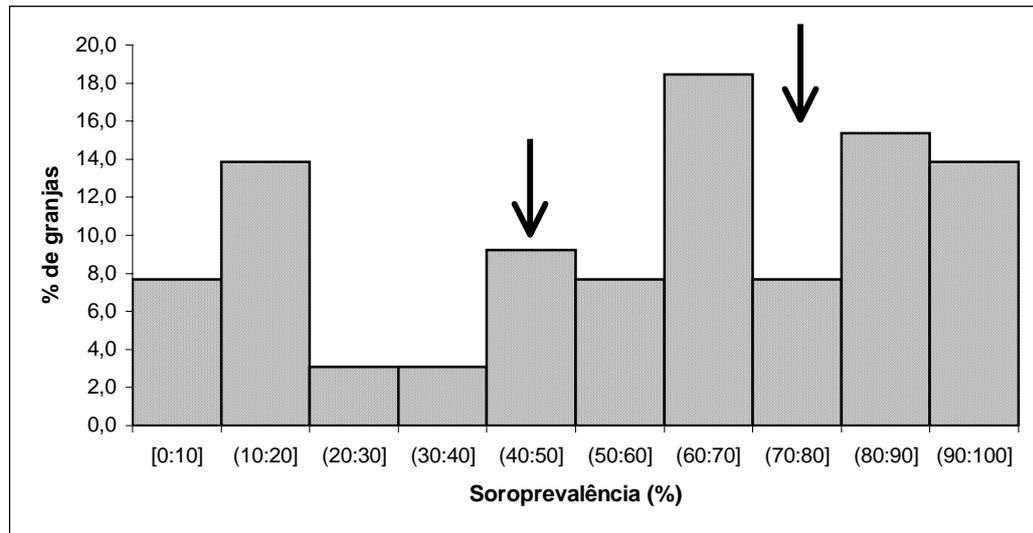
MICHAEL, G.B.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Comparison of diferent selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 138 – 142, 2003.

- MORES, N. et al. Fatores de risco associados aos problemas dos leitões na fase de creche em rebanhos da região sul do Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.3, p.191-199, 2000.
- MOUSING, J. et al., 1997. Nation-wide Salmonella enterica surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 53, p. 247-261, 1997.
- NIELSEN, B. et al. The serological response to Salmonella serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with on indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 47, p. 205 - 218, 1995.
- NIELSEN, B. Food safety quality assurance programs in the Danish swine production. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO, MERCADO E QUALIDADE DA CARNE DE SUÍNOS, 2, 2003, Florianópolis, *Anais... Concórdia: Embrapa Suínos e Aves*, 2003, 110p. p. 63-73.
- OLIVEIRA, S. D. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.87, 25-35, 2002.
- PROUX, K. et al. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infeted pigs. *Veterinary Research*, Ploufragan, v.31 p. 481-490, 2000.
- RICROFT, A. Structure, function and synthesis of surface polysaccharides in *Salmonella*. In: WRAY, C, WRAY, A. *Salmonella in domestic animals*. New York, CABI, 2000. Cap.2 p.19-34.
- SILVA, L. et al. Estudo longitudinal da infecção por *Salmonella* sp. em um sistema integrado de produção de suínos. In: CONGRESSO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003 Goiânia. *Anais... Concórdia: Embrapa Suínos e Aves*, 2003, 483p. p.61 - 62.
- THORNS C. J. Bacterial food-borne zoonoses. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, Paris, v.19 n.1 p.226-239, 2000.
- VAN DER WOLF P., J et al. 2001. Herd level husbandry factors associated with the serological salmonella prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.78:205-219.
- VOLLER A.; BIDWELL D. E. ; BARTLETT A. *The enzyme linked immunosorbent assay*. A guide with abstracts of microplate applications. Nuffield laboratories of Comparative Medicine, 1979,London, 128p.
- WEGENER et al., *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v.9 n.7 p. 774-780, 2003.

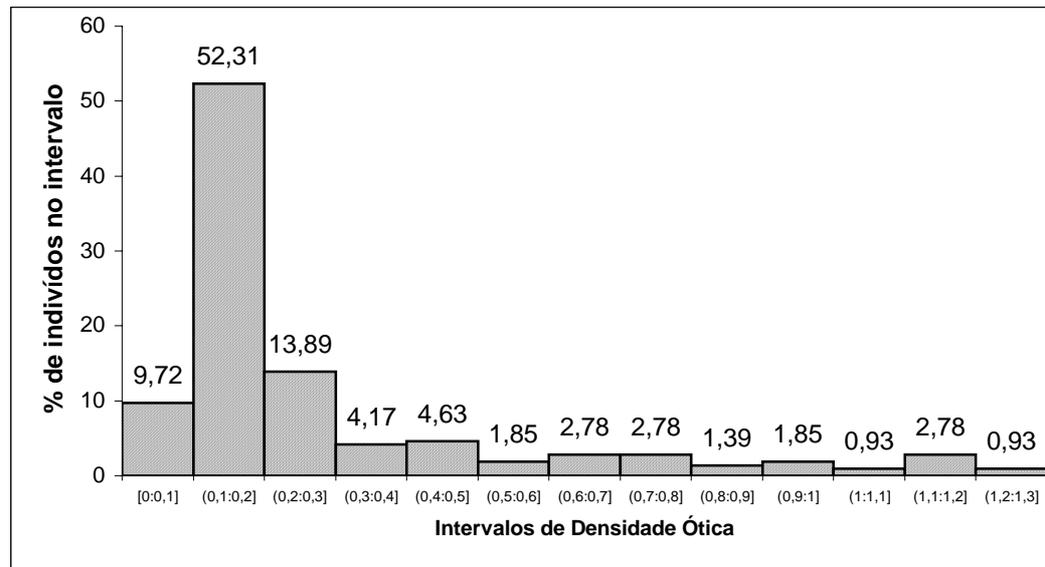
## CONCLUSÕES

- A infecção por *Salmonella* está amplamente disseminada entre os rebanhos de terminação de suínos amostrados no RS e SC.
- O teste de ELISA desenvolvido para soro foi capaz de identificar suínos infectados por *Salmonella* sp. e pode ser adaptado para o uso com suco de carne.
- Os fatores de risco associados à alta soroprevalência de *Salmonella* nas granjas terminadoras foram: uso de ração peletizada, distribuição de dejetos a menos de 100m do local de captação de água, não utilização de comedouro do modelo comedouro/bebedouro, transporte com freteiro misturando animais de várias granjas
- Os fatores de risco associados à alta soroprevalência de *Salmonella* nas granjas de ciclo completo foram: ingredientes de ração desprotegidos de outros animais, ausência de controle de roedores, ração seca, ausência de cerca, não uso da pintura com cal após lavagem e desinfecção e a entrada de outras pessoas, além do técnico, na granja.
- Os desinfetantes a base de amônia quaternária, hipoclorito de sódio (0,1%) glutaraldeído/cloreto de benzalcônio e iodóforo tiveram sua atividade contra amostra de *Salmonella* Typhimurium prejudicada na presença de matéria orgânica. O tempo de contato destes desinfetantes, mesmo na ausência de matéria orgânica, afetou a eficácia do mesmo, porém não houve diferença de sensibilidade frente a diferentes amostras de *Salmonella* Typhimurium.

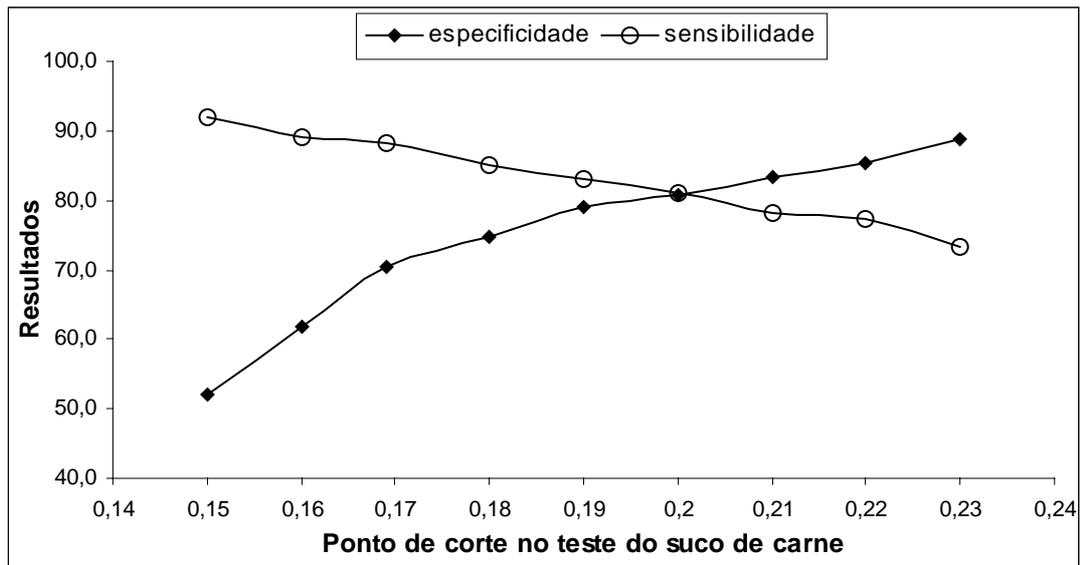
**APÊNDICE A** - Histograma da distribuição das soroprevalências dos 65 rebanhos estudados. As setas indicam os limites das categorias utilizadas no estudo de fatores de risco (capítulo 3).



**APÊNDICE B** - Histograma da distribuição das leituras de densidade ótica observadas no soro da população de suínos submetidos ao ELISA-LPS com soro e suco de carne (capítulo 2).



**APÊNDICE C** - Sensibilidade e especificidade do teste de ELISA aplicado ao suco de carne em relação ao soro de acordo com o ponto de corte do teste aplicado ao suco de carne.



**APÊNDICE D** - Questionário aplicado aos rebanhos de ciclo completo, nos rebanhos terminadores foi aplicado o mesmo protocolo retirando as informações que são exclusivas do ciclo completo.



**PROJETO de SALMONELOSE dos SUÍNOS  
CICLO COMPLETO**

DATA DE REALIZAÇÃO DO QUESTIONÁRIO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

GRANJA: \_\_\_\_\_

NOME DO CRIADOR: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: Localidade: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Empresa integradora: \_\_\_\_\_

**RESPONSÁVEL PELO PREENCHIMENTO DO QUESTIONÁRIO**

NOME: \_\_\_\_\_

FUNÇÃO: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

CIDADE: \_\_\_\_\_

TELEFONE: \_\_\_\_\_

**EMBRAPA - Suínos e Aves  
CX. POSTAL 21**

**89700-000 - CONCÓRDIA - SC.**

**FONE - 049-4428555; FAX: 049-442-8559**

## 1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

1.1 Idade da propriedade: \_\_\_\_\_ anos.

1.2 Grau de escolaridade do responsável pela granja? \_\_\_\_\_

1.3 A suinocultura é a principal atividade da propriedade? ( ) sim ( ) não  
Quais são as outras atividades? \_\_\_\_\_

1.4 Assistência técnica: ( ) 1 vez cada 30 dias ( ) quando necessário

1.5 Duração média da visita: \_\_\_\_\_

1.6 Mão de obra:

a) familiar - número de pessoas envolvidas com atividade: \_\_\_\_\_

b) número de funcionários envolvidos com atividade: \_\_\_\_\_

1.7 Capacidade da granja:

a) n<sup>o</sup> de matrizes \_\_\_\_\_

b) n<sup>o</sup> de machos \_\_\_\_\_

## 2 RACÃO e INGREDIENTES

2.1 Produz as rações na propriedade? ( ) sim ( ) não

Ingredientes:

produto	quantidade	procedência (local e data de fabricação e data de chegada na granja)	tempo de utilização
milho			
farelo de soja			
premix			
concentrado			

2.2 Outros animais tem acesso a fábrica de ração? ( ) sim ( ) não

Quais? \_\_\_\_\_

2.3 Ração comprada pronta? ( ) sim ( ) não

Procedência (local e data de fabricação) \_\_\_\_\_

Tempo de utilização \_\_\_\_\_

2.4 A ração é fornecida pela empresa? ( ) sim ( ) não

Se fornecida pela empresa, qual o programa de antibiótico e ou tratamento específico para salmonela?

a) na ração lanche: \_\_\_\_\_

b) na ração crescimento: \_\_\_\_\_

c) na ração terminação: \_\_\_\_\_

2.5 A ração pronta é estocada:

( ) silos ( ) sacos abertos ( ) sacos fechados ( ) granel sem proteção ( ) caixas

2.6 Estado de conservação dos sacos: ( ) boa ( ) ruim

2.7 A sacaria entra na granja e retorna para fábrica de ração: ( ) sim ( ) não

2.8 Estocagem dos produtos ou insumos (concentrado, núcleo e premix):

protegidos do sol ( ) sim ( ) não

sobre estrados ( ) sim ( ) não

protegidos de animais ( ) sim ( ) não

sacarias estão ( ) abertas ( ) fechadas

2.9 Os produtos (núcleo, concentrado, premix) são armazenados até:

( ) 20 dias ( ) 60 dias ( ) 90 dias ( ) mais de 90 dias

2.10 Estocagem do farelo de soja:

( ) sacos ( ) silo a granel ( ) granel no piso.

armazenado até: ( ) 60 dias ( ) 90 dias ( ) mais de 90 dias

2.11 Estocagem de milho:

( ) sacos ( ) espiga no paiol ( ) campo ( ) silo a granel ( ) granel piso

armazenado até: ( ) 60 dias ( ) 90 dias ( ) mais de 90 dias

2.12 Fornece aves mortas para os suínos?

( ) sim ( ) cozidas ( ) in natura

( ) não

2.13 Acrescenta medicamento nas rações: ( ) sim ( ) não

Quais? \_\_\_\_\_

Quando? \_\_\_\_\_ dose \_\_\_\_\_

## 2.14 Avaliação da higiene na fábrica de ração

- a) existe contaminação fecal dos ingredientes da ração:  sim  não
- b) o sistema foi desenhado para evitar a contaminação fecal:  sim  não
- c) existe acúmulo de poeira, resto de ração, teia de aranha etc. :  sim  não

**3 CRESCIMENTO-TERMINAÇÃO**

## 3.1 Sistema de criação:

- confinado convencional
- semi-confinado
- criação sobre cama

3.2 Como é feita alimentação dos animais?  no chão  em comedouros

## 3.3 Tipo de comedouro:

- comedouro-bebedouro  comedouro com depósito de ração
- comedouro sem depósito de ração

## 3.4 O comedouro possui divisória para impedir que os suínos pisem na ração?

- sim  não

3.5 Há desperdício de ração?  sim  não3.6 Forma da Ração:  farelada  peletizada - % de finos \_\_\_\_

- seca  sopa  úmida com:  água  soro de leite

Quanto tempo a ração permanece úmida antes de ser consumida? \_\_\_\_\_

## 3.7 Fornecimento de ração:

- a vontade
- restrição/controlada - quantas vezes por dia \_\_\_\_\_

## 3.8 Tipo de bebedouro:

- chupeta  taça ou concha  nível constante de cano  nível constante com bóia
- ) outros: \_\_\_\_\_

## 3.9 Formação dos lotes:

- mesmo da creche  por tamanho  ao acaso  por sexo

## 3.10 Lotação

	baia 1	baia 2
--	--------	--------

Tamanho médio das baias	_____ m X _____ m	_____ m X _____ m
n <sup>o</sup> médio de suínos por baía		
n <sup>o</sup> de bocas no comedouro		
n <sup>o</sup> de bebedouros		

Galpão 1 - n<sup>o</sup> de salas \_\_\_\_\_ n<sup>o</sup> de baias por salas \_\_\_\_\_

Galpão 2 - n<sup>o</sup> de salas \_\_\_\_\_ n<sup>o</sup> de baias por salas \_\_\_\_\_

Galpão 3 - n<sup>o</sup> de salas \_\_\_\_\_ n<sup>o</sup> de baias por salas \_\_\_\_\_

3.11 Tipo de divisória entre as baias: ( ) compacta ( ) vazada

3.12 Tipo de piso utilizado: ( ) compacto ( ) compacto + cama ( ) ripado  
 ( ) ripado + cama ( ) parcialmente ripado + cama ( ) parcial. ripado sem cama  
 ( ) sobre cama

3.13 Intervalo de troca das camas:

( ) quando está suja ( ) diariamente ( ) esporadicamente ( ) nenhuma

3.14 Higiene e desinfecção das instalações:

a) Sistema de manejo: ( ) contínuo ( ) todos dentro todos fora

b) Desinfecção das instalações:

( ) desinfecção com vazio – quanto dias \_\_\_\_\_

( ) desinfecção só das baias desocupadas

( ) desinfecção periódica dos corredores

( ) não possui programa de desinfecção

c) Faz limpeza das baias antes da introdução dos animais: ( ) sim ( ) não

Como faz a limpeza?

( ) lavagem com água + detergente

( ) lavagem só com água

( ) só com varredura ou pá

d) Tipo de desinfecção:

( ) química: produto mais usado \_\_\_\_\_ diluição: \_\_\_\_\_

princípio ativo \_\_\_\_\_

( ) faz rodízio de produtos, Quais? \_\_\_\_\_

( ) física: água quente ( ) vassoura de fogo ( )

e) Faz caiação das instalações após a lavagem

sim       não       esporadicamente

3.15 Sistema de limpeza diária com pá e/ou vassoura:

3 vezes ao dia     2 vezes ao dia     1 vez ao dia     não faz

3.16 Avaliação da qualidade da higiene por ocasião da visita:

animais:                     limpos     sujos

piso das baias:           limpas     sujas

prédio (aspecto geral):  limpo       sujo

comedouros:             limpos     sujos

bebedouros:             limpos     sujos

3.17 Instalações - aberturas e ventilação:     aberto     janelão     cortinas

3.18 Possui telas nas aberturas?     sim     não

3.19 Estado de conservação da instalação?  bom     regular     ruim

3.20 Existe sinais significativos de diarreia nos animais:     sim     não

aspecto:     amolecidas     aquosas     mucóides     sanguinolentas

#### **4 BIOSSEGURANÇA**

4.1 Qual a distância do produtor de suínos mais próximo? \_\_\_\_\_

4.2 Existe barreira física (árvores) entre as propriedades?     sim     não

4.3 A granja é atingida por poeira de estrada próxima?     sim     não

4.4 A granja é cercada?     sim     não

4.5 Quais são as pessoas que visitam a granja?

só funcionários e o técnico     vizinhos, parentes, etc.

4.6 A granja possui portaria de controle de entrada de pessoas?  sim     não

4.7 Quais os cuidados são tomados na entrada da granja pelas visitas?

lavar as mãos     banho e troca completa de roupas     troca de macacão e botas     troca apenas das botas     uso de macacão sobre a própria roupa     nenhum dos anteriores

4.8 Transporte de animais:  caminhão próprio  freteiro

4.9 O caminhão transporta só animais dessa granja?  sim  não

4.10 O caminhão que transporta insumos ou ração também transporta animais?

sim  não

lavado  lavado e desinfetado

4.11 O caminhão que carrega animais:  entra na granja

possui área restrita com carregador

4.12 O trator que carrega dejetos:  entra na granja  possui área restrita

4.13 Quem faz o transporte dos dejetos?

trator e equipamentos próprios

trator e equipamentos comunitários

trator e equipamentos da prefeitura

4.14 Dejetos de suínos e ou aves de outras propriedades são depositados nas proximidades da granja?  não  sim, Quais e a que distância? \_\_\_\_\_

4.15 Qual é o destino dos animais mortos? \_\_\_\_\_

4.16 Os funcionários da granja possuem criações em suas casas?

não  sim, quais? \_\_\_\_\_

4.17 Existem outras espécies domésticas na granja?

aves domésticas: Quais? \_\_\_\_\_

bovinos, quantos? \_\_\_\_\_

ovinos, quantos? \_\_\_\_\_

caprinos, quantos? \_\_\_\_\_

eqüinos, quantos? \_\_\_\_\_

caninos, quantos? \_\_\_\_\_

felinos, quantos? \_\_\_\_\_

outros, quais? \_\_\_\_\_

4.18 Como vende os animais :

lote inteiro  só os mais pesados, mantendo refugos período \_\_\_\_\_

4.19 Manejo das instalações de maternidade e creche no ciclo completo;

maternidade:  contínuo  todos dentro todos fora.

creche:  contínuo  todos dentro todos fora.

4.20 Outros animais têm acesso às instalações dos suínos?

bovinos  cães  gatos  aves silvestres  galinhas caipiras

outros: \_\_\_\_\_

4.21 Existe criação de pombos na propriedade?  sim  não

4.22 Existe presença de pombos na propriedade?  sim  não

4.23 Existe programa de controle de ratos?  sim  não

produto \_\_\_\_\_ período \_\_\_\_\_

4.24 Possui aviário na granja?  sim  não

4.25 Possui galinhas caipiras soltas na propriedade?  sim  não

## 5 ÁGUA

5.1 Origem:  riacho  distribuição por rede pública  poço artesiano

fonte ou poço freático

5.2 A água é tratada:

sim, com que produto: \_\_\_\_\_ diluição: \_\_\_\_\_

não

5.3 Existência de reservatórios:  sim  não

5.4 Utilização de tampa no reservatório:  sim  não

5.5 Higienização dos reservatórios (período):

menos de 6 meses  mais de 6 meses  nunca faz

5.6 Como faz a higienização dos reservatório:

só limpa e lava  limpa, lava e desinfeta

Que produto usa na desinfecção? \_\_\_\_\_ diluição: \_\_\_\_\_

5.7 Acesso de outras espécies animais ao reservatório:

não  sim, quais \_\_\_\_\_

5.8 A fonte de captação de água:

protegida por floresta  outra proteção  não é protegida

5.9 Há distribuição de dejetos de suínos ou aves a menos de 100 metros da fonte de captação de água?

sim  não

#### EXAMES COMPLEMENTARES

1 Água – data de coleta \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

2 Ração – data de coleta \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

OBSERVAÇÕES:

---

---

---

---

---

**APÊNDICE E** - Resultados do teste de  $\chi^2$  utilizado na análise preliminar entre variáveis explicativas e resposta para os 65 rebanhos.

Variável	Valor de $\chi^2$	Valor de p
Existe programa de controle de roedores - PRC	13,33	0,0013
Tipo de controle de roedores - PRC1C	13,33	0,0013
Estocagem dos produtos e insumos da ração protegidos de animais - EPI3	16,19	0,0027
Período de controle de roedores - PRC2C	22,06	0,0048
A granja é atingida por poeira de estrada próxima - AAP	8,07	0,0177
Situação da higiene dos animais por ocasião da visita - OAE	7,32	0,0257
Situação da higiene dos bebedouros por ocasião da visita - BEB	6,95	0,0310
Há distribuição de dejetos de suínos ou aves a menos de 100 metros da fonte de captação de água - HDD	6,52	0,0383
Número médio de baias por galpão - AGC	6,44	0,0399
Possui telas nas aberturas - PTA	5,90	0,0522
Quem faz o transporte dos dejetos - QTDC	5,89	0,0525
O caminhão só transporta animais dessa granja - CTA	5,61	0,0604
Situação da higiene dos comedouros por ocasião da visita - CLS	5,57	0,0614
Número de bebedouros por baia - NMBC	5,57	0,0617
Há desperdício de ração - HDR	5,42	0,0665
A fonte de captação de água é protegida - APF	8,73	0,0680
Distância de dejetos de vizinhos - DOP	5,20	0,0741
Formação do lote - TOLC	4,94	0,0843
Existem eqüinos na granja - EEG	4,84	0,0889
Estado de conservação das instalações - ECIC	4,77	0,0918
A granja possui portaria de controle de entrada - GPP	4,72	0,0943
Cuidados para entrar na granja - CEGC	4,72	0,0943
Tipo de mão de obra - MOB	7,81	0,0987
Existem outros animais na granja - EOG1	4,44	0,1083
Número médio de animais por baia - ANIBAIAC	7,46	0,1132
Sacarias estão abertas - EPI4C	7,35	0,1182
Vende todos os animais - CVAC	4,22	0,1208
Situação da higiene do piso das baias por ocasião da visita - PDB	4,01	0,1349
Forma de ração - FOR	3,86	0,1450
As galinhas têm acesso às instalações de suínos - GAS	3,83	0,1469
Grau de escolaridade do produtor - GERC	6,73	0,1508
Tempo que a ração permanece úmida - RSU2C	6,63	0,1567
Assistência técnica - ATEC	3,63	0,1622
Distância de dejetos de vizinhos - DOP1C	6,45	0,1677
Número provável de coliformes totais na água - AGUATC	3,40	0,1824
Tipo de comedouro - TCOC	5,96	0,2018
Fornecimento de ração contínua ou restrita - FRA	3,12	0,2099
O sistema de armazenamento de ração foi desenhado para evitar contaminação fecal - SDC	3,04	0,2187
Outros animais tem acesso a fábrica de ração - OAF	2,98	0,2247
Existe contaminação fecal dos ingredientes e/ou ração pronta - ECF	2,80	0,2460
Os comedouros possuem divisória para impedir que os suínos pisem na ração - CPD	2,78	0,2487
Número mais provável de coliformes fecais na água - AGUAFC	5,29	0,2580
Existe presença de pombos na propriedade - EPP	2,69	0,2597
Quais são as pessoas que visitam a granja - QSP	2,68	0,2612

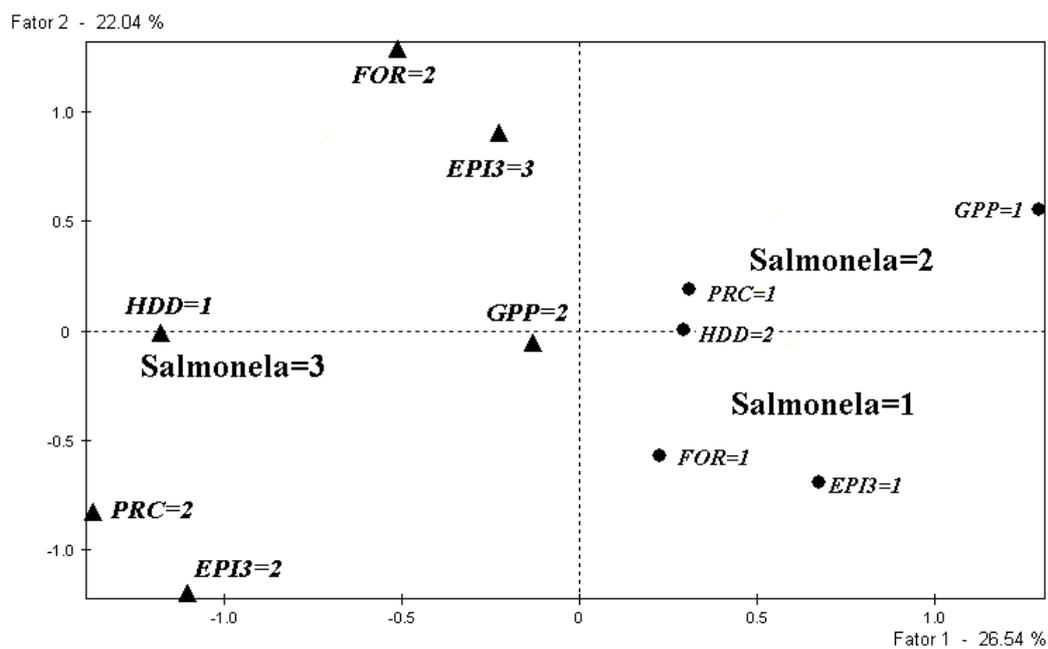
Possui aviário na granja - PAG	2,57	0,2768
Faz caiação nas instalações - TCIC	2,49	0,2868
Existem bovinos na granja - EBG	2,45	0,2934
Existe o acesso de outros animais no reservatório de água- AAR	2,26	0,3229
Existem caninos na granja - ECG2	2,21	0,3305
Número de dias vazio sanitário - DIASC	4,53	0,3389
Possuí aves na propriedade - OATC	4,52	0,3404
Número de animais de terminação - TERC	6,76	0,3432
Transporte próprio dos animais - TRA	2,13	0,3438
Os funcionários da granja possuem criações em suas casas - FPC	4,39	0,3550
Tipo de desinfetante - TIDC	6,62	0,3571
Tipo de piso - TPUC	2,01	0,3670
Existem ovinos na granja - EOG	2,01	0,3670
Quantas vezes por dia fornece a ração - FRA1C	4,14	0,3873
Sistema de criação com ou sem lâmina d'água- SICC	1,87	0,3911
Os gatos têm acesso às instalações de suínos - GAI	1,87	0,3922
Manejo das instalações das creches (contínuo ou todos dentro-todos - fora) - MRCC	4,05	0,3985
Existe acúmulo de poeira - EAP	1,73	0,4197
Possui galinhas caipiras soltas na propriedade - PGC	1,59	0,4509
Estado de conservação dos sacos - ECSC	1,57	0,4558
Ração fornecida seca ou úmida - RSUC	1,56	0,4565
Como é umedecida - RSUIC	1,56	0,4565
Número de bocas no comedouro- BOCASC	3,60	0,4620
Faz rodízio de produtos desinfetantes - FRP	1,52	0,4669
Existe barreira física (árvores) entre as propriedades - EBF	1,49	0,4730
Lava o caminhão - CTIIC	1,48	0,4755
Existem felinos na granja - EFG	1,48	0,4768
O caminhão que transporta insumos para ração também transporta animais - CTI	1,36	0,5057
Possui tampa no reservatório de água - RPTC	1,28	0,5270
Estocagem de farelo de soja - EFSC	3,12	0,5369
Número médio de baias por galpão - NBAIAGC	3,11	0,5396
Estocagem do milho - ESMC	3,01	0,5562
Procedência dos suínos - PSDC	2,97	0,5629
Isolamento de <i>Salmonella</i> sp. na ração - ISOL	1,14	0,5653
Resultado do PCR para <i>Salmonella</i> sp. na ração - PCR	1,14	0,5653
Estocagem dos produtos e insumos - sobre estrados - EPI2	2,90	0,5740
Origem da água - ORAC	1,10	0,5751
Número de fêmeas - FEMC	4,70	0,5826
Estocagem da ração pronta - RPEC	2,75	0,6001
Peso no alojamento - PESC	2,74	0,6023
Tipo de bebedouro - chupeta - TIBC	4,53	0,6044
Como é feita a higienização do reservatório de água - CHRC	2,70	0,6080
Distância do vizinho mais próximo - QDPC	2,62	0,6229
Tempo de armazenamento de farelo de soja -TAFC	0,93	0,6273
Tipo de divisória entre baias - TIPD	2,59	0,6284
Produz ração na propriedade - RAC	0,79	0,6729
Ração comprada pronta - RCP	0,79	0,6729
Estocagem dos produtos e insumos - protegidas do sol - EPI1	0,79	0,6729
Prédio aspecto geral - AGP	0,76	0,6808
Sistema de criação- TIP	0,75	0,6876
Idade da propriedade em anos - IDPC	2,14	0,7094
Armazenamento de milho - TAMC	2,12	0,7142
Os produtos (núcleos, concentrado, premix) são armazenados - PNC	5,33	0,7214
Lotação doa animais na terminação - LOTC	2,01	0,7330

Existem galinhas caipiras na granja - EAD	0,55	0,7602
Existem sinais significativos de diarreia - DIA	0,54	0,7631
Número de machos - MACC	1,60	0,8079
Os sacos, carinhos e/ou latas entram na granja - SEG	0,42	0,8114
O trator entra na granja - TCDC	0,39	0,8228
A água é tratada - AGT	0,35	0,8364
Produto para o tratamento da água - AGT1	0,35	0,8364
Higienização dos reservatórios - HIRC	0,33	0,8456
Manejo das instalações de maternidade (contínuo ou todos dentro - todos fora) - MMAC	1,33	0,8559
Número de pessoas que trabalham na granja - MOB1C	1,26	0,8673
Os cães têm acesso às instalações de suínos - CAI	0,25	0,8786
Número de fornecedores de leitões do último lote - NUMC	1,15	0,8851
Destinos animais mortos - QDAC	0,78	0,9399
Limpeza diária - SLDC	0,62	0,9607
Duração da visita até 30 minutos - DVHC	0,50	0,9733
Higiene e desinfecção das instalações - sistema de manejo contínuo ou todos dentro- todos fora - HDI	0,02	0,9877
Como realiza a desinfecção - DDIC	0,02	0,9877
Dias em vazio sanitário categorizada - DDI1C	0,02	0,9877

**APÊNDICE F** - Relação das variáveis explicativas, indicadas pela análise preliminar ( $\chi^2$ ) submetidas a análise fatorial de correspondência múltipla, segundo categorias, frequências e prevalência sorológica média encontrada nos rebanhos.

Variável	Categorias	Frequência Absoluta	Prevalência média (%)	Valor de p
Controle de roedores	PRC=1 sim	53	53	0,0013
	PRC=2 não	12	78	
Estocagem dos ingredientes da ração protegidos de animais	EPI3=1 sim	25	43	0,0028
	EPI3=2 não	9	85	
	EPI3=3 não estoca ingredientes	31	61	
Distribuição dos dejetos a menos de 100m da captação de água	HDD=1 sim	13	73	0,0383
	HDD=2 não	52	54	
A granja é cercada	AGC=1 sim	11	34	0,0399
	AGC=2 não	54	62	
Transporte dos dejetos	QTDC=1 próprio	30	69	0,0525
	QTDC=2 terceiros	35	48	
Caminhão transporta animais só desta granja	CTA=1 sim	15	50	0,0604
	CTA=2 não	50	60	
Número médio de bebedouros por baia	NMBC=1 um	52	61	0,0617
	NMBC=2 mais que um	13	45	
Proteção da fonte de captação de água	APF=1 floresta	10	79	0,0680
	APF=2 outra	46	54	
	APF=3 não é protegida	9	52	
Mão de obra	MOB=1 familiar	37	60	0,0988
	MOB=2 empregados	12	55	
	MOB=3 mista	16	55	
Existem outros animais na granja	EOG1=1 sim	9	70	0,1084
	EOG2=2 não	56	56	
Número médio de animais por baia	ANIBAIAC=1 até 12	17	69	0,1133
	ANIBAIAC=2 12-18	30	55	
	ANIBAIAC=3 mais de 18	18	51	
Estocagem de produtos para ração em sacos	EPI4C=1 abertos	10	74	0,1182
	EPI4C=2 fechados	23	47	
	EPI4C=3 não usa sacos	32	60	
Forma da ração	FOR=1 Farelada	45	53	0,1451
	FOR=2 Peletizada	20	68	
Grau de escolaridade do responsável pela granja	GERC=1 até quarta série primária	36	58	0,1508
	GERC=2 primeiro grau	18	67	
	GERC=3 segundo grau e superior	11	40	
Tempo que a ração permanece úmida do comedouro	RSU2C=1 uma hora	10	39	0,1567
	RSU2C=2 mais de uma hora	8	67	
	RSU2C=3 fornece ração seca	47	60	
Portaria de controle presente na granja	GPP=1 sim	6	52	0,0943
	GPP=2 não	59	42	

**APÊNDICE G** - Mapa dos fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* sp. em 65 granjas suínas na análise fatorial de correspondência múltipla. Salmonela1 = granjas com até 40% de soroprevalência, Salmonela 2 = entre 40 e 70%) e Salmonela 3 mais de 70%.



**APÊNDICE H** - Resultados de colimetria, número mais provável (NMP) em 100 ml água e em uma grama de ração por granja, coletadas no dia da visita às granjas que compuseram o estudo de fatores de risco (capítulo 3).

GRANJAS	Água		Ração	
	Coliformes Totais NMP	Coliformes Fecais NMP	Coliformes Totais NMP	Coliformes Fecais NMP
1	>23	6,9	<3	<3
2	>23	>23	>2400	28
3	>23	>23	<3	93
4	>23	5,1	>2400	4
5	>23	>23	460	9
6	>23	12	210	23
7	>23	>23	>2400	4
8	>23	>23	>2400	3
9	>23	1,1	>2400	<3
10	>23	2,2	>2400	23
11	>23	<1,1	210	<3
12	>23	23	>2400	7
13	>23	12	>2400	<3
14	>23	6,9	1100	240
15	>23	<1,1	>2400	9
16	3,6	<1,1	9	9
17	>23	>23	>2400	<3
18	>23	1,1	>2400	<3
19	>23	<1,1	>2400	>2400
20	>23	>23	>2400	>2400
21	>23	>23	460	43
22	>23	1,1	460	4
23	>23	<1,1	>2400	>2400
24	>23	>23	>2400	>2400
25	>23	>23	>2400	1400
26	>23	>23	>2400	>2400
27	>23	>23	>2400	>2400
28	>23	>23	1100	460
29	>23	>23	210	3
30	<1,1	<1,1	>2400	9
31	<1,1	<1,1	>2400	240
32	>23	>23	>2400	>2400
33	>23	>23	>2400	>2400
34	>23	<1,1	>2400	>2400
35	>23	>23	>2400	>2400
36	>23	>23	>2400	>2400
37	>23	>23	>2400	>2400
38	>23	12	>2400	>2400
39	5,1	5,1	>2400	>2400

40	>23	>23	>2400	>2400
41	>23	<1,1	>2400	>2400
42	>23	1,1	>2400	>2400
43	<1,1	<1,1	>2400	>2400
44	>23	1,1	>2400	>2400
45	>23	23	>2400	1100
46	>23	>23	1100	240
47	>23	6,9	>2400	240
48	>23	>23	>2400	>2400
49	>23	>23	1100	23
50	>23	1,1	240	460
51	>23	3,6	23	<3
52	>23	23	>2400	1100
53	>23	>23	460	28
54	>23	>23	150	9
55	>23	>23	>2400	>2400
56	>23	>23	240	<3
57	9,2	2,2	>2400	<3
58	>23	6,9	>2400	<3
59	>23	6,9	>2400	20
60	>23	>23	>2400	<3
61	>23	>23	>2400	<3
62	>23	3,6	>2400	<3
63	>23	<1,1	>2400	7
64	>23	>23	240	23
65	9,2	2,2	>2400	>2400