

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**Comparação da presença de suínos portadores de *Salmonella*
sp. no início da fase de terminação e ao abate, em três granjas do Rio
Grande do Sul**

Monika Müller
Médica Veterinária

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Fevereiro 2005

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer à Professora Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso pelo voto de confiança que me foi dado pois ela não me conhecia, nunca havia sido aluna dela. Também pelo seu apoio nos momentos difíceis que se manifestaram durante o mestrado e por sua orientação.

Aos Professores César Avancini e Verônica Schmidt pelas dicas e apoio.

À minha amiga Simone U. Picoli pelo apoio.

Aos meus colegas mestrados e doutorandos, Sandra, Luiz, Marjo, Luciane, Patrícia, Ana Beatriz e Lizandra pelas dicas e ajuda durante a execução deste trabalho.

Às minhas bolsistas, Thais e Alessandra. Sem elas meu trabalho teria sido muito mais difícil e quase não executável. Em especial à Alessandra Sella, que não era minha bolsista mas estava sempre disposta a ajudar, além de me emprestar um monitor de computador. Aos bolsistas de meus colegas e dos Professores César Avancini e Verônica Schmidt pelo bom convívio dentro do laboratório.

À Fundação Instituto Oswaldo Cruz pela sorotipagem das amostras.

À minha mãe, pelo apoio dado em casa pois às vezes é difícil conviver com um mestrando!

E, finalmente, à Naná que sempre esteve ao meu lado em casa!

Comparação da presença de suínos portadores de *Salmonella* sp. no início da fase de terminação e ao abate, em três granjas do Rio Grande do Sul¹.

Autor: Monika Muller

Orientadora: Prof. Dr^a Marisa Ribeiro de Itapema

Cardoso

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar o índice de animais positivos para *Salmonella* sp. no início da terminação e ao abate e identificar possíveis fontes de contaminação. Em três granjas terminadoras, foram coletados suabes de superfície nas baias e nos silos durante o vazio sanitário; amostras de fezes e sangue dos animais no dia do alojamento; alíquotas de todos os lotes de ração e amostras de sangue, linfonodos mesentéricos (LM) e conteúdo intestinal (CI) dos animais ao abate. As amostras de sangue foram submetidas a testes de ELISA-LPS para *Salmonella* Typhimurium, enquanto nas demais amostras pesquisou-se a presença de *Salmonella* sp. As amostras de ração foram adicionalmente submetidas à técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Todos animais foram negativos para presença de *Salmonella* sp. nas fezes no início da terminação, entretanto um pequeno número de animais foi positivo na sorologia. Em duas granjas, havia a contaminação residual no ambiente, enquanto na terceira granja, em um dos lotes de ração, foi detectada a presença de *Salmonella* sp. pela PCR. Ao abate, acima de 90% dos animais foi positivo no teste de ELISA-LPS, sendo que, em todos os lotes, encontrou-se um número variável (12-92%) de portadores em LM e CI. A partir disso, concluiu-se que a terminação foi a fase crítica para a amplificação da infecção por *Salmonella* sp., sendo a presença residual do microrganismo na granja e o fornecimento de ração contaminada fontes prováveis de infecção.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (71p.) - Fevereiro 2005

Comparison of the presence of pigs carrying *Salmonella* sp. in the beginning of the finishing phase and at the slaughter, in three farms in Rio Grande do Sul.¹

Author: Monika Müller

Advisor: Prof^a Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, PhD

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the prevalence of positive animals for *Salmonella* sp. in the beginning of the finishing phase and at slaughter, and to identify the possible sources of contamination. In three finishing farms, environmental swabs of the barns and grain elevators were collected during the sanitary emptiness; samples of faeces and blood of the animals on the day of housing; aliquots of all feed lots and samples of blood, mesenteric lymph nodes (LM) and intestinal contents (CI) of the animals at slaughter. The blood samples were submitted to a *S. Typhimurium* ELISA-LPS test. Other samples were submitted to an *Salmonella* isolation protocol. Feed samples were supplementary submitted to PCR. All animals were negative for the presence of *Salmonella* sp. in the faeces on the beginning of the finishing phase, but some animals were positive on serology. In two farms, residual environment contamination were detected, and, in the third farm one of the feed lots was *Salmonella* positive by PCR. At the slaughter, over 90% of the animals were positive on the ELISA-LPS test and, in all cohorts, a variable number (12-92%) of carrying animals in LM and CI were detected. From this on, it was concluded that the finishing phase was critical for the amplification of *Salmonella* infection, and the residual environmental contamination on farms as well as *Salmonella* positive feed are probable infection sources.

¹ Master os Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. (71p.) – February, 2005.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. <i>Salmonella</i> sp.....	5
2.1.1 Características gerais.....	5
2.1.2. Importância.....	6
2.1.3.Importância do gênero <i>Salmonella</i> sp. na segurança alimentar.....	8
2.2. Infecção por <i>Salmonella</i> sp. em suíno.....	11
2.3. Epidemiologia da infecção por <i>Salmonella</i> sp. em suínos.....	14
2.4. Métodos diagnósticos.....	17
2.4.1. Isolamento do agente.....	17
2.4.2. Fases do isolamento.....	19
2.4.2.1. Etapa de pré-enriquecimento não seletivo.....	19
2.4.2.2. Etapa de enriquecimento seletivo.....	20
2.4.2.3. Etapa de semeadura em meio sólido seletivo.....	22
2.4.2.4. Confirmação.....	25
2.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	27
2.4.4. Pesquisa de anticorpos.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1. Delineamento experimental	35
3.2. Coleta de amostras dos silos e ambiente.....	36
3.3. Coleta de amostras dos animais no início da terminação.....	36
3.4. Coleta de amostras de ração.....	37
3.5. Coleta de amostras dos animais no frigorífico.....	38
3.6. Contaminação artificial de amostras de ração.....	38
3.7. Técnicas utilizadas para o isolamento de <i>Salmonella</i> sp.....	39
3.7.1. Pré-enriquecimento das amostras.....	39
3.7.2. Enriquecimento seletivo.....	39
3.7.3. Isolamento em meio sólido.....	40
3.7.4. Identificação das colônias.....	40
3.7.4.1. Provas de triagem.....	40
a) TSI.....	41
b) LIA.....	41
3.7.4.2. Provas bioquímicas confirmatórias.....	42
a) Citrato.....	42
b) Fenilalanina desaminase.....	42

c) ONPG.....	43
d) SIM.....	43
e) Urease.....	44
3.7.4.3. Confirmação sorológica.....	44
3.7.5. Sorotipificação de amostras de <i>Salmonella</i> sp.....	45
3.8. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	45
3.8.1. Iniciadores selecionados.....	45
3.8.2. Obtenção de amostras.....	45
3.8.3. Extração do DNA.....	46
3.8.4. Amplificação do DNA.....	47
3.9. Técnica utilizada para pesquisa de anticorpos nas amostras de soro.....	48
3.10. Análise estatística.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1. Avaliação da contaminação residual nas granjas.....	50
4.2. Soroprevalência e isolamento de <i>Salmonella</i> sp. a partir de fezes dos animais no início da terminação.....	51
4.3. Soroprevalência e isolamento de <i>Salmonella</i> sp. dos animais ao abate.....	52
4.4. Sorotipificação dos isolados de <i>Salmonella</i> sp.....	53
4.5. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. em amostras de ração fornecidas aos animais durante a fase de terminação.....	54
4.6. Contaminação artificial das amostras de ração.....	55
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8. APÊNDICES.....	82

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1 Amostras positivas para <i>Salmonella</i> sp. coletadas do piso de três granjas de terminação no Rio Grande do Sul, 2003.	50
2 Animais sorologicamente positivos e com isolamento de <i>Salmonella</i> sp. das fezes no início da fase de terminação em três granjas do Rio Grande do Sul, 2003.	51
3 Animais sorologicamente positivos e com isolamento de <i>Salmonella</i> sp. ao abate, em três granjas do Rio Grande do Sul, 2003.	52
4 Resultado da sorotipificação de linhagens de <i>Salmonella</i> sp. isoladas de conteúdo intestinal (n=34) e de linfomodos mesentéricos (n=39).	54

RELAÇÃO DE FIGURAS

- | | Página |
|--|--------|
| 1 Percentagem de animais positivos no teste de ELISA-LPS para <i>Salmonella</i> sp. no início da terminação e ao abate.
* Diferença altamente significativa ($P < 0,0001$). | 53 |
| 2 . Gel de agarose a 1,2% mostrando o fragmento amplificado do gene <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> sp. pela técnica de PCR. Coluna 1: marcador de peso molecular com escala de 100 pb. Coluna 2: controle positivo. Coluna 3 e 4: alíquotas de ração positivas. Coluna 5: controle negativo. | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – Association of Official Analytical Chemists
BAM – Bacteriological Analytical Manual
BPLS – Ágar Verde Brilhante-Lactose-Sacarose
CI – Conteúdo Intestinal
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DNTP – Desorribonucleotídeo trifosfatado
DTA – Doenças transmitidas por alimentos
EDTA – Ácido etileno diamino tetraacético
EGTA – Ethylene glycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay
IMC – Isolamento microbiológico convencional
LIA – Ágar Lisina-Ferro
LM – Linfonodos Mesentéricos
OIE – Organização Internacional de Epizootias
ONPG – 0-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
pb – pares de bases
PBS – Salina tamponada com fosfatos
PCR – Reação em cadeia da polimerase
RA – Ágar Rambach
S. – *Salmonella* sp.
SDS – Sódio Duodecil Sulfato
SIM – Sulfito Indol Motilidade
TBE – (Tris/Ácido Bórico/EDTA)
TE – TrisHCl; EDTA
TSA – Ágar Triptona Soja
TSI – Ágar Três Açúcares-Ferro
VB – Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
XLT4 – Ágar Xilose-Lisina-Tergitol-4

1. INTRODUÇÃO

À partir do ano de 2001, o Brasil aumentou as exportações da carne suína na ordem de 110,5% em relação ao ano de 2000, criando expectativa de uma maior participação no mercado internacional. Entre os requisitos para uma maior competitividade nas exportações, destaca-se a preocupação com patógenos que possam representar barreiras à comercialização, como é o caso da presença de *Salmonella* sp. nos produtos de origem animal. Associa-se a isto, o fato de países como a Dinamarca terem lançado, com sucesso, programas de controle de *Salmonella* sp. em rebanhos suínos, estimulando outros países produtores a implementar medidas semelhantes.

Para estabelecer estratégias de controle é necessário reconhecer, quantificar e qualificar a infecção na cadeia produtiva, além de testar alternativas de controle. Duas preocupações estão relacionadas com a infecção por salmonelas em suínos: uma, com a manifestação clínica e outra, pela presença desse agente em carcaças e produtos que possam causar toxinfecções em humanos. Os suínos 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.

Considerando todos estes fatores e tendo em vista que a *Salmonella* sp. já é investigada nos produtos de exportação pelos compradores e no Brasil por alguns grandes empreendimentos de alimentação, é possível afirmar que há razões para não retardar a implementação de medidas de controle efetivas ao longo de toda a cadeia produtiva. Estas visam assegurar que a indústria forneça, ao consumidor, um produto absolutamente seguro, com boa qualidade alimentícia e microbiológica.

As condições para conseguir estes objetivos dependem de algumas atitudes, como: a atenção a todos os estágios da cadeia produtiva; uso de dados gerados pela pesquisa básica, que possam ser aplicados como ferramentas para alcançar um controle de salmonelas no produto final; os quais devem ser eficientes e de custo razoável.

A partir dos estudos epidemiológicos desenvolvidos mundialmente, busca-se determinar os fatores envolvidos na contaminação dos animais. Trabalhos realizados no Rio Grande do Sul têm encontrado uma alta prevalência de animais portadores durante a terminação e ao abate, demonstrando, também, que há implicação na contaminação das carcaças e do produto final.

Embora ingredientes de origem vegetal também possam servir de fonte de contaminação para os alimentos, a utilização de farinhas de origem

animal é apontada como a principal fonte de introdução de *Salmonella* sp. A contaminação dos componentes se dá por (re)contaminação cruzada após o processamento, devido a falhas estruturais como a proximidade da fábrica com a plataforma de desembarque para o abate. Como exemplo disso, têm-se estudos onde foram encontrados 5,8% de amostras de ingredientes de origem animal contaminados, destacando-se a farinha de carne e ossos bovina e os concentrados. Em consequência, pesquisas estimam que 15 a 30% de todas infecções no período de terminação podem ser atribuídas à (re)contaminação de ração. Desta forma, é importante considerar que a contaminação da ração nos silos ou comedouros pode ter um importante papel na propagação do ciclo de contaminação na granja.

Atualmente, o método padrão para o isolamento de *Salmonella* sp. é o isolamento bacteriológico, que pode levar até 7 dias. Como alternativa, a reação em cadeia da polimerase, que já é aplicada em outros tipos de amostras como sangue e soro, pode ser utilizada. O teste da reação em cadeia pela polimerase pode ser útil como um método de monitoramento mais rápido.

Ao acompanhar um lote de suínos em um sistema integrado do Rio Grande do Sul, desde o nascimento até o abate, estudos concluíram que a infecção dos animais ocorria na fase de terminação e que a ração era uma das fontes de contaminação dos lotes.

Diante destes dados, o objetivo geral do presente estudo foi a comparação da presença de *Salmonella* sp. em suínos no início da fase de terminação e ao abate e os objetivos específicos foram confirmar a fase de terminação como crítica para amplificação da infecção no sistema de produção que vem sendo estudado, confirmar a ração como possível fonte de contaminação e verificar a concordância entre o isolamento microbiológico

convencional e a técnica da reação em cadeia pela polimerase, na detecção de *Salmonella* sp. em rações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Salmonella* sp.

2.1.1. Características gerais

O gênero *Salmonella* sp. é membro da família *Enterobacteriaceae* que compreende bacilos Gram negativos, não produtores de esporos. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares Gallinarum e Pullorum (Holt *et al.*, 1994). São anaeróbios facultativos, geralmente não fermentam a lactose ou o fazem lentamente (Clarke & Gyles, 1993).

As *Salmonella* sp. sp produzem ácido e freqüentemente gás (exceto *S. Typhymurium*) a partir de D-glicose e outros carboidratos. São indol negativas, produzem ácido sulfídrico (H₂S) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A uréia não é hidrolisada e são capazes de descarboxilar lisina e ornitina (Holt *et al.*, 1994).

Resistem à dessecação e ao congelamento, possuindo a capacidade de sobreviver no ambiente por anos (Wilcock & Schwartz, 1992). A temperatura ideal de multiplicação é de 35-37°C (Franco & Landgraf, 1996), porém, apresentam crescimento numa faixa de 7°C e 45°C. Para Jay (1992), o tempo de geração em temperaturas inferiores a 10°C é

muito grande, mas esta capacidade de crescimento em temperaturas relativamente baixas pode ser significativa onde a refrigeração quase não existe e onde o tempo de armazenamento do alimento na prateleira é prolongado.

O crescimento de *Salmonella* sp. ocorre em um pH ótimo entre 6,5 e 7,5, admitindo uma variação entre 4,5 e 9,0. Valores inferiores a 4,1 inativam e matam a *Salmonella* sp. (Tortora *et al.*, 1993).

Existem 2.400 sorovares identificados de *Salmonella* sp. com vasta distribuição na natureza (Schwartz, 2000), podendo estar presentes no trato gastrointestinal de diversos animais, incluindo peixes, répteis, pássaros e mamíferos (Hirsh, 1990; Clarke & Gyles, 1993), tendo o homem e os animais vertebrados como seus reservatórios primários (Jay., 1992).

A *Salmonella* sp. recebeu este nome em homenagem ao seu descobridor, Daniel Salmon (Tortora *et al.*, 1993). Salmon e Smith descreveram a *S. Choleraesuis* como agente etiológico de uma doença infecciosa em suínos, posteriormente identificada como sendo a Peste Suína Clássica, em que a *S. Choleraesuis* aparecia como agente secundário (Jubb *et al.*, 1985).

A nomenclatura do gênero *Salmonella* sp. ainda não está totalmente definida. Pelo fato da classificação atual, baseada em características bioquímicas, apresentar pouca importância prática, é utilizado como rotina um esquema de identificação denominado esquema de Kauffmann e White, que divide o gênero em sorovares, tendo por base a composição de seus antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar) (Campos, 1999).

Tomando como exemplo o sorotipo Typhimurium a classificação atual apresenta a seguinte nomenclatura: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium, mas formas simplificadas para representação

têm sido usadas como *Salmonella typhimurium* (Salyers & Whitt, 1994), ou ainda *Salmonella* sp. sorotipo Typhimurium (Clarke & Gyles, 1993), e *Salmonella* Typhimurium (Campos, 1999).

2.1.2.Importância

O amplo número de sorovares de *Salmonella* sp. distribuído na natureza pode ocasionar infecções entéricas e sistêmicas (Esper *et al.*, 1998). A transmissão pode acontecer entre animais, entre humanos e de animais para humanos (Clarke & Gyles, 1993). Vários sorovares de *Salmonella* sp. são adaptados a um hospedeiro específico, como por exemplo, o Typhi a humanos, o Choleraesuis a suínos e o Dublin a bovinos (Schwartz, 2000). Apesar de adaptadas à determinada espécie animal os sorovares citados podem, sob condições especiais, também causar sérias doenças em humanos (Blaha, 1997). Outros sorovares, como *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Anatum e *Salmonella* Newport podem infectar um amplo número de hospedeiros como pássaros e roedores, que passam a ser importantes fontes de disseminação do agente (Hirsh, 1990). A exemplo disto, tem-se o sorotipo Typhimurium que por ter ampla distribuição, torna-se de mais difícil eliminação em um rebanho de suínos em comparação com o sorotipo Choleraesuis mais adaptado a este hospedeiro (Wilcock *et al.*,1976).

2.1.3.Importância do gênero *Salmonella* sp. na segurança alimentar

Atualmente, disponibilizar produtos livres de patógenos ou com baixos níveis de contaminação tornou-se uma necessidade para entrar no

mercado e os produtores de suínos que enviam ao mercado um alimento seguro, podem obter vantagens na comercialização. Segundo Gorton *et al.* (1996), a demanda de exportação para produtos suínos com baixo nível ou ausência de patógenos tende a crescer.

A transmissão dos sorovares de *Salmonella* sp., adaptados ao humano, ocorre geralmente pela água e alimentos contaminados com fezes humanas, o que está associado às deficientes condições sanitárias (Calzada *et al.*, 1984). No caso dos sorovares de *Salmonella* sp. não-adaptados, são principalmente os alimentos de origem animal, a fonte mais importante para a infecção de humanos (Zebral *et al.*, 1974). A *Salmonella* sp. *enterica* é provavelmente o mais importante patógeno transmitido por alimentos cárneos de origem suínas nos Estados Unidos (Funk *et al.*, 2001). A Salmonelose é também apontada como sendo uma das mais importantes zoonoses em países desenvolvidos (Fedorka-Cray *et al.*, 1997).

Esta zoonose é considerada importante devido à doença nos suínos, à contaminação de carcaças e à contaminação de seus produtos (Wilcock & Schwartz, 1992). A *Salmonella* sp. estabelece uma infecção no ser humano, que pode contaminar-se através do manejo dos animais, ou a partir da ingestão de produtos suínos (Sobestiansky *et al.*, 1999).

Em humanos, os sintomas iniciais da doença são náuseas e vômitos, que ocorrem de 8 a 24 horas após a ingestão do alimento contaminado e, geralmente, não persistem após o início da diarreia. Durante a salmonelose aguda, as fezes podem conter um bilhão de células de *Salmonella* sp. por grama. Alguns sorovares de *Salmonella* sp. podem penetrar e ganhar acesso à corrente sanguínea, causando bacteremia (Atlas, 1997), entretanto as infecções apresentam maior tendência de permanecerem localizadas.

A salmonelose vem aumentando gradativamente na população humana. Um dos fatores que contribui para a disseminação é o aumento do consumo de produtos alimentares de origem animal. As enfermidades

transmitidas por alimentos causadas por *Salmonella* sp. são consideradas um dos mais importantes problemas de Saúde Pública, tanto nos países em desenvolvimento como nos países desenvolvidos (Jakabi *et al.*, 1999).

Os suínos são reconhecidos como reservatórios desses microrganismos e utilizados como fonte de proteínas para população humana. Portanto, têm um papel preponderante nesses fenômenos, porque funcionam epidemiologicamente como portador hígido (Zebral *et al.*, 1974).

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo, representando 44% do consumo total, seguida das carnes bovinas (28%), de aves (24%) e de outras carnes (4%). No Brasil, cerca de 70% da produção suinícola é voltada para a produção de produtos industrializados, como presuntos, lingüiças, defumados, salsichas e mortadelas (Corrêa *et. al.*, 2003).

Conforme Hald & Wegener (1999), entre as fontes de infecções humanas por *Salmonella* sp., 40-45% são provenientes de ovos e 10-15% de produtos suínos. A carne suína é responsável por aproximadamente 15% de todos os casos de salmonelose em humanos no leste Europeu e América do Norte.

Pela legislação brasileira, *Salmonella* sp. tem que estar ausente em 25g da amostra de produtos suínos (ANVISA, 2001). Entretanto, existe uma quantidade mínima necessária do microorganismo para ocorrência da doença em humanos. Esta quantidade, ou dose infectante, pode variar em função do sorovar, da afinidade dos mesmos a determinadas espécies animais e do tipo de alimento ingerido (Jakabi *et al.*, 1999).

Segundo a Secretaria Estadual da Saúde, no Rio Grande do Sul, entre 1987 e 2000 foram investigados 1.298 surtos de doenças transmitidas por

alimentos (DTA). Foi verificado que desde 1993, a salmonelose tem sido a DTA de maior ocorrência no Estado. No período 1987-2000, a *Salmonella* sp. correspondeu a 34,1% do total de surtos investigados e 57,5% dos surtos com o agente etiológico confirmado (Nadvorny *et al.*, 2004)

A relação dos alimentos preparados com ovos, envolvidos em casos de salmonelose em humanos é superior à relação de alimentos preparados com carne de frango (Santos *et al.*, 2003). A ocorrência de surtos veiculados por alimentos contendo carnes e derivados suínos tem sido pequena, apesar de alguns estudos relatarem a presença de *Salmonella* sp. em lingüiças (Castagna *et al.*, 2002) e pernil suíno (Bandeira *et al.*, 2002).

2.2. Infecção por *Salmonella* sp. no suíno

Em geral esta bactéria não causa doença clínica em suínos (Van Der Gaag *et al.*, 2003), sendo poucos os sorovares que constituem causa significativa de doença como o Cholerasuis e o Typhimurium (Sobestiansky *et al.*, 1999).

Nos suínos a forma clínica pode se manifestar como uma septicemia aguda ou uma enterocolite aguda ou crônica (Sobestiansky *et al.*, 1999). No Rio Grande do Sul, existem registros de formas entéricas e septicêmicas (Barcellos *et al.*, 1984), o que ocorre também em outras áreas do Brasil e do

mundo. Suínos que sobrevivem à septicemia aguda podem desenvolver sinais clínicos devido às lesões localizadas como pneumonia, hepatite, enterocolite e, ocasionalmente, meningoencefalite. Animais com enterocolite podem vir a desenvolver um definhamento crônico (Schwartz, 2000). Os suínos podem recuperar-se totalmente, mas alguns poderão permanecer como portadores e excretadores intermitentes por meses (Wilcock & Schwartz, 1992).

A salmonelose septicêmica ocorre freqüentemente após o desmame dos suínos, podendo aparecer em adultos, causando morte súbita ou aborto. Os sinais clínicos característicos desta doença são febre de 40,5 - 41,6°C e, após o 4º dia, diarreia aquosa e amarela com ou sem a presença de sangue, falta de apetite, tosse e dificuldade de locomoção. A mortalidade é alta e os suínos, sobrevivendo a esta infecção, podem permanecer portadores por um tempo variável (Wilcock & Schwartz, 1992; Schwartz, 2000).

A maior ocorrência em suínos desmamados pode ser devido à deficiência imunológica específica ou pela ausência da microbiota intestinal bem estabelecida (Jubb, *et al.*, 1985; Clarke & Gyles, 1993). Nos suínos mais jovens é mais difícil ocorrer a doença devido à proteção do colostro (Sobestiansky *et al.*, 1999)

A *Salmonella* Typhimurium é a principal responsável pela enterocolite. Dissemina-se rapidamente entre os suínos, mas a mortalidade é baixa, afetando principalmente animais em torno dos quatro meses de idade.

O sinal clínico inicial da enterocolite é diarreia aquosa, amarelada, inicialmente sem sangue ou muco. O sangue pode aparecer esporadicamente nas fezes, mas não com a mesma intensidade que ocorre em desenterias hemorrágicas. Os suínos afetados apresentam-se febris, alimentam-se menos e apresentam desidratação em decorrência da severidade e duração da diarreia. A mortalidade é baixa, ocorrendo somente após muitos dias de diarreia. Os animais afetados apresentam, como maior lesão, a enterite

necrótica, focal ou difusa e colite. Podem ainda ser encontrados o espessamento da superfície mucosa do cólon, ceco e íleo e, ainda, aumento dos linfonodos mesentéricos, especialmente os ileocecais (Schwartz, 2000)

Por outro lado, animais portadores são componentes importantes na epidemiologia da *Salmonella* sp. (Wilcock & Schwartz, 1992). Portadores são indivíduos que podem propagar um agente patogênico, direta ou indiretamente e tornam-se importante fonte na transmissão de doenças em uma população (Torrence, 1997). A ausência de sintomas da doença pode ocorrer tanto em humanos como em animais infectados com *Salmonella* sp. (Reynolds *et al.*, 1968). Uma dose relativamente baixa do microrganismo pode levar a este estado de portador, que pode evoluir para um estado de excretor (Clarke & Gyles, 1993).

Existem animais que podem excretar *Salmonella* sp., por meses ou anos, nas fezes após a recuperação da doença, sendo chamados de portadores ativos. Outros ingerem o microrganismo, que passa pelo intestino com pouca ou nenhuma invasão para os linfonodos mesentéricos e são chamados de portadores passivos. Finalmente, existem os portadores latentes que são animais que apresentam *Salmonella* sp. em seus tecidos, mas geralmente não excretam o microrganismo nas fezes, ou o fazem de forma intermitente (Clarke & Gyles, 1993). O sistema linfático dos suínos retém a *Salmonella* sp. adquirida do meio e age como um indicador biológico de que suínos foram expostos à *Salmonella* sp. antes do abate (Langenegger *et al.*, 1983; Damman *et al.*, 1999).

Os portadores, por sua vez, podem contaminar o ambiente, os equipamentos e contaminar as carcaças no abatedouro (Wilcock & Schwartz, 1992). Através da inspeção da carne, os linfonodos contaminados com *Salmonella* sp. podem ser expostos e transferirem o microrganismo para outras partes da carcaça ocorrendo, assim, risco de contaminação cruzada (Moo *et al.*, 1980). Outros autores analisaram a ocorrência de *Salmonella* sp. em linfonodos que permaneciam intactos na carcaça e que representavam uma forma de contaminação pós-morte do animal (Zebral *et al.*, 1974; Alves *et al.*, 1994). Este fato é de suma importância em saúde pública uma vez que pode existir considerável número de animais portadores abatidos, representando com isso risco para a população (Costa *et al.*, 1972; Alves *et al.*, 1994). Weiss *et al.* (1999), no Rio Grande do Sul, fizeram o primeiro isolamento de *Salmonella* sp. em suínos de terminação, sem sintomas clínicos. A bactéria foi encontrada em 6,4% das fezes coletadas na granja, 3,24% no conteúdo intestinal e 5,6% nos linfonodos. Segundo estudos realizados por Castagna *et al.* (2004) os maiores índices de isolamento de *Salmonella* sp. foram obtidos a partir de linfonodos mesentéricos (61%), seguido de conteúdo intestinal (55,5%) e linfonodos submandibulares e tonsilas (36,7%).

2.3. Epidemiologia da infecção por *Salmonella* sp. em suínos

São fontes relevantes na disseminação do microrganismo para os suínos: o contato com as fezes de animais infectados, a inadequada limpeza e desinfecção das baias, a introdução de animais portadores e alimentos contaminados com *Salmonella* sp. na granja e componentes de ração animal contaminados contendo subprodutos de leite e carne

(Linton, 1979; Hirsh, 1990; Sobestiansky *et al.*, 1999). Nascimento & Silva (1994) relataram que um dos mais importantes veículos de introdução de *Salmonella* sp. nos lotes avícolas é a ração, principalmente, nos componentes de origem animal, como farinhas de carne, de osso e de penas. No entanto, é importante enfatizar que ingredientes de origem vegetal também podem ser fonte de contaminação para os alimentos (Schwartz, 2000).

Foram realizados diversos estudos comprovando a presença de *Salmonella* sp. em matérias-primas para fabricação de rações animais (Jacobs *et al.*, 1963; Williams *et al.*, 1969; Harris *et al.*, 1997). No Brasil, vários trabalhos, analisando componentes das rações, consideraram as mesmas como possíveis fontes de *Salmonella* sp. para os animais (Silva *et al.*, 1973; Miranda *et al.* 1978;). Oliveira (1996) no Sul do País, avaliou os pontos críticos de contaminação por *Salmonella* sp. em 5 etapas do processo de fabricação da farinha de vísceras, destinada à fabricação de rações. A positividade foi de 70% no ponto A (início do processo); 0% no ponto B (saída do digestor) e no ponto C (saída da prensa); 6,7% no ponto D (esteira de moagem) e 16,7% no ponto E (silo). O autor relacionou a contaminação cruzada observada, com fatores como: a não separação entre as zonas “suja e limpa”; o sistema de condução da farinha, desde o digestor até o silo ser aberto; e ainda, pela proximidade da fábrica de farinha de vísceras com a plataforma de desembarque dos frangos para o abate.

Além da ração, os roedores são apontados como fonte de disseminação de *Salmonella* sp. na granja (Reinolds *et al.*, 1968). Schnurrenberger *et al.* (1968) isolaram *Salmonella* sp. de diversos animais domésticos e silvestres de fazendas em Illinois, Estados Unidos. Guiné *et al.* (1963) encontraram *Salmonella* sp. em ratos capturados próximos a abatedouros e granjas de suínos. Caley (1972) constatou que roedores e lagartos poderiam estar envolvidos na introdução ou propagação de *Salmonella* sp. em granjas. Williams (1975) mencionou que a infecção por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis em roedores é bastante difundida.

Barber *et al.* (1999) pesquisaram *Salmonella* sp. em 3.564 amostras provenientes de fezes de animais presentes em propriedades (gatos, cães, roedores, pássaros e suínos) além de água, alimentos e ambiente. Foram encontrados, entre os tipos diferentes de amostras, 157 positivas para

Salmonella sp. A partir disto, demonstraram a ampla distribuição de *Salmonella* sp. no ambiente da granja, sendo a distribuição e permanência do gênero *Salmonella* sp. no ambiente mais um fator importante para a epidemiologia da infecção dos suínos.

Diversos estudos, realizados no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS, apontaram a presença de *Salmonella* sp. na ração. Segundo Bessa. (2001) muitos autores já relataram que a *Salmonella* sp. entra em contato com o animal sadio principalmente através da alimentação e que os linfonodos mesentéricos agem como um filtro e uma barreira, tornando-se fonte de propagação para a carne e para o produto final. Castagna *et al.* (2004) relatam em seu trabalho que é importante mencionar que as salmonelas presentes em ingredientes de rações, mesmo em pequeno número, podem estabelecer uma contaminação em suínos. No estudo realizado por Kich, (2004), em sua tese de doutorado, foram visitadas 65 granjas uma semana antes do abate dos animais para aplicação de questionário e coletas de ração e sangue. A ração foi submetida à pesquisa de *Salmonella* sp. por isolamento e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram testados soros de aproximadamente 40 leitões de cada propriedade, utilizando o teste de ELISA incluindo antígeno lipopolissacarídeo do sorovar Typhimurium. A ração, apesar de ter sido positiva em duas propriedades, não pode ser identificada como um fator de risco. 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%). A alta soroprevalência esteve associada 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 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% tinham animais positivos no teste de ELISA, com prevalência variando entre 0 e 100%. Já na dissertação de mestrado realizada por Silva (2004), foi possível identificar a terminação como a fase de risco para infecção por *Salmonella* sp. em um sistema de produção acompanhado no sul do Brasil. Puderam ser identificadas 2/26 amostras de ração positivas para *Salmonella* sp., fornecidas ao lote de animais acompanhado, sendo uma das prováveis fontes de contaminação dos animais.

2.4. Métodos diagnósticos

2.4.1 Isolamento do agente

O procedimento internacionalmente aceito para a detecção de *Samonella* é a técnica microbiológica convencional, preconizada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) e Organização Internacional de Epizootias (OIE). Embora esta técnica seja consagrada, possui algumas limitações, como o tempo requerido para o cultivo e para as caracterizações bioquímicas e antigênicas. Além disto, os testes bacteriológicos somente indicam se a *Salmonella* sp. *enterica* está presente no suíno no momento da amostragem (Christensen. & Rudemo, 1998). Entretanto, o isolamento é a alternativa de eleição no controle de alimentos e rações, além de fornecer dados epidemiológicos a respeito do sorovar isolado e a resistência a antimicrobianos.

O crescimento em meio artificial, por si só, resulta de uma pressão de seleção que nem todos microrganismos são capazes de ultrapassar. Como exemplo, estudos da composição microbiana de amostras do meio ambiente revelaram que somente uma fração do total de espécies de bactérias é capaz de crescer em meio artificial (Ward *et al.*, 1990, Amann *et al.*, 1991, Liesack & Stackenbrandt, 1992).

Além disso, algumas células de *Salmonella* sp. podem estar lesadas pelo processamento ou condições ambientais, dificultando o crescimento em meios de cultura (Varnam & Evans, 1991). Ainda segundo Van Der Wolf *et al.* (2001), diferenças podem ser causadas pelo local de amostragem (granja ou frigorífico), delineamento de amostragem (volume e número de coletas), procedimentos de diagnóstico (pools e método de cultivo) e pode ocorrer ainda que a presença de bactérias interferentes nas amostras mascarem a presença de *Salmonella* sp. (Fierens & Huyghebaert, 1996).

2.4.2. Fases do isolamento

Segundo Oliveira (2000) a técnica microbiológica convencional pode incluir um passo de pré-enriquecimento ou começar diretamente no enriquecimento seletivo. O pré-enriquecimento visa a recuperação de salmonelas lesionadas e o enriquecimento seletivo visa a inibição de microrganismos que competem com a *Salmonella* sp.

De acordo com Silva (1999), fezes, sangue ou outros materiais podem ser semeados em muitos meios de cultura seletivos (ágar X.L.D., agar S.S., agar verde brilhante, entre outros), bem como em diferentes caldos de enriquecimento como o selenito-cistina, tetracionato, etc. Qualquer crescimento nos meios de enriquecimento deve ser subseqüentemente subcultivado em placas com meio sólido. As reações bioquímicas dos microrganismos suspeitos são então determinadas e, após, deve-se fazer a confirmação pela análise dos antígenos O e Vi usando anti-soros específicos polivalentes.

2.4.2.1. Etapa de pré-enriquecimento não seletivo

Na análise de fezes, quando esta etapa é utilizada, normalmente o pré-enriquecimento em meio não seletivo (primeira etapa) é feito em Água Peptonada Tamponada. Nesta etapa amostras de 25g são incubadas a 37°C (Bager & Petersen, 1991; Cherrington & In't Velt, 1993). Alguns autores não fazem o pré-enriquecimento (Calderon & Furlanetto, 1991), no entanto utilizam uma quantidade menor de amostra (10g), a qual é colocada diretamente no enriquecimento seletivo (segunda etapa), sempre mantendo a relação de volume indicada para o caldo em questão, 1:10 ou 1:100.

Esta etapa inicial é utilizada para permitir que as células bacterianas, quando lesadas, possam recuperar-se e multiplicar. O que eleva, desta forma, o número de *Salmonella* sp. que serão inoculadas nos meios de enriquecimento seletivo. Conseqüentemente, a probabilidade de que *Salmonella* sp. permaneçam viáveis após esta segunda etapa será maior (Nielsen & Baggesen, 1997). Em alimentos, que não sofreram tratamento térmico, considera-se que as células de *Salmonella* sp. não se apresentam lesadas e, desta forma, não seria necessário o uso de pré-enriquecimento (Fagerberg & Avens, 1976). Ao contrário, o pré-enriquecimento das amostras de fezes pode permitir uma melhor detecção de *Salmonella* sp., a exemplo do que ocorre com outros materiais como amostras ambientais e de ração, nos quais as células bacterianas podem estar lesadas devido à falta de umidade e efeito potencial de desinfetantes (Nielsen & Baggesen, 1997; Kim *et al*, 1999).

O tempo de incubação desta etapa, na maioria dos métodos, fica em torno de 20-24 h, mas são citados também períodos menores, de 16 h (Bager & Petersen, 1991).

2.4.2.2. Etapa de enriquecimento seletivo

Esta etapa permite o crescimento preferencial de *Salmonella* sp. e tem sua eficiência afetada pelo meio utilizado, o volume do inóculo proveniente do pré-enriquecimento, o tempo e a temperatura de incubação (Fagerberg & Avens, 1976; Bager & Petersen, 1991;

Calderon & Furlanetto, 1991), bem como pela matéria orgânica e microbiota presentes (Sharma & Parker, 1969; June *et al*, 1995).

Os meios de enriquecimento seletivo inibem o crescimento de outras bactérias que não *Salmonella* sp., geralmente através de compostos tóxicos, do pH e da pressão osmótica. Tais fatores podem estar presentes de forma isolada ou combinada nos meios (Bager & Petersen, 1991).

O meio ideal, portanto, não deve ser inibitório à *Salmonella* sp., permitindo que esta se multiplique até níveis detectáveis, e ser suficientemente seletivo para evitar um grande crescimento da microbiota competitiva (Beckers *et al.*, 1987), que no meio sólido pode dificultar o isolamento do patógeno.

A microbiota competitiva, principalmente algumas espécies da família Enterobacteriaceae, constituem-se em um grande problema tanto para o isolamento como na identificação de *Salmonella* sp. Portanto, o uso de uma etapa de enriquecimento seletivo demonstra-se indispensável, até mesmo para os mais modernos sistemas de detecção de *Salmonella* sp. (Arroyo & Arroyo, 1995). Alguns dos meios mais utilizados têm sido o caldo Selenito, o caldo Tetrionato, e o caldo Rappaport-Vassiliadis (Bager & Petersen, 1991).

Bello-Pérez (1993) enfatiza a importância dos meios de enriquecimento seletivo e, da mesma forma como Vassiliadis *et al.*(1987) e Bager & Petersen (1991), recomendam o uso de pelo menos dois tipos de meios para enriquecimento seletivo, pois de acordo com seu estudo, os caldos não recuperam com igualdade os sorotipos de *Salmonella* sp.

2.4.2.3 Etapa de semeadura em meio sólido seletivo

A eficiência da etapa de enriquecimento seletivo permite uma melhor recuperação (com diminuição de falso-negativo e falso-positivo) de *Salmonella* sp. nos meios sólidos seletivos. A semeadura de alíquotas dos caldos de enriquecimento seletivo, em meios sólidos, constitui a terceira etapa do isolamento destas bactérias. Quanto maior for a seletividade obtida na etapa de enriquecimento seletivo, menor será o crescimento de microrganismos

competidores no ágar, e melhor serão as condições para o isolamento de *Salmonella* sp. (Sherrod *et al.*, 1995).

Segundo Tate *et al.* (1990) o crescimento em número elevado destes competidores no ágar pode mascarar as *Salmonella* sp., quando estas não estiverem presentes em número de colônias elevado. O ágar, desta forma, deve apresentar um nível de seletividade que diminua o crescimento destas bactérias competidoras, as quais não foram inibidas na etapa anterior (Sherrod *et al.*, 1995), exercendo o mínimo possível de inibição sobre a *Salmonella* sp. (Fagerberg & Avens, 1976).

O ágar, além de ser seletivo, deve ainda conter um sistema confiável que permita a diferenciação das colônias de *Salmonella* sp. das outras bactérias (Rappold & Bolderdijk, 1979).

Miller *et al.* (1991) sugerem o uso de mais de um meio seletivo, pois alguns sorotipos de *Salmonella* sp. podem ser sensíveis ao inibidor presente em determinado meio. O uso de um meio adicional poderia permitir o isolamento do sorotipo que não foi detectado através de outro meio. Esta associação diminuiria, assim, os falsos-negativos.

Os meios seletivos consistem geralmente de um meio nutricional básico adicionado de corantes, antibióticos, sais biliares e/ou outros inibidores químicos do crescimento de microrganismos indesejáveis, e um sistema indicador que, através da coloração das colônias, indique quais possivelmente sejam *Salmonella* sp. (Fagerberg & Avens, 1976). Em sua maioria, a diferenciação das colônias de *Salmonella* sp. das acompanhantes ocorre pela produção de ácido sulfídrico, ou utilização de açúcares como lactose (Sherrod *et al.*, 1995; Fagerberg & Avens, 1976).

De acordo com Busse (1995) os meios sólidos seletivos podem ser classificados de acordo com o agente seletivo utilizado em meios contendo sais biliares (ágar Citrato Desioxicolato, *Salmonella-Shiguella*, Hektoen Entérico, Xilose Lisina Desoxicolato, Rambach), verde brilhante (ágar verde brilhante, verde brilhante Manitol Lisina Cristal Violeta) e bismuto sulfito (ágar Bismuto Sulfito). Atualmente novos meios têm sido formulados, através da adição de substratos cromogênicos, com o objetivo de permitir um melhor isolamento de *Salmonella*

sp. e um sistema indicador mais eficiente (Cooke *et al.*, 1999). O ágar Verde Brilhante é normalmente utilizado em laboratórios de diagnóstico veterinário (Nielsen & Baggesen, 1997).

O sistema indicador destes meios, como o Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose sacarose (VB), utiliza a capacidade dos microrganismos degradarem ou não a lactose e sacarose. A degradação do açúcar resulta na acidificação do meio, sendo visualizada através da viragem do indicador vermelho de fenol para amarelo. Microrganismos que não utilizam tais açúcares irão alcalinizar o meio através dos produtos finais do metabolismo das peptonas, com o desenvolvimento de uma coloração vermelho intensa. Como *Salmonella* sp. não fermentam tais açúcares, suas colônias terão uma coloração rosa forte, com um halo vermelho intenso no ágar, apresentando-se ainda como colônias translúcidas (Fagerberg & Avens, 1976).

Miller *et al.* (1991) propõem a utilização de um meio no qual à base ágar Xilose Lisina foi acrescentado um agente surfactante, o Tergitol 4. Este meio, denominado Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4), inibe o crescimento de competidores como *Proteus* sp. , *Pseudomonas* sp. , e *Providencia* sp. , o que permite um melhor isolamento de *Salmonella* sp. , diminuindo assim os falsos-negativos.

Detecta-se *Salmonella* sp. neste meio pela produção de ácido sulfídrico (H₂S) formado pela degradação do tiosulfato de sódio que reage com íons férricos presentes no meio, formando um precipitado preto nas colônias, o sulfeto ferroso (Ribeiro e Soares, 1993). Além disso, a base do meio ainda contém lisina, a qual a *Salmonella* sp. é capaz de degradar até cadaverina, provocando a elevação do pH do meio, visualizada pelo halo violeta produzido pela viragem do indicador de vermelho de fenol.

Rambach (1990) desenvolveu um meio, ágar Rambach (RA), que permite a identificação de colônias de *Salmonella* sp. através de outra característica fenotípica: a formação de ácido a partir de propilenoglicol. Colônias positivas desenvolveriam uma coloração rosa avermelhada. Outros microrganismos, principalmente os entéricos, seriam diferenciados através do substrato cromogênico que permite a detecção da produção da enzima β-D-galactosidase, resultando em colônias azuis. No entanto, algumas *Salmonella* sp. podem não degradar o propilenoglicol, não produzindo a coloração vermelha característica (Gruenewald *et al.*, 1991)

Dusch & Altwegg (1995) encontraram melhores resultados com a utilização do ágar XLT4, em relação ao ágar RA. O XLT4 além de ter apresentado maior sensibilidade, foi mais específico, sendo indicado por estes autores para recuperação de *Salmonella* sp. não tifóides a partir de fezes. Em estudo realizado por Michael (2000), a metodologia mais eficiente para o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes de suínos foi o isolamento em ágar XLT4 e VB.

2.4.2.4. Confirmação

As colônias supostamente classificadas como *Salmonella* sp. (típicas ou atípicas), encontradas nos meios sólidos, são submetidas à uma triagem bioquímica (quarta etapa). Testes como ágar Ferro Lisina (LIA) e ágar Ferro Trílice Açúcar (TSI) são utilizados como triagem inicial, a partir dos quais faz-se então uma série de provas bioquímicas adicionais, entre estas: citrato, fermentação de dulcitol, lactose e sacarose, crescimento em KCN, malonato, vermelho de metila, Voges-Proskauer, SIM, urease (Helrich, 1990), ou ainda fenilalanina desaminase, β -galactosidase (ONPG), fermentação de adonitol, rafinose e salicina (Kelly *et al.*, 1985). Se estes ainda forem indicativos para *Salmonella* sp., então é realizado a confirmação (quinta etapa), através da sorologia (Silva, 1977), necessária para complementar os resultados obtidos pelos testes bioquímicos, pois tanto estes como o teste sorológico não são específicos para *Salmonella* sp. (Banwart, 1989).

A sorologia realizada através da técnica de aglutinação utiliza soros polivalentes que provocam a reação de aglutinação pela presença de anticorpos contra antígenos O, por exemplo, soro polivalente somático.

Após estas cinco etapas que constituem os princípios básicos dos métodos de cultura convencionais, obtem-se então o diagnóstico final (Nielsen & Baggesen, 1997). No entanto, a realização da sorotipagem confere ao resultado um maior valor epidemiológico. Desta forma, através do esquema Kauffmann-White a *Salmonella* sp. é classificada de acordo com a presença dos antígenos somáticos, capsulares e flagelares (Campos, 1999).

Este esquema é o mais adotado em microbiologia de alimentos e classifica as linhagens, dividindo o gênero em tipos sorológicos baseado nos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (Clarke & Gyles, 1993; Franco & Landgraf, 1996). Os antígenos O, associados com a parede celular e de constituição polissacarídica, caracterizam os sorogrupos de *Salmonella* e são designados por números arábicos (Ekperigin & Nagaraja, 1998). Os antígenos flagelares, associados aos flagelos peritríquios, podem ocorrer em duas fases, denominadas 1 e 2 (Campos, 1999). A fase 1 é indicada por letras minúsculas de “a” a “z”, aparecendo esta última letra, algumas vezes, associadas a expoentes numéricos, por serem os antígenos flagelares mais numerosos que as letras do alfabeto. A fase 2 é designada por numerais arábicos (1-12) (Campos, 1999; Old & Threlfall, 1998). O antígeno Vi é encontrado apenas em três sorotipos: *S. typhi*, *S. paratyphi C* e *S. dublin* (Campos, 1999).

Tomando como exemplo o sorotipo Typhimurium a classificação atual apresenta a seguinte nomenclatura: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium, mas formas simplificadas para representação têm sido usadas como *Salmonella typhimurium* (Salyers & Whitt, 1994), ou ainda *Salmonella* sorotipo Typhimurium (Clarke & Gyles, 1993), e *Salmonella* Typhimurium (Campos, 1999).

2.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Stone *et al.* (1994) relataram que o diagnóstico de infecções por *Salmonella* sp. é baseado primariamente no método tradicional de cultivo e identificação deste microrganismo

que, além de trabalhoso, pode demorar até sete dias. Além disso, poucas células de *Salmonella* sp. não são detectáveis em certas amostras clínicas. A utilização de técnicas de biologia molecular, como a PCR, diminui o tempo necessário para detecção e identificação de vários dias para poucas horas (Rahn *et al.*, 1992; Cohen *et al.*, 1993).

Bennet *et al.* (1998) relataram a dificuldade de detectar salmonelas que são consideradas atípicas, pois produzem colônias que não apresentam características de *Salmonella* sp. e, podem ser descartadas pela metodologia convencional. Acredita-se que tais isolados atípicos não ocorram freqüentemente, porém isto pode denotar a incapacidade de detectá-los. Além de características morfológicas incomuns, as salmonelas podem apresentar variações quanto à utilização de substratos bioquímicos, podendo induzir a resultados falso-negativos. Como a PCR independe de variações fenotípicas, não é vulnerável a tais reações atípicas, evitando os resultados falso-negativos fornecidos pela técnica microbiológica convencional (Hoorfar *et al.*, 1999).

Segundo trabalho realizado por Hoorfar *et al.* (1999), isolados que não puderam ser confirmados como *Salmonella* sp. pela sorologia, por se apresentarem rugosos, foram detectados pela PCR realizada com iniciadores específicos para este gênero, além de serem identificados, em nível de sorogrupo, pela PCR específica para os mesmos. Alguns isolados, identificados bioquimicamente como *Salmonella* sp. podem perder os antígenos O, sendo chamados de rugosos, o que impossibilita a identificação final da *Salmonella* sp., pela caracterização antigênica, porém a PCR não depende da expressão desses antígenos, podendo fornecer resultados definitivos. Além disso, a caracterização antigênica das salmonelas pode ser dificultada por reações sorológicas cruzadas com outras enterobactérias, tais como *Proteus* sp., *Morganella* sp. e *Citrobacter freundii* (Arroyo & Arroyo, 1995), o que não ocorreu quando estas bactérias foram testadas pela PCR (Rahn *et al.*, 1992).

A Organização Mundial da Saúde (1998) *apud* Stone *et al.* (1994), afirma que muitos fatores podem interferir no isolamento de sorovares de *Salmonella* sp. oriundos de amostras clínicas, como a competição com outros microrganismos, a administração de antibióticos, que pode retardar o

crescimento da *Salmonella* sp., e a eliminação de salmonelas de maneira intermitente e em baixo número, particularmente no caso dos portadores.

A expectativa das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos “in vitro” é a substituição do processo biológico de multiplicação pela amplificação enzimática de seqüências específicas de ácidos nucleicos. A técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) possui uma significativa vantagem sobre o cultivo “in vitro”: as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos não são limitadas pela capacidade do organismo crescer em cultura e a caracterização do amplicon pode prover importantes informações epidemiológicas e evolutivas.

A utilidade da detecção de microrganismos através da PCR em amostras de alimentos, clínicas e ambientais é limitada, em parte, pela presença de substâncias que inibem a PCR ou reduzem a eficiência de amplificação. Os inibidores da PCR podem agir através de um ou mais dos seguintes mecanismos: interferência no passo de lise da célula, degradação ou captura dos ácidos nucleicos e inativação da DNA polimerase termoestável (Al-Soud & Rådström, 1998).

Os mesmos autores citaram várias substâncias que têm sido descritas como inibidoras da PCR, tais como: sais biliares nas fezes, grupo heme no sangue, substâncias húmicas no solo, proteinases no leite e uréia na urina. Diferentes técnicas têm sido empregadas para reduzir o efeito dos inibidores da PCR e/ou para separar microrganismos dos inibidores da PCR. Por exemplo, calor, centrifugação por gradiente de densidade, diluição, métodos de extração de DNA, enriquecimento, filtração e técnicas

imunológicas têm sido usadas para facilitar a PCR. A DNA polimerase termoestável é, talvez, o alvo mais importante dos inibidores da PCR. A polimerase mais usada na PCR para detecção de microrganismos é a *Taq* DNA polimerase. A polimerase pode ser degradada por proteinases, pelo fenol e por detergentes, ou, inibida pelo bloqueio do seu sítio ativo.

Rossen *et al.* (1992) também demonstraram a existência da inibição da PCR pela proteína e gordura dos alimentos, componentes dos meios de cultivo e vários reagentes utilizados na extração do DNA (detergentes, lisozima, hidróxido de sódio, álcoois, EGTA e EDTA). Contudo, concluíram que somente uma fração de uma amostra ou solução de extração é transferida para a PCR, o que significa que muito poucas substâncias chegam a concentrações que possam, realmente, inibir a reação. Em alguns casos, é possível fazer a PCR diretamente da amostra, sem nenhum procedimento de extração, ou pode ser precedida por um curto período de aquecimento. Entretanto, procedimentos de extração têm sido apresentados para melhorar o desempenho da PCR a partir de vários tipos de amostras.

Stone *et al.* (1994) demonstraram que um enriquecimento anterior à execução da técnica de PCR não só diluiu os inibidores como aumentou o número de microrganismos. Esta combinação requer pouca manipulação da amostra e ainda é aplicável à maioria dos laboratórios de detecção rápida de sorovares de *Salmonella* sp.

Teoricamente, a PCR pode detectar uma única cópia de DNA, o que faz com que a sensibilidade do método seja limitada pela capacidade de recuperação das seqüências alvo (Nguyen *et al.*, 1994). Assim, métodos

apropriados de extração de DNA, combinando centrifugações e filtragens podem permitir que a PCR reconheça um determinado microrganismo, mesmo que este esteja em pequeno número.

O enriquecimento não seletivo e/ou seletivo das amostras, combinado com a PCR, tem sido aplicado para detecção de muitas bactérias em uma grande variedade de alimentos (Candrian, 1995), com o objetivo de diluir os inibidores e aumentar a sensibilidade (Fluit *et al.*, 1993).

Segundo Galán *et al.* (1992), o *invA* é um gene de *Salmonella* sp. que codifica uma proteína de invasão celular, sendo o primeiro gene de um operon contendo três ou, possivelmente, mais genes presentes e funcionais na maioria, senão em todos os sorovares de *Salmonella* sp.

Conforme o estudo de Rahn *et al.* (1992), usando um par de iniciadores homólogos ao gene *invA*, a PCR amplificou o DNA de 626 das 630 culturas de *Salmonella* sp. testadas, com uma sensibilidade de 99,4%. No mesmo trabalho, para avaliar especificidade, foram testados os DNAs de 142 culturas de outros 21 gêneros bacterianos, onde nenhum foi amplificado especificamente. Os mesmos autores afirmaram que a PCR é uma técnica efetiva, rápida e sensível para detecção do gene *invA* de *Salmonella* sp.

Recentemente, um projeto de validação e padronização da PCR para detecção de *Salmonella* sp. avaliou quatro pares de iniciadores específicos para este gênero. O par de iniciadores 139-141, que amplifica um segmento de 284 pb do gene *invA*, descrito por Rahn *et al.* (1992), foi considerado o mais seletivo, sendo proposto como padrão internacional para detecção de *Salmonella* sp. (Malorny *et al.*, 2003).

2.4.4. Pesquisa de anticorpos

O elemento chave de um programa de controle é uma rápida e correta identificação de rebanhos com alta soroprevalência (Alban *et al.*, 2002). Assim, se o objetivo for identificar todos rebanhos que foram expostos à *Salmonella* sp., a sorologia pode ser aplicada ao invés de análise de amostras fecais (Sandberg *et al.*, 2002).

Segundo Kich (2004) países como a Dinamarca vem desenvolvendo programas intensivos de controle de *Salmonella* sp., baseados em monitoramentos sorológico de lotes terminados e classificação de granjas de acordo com o nível de infecção. A implementação destes programas exige métodos rápidos e baratos para determinação do padrão de infecção nos rebanhos. Em estudos realizados no Brasil, concluiu-se que o ELISA indireto utilizando antígeno somático do sorovar Typhimurium, que possui antígenos comuns aos sorovares prevalentes na Região Sul do Brasil (Bessa *et al.*, 2001) apresenta-se como uma ferramenta adequada para a determinação da severidade da infecção e identificação dos fatores de risco associados

Em estudo realizado por Loguercio *et al.* (2002) o teste de ELISA apresentou uma correlação de resultados muito grande em relação à metodologia convencional de detecção e isolamento de *Salmonella* sp. em alimentos, com a vantagem de ser mais rápido e de alta sensibilidade, diminuindo o tempo do resultado de quatro para dois dias. Além disso, em outro estudo conduzido por Davies, *et al.* (2003), chegou-se à conclusão que um “pool de soros” ou amostras de suco de carne podem ser usadas como um substituto mais barato do que a monitoração sorológica de granjas para *Salmonella* sp.

O período de soroconversão, para atingir níveis de anticorpos detectáveis após a infecção, é de mais ou menos duas semanas (Van Der Wolf *et al.*, 2001; Van Der Gaag *et al.*, 2003).

Esta característica impede que o teste possa ser utilizado para determinar a prevalência em um curto espaço de tempo (Hurd *et al.*, 2002), pois nem sempre representaria o status atual do rebanho (Swanenburg *et al.*, 2001).

Além disso, o ELISA não pode ser utilizado como teste individual, uma vez que nem todos os suínos soroconvertem após inoculação ou enquanto excretam *Salmonella* sp. nas fezes. Isto foi demonstrado em estudo no qual a soroconversão iniciou no sétimo dia pós-inoculação.

No 22º dia pós-infecção, 86% dos suínos eram sorologicamente positivos enquanto 3% dos animais não soroconverteram (Nielsen *et al.*, 1995). Em outro trabalho, observou-se que os animais passaram a apresentar sorologia positiva 14 dias após inoculação, mas não reagiram homoganeamente frente a dois testes de ELISA (Van Winsen *et al.*, 2001).

Porém, observa-se que, diferentemente da excreção intermitente de *Salmonella* sp. nas fezes, níveis de anticorpos no soro não flutuam diariamente (Galland *et al.*, 2000), de forma que a prolongada resposta do ELISA tem potencial de detectar animais carreadores (Nielsen *et al.*, 1995).

Mas, também pode ocorrer que, uma vez recuperado, o animal possa permanecer portador e tornar-se sorologicamente negativo (Van Der Gaag *et al.*, 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Foi conduzido um estudo longitudinal, entre outubro de 2003 e fevereiro de 2004, que acompanhou três lotes de suínos em fase de terminação, alojados em duas propriedades localizadas no município de São Sebastião do Caí e uma em Feliz, sendo que cada granja tinha capacidade para alojar 300 animais, em média. Foram coletadas amostras dos animais aleatoriamente, sendo sempre de 25 animais por granja. Todas as granjas adotavam um manejo de vazio sanitário (“all in/all out”) e forneciam aos animais ração recebida da empresa integradora. Os lotes foram monitorados quanto ao seu status em relação à infecção por *Salmonella* sp. no início da terminação e ao abate. Da mesma forma, foi monitorado o status de contaminação do ambiente da granja, antes do alojamento dos animais, e dos lotes de ração fornecidos aos animais durante todo o período de terminação.

Paralelamente, foi comparada a detecção de *Salmonella* sp. em amostras de ração através da técnica de isolamento e pela reação em cadeia da polimerase. Para tanto, as mesmas amostras de ração foram submetidas às duas técnicas, sendo portanto, amostras não-independentes.

3.2. Coleta de amostras dos silos e do ambiente

Foram realizadas amostragens dos silos e das baias dos animais, após a desinfecção da granja e dez dias antes do alojamento dos animais. Para amostragem dos silos, que estavam vazios, foram coletados vários suabes, em área aproximada de 100 cm² da

superfície interna dos mesmos, que foram colocados num mesmo saco plástico, dando origem a um “pool” de amostras por granja. Para amostragem do ambiente, coletaram-se +/- 6 suabes por baía de 5 baias, estes 6 suabes também foram processados em “pools”. Cada 6 suabes correspondiam a um “pool” As amostras, foram identificadas e conservadas sob refrigeração até a chegada ao laboratório.

3.3. Coleta de amostras dos animais no início da terminação

A coleta foi realizada em outubro de 2003, no dia em que os animais foram alojados, sendo amostradas fezes e sangue de 25 animais por granja. O número de animais amostrados foi determinado, considerando-se uma população de 300 animais, um intervalo de confiança de 90%, uma prevalência esperada de 30% e um erro relativo de 50% (Toma *et al.*, 1986). No caso das fezes, foram coletadas no mínimo 100 gramas de cada animal para o processamento microbiológico. Coletaram-se fezes de 5 animais em 5 baias distintas que, posteriormente, foram processadas em forma de “pool” de fezes de 5 animais. Assim, de cada propriedade foram obtidas 5 “pools” de fezes, totalizando 15 amostras. As fezes colhidas foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório.

O sangue foi coletado também de 25 animais por granja, porém foram processados separadamente, totalizando 75 amostras. As amostras de sangue foram coletadas da jugular dos animais com seringas de 10 mL, identificadas e mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório. Essas amostras foram centrifugadas a 600 x g por 10 minutos e o soro congelado para posterior análise sorológica.

3.4. Coleta de amostras de ração

Durante o período de terminação, entre novembro de 2003 e janeiro de 2004, as granjas incluídas no estudo receberam cerca de 15 lotes de ração, sendo todas amostras coletadas pelo proprietário da granja em sacos plásticos. Para tanto, a ração, ao ser

descarregada no silo, tinha várias porções coletadas na tentativa de abranger diferentes frações do total do lote mas, resultando em apenas um saco contendo ração. As amostras, acondicionadas em sacos plásticos, foram identificadas de acordo com a data de recebimento na propriedade e lote de produção. Cada saco plástico continha 200 gramas de ração e de cada saco foram retiradas, no momento do processamento, três alíquotas de 25 gramas para aumentar as chances de isolamento de *Salmonella* sp. nas amostras. Foram processadas um total de 144 alíquotas de ração.

3.5. Coleta de amostras dos animais no frigorífico

As amostras foram coletadas no frigorífico vinculado ao sistema de integração das granjas em fevereiro de 2004. Os três lotes foram abatidos no mesmo dia, sendo que os animais a serem coletados foram escolhidos de forma aleatória em cada lote. As amostras de sangue foram coletadas no momento da sangria, em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL, sendo identificadas e mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório, onde foram centrifugadas a 600 x g por 10 minutos e o soro congelado para posterior análise sorológica. Posteriormente, na linha de processamento, amostras de conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos individuais, identificadas e mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório.

3.6. Contaminação artificial de amostras de ração

Paralelamente, para que se pudesse ter um maior número de amostras para a comparação das técnicas de detecção de *Salmonella* sp. (o isolamento microbiológico convencional e a Reação em Cadeia da Polimerase) foram feitas contaminações artificiais em amostras de rações provenientes das três granjas estudadas. Para tanto, foram realizadas as contaminações de duas amostras (25 gramas) provenientes de cada uma das três granjas, com três concentrações diferentes de *Salmonella* sp., sendo elas 6.000 UFC, 600 UFC e 60 UFC. No total obtivemos 18 amostras contaminadas artificialmente.

3.7. Técnicas utilizadas para o isolamento de *Salmonella* sp.

As amostras coletadas do ambiente, “pool” de fezes, linfonodos mesentéricos, conteúdo intestinal e ração foram submetidas ao protocolo de isolamento descrito por Michael *et al.* (2003). A metodologia adotada compreende as etapas descritas a seguir.

3.7.1. Pré-enriquecimento das amostras

Alíquotas de 25 gramas do material a ser analisado, bem como os suabes de arrasto, foram inoculados em 225 mL de água peptonada à 1% tamponada e incubados em estufa durante 18-24 horas a uma temperatura de 37 °C.

3.7.2 Enriquecimento seletivo

Alíquotas de 100 microlitros do pré-enriquecimento foram inoculados em Caldo Rappaport-Vassiliadis (MERCK) e incubado em banho-maria a 42 °C durante 24 horas. Paralelamente, alíquotas de 1 mL foram inoculadas em Caldo Tetrionato de Müller-Kauffmann (MERCK), igualmente incubadas em banho-maria a 42 °C durante 24 horas.

3.7.3. Isolamento em meio sólido

Com o auxílio de uma alça de platina, alíquotas de cada um dos caldos de enriquecimento foram semeados nos meios Ágar Verde Brilhante-Lactose-Sacarose (BPLS) com Novobiocina 4% (MERCK) e Ágar Xilose-Lisina-Tergitol 4 (XLT4 , MERCK). As placas foram incubadas em estufa, a 37°C durante 24-48 horas.

3.7.4. Identificação das colônias

Colônias suspeitas nos meios seletivos foram isoladas em Ágar Tripton Soja (TSA) e, após a obtenção de culturas puras, foram submetidas a provas de triagem. Todas as amostras bacterianas que apresentavam perfil semelhante ao de *Salmonella* sp., nos meios de triagem, foram submetidas a outras provas bioquímicas fundamentais para caracterização. Os meios foram preparados conforme instruções do fabricante e interpretados conforme Mac Faddin (1980).

3.7.5. Provas de triagem

Foram utilizados o Ágar Três Açúcares-Ferro (TSI) e o Ágar Lisina-Ferro (LIA) para a identificação inicial das colônias suspeitas.

a) TSI (Merck)

Determina a capacidade de um microrganismo fermentar glicose, sacarose e lactose incorporado no meio, manifestado pela troca de cor do indicador vermelho de fenol (laranja avermelhado) para amarelo (acidificação). Com ou sem produção de gás (CO_2 , H_2) e com determinação de possível produção de H_2S (precipitado preto), devido a presença de citrato tínico de amônia férrico e tiosulfato de sódio que são indicadores de H_2S (ácido sulfídrico). A inoculação é feita com uma agulha de platina introduzindo a mesma na base do ágar e fazendo estrias na superfície inclinada. Após incubação a 37°C por 18-24 horas, o resultado característico para a maioria das *Salmonella* sp. é a superfície do ágar vermelha (alcalina) por não fermentar lactose nem sacarose, a base ácida (amarela) por fermentar glicose e enegrecimento do meio pela produção de H_2S . Pode ocorrer, ainda, a produção de gás demonstrado pela presença de bolhas ou rachaduras no meio.

b) LIA (Biobrás)

Este teste é baseado na descarboxilação da lisina, produção de ácido sulfídrico (H₂S) e fermentação da glicose. A descarboxilação da lisina, pela enzima lisina descarboxilase, é observada pela coloração púrpura-azulada devido a alcalinização do meio de cultura. A produção de H₂S é verificada pelo enegrecimento do meio e a fermentação da glicose pode ser observada pela cor amarela devido a acidificação do meio. A inoculação e incubação é feita da mesma forma que no teste TSI. O resultado positivo para *Salmonella* sp. sp é apresentado pela coloração púrpura tanto na base como no bisel podendo haver produção de H₂S pela coloração escura na base.

3.7.4.2. Provas bioquímicas confirmatórias

a) Citrato

Este teste determina a capacidade de um microrganismo utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono para o metabolismo resultando em alcalinização do meio. O meio é semeado com o auxílio de alça de platina, fazendo uma estria central sobre a superfície e incubado a 37°C por até 4 dias. Somente os microrganismos que utilizam o citrato como única fonte de carbono crescem neste meio, alterando dessa forma a cor do meio de verde para azul, devido o indicador azul de bromotimol. As amostras de *Salmonella* sp. podem apresentar tanto resultado positivo quanto negativo.

b) Fenilalanina desaminase

Esta prova verifica a capacidade de um microrganismo desaminar a fenilalanina a ácido fenilpirúvico pela atividade da enzima fenilalanina desaminase. A semeadura no meio é feito com o auxílio de alça de platina fazendo estrias na superfície e é incubada a 37°C por 18-24 horas. Após a incubação adicionam-se 4 a 5 gotas de cloreto férrico (FeCl₃) a 10% diretamente sobre a superfície do ágar. A presença do ácido fenilpirúvico é determinado pela

reação com o cloreto férrico resultando na coloração verde. A *Salmonella* sp. não possui a enzima, sendo portanto, negativa nesta prova.

c) ONPG

Este teste demonstra a presença ou ausência da enzima β -galactosidase utilizando o composto orgânico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) no meio. Este meio é semeado com alça de platina e incubado a 37°C por 4-24 horas. Microrganismos que possuem essa enzima alteram a coloração do caldo de amarelo claro para amarelo ouro. As amostras de *Salmonella* sp. são negativas para este teste.

d) SIM

Este meio é utilizado para detectar a produção de H₂S, produção de indol e observar a motilidade bacteriana. A inoculação deste meio é feita com o auxílio de agulha de platina, em profundidade, não ultrapassando $\frac{3}{4}$ do meio, seguido de incubação a 37°C por 24 horas. A produção de H₂S é baseada na utilização metabólica de tiosulfato ou aminoácidos sulfurados levando à liberação de ácido sulfídrico, sendo detectado no meio pela coloração escura. A produção de indol é verificada pela adição de 3 gotas do reativo de Ehrlich resultando em um anel róseo na superfície do meio devido a presença de indol. A *Salmonella* sp. é negativa para o teste do indol, positiva para H₂S e na sua maioria, móvel. A motilidade é observada pela turvação difusa do meio.

e) Urease

O teste baseia-se na habilidade de um organismo degradar a uréia através da enzima urease, com formação de duas moléculas de amônia. A inoculação da cultura é realizada com alça de platina e incubado a 37°C por 24 horas a 6 dias. Os microrganismos que

possuírem a enzima urease alteram a cor do meio de amarelo para rosa, sendo interpretado como resultado positivo. A *Salmonella* sp. apresenta resultado negativo.

3.7.4.3. Confirmação sorológica

Para confirmação definitiva de *Salmonella* sp. foi realizado a prova da aglutinação em lâmina com Soro *Salmonella* sp. Polivalente Somático (Probac). Nesta prova, a amostra bacteriana isolada em ágar TSA, foi misturada sobre uma lâmina com solução tampão fosfato salina (PBS), fazendo uma suspensão de volume inferior ao da gota de soro. Após, foi adicionada uma gota do soro polivalente sobre a suspensão e homogeneizada por 1 a 2 minutos. A presença de grumos na suspensão, num período de 2 minutos, representará resultado positivo para *Salmonella* sp.

3.7.5. Sorotipificação de amostras de *Salmonella* sp.

Todas as amostras de *Salmonella* sp. isoladas foram enviadas para sorotipificação na Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

3.8. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

As amostras de ração foram submetidas, paralelamente, ao protocolo de detecção de *Salmonella* sp. pela técnica PCR.

3.8.1. Iniciadores selecionados

Iniciadores já descritos foram selecionados e sintetizados por empresas especializadas (Bio Synthesis). Os iniciadores desenhados para amplificar especificamente

amostras do gênero *Salmonella* sp. delimitam um fragmento de 284 pb do gene *invA*, conforme Rahn *et al.* (1992).

3.8.2. Obtenção de amostras

Após a coleta de alíquotas para semeadura a partir do meio Rappaport-Vassiliadis, foi realizada a retirada de 1 mL deste meio para um tubo de reação com capacidade para 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados a 2000 x *g* por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado, ficando somente o sedimento. Após, 1 mL de TE (10 mM TrisHCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) foi adicionado ao sedimento e nova centrifugação foi realizada a 2000 x *g* por 10 minutos. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Por fim, o sedimento foi ressuspensão em 444 µL de TE e congelado para posterior extração de DNA.

3.8.3. Extração do DNA

O DNA das amostras de ração foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio, de acordo com Oliveira (2000).

As amostras, anteriormente ressuspensas em 444 µL de TE a partir do meio Rappaport-Vassiliadis, foram retiradas do congelador para retornarem a temperatura ambiente. Foram adicionados 30 µL de lisozima (50 mg/mL, Pharmacia Biotech), homogeneizou-se em um agitador de tubos e incubou-se por 30 minutos a 4°C. Após o período de incubação, foram acrescentados 25 µL de SDS (Sódio Duodecil Sulfato) a 10 %, ficando com uma concentração final de 0,5% e 1,25 µL de proteinase K (20 mg/mL, GibcoBRL), com uma concentração final de 50 µg/mL, homogeneizou-se e incubou-se a 55°C em banho-maria por 30 minutos. Os tubos foram retirados do banho-maria, homogeneizados e adicionados de um igual volume (500 µL) de fenol-clorofórmio (1:1), pH 8,0. Homogeneizou-se por 5 a 10 segundos em um agitador de tubos. Os tubos foram centrifugados a 16000 x *g* por 4 minutos a temperatura ambiente. Transferiu-se 450 µL da fase aquosa para um novo tubo, adicionou-se novamente um igual volume (450 µL) de fenol-clorofórmio, homogeneizou-se e centrifugou-se a 16000 *g* por 2

minutos a temperatura ambiente. Foram transferidos 400 μL da fase aquosa para um novo tubo, onde foi adicionado igual volume de clorofórmio (400 μL), homogeneizou-se e centrifugou-se a 16000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente. Em um novo tubo, adicionou-se 1/10 do volume (35 μL) de acetato de sódio 3M, pH 7,0 e 1 volume (350 μL) de isopropanol gelado, onde foram colocados 350 μL da fase aquosa e incubou-se por 30 minutos a -20°C . Decorrido este período, centrifugou-se por 10 minutos a 16000 g a 4°C . Desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de etanol a 80% gelado e centrifugou-se por 4 minutos a 16000 x g a temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o sedimento em 50 μL de TE e manteve-se a 4°C por 2 horas ou a -20°C até a execução da PCR.

3.8.4. Amplificação do DNA

Para a reação em Cadeia da Polimerase e eletroforese, foi seguido o protocolo usado por Allgayer (2003).

As amplificações foram realizadas em um volume final de 25 μL em um tubo de reação com capacidade para 200 μL . Este volume foi composto de 15,55 μL de água milliQ; 2,5 μL de um tampão concentrado 10 vezes (100mM de Tris HCl pH 8,3 e 50 mM de cloreto de potássio); 0,75 μL 50 mM de cloreto de magnésio; 2,0 μL do mix de dNTP com uma concentração de 2,5 mM de cada nucleotídeo; 1,0 μL (20 pmol) de cada iniciador (141 e 139); 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase 5 U/ μL , onde foram acrescentados 2 μL do DNA extraído conforme o item anterior. Foi utilizado um controle positivo, proveniente de uma cultura de *Salmonella* sp. e um controle negativo proveniente de uma cultura de *Escherichia coli*.

As amostras preparadas foram levadas a um termociclador modelo GeneAmp PCR System 2400 da AB Biosystems para que o DNA fosse amplificado através de uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida por 35 ciclos de desnaturação (94°C , 1 minuto), anelamento (54°C , 30 segundos) e extensão (72°C , 1 minuto), com uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

A 10 μ L da reação de PCR adicionou-se 2 μ L de tampão de amostra (solução de azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30 % na proporção de 1:1) e submeteu-se à eletroforese em gel de agarose a 1,2% com 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo em tampão TBE concentrado 0,5 vezes (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,0) (Sambrook *et al.*, 1989). A visualização foi feita sob lâmpada ultravioleta, comparando-se os produtos de amplificação com padrões de peso molecular com escala de 100 pb.

3.9. Técnica Utilizada para Pesquisa de Anticorpos nas Amostras de Soro

As amostras de soro coletadas dos animais foram enviadas ao Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves/EMBRAPA, onde foram testados utilizando um KIT de ELISA, contendo antígenos lipopolissacarídicos do sorovar Typhimurium, desenvolvido por Kich (2004).

3.10. Análise estatística

O número de animais positivos no teste de ELISA-LPS para *Salmonella* sp. no início da terminação e ao abate foram comparados pelo Teste Exato de Fisher, com nível de significância $P < 0,05$ (Instat, 1993).

Os resultados do isolamento e detecção por PCR foram comparados pelo teste de Mac Nemar com nível de significância $P < 0,05$ (Instat, 1993).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da contaminação residual nas granjas

Dos treze “pools” de suabes de piso coletados em três granjas de terminação de suínos, dois foram positivos (TABELA 1). Os “pools” positivos eram provenientes de duas granjas diferentes, indicando que as mesmas apresentavam contaminação residual pelo microrganismo.

TABELA 1: Amostras positivas para *Salmonella* sp. coletadas do piso de três granjas de terminação no Rio Grande do Sul, 2003.

Granjas	Amostras*	Amostras positivas
1	4	1
2	5	0
3	4	1
Total	13	2

* As amostras constituíam-se de “pools” de +/- 6 suabes .

4.2. Soroprevalência e isolamento de *Salmonella* sp. a partir de fezes dos animais no início da terminação

O status de chegada dos animais na terminação está apresentado na TABELA 2. Observa-se que, no início da terminação, os animais não estavam excretando *Salmonella* sp. nas fezes.

TABELA 2: Animais sorologicamente positivos e com isolamento de *Salmonella* sp. das fezes no início da fase de terminação em três granjas do Rio Grande do Sul, 2003.

Granja	Animais amostrados		Animais positivos			
			Sorologia		Isolamento	
			n	%	n	%
1	25	7	28	0	-	
2	25	0	0	0	-	
3	25	3	12	0	-	

Nas granjas 1 e 3, observa-se a presença de uma baixa percentagem de animais positivos no teste de ELISA-LPS. Entretanto, avaliando as leituras de densidade ótica obtidas nos animais positivos, verifica-se que em todos os casos da granja 1 e, em mais da metade dos animais da granja 3, as densidades óticas encontradas estão próximas ao ponto de corte do teste que foi de 0,169 (Apêndices 1-3).

4.3 Soroprevalência e isolamento de *Salmonella* sp. nos animais ao abate

Os resultados encontrados ao abate (TABELA 3) demonstram claramente que a amplificação da infecção dos lotes ocorreu durante a fase da terminação, permanecendo uma percentagem variável de animais positivos no isolamento de *Salmonella* sp. a partir de linfonodos e conteúdo intestinal ao abate.

TABELA 3: Animais sorologicamente positivos e com isolamento de *Salmonella* sp. ao abate, em três granjas do Rio Grande do Sul, 2003.

Granja	Amostras	Sorologia +		Isolamento positivo			
		n	%	C. Intestinal		Linfonodos	
				n	%	n	%
1	25	23	92	13	52	9	36
2	25	25	100	23	92	19	76
3	25	23	92	3	12	6	24
Total	75	71	-	39	-	34	-

Paralelamente, quase a totalidade dos animais amostrados ao abate foram positivos no teste ELISA-LPS para *Salmonella* Typhimurium (FIGURA 1). Na grande maioria das vezes, apresentando leituras de densidades óticas bastante acima do ponto de corte do teste (Apêndice 4).

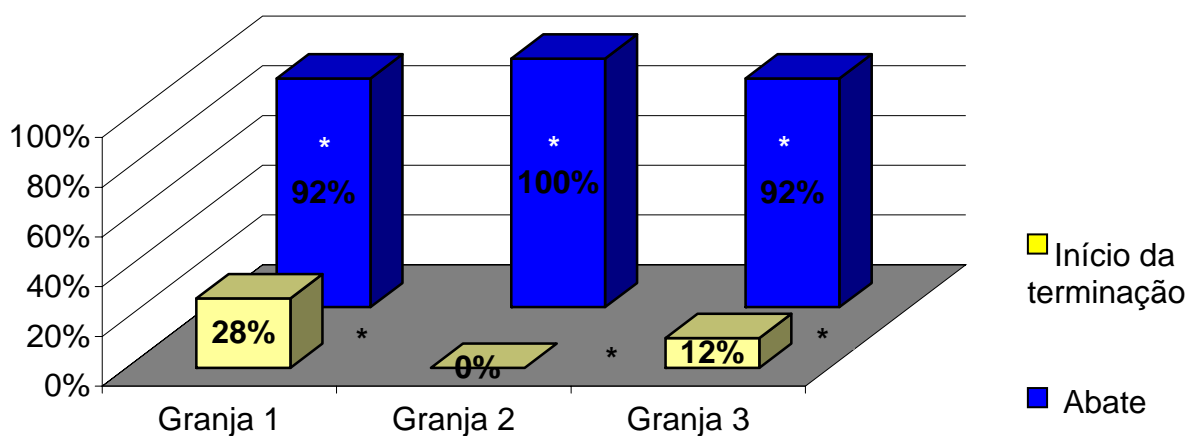


FIGURA 1: Percentagem de animais positivos no teste de ELISA-LPS para *Salmonella* sp. no início da terminação e ao abate.

* Diferença altamente significativa ($P < 0,0001$).

4.4. Sorotipificação dos isolados de *Salmonella* sp.

Os isolados provenientes do ambiente foram identificados como Derby (granja 1) e Tiphymurium (granja 3).

As 73 linhagens de *Salmonella* sp. isoladas ao abate, sendo 34 oriundas de linfonodos mesentéricos e 39 de conteúdo intestinal, foram classificadas em 7 sorovares diferentes (TABELA 4). O sorovar Bredeney foi o mais prevalente, representando um total de 64,3% do total de isolados.

TABELA 4: Resultado da sorotipificação de linhagens de *Salmonella* sp. isoladas de conteúdo intestinal (n=34) e de linfomodos mesentéricos (n=39).

Granja	Sorovar (CI)*	n	%	Sorovar (LM)*	n	%
1	Bredeney	7	53,8	Derby	4	44,4
1	Ohio	2	15,3	Enteritidis	2	22,2
1	Worthington	2	15,3	Panama	2	22,2
1	Derby	2	15,3	Bredeney	1	11,1
2	Bredeney	22	95,6	Bredeney	14	73,6
2	Derby	1	4,3	Derby	3	15,7
2	-	-	-	Senftenberg	1	5,2
2	-	-	-	Panama	1	5,2
3	Worthington	2	66,6	Bredeney	3	42,8
3	Derby	1	33,3	Ohio	2	28,5
3	-	-	-	Derby	1	14,2

* CI= conteúdo intestinal; LM= linfonodos mesentéricos.

4.5. Pesquisa de *Salmonella* sp. em amostras de ração fornecidas aos animais durante a fase de terminação

No presente estudo, todas as 144 alíquotas de ração pesquisadas foram negativas para *Salmonella* sp. no isolamento bacteriológico. Por outro lado, duas alíquotas, provenientes da granja 2, foram positivas na detecção de *Salmonella* sp. pela técnica da PCR (FIGURA 2).

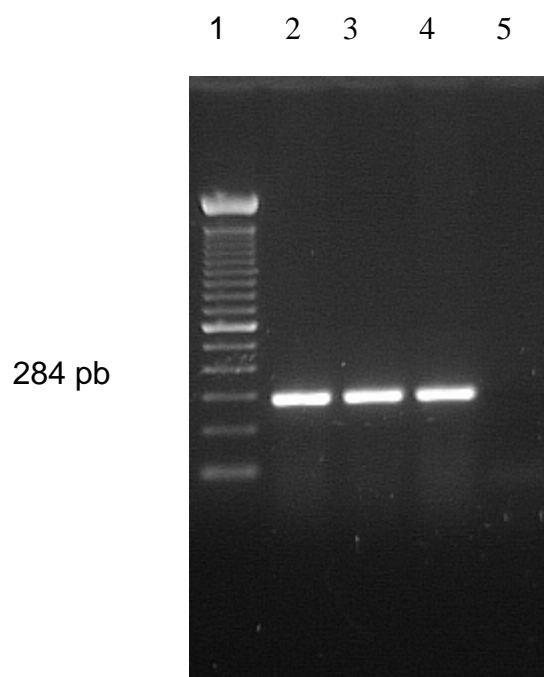


FIGURA 2: Gel de agarose a 1,2% mostrando o fragmento amplificado do gene *invA* de *Salmonella* sp. pela técnica de PCR. Coluna 1: marcador de peso molecular com escala de 100 pb. Coluna 2: controle positivo. Coluna 3 e 4: alíquotas de ração positivas. Coluna 5: controle negativo.

4.6. Contaminação artificial das amostras de ração

Das 18 alíquotas de ração contaminadas artificialmente, apenas uma foi negativa no isolamento. A alíquota negativa (25g) havia sido

contaminada com 60 UFC de *Salmonella* sp. Todas as amostras contaminadas artificialmente foram positivas na PCR, inclusive a amostra que havia sido negativa ao isolamento.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo fica evidente a importância da fase de terminação na infecção dos lotes por *Salmonella* sp., bem como na amplificação do problema, culminando com a chegada de elevado número de animais positivos ao abate. Esses resultados confirmam dados anteriores obtidos no mesmo sistema de produção por Silva (2004).

Estudos têm apontado a prevalência de *Salmonella* sp. em fêmeas suínas como sendo um fator de risco para introdução de *Salmonella* sp. em rebanhos de terminação (Kranker & Dahl, 2001). Ao lado disto, Funk *et al.* (2001) observaram em outro estudo que todos leitões positivos ao desmame eram oriundos de fêmeas positivas na gestação. Ainda, Davies *et al.* (1998) encontraram o mesmo sorovar de *Salmonella* sp. na creche e na maternidade, demonstrando a possível contaminação dos leitões antes do desmame. Por outro lado, outros autores afirmam que as fases anteriores à terminação não contribuem com mais de 10% de todas as infecções detectadas ao abate, sendo esta fase a mais crítica para a amplificação da infecção por *Salmonella* sp. (Berends *et al.*, 1996).

Esta aparente contradição entre os resultados encontrados na literatura reflete a variação do ciclo epidemiológico de infecção por *Salmonella*

sp. que pode ocorrer em diferentes sistemas de produção de suínos. Dessa forma, evidencia-se que o primeiro passo para o controle do problema no rebanho é a identificação da fase crítica para a infecção.

Essa identificação pode ser alcançada, utilizando ferramentas confiáveis, em momentos estratégicos, que indiquem se houve contato prévio do lote de animais com *Salmonella* sp. associado às técnicas de isolamento do microrganismo a partir das fezes.

A excreção ativa de *Salmonella* sp. pode ser originada pelo estresse que está associado a vários fatores como a superlotação das baias, a idade, a inanição, a administração de corticóides, o transporte dos animais e, ainda, o tratamento oral com antimicrobianos (Clarke *et al.*, 1993). Tem-se ainda a mistura de lotes de várias propriedades, feito nas unidades de terminação, o que também propicia a disseminação da infecção (Sobestiansky *et al.*, 1999).

Dessa forma, animais infectados no período de creche e submetidos ao estresse do transporte e alojamento na granja de terminação terão grande probabilidade de excretarem *Salmonella* sp. e apresentarem isolamento do microrganismo a partir das fezes. Entretanto, a excreção de *Salmonella* sp. torna-se intermitente rapidamente (Nielsen *et al.*, 1995; Van Winsen *et al.*, 2001), o que pode levar à incerteza quando diante de um teste bacteriológico negativo.

Por esta razão, o teste de ELISA-LPS para detecção de anticorpos contra *Salmonella* sp. tem sido uma das ferramentas mais utilizadas em programas de controle em vários países (Nielsen *et al.*, 1995; Van der Gaag *et al.*, 2004). O teste de ELISA fornece informação sobre a ocorrência de infecção

por *Salmonella* sp. em um animal nos 30 aos 120 dias antes da coleta da amostra (Galland *et al.*, 2000) e o período de soroconversão (para atingir níveis de anticorpos detectáveis após infecção) é de mais ou menos duas semanas, (Van Der Wolf *et al.*, 2001; Van Der Gaag. *et al.*, 2004). Esta característica impede que o teste possa ser utilizado para determinar a prevalência em um curto espaço de tempo (Hurd *et al.*, 2002), pois nem sempre representaria o status atual do rebanho (Swanenburg. *et al.*, 2001b). Entretanto, uma vez que tenha ocorrido a soroconversão, os resultados no teste de ELISA não estão sujeitos à variação intensa que se observa no isolamento de *Salmonella* sp. a partir das fezes.

No Brasil, Kich (2004) desenvolveu um teste de ELISA-LPS, utilizando antígeno de *Salmonella* Typhimurium, o qual apresenta determinantes antigênicos comuns com os sorovares mais isolados no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Bessa *et al.*, 2004). O teste desenvolvido foi capaz de detectar tanto animais inoculados artificialmente, como contaminados naturalmente, demonstrando que pode ser empregado em programas de controle no país.

Por outro lado, 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, e pode resultar de reações inespecíficas (Kich, 2004). Entretanto, o ELISA-LPS para *Salmonella* sp. não pretende ser uma ferramenta de diagnóstico individual, visando apenas à determinação da intensidade da infecção no rebanho avaliado

(Nielsen *et al.*, 1995). Além disso, o ponto de corte do ELISA pode e deve ser adaptado às fases de um programa de controle.

No presente estudo, observa-se que os animais apresentavam ausência de isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de fezes coletadas no dia de alojamento dos animais na granja, coincidindo, portanto, com o momento de maior estresse. Ao lado disso, 28% dos animais na granja 1 e 12% dos alojados na granja 3 apresentavam-se positivos no teste de ELISA (TABELA 2). Vários animais positivos, entretanto, apresentavam soros com leitura de densidade ótica próximas ao ponto de corte estabelecido para o teste, podendo ser resultantes de reações inespecíficas.

A partir disso, a combinação dos resultados da sorologia e do isolamento permitem supor que a contribuição das fazes zootécnicas anteriores à terminação não contribuíram de forma importante para infecção dos animais nos lotes acompanhados, nesse sistema de produção.

Por outro lado, os lotes alojados nas granjas 1 e 3 foram colocados em um ambiente em que foi constatada a existência de contaminação residual por *Salmonella* sp. (TABELA 1). De acordo com Berends *et al.* (1996), o fato da *Salmonella* sp. ter a capacidade de sobreviver e multiplicar fora do hospedeiro leva ao “problema *Salmonella*” que é basicamente um contínuo ciclo oro-fecal e, assim, um problema de higiene. Nas superfícies de materiais como madeira, concreto, ferro, aço e tijolos, a *Salmonella* sp. pode sobreviver por um período que pode ir de alguns dias até nove meses, contaminando lotes que sejam alojados posteriormente. Da mesma forma, o ciclo oro-fecal determina que a infecção não fique restrita ao indivíduo, mas se dissemine por

todo o lote. Desta forma, a constatação de contaminação residual, mesmo que em apenas uma baia, representa risco de infecção de todo o lote de animais alojados. Isto porque, os animais em contato com a contaminação residual, ao se infectarem, amplificarão a população de *Salmonella* sp., e excretarão o microrganismo. As fezes dos animais excretadores, por sua vez, aumentarão a contaminação ambiental e serão fonte de infecção para animais alojados em outras baias. Quando animais alojados numa mesma baia estão infectados, a probabilidade de que a transmissão baia-baia ocorra é de até 90% (Berends *et al.*, 1996). Contribuindo para isto, têm-se os tipos de divisórias entre as baias, que são usualmente abertas ou vazadas (Van der Gaag *et al.*, 2004).

Lo Fo Wong *et al.* (2004) realizaram um estudo abrangendo a Alemanha, Dinamarca, Grécia, Suécia e Holanda, onde dados de 359 lotes de terminação foram coletados. O objetivo do trabalho foi avaliar, em nível de rebanhos, os fatores de risco para infecção subclínica de *Salmonella* sp. em lotes de terminação na Europa. Um dos fatores de risco avaliado no trabalho foi a contaminação do ambiente. Segundo esses autores, a produção de suínos no sistema “all in/all out” pode não prevenir a introdução de *Salmonella* sp. no rebanho, mas pode ajudar a diminuir a contaminação cruzada entre lotes e permitir a limpeza e desinfecção antes da introdução de novos animais. Por fim, os dados encontrados neste trabalho apontam para um efeito positivo da produção em lotes, quando em combinação com os cuidados de higiene.

Na granja 2 não foi detectada a contaminação ambiental por *Salmonella* sp., entretanto constatou-se a presença de microrganismo em duas alíquotas de um dos lotes de ração fornecida aos animais. A ração fornecida

aos animais tem sido um dos fatores de risco mais referidos para a infecção de lotes suínos por *Salmonella* sp. Nesse sentido, aspectos relacionados com o tipo de ração (farelada, líquida, peletizada, etc.) que, provavelmente, influenciam na sobrevivência da *Salmonella* sp. antes e durante a passagem pelo trato gastrointestinal do animal, tem sido relatados (Lo Fo Wong *et al.*, 1999; Kich, 2004). Ao lado disto, rações com baixa qualidade microbiológica (presença de *Salmonella* sp., por exemplo) podem ser a fonte de infecção para todo o lote (Kich, 2004; Silva, 2004).

Deve-se considerar que os planos de amostragem de ração são um obstáculo para a detecção de *Salmonella* sp. , principalmente em baixos níveis de contaminação. De acordo com Hurd *et al.* (2002) temos maiores chances de detecção quando for utilizado um maior número de repetições. Ao lado disto, é preciso coletar uma amostra que seja representativa do silo, contento frações em diferentes intervalos durante o descarregamento da ração. No presente estudo, buscou-se diminuir as dificuldades inerentes à amostragem a partir da coleta de várias frações do silo que, após homogeneizadas, foram subdivididas em três alíquotas para aumentar a probabilidade de detecção de *Salmonella* sp. Apesar disso, as 144 alíquotas analisadas foram negativas no isolamento bacteriológico. Segundo Blackburn (1993), a técnica microbiológica convencional é capaz de detectar uma célula somente de forma teórica, já que o limite real depende da qualidade dos procedimentos adotados, dos meios de cultura utilizados, dos equipamentos disponíveis e do conhecimento do pessoal responsável, que são fatores bastante variáveis entre diferentes laboratórios.

De acordo com Oliveira (2000), a PCR também é influenciada por estes fatores, mas o grau de subjetividade na interpretação dos resultados é bem menor, o que diminui a margem de erro. Ainda segundo Oliveira (2000), a determinação da sensibilidade da PCR para detecção genérica de *Salmonella* sp., utilizando a *S. Gallinarum* e a *S. Pulum*, apresentou limites de detecção de $1,1 \times 10^3$ e $1,8 \times 10^5$ células, respectivamente. Estes resultados indicaram que a PCR foi superior à técnica microbiológica convencional, pois esta tem apresentado dificuldades no isolamento destes sorovares, conseguindo detectá-los somente em quantidades tão altas quanto 10^8 a 10^9 células. No presente estudo, igualmente, a técnica da PCR foi capaz de detectar a presença de *Salmonella* sp. em duas alíquotas negativas no isolamento.

A maior sensibilidade da PCR, na detecção de *Salmonella* sp., principalmente associada ao enriquecimento seletivo em caldo RV, já foi relatada anteriormente (Oliveira, 2002; Castagna, 2004). Por outro lado a especificidade do gene *invA* como alvo de amplificação foi determinada por Rahn *et al.* (1992) que concluíram que esta seqüência está presente unicamente no gênero *Salmonella* sp. Essas características tem levado a amplificação do gene *invA* a ser indicada como o alvo de eleição na detecção de *Salmonella* sp. por PCR (Malorny *et al.*, 2003).

Seja devido ao contato com um ambiente contaminado ou por terem sido alimentados com lotes de ração com presença de *Salmonella* sp., ou, ainda, por outros fatores de risco ainda não detectados, os lotes chegaram ao abate com elevado número de animais soropositivos (94,6%) e uma parcela

considerável de animais com isolamento de *Salmonella* sp. a partir de linfonodos mesentéricos (52%) e conteúdo intestinal.(46,6%).

A infecção de suínos com *Salmonella* sp. pode ocorrer na granja, entretanto o transporte, a espera e o abate também serão momentos críticos para a contaminação dos lotes (Berends. *et al.*, 1996; Swanenburg *et al.*, 2001).

Conforme Berends *et al.* (1998), 90% das novas infecções que ocorrem durante o transporte são decorrentes do estresse e são causadas pelo mesmo sorovar já presente no rebanho. O transporte para o abatedouro reduz a resistência do animal (Lázaro *et al.*, 1997), levando-o a excretar o microrganismo (Wilcock & Schwartz 1992), o que facilita a transmissão oro-fecal de *Salmonella* sp. (Lázaro *et al.*, 1997). Assim, salmonelas isoladas em caminhões utilizados para o transporte de suínos terminados e nas baias de espera podem influenciar na prevalência de animais positivos ao abate (Van Der Wolf *et al.*, 1999).

Entretanto, novamente através da combinação de resultados do isolamento e sorologia é possível descartar a contaminação pré-abate dos lotes estudados, indicando a fase de terminação como o momento de infecção e amplificação do problema no presente estudo. Isto porque, caso os animais houvessem entrado em contato com *Salmonella* sp. apenas no transporte e na espera pré-abate poderiam ser positivos no isolamento, porém seriam negativos na sorologia. Por outro lado, esses animais portadores são fonte de infecção para lotes que chegam negativos ao frigorífico (Swanenberg *et al.*, 2001).

Ao lado disso, como já amplamente demonstrado esses animais constituem o principal fator de risco para a introdução de *Salmonella* sp. na linha de processamento e para contaminação do produto final, (Swanenburg *et al.*, 2001; Castagna *et al.*, 2003).

Salmonella Typhimurium, S. Derby, S. Bredeney, S. Anatum, S. Enteritidis e S. Agona são freqüentemente os mais encontrados em suínos portadores no Brasil e no mundo. Vários autores já relataram pelo menos um desses sorotipos como sendo o mais freqüente em seus estudos (Pestana & Rugai, 1943; Neiva, 1946; Kampelmacher *et al.*, 1963; Riley, 1970; Costa *et al.*, 1972; Zebreal *et al.*, 1974; Di Guardo *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1999).

Bessa *et al.* (2004) encontraram os sorovares Typhimurium, Bredeney e Agona como os mais prevalentes em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. No presente estudo o sorovar Bredeney foi o mais encontrado (64,3% dos isolados), porém observou-se uma grande variação de sorovares isolados entre os lotes amostrados. De forma geral, observou-se a ocorrência de mais de um sorovar em todos os lotes, bem como uma variação nos sorovares isolados a partir de linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal de animais de um mesmo lote.

A infecção com múltiplos sorovares é uma característica que tem sido encontrada tanto dentro de lotes de suínos como em amostras colhidas de um mesmo animal (Michael *et al.*, 2000; Bessa *et al.*, 2004; Castagna *et al.*, 2004). Sem dúvida essa é mais uma indicação da complexidade do ciclo de infecção e reinfecção por *Salmonella* sp. e da dificuldade em estabelecer programas de controle efetivos.

Finalmente, o presente estudo demonstrou que a combinação dos resultados do teste de ELISA-LPS e do isolamento são úteis para determinar a fase crítica de infecção por *Salmonella* sp. e de amplificação do problema. A partir da determinação da fase crítica, é possível propor medidas de intervenção que, também de acordo com os resultados encontrados, devem partir de normas de biossegurança, desinfecção e controle da ração fornecida. Ao lado disto, principalmente em amostras como a ração, cuja dificuldade de amostragem e isolamento bacteriológico podem ser uma barreira para a detecção de *Salmonella* sp., técnicas como a PCR podem vir a contribuir, aumentando a sensibilidade e a rapidez do diagnóstico.

6. CONCLUSÕES

1. A fase de terminação constituiu um ponto crítico na difusão da infecção por *Salmonella* sp., resultando na soroconversão dos animais e presença de *Salmonella* sp. em seus linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal ao abate.

2. A contaminação residual do ambiente das granjas de terminação e o fornecimento de ração contaminada contribuíram para a introdução de *Salmonella* sp. no lote de suínos na fase de terminação.

3. A técnica de PCR possibilitou a detecção de *Salmonella* sp. em duas alíquotas de ração que haviam sido negativas no isolamento bacteriológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SOUD, W.A.; RÅDSTRÖM, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Sweden, v. 64, n. 10, p. 3748-3753, 1998.

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, n. 53, p. 133–146, 2002

ALLGAYER, M. C. **Detecção de *Salmonella* sp. em Psitacídeos de Cativeiro através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. 2002. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ALVES, J.C. et al. *Salmonella* sp. sp em linfonodos de suínos normais abatidos no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v .16, n .4, p. 172-176, 1994.

AMANN, R. et al. Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. **Nature**, London, n. 351, p. 161-164, 1991.

ARROYO, G.; ARROYO, J. A. Efficiency of different enrichment and isolation procedures for the detection of *Salmonella* sp. serotypes in edible offal. **Journal of Applied Bacteriology**, Madrid v. 79, p.360-367, 1995.

ATLAS, R. M. **Principles of Microbiology**. 2. ed. New York: Smith, 1997. 1298 p.

BANDEIRA, R.M. et al. Correlação da presença de suínos positivos para *Salmonella* sp. ao abate e a presença do microrganismo no produto final. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24, 2002, Gramado, RS. **Resumos**. Porto Alegre: SOVERGS, 2002, 57 p.

BAGER, F.; PETERSEN, J. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Vanloese, v. 32, p. 473-481, 1991.

BANWART, G.J. **Foodborne agents causing illness**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinold, 1989. 773 p.

BARBER, D.A. et al. Spacial and temporal patterns of the distribution of *Salmonella* sp. on swini farms in Illimois. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* SP. IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1999. p. 97-100.

BARCELLOS, D.E.S.N. et al. Ocorrência de salmonelose septicêmica em suínos no período neonatal. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1984, Curitiba. **Resumos**. Curitiba: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1984. 29p.

BECKERS, H.J. et al. Fate of salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Müller-Kauffmann's tetrathionate medium. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 62, p. 97-104, 1987.

BELLO-PÉREZ, L.A. Serotipos de *Salmonella* identificados en Chorizos que se expenden en Acapulco, Guerrero, México. **Revista Latino-Americana de Microbiologia**, Amsterdam, v. 30, p. 37-53, 1996.

BENNET , A.R. et al. Rapid and definitive detection of *Salmonella* sp. in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Humboldt, v. 26, p. 437-441, 1998.

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, n. 30, p. 37-53, 1996.

BESSA, M. C .**Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Rio Grande do Sul**. 2001. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

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

BLAHA, T. The state of the art of *Salmonella* sp.. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1997, Minnesota. **Proceedings**. Minnesota: [s.n.], 1997. p. 79-81.

BLACKBURN, C. W. Rapid and alternative methods for the detection of *Salmonella* sp.s in foods. A reiew. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford v. 75, p. 199-214, 1993.

BURKHARD, M. et al. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR – based method. **International Journal of Food Microbiology**, Berlin, v. 89, p. 241-249, 2003.

BUSSE, M. Media for *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, p. 117-131, 1995.

CALDERON, D.F.; FURLANETTO, S.M.P. Isolamento de *Salmonella* em diferentes meios seletivos de enriquecimento, tempos e temperaturas de incubação. **Revista de Microbiologia.**, São Paulo, n. 22, v. 2, p. 127-130, 1991.

CALEY, J.E. *Salmonella* sp. in pigs in papua new Guinea. **Australian Veterinary Journal**, Melbourne, v. 48, p. 601-604, 1972.

CALZADA, C.T. et al. Sorovares de *Salmonella* sp. identificados no período 1977-1982, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 1-18, 1984.

CAMPOS, L.C. *Salmonella* sp. In: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 229 – 238.

CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction in food microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, Switzerland, v. 23, p. 89-103, 1995.

CASTAGNA, S.M.F. et al. Perfil de resistência a antimicrobianos de amostras de *Salmonella* sp. isoladas de produtos de origem suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 2002, Gramado, RS. **Resumos**. Porto Alegre: SOVERGS, 2002. p. 57

CASTAGNA, S.M.F. **Associação da prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e a contaminação de embutidos tipo frescal**. 2004. 50 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CASTAGNA, S.M.F. et al. Presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, 2004.

CHEN, S. et al. A rapid, sensitive and automated method for detection of *Salmonella* sp. species in foods using AG-9600 AmpliSensor analyser. **Journal of Applied Microbiology**, Ontario, v. 83, p. 314-321, 1997.

CHERRINGTON, C.A.; IN'T VELD, J.H.J.H. Comparison of classical isolation protocols with a 24h screen to detect viable *Salmonella* in faeces. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, p. 65-68, 1993.

CHRISTENSEN, J.; RUDEMO, M. Multiple change-point analysis applied to the monitoring of *Salmonella* sp. prevalence in Danish pigs and porks. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, n. 36, p.131-143, 1998.

CHUNG, G.T.; FROST, A.J. The occurrence of *Salmonella* in slaughtered pigs. **Australian Veterinary Journal**, Melbourne, v. 45, p. 350-353, 1969.

CLARKE, R.C.; GYLES, C.L. *Salmonella* sp. In: GYLES, C.L.; CHARLES, O.T. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa State University, 1993. p. 133-153.

COHEN, N.D. et al. Genus-specific detection of *Salmonella* sp. using the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Texas, n. 5, p. 368-371, 1993.

COOKE, V.M. et al. A novel chromogenic ester agar medium for detection of *Salmonellae*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 807-812, 1999.

CORRÊA, M. N.; LUCIA, JR; DESCHAMPS, J.C. **Tópicos em Suinocultura II**. Pelotas - RS: Printpar, 2003. v. 2, 320p.

COSTA, G.A. et al. Sobre o isolamento de salmonelas de gânglios linfáticos de suínos abatidos no matadouro da cidade de Salvador – Bahia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 3, p. 417-431, 1972.

DAMMAN, D. et al. An estimate of *Salmonella* sp. prevalence on Illinois swine farms using mesenteric lymph node cultures. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* SP. IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1999. p. 123-125.

DAVIES, P.R. et al. Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. **Epidemiology and Infection**, North Carolina, v. 119, p. 237-244, 1997.

DAVIES, P.R. Spatial patterns of fecal shedding of *Salmonella* by pigs housed in buildings with open-flush gutters. **Swine Health Production**, London, v. 6, p. 101–106, 1998.

DAVIES, P.R. et al. Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production system. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 212, n. 12, p. 1925-1929, 1998.

DAVIES, R.H. The evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for *Salmonella*. England. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 95, n. 5, p. 1016-1025, 2003.

Di GUARDO, G. et al. Occurrence of *Salmonella* in swine in the Latium Region (central Italy) from 1980 to 1989: a retrospective study. **The Veterinary Quartely**, Utrecht, v. 14, n. 2, p. 62-65, 1992.

DUSCH, H.; ALTWEGG, M. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 4, p. 802-804, 1995.

EKPERIGIN, H.E.; NAGARAJA, K.V. *Salmonella*. **The Veterinay Clinics of North America**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 17-29, 1998.

ESPER, M.R.N.R. et al. *Salmonella* sp.: Sorovares 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**, São Paulo, v. 57 n. 2, p. 45-50, 1998.

FAGERBERG, D.J.; AVENS, J. S. Enrichment and plantig methodology for *Salmonella* detection in food. a reiew. **Journal of Milk and Food Thecnology**, Des Moines, Iowa, v. 39, n. 9, p. 628-646, 1976.

FEDORKA-CRAY, P.; McKEAN, J.D.; BERAN, G.W. Feed and feed trucks as sources of *Salmonella* sp. contamination in swine. **Journal of Swine Health Production**, Nebraska, v. 5, n. 5, p. 189-193, 1997.

FIALHO, E.T. et al. **Análise proximal e ocorrência de Salmonelas em alimentos e concentrados protéicos utilizados em rações de suínos.** [Local] : EMBRAPA, 1985. p. 1-4. (Comunicado Técnico, 87).

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

FLUIT, A.C. et al. Rapid detection of *Salmonella* sp. in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Utrecht, v. 59, n. 5, p. 1342-1346, 1993.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia Alimentar**. São Paulo: Atheneu, 1996. 181 p.

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

GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* sp. invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, New York, p. 4338-4349, 1992.

GALLAND, J.C. et al. Prevalence of *Salmonella* sp. in beef feeder steers as determined by bacterial culture and ELISA serology. **Veterinary Microbiology**, Hannover, n. 76, p. 143-151, 2000.

GORTON, S.J.; KLIEBENSTEIN, J.B.; BERAN, G. W. Cost of on-farm microbial testing for *Salmonella* sp.: An application by farm and prevalence level. **ISU Swine Research Report**, Iowa, 1996. Disponível em: <<http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports/asl-1413.pdf>>. Acesso em : 18 de out. de 2004.

GRUENEWALD, R. et al. Use of Rambach propylene glycol containing agar for identification of *Salmonella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 10, p. 2354-2356, 1991.

GUINÉE, P.A.M. et al. Incidence of *Salmonella* sp. in brown rats (*rattus norvegicus*) caught in and near slaughterhouses, farm and mink farms. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v. 10, p. 182-185, 1963.

HALD, T.; WEGENER, H.C. Quantitative assesment of the sources of human salmonellosis atributable to pork. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY E CONTROL OF *SALMONELLA* SP. IN PORK, 3, 1999, Washington, USA. **Proceedings**. Washington, 1999. p. 200-205

HARRIS, I.T. et al. Prevalence of *Salmonella* sp. organism in swine feed. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 210, n. 3, p. 382-385, 1997.

HELDRICH, K. (Ed.) *Salmonella*. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15 ed. Arlington, 1990. p. 467-476.

HIRSH, D.C. *Salmonella* sp.. In: BIBERSTEIN, D.V.M.; ZEE, Y.C. **Review of Veterinary Microbiology**. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1990, p. 110-115.

HOLT, J.G. et al. (Eds.). Facultative anaerobic Gram-negative rods. In: BERGEY'S manual of determinative bacteriology. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 186-187.

HOORFAR, J.; BAGGENSEN, D.L.; PORTING, P.H. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* sp. isolates. **Journal of Microbiological Methods**, Copenhagen, v. 5, p. 7-84, 1999.

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

HURD, H.S. et al. *Salmonella* enterica infections in market swine with and without transport and holding. **Applied and Environmental Microbiology**, Iowa, v. 68, n. 5, p. 237–2381, 2002.

INSTAT. **Graphpad Instat tm. versão 2.1**. San Diego : Graphpad Software, 1993. 1 disquete.

JACOBS, J. et al. Studies on the incidence of *Salmonella* sp. in imported fish meal. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v. 10, p. 542-550, 1963.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp. sp, ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 5th ed. New York: Chapman & Hall, 1992. 661 p.

JUBB, K.V.F; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 3 ed. Washington: Academic Press, 1985. v. 2, p. 135-143.

JUNE, G.A. et al. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport-Vassiliadis Medium for the recovery of *Salmonella* from raw flesh and other highly contaminated foods: precollaborative study. **The Journal of AOAC International**, Washington, v. 78, n. 2, p. 375-380, 1995.

KAMPELMACHER, E.H. et al. Further studies on *Salmonella* in slaughterhouses and in normal slaughter pigs. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Berlin, v. 10, p. 2-27, 1963.

KELLY, M.T.; BRENNER, D.J.; FARMER, J.J. Enterobacteriaceae. In: LANNETE, E. H. (Ed). **Manual of clinical microbiology**. 4 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. p. 271-272.

KICH, J. D. **Desenvolvimento de um teste de ELISA-LPS para *Salmonella* sp. e sua aplicação em rebanhos suínos na identificação de fatores de risco associados à infecção**. 2004. 112 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

KIM, J.Y. et al. *Salmonella* prevalence in market weight pigs before and after shipment to slaughter. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3., 1999, Washington. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1999. p. 191-193.

KRANKER, S.; DAHL, J. Bacteriological and serological examination and risk factor analysis of *Salmonella* occurrence in sow herds, including risk factors for high *Salmonella* seroprevalence in receiver finishing herds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 4, 2001, Leipzig, Germany. **Proceedings**. Leipzig, 2001. p. 237-243.

LANGENEGGER, C.H.; ALFINITO, J.; LANGENEGGER, J. *Salmonellas* isoladas de suínos de abate do Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 3, p. 91-94,1983.

LÁZARO, N. S.; TIBANA, A.; HOFER, E. *Salmonella* spp. in healthy swine and in abattoir environments in Brazil. **Journal of Food Protection**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 9, p. 1029-1033, 1997.

LIESACK, W.; STACKEBRANDT, E. Occurence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetical material isolated from an australian terrestrial environment. **Journal of Bacteriology**, St. Lucia, Australia, v. 174, n. 15, p. 5072-5078, 1992.

LINTON, A.H. Salmonellosis in pigs. **British Veterinary Journal**, London, v. 135, n. 2, p. 109-112, 1979.

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, 3, 1999, Washington. **Proceedings**. Urbana-Champaing: University of Illinois, 1999. p. 151-154.

LO FU WONG, D.M.A. et al. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Denmark, v. 62, p. 253-266, 2004.

LOGUERCIO, A. et al. Elisa indireto na detecção de *Salmonella* sp. em lingüiça suína. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 7, 2002.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. p. 527.

MALORNY, B. et al. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standart. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 69, n. 1, p. 290-296, 2003.

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

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

MILLER, R.G. et al. Xylose-lysine-tergitol-4: an improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. **Poultry science**, Champaign, v. 70, p. 2429-2432, 1991.

MIRANDA, J.B.N. et al. Ocorrência de *Salmonella* sp. em farinhas utilizadas como matéria-prima na composição de rações de animais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 157-160, 1978.

MOO, D. Et al. The isolation of *Salmonella* sp. from Jejunal and caecal lymph nodes of slaughtered animals. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v. 56, p. 181-183, 1980.

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

NASCIMENTO, V.P.; SILVA, A.B. Controle de qualidade de produtos de origem avícola: programas de monitorização em *Salmonellas*. In: CICLO DE CONFERÊNCIAS DA A.V.E., 4., 1994, Porto Alegre. **Anais**. [S.l.:s.n.], [1994?]. Não paginada.

NEIVA, C. Incidência de *Salmonellas* em suínos. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, n. 7, p. 430-435, 1946.

NGUYEN, A.N.; KHAN, M.I.; LU, Z. Amplification of *Salmonella* sp. chromosomal DNA using the polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, Connecticut, v. 38, p. 119-126, 1994.

NIELSEN, B. et al. The serological response to *Salmonella* sp. serovars Typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. **Veterinary Microbiology**, Copenhagen, n. 47, p. 205-218, 1995.

NIELSEN, B., BAGGESEN, D.L. Update on laboratory diagnosis of subclinical salmonella infections in pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Copenhagen: [s.n.], 1997. p. 19-31

OLD, D.C.; THRELFALL, E.J. *Salmonella*. In: COLLIER, L. (ed.) **Microbiology and Microbial Infections**. 9. ed. London: Topley & Wilson, 1998.

OLIVEIRA, G. **Avaliação de pontos críticos de contaminação por *Salmonella* sp. spp. no processo da fabricação da farinha de vísceras, destinada à fabricação de rações para aves**. 1996. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

OLIVEIRA, S. **Detecção e identificação de *Salmonella* sp., *S* Typhimurium, *S. Enteritidis*, *S. Galinarum* e *S. Pulorum* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em materiais de origem avícola.** 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

OLIVEIRA, S. Detection and identification of *Salmonellas* from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, Porto Alegre, v. 87, p. 25-35, 2002.

PESTANA, B.R.; RUGAI, E. O porco normal como portador de salmonelas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 3, p. 232-235, 1943.

RAHN, K. et al. Amplification of an *invA* sequence of *Salmonella* sp. typhimurium by polimerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella* sp. **Molecular and Cellular Probes**, Ontario, n. 6, p. 271-279, 1992.

RAMBACH, A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. From *Proteus* spp. And other enteric bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 1, p. 301-303, 1990.

RAPPOLD, H.; BOLDERDIJK, R. Modified lysine iron agar for isolation of *Salmonella* from food. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 162-163, 1979.

REYNOLDS, I.M.; MINER, P.W.; SMITH, R.E. *Salmonella* sp. Enteritidis from porcine meningitis. A case report. **Cornell Veterinarian**, New York, v. 58, n. 1, p. 180-185, 1968

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática roteiro e manual: bactérias e fungos.** São Paulo: Atheneu, 1993, 112p.

RILEY, M.G.I. The incidence of *Salmonella* in normal slaughtered pigs. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 46, p. 40-43, 1970.

ROSSEN, L. et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbiol diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, Lyngby, n. 17, p. 37-45, 1992.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. *Salmonella* sp. Infections. In: **BACTERIAL Pathogenesis.** Washington: American Society for Microbiology Press, 1994. p. 229-243.

SAMBROOK, R.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** 2. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. v. 3, 417p.

SANDBERG, M. et al. An evaluation of the Norwegian Salmonella surveillance and control program in live pig and pork. **International Journal of Food Microbiology**, Oslo, n. 72, p. 1–11, 2002.

SANTOS, L.R. et al. Phage Types of *Salmonella* sp. Enteritidis isolated from clinical and food samples and from broiler carcasses in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 1-4, 2003.

SCHNURRENBERGER, P.R.; MARTIN, R.J.; GALTON, M.M. Prevalence of *Salmonella* sp. spp. in domestic animals and wildlife on selected illinois farms. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 153, n. 4, p. 442-445, 1968.

SHARMA, R.M.; PARKER, R.A. Evaluation of culture media for isolation of *Salmonella* from faeces. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 18, n. 4, p. 589-595, 1969.

SHERROD, P.S. et al. Relative effectiveness of selective plating agars for recovery of *Salmonella* species from selected high-moisture foods. **Journal of AOAC International**, Washington, v. 78, n. 3, p. 679-690, 1995.

SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, et al.. **Diseases of swine**. 8.ed. Ames, Iowa: University Press, 2000. p.535-551.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia**: um texto ilustrado. Rio de Janeiro: Eventos, 1999. p.181.

SILVA, E.N. et al. Salmonelas em farinhas de origem animal destinadas à fabricação de rações. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 169-173, 1973.

SILVA, L. E. et al. Infecção por *Salmonella* sp. em um sistema de produção de suínos. In: CONGRESSO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais**. Goiânia, 2003. v 1, p. 65.

SILVA, L.E. **Estudo longitudinal da infecção por *Salmonella* sp. em um sistema integrado de produção de suínos**. 2004. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo : Varela, 1997. 295p. cap. 5: Detecção de *Salmonella*.

SOBESTIANSKY, J. et al. Salmonelose. In: CLÍNICA e patologia suína. Goiânia: [s.n.], 1999. p.464.

STONE, G.G. et al. Detection of *Salmonella* sp. serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, Kansas, v. 32, n. 7, p. 1742-1749, 1994.

SWANENBURG,M. et al. Tonsils of slaughtered pigs as marker sample of *Salmonella* sp. positive pork. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL

OF *SALMONELLA* SP. IN PORK, 3,1999, Washington. **Proceedings**. Washington, 1999. p. 264-265.

SWANENBURG, M. et al. *Salmonella* sp. in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control point during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, Lelystad, v 70, p. 243-254, 2001a.

SWANENBURG, M. et al. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. **International Journal of Food Microbiology**, Lelystad, v. 70, p. 231–242, 2001b.

TATE, C.R. et al. The isolation of salmonellae from poultry farm environmental samples by several enrichment procedures using plating media with and without novobiocin. **Poultry Science**, Champaign, v. 69, p. 721-726, 1990.

TOMA, B. et al. **Applied veterinary epidemiology and the control of disease in populations**. France: AEEMA, 1999. 530 p.

TORRENCE, M. E. **Understanding epidemiology**. St. Louis: Mosby, 1997. 180p.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Introducion a la Microbiologia**. 3rd ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 792 p.

TRKOV, M. et al. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, Ljubljana, v. 16, p.393-399, 1999.

VAN DER GAAG, M. A. et al. A state-transition simulation model for the spreadof *Salmonella* sp. in the pork supply chain. **European Journal of Operational Research**, Lelystad, v. 156, p. 782-798, 2004.

VAN DER WOLF, P.J. et al. *Salmonella* infections in finishing pigs in the Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resitance of isolates and risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, Boxtel, v. 67, p. 263–275, 1999.

VAN DER WOLF, P. J. et al. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* sp. prevalence in finishing pig heards in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, Boxtel, n.78, p. 205-219, 2001.

VAN WINSEN, R. L. et al. Monitoring of transmission of *Salmonella* sp. enterica serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. **Veterinary Microbiology**, Uthrecht, n. 80, p. 267-274, 2001.

VARNAM, A. H. ; EVANS, M. G. *Salmonella* sp. In: **FOODBORNE Pathogens an Illustrated Text**. [S.I], England : Wolff, 1991. p. 51-462.

VASSILIADIS, P. et. al. *Salmonella* isolation with Rappaport-Vassiliadis enrichment medium seeded with different size inocula of pre-enrichment culture of meat products and sewage polluted water. **Journal of Hygiene**, London, v. 95, p. 139-147, 1985.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in natural community. **Nature**, Bozeman, v.345, p. 63-65, 1990.

WEISS, L.H.N. et al. Occurrence of *Salmonella* sp. in finishing pigs in south Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA SP. IN PORK, 2., 1997, Copenhagen. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1999. p.184-185.

WILCOCK, B.P. et al. The significance of the serotype in the clinical and pathological features of naturally occurring porcine salmonellosis. **Canadian journal of comparative medicine**, Indiana, v. 40, p. 81-88, 1976.

WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis. In: LENSAN, A.D.; SHAW, B.E.; MENGELIN L. W. et al. (Eds) **Diseases of swine**. 7. ed. Iowa: Iowa University Press, 1992. p.570-583.

WILLIAMS, B.M. Environmental considerations in salmonellosis. **The Veterinary Record**, London, v. 96, p.318-321, 1975.

WILLIAMS, L.P.; VAUGHN, J.B.; BLANTON, V. A ten-month study of *Salmonella* sp. contamination in animal protein meals. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 155, n. 2, p. 167-174, 1969.

ZEBRAL, A.A.; FREITAS, C.A.; HOFER, E. Ocorrência de *Salmonella* sp. em gânglios linfáticos de suínos aparentemente normais, abatidos no matadouro de Santa Cruz, cidade do Rio de Janeiro, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.72, n.3/4, p. 223-235, 1974.

APÊNDICE 1

Resultados sorológicos da Granja 1 (separado por baias). Note-se que todos os animais positivos, marcados em cinza claro, estão próximos ao ponto de corte que é 0,169. Os resultados dentro da caixa negritada são os controles.

Protocolo	Granja	Amostra	Número	mediana	correção/regressão		
S.typhi97	C0			1	0,181	0,151	negativo
S.typhi97	C1			2	0,387	0,324	positivo
S.typhi97	C2			3	0,927	0,776	positivo
S.typhi97	C3			4	1,217	1,018	positivo
S.typhi97	G1B1		1	5	0,124	0,104	negativo
S.typhi97	G1B1		2	6	0,27	0,226	positivo
S.typhi97	G1B1		3	7	0,109	0,091	negativo
S.typhi97	G1B1		4	8	0,23	0,192	positivo
S.typhi97	G1B1		5	9	0,107	0,090	negativo
S.typhi97	G1B2		1	10	0,149	0,125	negativo
S.typhi97	G1B2		2	11	0,087	0,073	negativo
S.typhi97	G1B2		3	12	0,097	0,081	negativo
S.typhi97	G1B2		4	13	0,116	0,097	negativo
S.typhi97	G1B2		5	14	0,065	0,054	negativo
S.typhi97	G1B3		1	15	0,184	0,154	negativo
S.typhi97	G1B3		2	16	0,116	0,097	negativo
S.typhi97	G1B3		3	17	0,133	0,111	negativo
S.typhi97	G1B3		4	18	0,103	0,086	negativo
S.typhi97	G1B3		5	19	0,123	0,103	negativo
S.typhi97	G1B4		1	20	0,106	0,089	negativo
S.typhi97	G1B4		2	21	0,081	0,068	negativo
S.typhi97	G1B4		3	22	0,104	0,087	negativo
S.typhi97	G1B4		4	23	0,083	0,069	negativo
S.typhi97	G1B4		5	24	0,095	0,079	negativo
S.typhi97	G1B5		1	25	0,145	0,121	negativo
S.typhi97	G1B5		2	26	0,174	0,146	negativo
S.typhi97	G1B5		3	27	0,197	0,165	negativo
S.typhi97	G1B5		4	28	0,151	0,126	negativo
S.typhi97	G1B5		5	29	0,206	0,172	positivo

APÊNDICE 2

Resultados sorológicos da granja 2. Todos os animais foram negativos. Os resultados dentro da caixa negritada são os controles.

Protocolo	Granja	Amostra	Número	mediana	correção/regressão		
S.typhi97	C0		1	0,181	0,151	negativo	
S.typhi97	C1		2	0,387	0,324	positivo	
S.typhi97	C2		3	0,927	0,776	positivo	
S.typhi97	C3		4	1,217	1,018	positivo	
S.typhi97	G2B1		1	30	0,089	0,074	negativo
S.typhi97	G2B1		2	31	0,07	0,059	negativo
S.typhi97	G2B1		3	32	0,063	0,053	negativo
S.typhi97	G2B1		4	33	0,109	0,091	negativo
S.typhi97	G2B1		5	34	0,071	0,059	negativo
S.typhi97	G2B2		1	35	0,121	0,101	negativo
S.typhi97	G2B2		2	36	0,084	0,070	negativo
S.typhi97	G2B2		3	37	0,057	0,048	negativo
S.typhi97	G2B2		4	38	0,063	0,053	negativo
S.typhi97	G2B2		5	39	0,084	0,070	negativo
S.typhi97	G2B3		1	40	0,089	0,074	negativo
S.typhi97	G2B3		2	41	0,079	0,066	negativo
S.typhi97	G2B3		3	42	0,099	0,083	negativo
S.typhi97	G2B3		4	43	0,067	0,056	negativo
S.typhi97	G2B3		5	44	0,12	0,100	negativo
S.typhi97	G2B4		1	45	0,057	0,048	negativo
S.typhi97	G2B4		2	46	0,077	0,064	negativo
S.typhi97	G2B4		3	47	0,078	0,065	negativo
S.typhi97	G2B4		4	48	0,123	0,103	negativo
S.typhi97	G2B4		5	49	0,102	0,085	negativo
S.typhi97	G2B5		1	50	0,124	0,104	negativo
S.typhi97	G2B5		2	51	0,09	0,075	negativo
S.typhi97	G2B5		3	52	0,085	0,071	negativo
S.typhi97	G2B5		4	53	0,064	0,054	negativo
S.typhi97	G2B5		5	54	0,053	0,044	negativo

APÊNDICE 3

Resultados sorológicos da granja 3. Note-se que a metade dos animais ficaram próximos ao ponto de corte de 0,169. Os resultados dentro da caixa negritada são os controles.

Protocolo	Granja	Amostra	Número	mediana	correção/regressão	
S.typhi97	C0		1	0,181	0,151	negativo
S.typhi97	C1		2	0,387	0,324	positivo
S.typhi97	C2		3	0,927	0,776	positivo
S.typhi97	C3		4	1,217	1,018	positivo
S.typhi97	G3B1	1	55	0,286	0,239	positivo
S.typhi97	G3B1	2	56	0,095	0,079	negativo
S.typhi97	G3B1	3	57	0,117	0,098	negativo
S.typhi97	G3B1	4	58	0,107	0,090	negativo
S.typhi97	G3B1	5	59	0,164	0,137	negativo
S.typhi97	G3B2	1	60	0,128	0,107	negativo
S.typhi97	G3B2	2	61	0,102	0,085	negativo
S.typhi97	G3B2	3	62	0,092	0,077	negativo
S.typhi97	G3B2	4	63	1,011	0,846	positivo
S.typhi97	G3B2	5	64	0,135	0,113	negativo
S.typhi97	G3B3	1	65	0,474	0,397	positivo
S.typhi97	G3B3	2	66	0,17	0,142	negativo
S.typhi97	G3B3	3	67	0,084	0,070	negativo
S.typhi97	G3B3	4	68	0,129	0,108	negativo
S.typhi97	G3B3	5	69	0,267	0,223	positivo
S.typhi97	G3B4	1	70	0,103	0,086	negativo
S.typhi97	G3B4	2	71	0,524	0,438	positivo
S.typhi97	G3B4	3	72	0,09	0,075	negativo
S.typhi97	G3B4	4	73	0,108	0,090	negativo
S.typhi97	G3B4	5	74	0,52	0,435	positivo
S.typhi97	G3B5	1	75	0,21	0,176	positivo
S.typhi97	G3B5	2	76	0,137	0,115	negativo
S.typhi97	G3B5	3	77	0,076	0,064	negativo
S.typhi97	G3B5	4	78	0,168	0,141	negativo
S.typhi97	G3B5	5	79	0,166	0,139	negativo

APÊNDICE 4

SOROLOGIAS AO ABATE:

Sorologia dos suínos da Granja 1 ao abate. Os resultados dentro da caixa negritada são os controles.

Protocolo	Granja 1	Amostra	Número	mediana	correção/regressão	
Styphi98		C0	1	0,169	0,158	negativo
Styphi98		C1	2	0,343	0,322	positivo
Styphi98		C2	3	0,829	0,777	positivo
Styphi98		C3	4	1,085	1,017	positivo
Styphi98	G1	S 1	55	0,209	0,196	positivo
Styphi98	G1	S 2	56	0,269	0,252	positivo
Styphi98	G1	S 3	57	0,186	0,174	positivo
Styphi98	G1	S 4	58	0,309	0,290	positivo
Styphi98	G1	S 5	59	0,619	0,580	positivo
Styphi98	G1	S 6	60	0,182	0,171	positivo
Styphi98	G1	S 7	61	0,205	0,192	positivo
Styphi98	G1	S 8	62	0,146	0,137	negativo
Styphi98	G1	S 9	63	0,254	0,238	positivo
Styphi98	G1	S 10	64	0,277	0,260	positivo
Styphi98	G1	S 11	65	0,46	0,431	positivo
Styphi98	G1	S 12	66	0,253	0,237	positivo
Styphi98	G1	S 13	67	0,776	0,728	positivo
Styphi98	G1	S 14	68	0,224	0,210	positivo
Styphi98	G1	S 15	69	0,235	0,220	positivo
Styphi98	G1	S 16	70	0,226	0,212	positivo
Styphi98	G1	S 17	71	0,244	0,229	positivo
Styphi98	G1	S 18	72	0,306	0,287	positivo
Styphi98	G1	S 19	73	0,037	0,035	negativo
Styphi98	G1	S 20	74	0,219	0,205	positivo
Styphi98	G1	S 21	75	0,247	0,232	positivo
Styphi98	G1	S 22	76	0,183	0,172	positivo
Styphi98	G1	S 23	77	0,292	0,274	positivo
Styphi98	G1	S 24	78	0,334	0,313	positivo
Styphi98	G1	S 25	79	0,566	0,531	positivo

Sorologia dos suínos da granja 2 ao abate.

Protocolo Granja 2 Amostra Número mediana correção/regressão

Styphi98		C0	1	0,169	0,158	negativo
Styphi98		C1	2	0,343	0,322	positivo
Styphi98		C2	3	0,829	0,777	positivo
Styphi98		C3	4	1,085	1,017	positivo
Styphi98	G2	S 1	30	0,357	0,335	positivo
Styphi98	G2	S 2	31	0,352	0,330	positivo
Styphi98	G2	S 3	32	0,228	0,214	positivo
Styphi98	G2	S 4	33	0,713	0,669	positivo
Styphi98	G2	S 5	34	0,982	0,921	positivo
Styphi98	G2	S 6	35	0,276	0,259	positivo
Styphi98	G2	S 7	36	0,902	0,846	positivo
Styphi98	G2	S 8	37	0,224	0,210	positivo
Styphi98	G2	S 9	38	1,127	1,057	positivo
Styphi98	G2	S 10	39	0,365	0,342	positivo
Styphi98	G2	S 11	40	0,403	0,378	positivo
Styphi98	G2	S 12	41	0,423	0,397	positivo
Styphi98	G2	S 13	42	0,23	0,216	positivo
Styphi98	G2	S 14	43	0,219	0,205	positivo
Styphi98	G2	S 15	44	0,194	0,182	positivo
Styphi98	G2	S 16	45	0,25	0,234	positivo
Styphi98	G2	S 17	46	0,429	0,402	positivo
Styphi98	G2	S 18	47	0,402	0,377	positivo
Styphi98	G2	S 19	48	1,095	1,027	positivo
Styphi98	G2	S 20	49	0,209	0,196	positivo
Styphi98	G2	S 21	50	0,751	0,704	positivo
Styphi98	G2	S 22	51	0,218	0,204	positivo
Styphi98	G2	S 23	52	0,291	0,273	positivo
Styphi98	G2	S 24	53	0,356	0,334	positivo
Styphi98	G2	S 25	54	0,22	0,206	positivo

Sorologia dos suínos da granja 3 ao abate.

Protocolo Granja 3 Amostra Número mediana correção/regressão

Styphi98		C0	1	0,169	0,158	negativo
Styphi98		C1	2	0,343	0,322	positivo
Styphi98		C2	3	0,829	0,777	positivo
Styphi98		C3	4	1,085	1,017	positivo
Styphi98	IG3	S 1	5	0,262	0,246	positivo
Styphi98	G3	S 2	6	0,474	0,444	positivo
Styphi98	G3	S 3	7	0,413	0,387	positivo
Styphi98	G3	S 4	8	1,114	1,045	positivo
Styphi98	G3	S 5	9	0,372	0,349	positivo
Styphi98	G3	S 6	10	0,333	0,312	positivo
Styphi98	G3	S 7	11	0,378	0,354	positivo
Styphi98	G3	S 8	12	0,393	0,369	positivo
Styphi98	G3	S 9	13	0,316	0,296	positivo
Styphi98	G3	S 10	14	0,352	0,330	positivo
Styphi98	G3	S 11	15	0,359	0,337	positivo
Styphi98	G3	S 12	16	0,483	0,453	positivo
Styphi98	G3	S 13	17	0,224	0,210	positivo
Styphi98	G3	S 14	18	0,488	0,458	positivo
Styphi98	G3	S 15	19	0,249	0,233	positivo
Styphi98	G3	S 16	20	0,778	0,730	positivo
Styphi98	G3	S 17	21	0,617	0,579	positivo
Styphi98	G3	S 18	22	0,359	0,337	positivo
Styphi98	G3	S 19	23	0,551	0,517	positivo
Styphi98	G3	S 20	24	0,305	0,286	positivo
Styphi98	G3	S 21	25	0,487	0,457	positivo
Styphi98	G3	S 22	26	0,282	0,264	positivo
Styphi98	G3	S 23	27	0,169	0,158	negativo
Styphi98	G3	S 24	28	0,179	0,168	negativo
Styphi98	G3	S 25	29	0,422	0,396	positivo

Vita

Monika Muller, filha de Lore Muller e Hans Joachim Muller; nascida em Porto Alegre em 20 de julho de 1965.

No período de 1972 a 1979 cursou o primeiro grau no Colégio Anchieta em Porto Alegre. De 1980 a 1982 cursou o segundo grau na mesma instituição de ensino.

De Janeiro de 1986 a Julho de 1995, trabalhou com venda de passagens aéreas internacionais.

Em julho de 1995 ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Luterana do Brasil. Realizou estágio extracurricular no Centro de Pesquisa Desidério Finamor no setor de Patologia e Parasitologia no período de 06 a 29 de Janeiro de 1998. Também realizou estágio extra curricular na Cooperativa Agropecuária Petrópolis Ltda/PIÁ no setor de inspeção de produtos de origem animais no período de 10 a 14 de Julho de 2001. Gradou-se em Medicina Veterinária em 03 de Agosto de 2002.

Em 2003 ingressou curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com o projeto de mestrado “Comparação da presença de suínos portadores de *Salmonella* sp. no início da fase de terminação e ao abate, em três granjas do Rio Grande do Sul”.