



Aplicação da metodologia de coleta do fluido oral em suínos mestiços

[Application of the methodology for collecting the oral fluid in crossbred pigs]

"Artigo Científico/Scientific Article"

CN **Barbosa**^{1*}, RIAA **Baptista**², DF **Cunha**³, TRP **Freitas**⁴

^{1*}Departamento de Medicina Veterinária /UFRPE.

²Mestre em Ciência Veterinária / UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

³Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária/UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴Pesquisadora em Ciências Exatas e da Natureza. Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO/MG. MAPA. Brasil.

Resumo

O levantamento de diferentes patógenos em rebanhos de suínos é dificultado pelo alto custo, exigências e estresse dos métodos de coleta de sangue. Em busca de harmonizar ações efetivas na área de bem-estar animal e, principalmente, minimizar o estresse no rebanho, a coleta de fluido oral de suínos foi avaliada. Neste estudo, amostras de fluido oral foram colhidas de 38 suínos mestiços de ambos os sexos nas diferentes faixas etárias do ciclo de produção. A viabilidade de implantação da coleta de fluido oral foi avaliada pelo tempo para coleta, volume, qualidade das amostras e comportamento do animal. Nas faixas etárias de cinco a 24 semanas, todos os suínos foram atraídos para a mastigação das cordas de algodão sem a necessidade de indução de estímulos químicos. O tempo médio para coleta foi de cinco minutos. As amostras de obtidas atenderam aos parâmetros de transparência, translucidez e turbidez. De uma maneira geral, a coleta de fluido oral em suínos foi considerada eficaz pela facilidade de execução tanto na coleta e na manipulação, bem como pelos animais por ser indolor e não invasivo, não gerar estresse aparente e permitir a obtenção de um grande número de amostras.

Palavras-Chave: amostras, bem-estar, comportamento, cordas.

Abstract

Currently pathogens surveillance in swine herds is constrained by the cost-effectiveness, efficiency and stress of blood collection methods. The oral fluid collection from pigs was evaluated aiming to decrease the stress caused by the collection of samples for laboratory diagnosis and looking for harmonization the effective actions in animal welfare. In this study, oral fluid samples were collected from 38 crossbred pigs, females and males, at different age range of production cycle. The collecting time spending, volume and quality of samples and animal behavior were applying for oral fluid sampling feasibility valuation. All pigs from five to 24 weeks age range were attracted to the chewing of cotton ropes without inducing chemical stimuli in time average of five minutes. The oral fluid sampling reaching the parameters level of transparency, translucency and turbidity. Overall, the oral fluid sampling was considered effective either by easily to get the samples as by lab handling moreover the painless and noninvasive for pigs avoid stress and allowed obtaining a large number of samples.

Key words: behavior, ropes, samples, welfare.

(*) Autor para correspondência/Corresponding author: Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP: 52171-900. E-mail: clara@dmv.ufrpe.br

Recebido em: 02 de setembro de 2013.

Aceito em: 13 de setembro de 2013.

Introdução

O moderno sistema de produção de suínos (SPS) exige um controle sanitário rigoroso, regular e ininterrupto. Essas exigências refletem diretamente nos métodos de monitoramento do plantel que demandam a coleta de amostras individuais de sangue (STRAW et al., 2007). O método tradicional de coleta de sangue, além de exigir um investimento no treinamento específico dos técnicos e em equipamentos especiais, inexoravelmente, gera prejuízos na própria coleta e qualidade das amostras obtidas devido ao estresse provocado aos animais submetidos à prática (ISAKI et al., 1973; BARBOSA, 2005; PRICKETT et al., 2008; KITTAWORNAT et al., 2010).

Contudo, o diagnóstico imunológico de doenças infecciosas se baseia, preferencialmente, na análise dos produtos sanguíneos que torna inevitável a coleta de sangue e conseqüentemente seus percalços. Isso é evidenciado pelo grande número de kits de diagnósticos disponíveis comercialmente para análise de anticorpos e antígenos obtidos pelo processamento de amostras sanguíneas (KITTAWORNAT et al., 2012).

O estresse em animais pode ser identificado por alterações fisiológicas que afetam a saúde e produtividade do rebanho. As prerrogativas que visam o bem-estar de animais buscam, prioritariamente, os meios para reduzir ou remover a situação de estresse e/ou o agente estressor. Nesse sentido, a coleta do fluido oral atende diretamente ao desafio de minimizar o estresse dos animais quanto à obtenção de amostras clínicas não invasivas e indolores para suprir a demanda crescente de diagnósticos laboratoriais. Essa tendência tem possibilitado o desenvolvimento dos métodos de coleta do fluido oral em várias espécies de animais (MANDEL, 1990; PRICKETT e ZIMMERMAN, 2010).

Segundo Atkinson et al. (1993), o fluido oral (FO) é definido como um líquido incolor e viscoso presente na cavidade oral, resultante da combinação

entre a saliva e o soro transudado e que pode ser coletado por um dispositivo de absorção. A saliva é secretada por três glândulas principais a parótida, a submandibular e a sublingual, além de outras menores, localizadas na superfície dos lábios, língua, palato, bochecha e faríngea (HUMPHREY, 2001). O soro transudado tem origem nos capilares da mucosa oral e nos tecidos gengivais (DELIMA et al. 2000; MCKIE, 2002).

Prickett e Zimmerman (2010) demonstraram a eficácia da aplicação do método das cordas de algodão para obtenção do fluido oral dos suínos, bem como as técnicas de diagnósticos a base do fluido oral. Além do diagnóstico de doenças infecciosas, o fluido oral dos suínos vem sendo usado para avaliar e quantificar o hormônio cortisol em diferentes condições de alojamentos e de transporte (DALLA COSTA et al., 2008; BAPTISTA, 2012).

Os registros na literatura revelam que o fluido oral do suíno é rico em anticorpos e possível substituto do sangue em testes de diagnósticos (MALUMUD e RODRIGUEZ-CHAVEZ, 1992; STRECKFUS et al., 2002; KITTAWORNAT et al., 2010). Amostras de fluido oral já foram investigadas para triagem de anticorpos e patógenos de suínos como vírus da Síndrome respiratória reprodutiva suína (KITTAWORNAT et al., 2012), Circovirose suína (PRICKETT et al., 2008), Vírus da Influenza Suína, (DETMER et al., 2011; SCHAEFER et al., 2013), Pleuropneumonia suína (COSTA et al., 2012), e Erisipela suína (GIMÉNEZ-LIROLA et al., 2013).

O desenvolvimento de testes confiáveis que utilize o fluido oral como amostra clínica é fundamental para a suinocultura. Trata-se de uma ferramenta valiosa que pode ser aplicada para monitorar o estado sanitário do rebanho, avaliar a progressão da doença, bem como a eficiência dos programas vacinais. Neste trabalho, o método das cordas de algodão para a coleta do fluido oral em suínos em

diferentes faixas etárias foi avaliado em termos de viabilidade de implantação do método, tempo de coleta, volume, qualidade de amostras e comportamento do animal.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado na Estação de Pesquisa de Carpina da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Foram utilizados 38 suínos mestiços (cruzamento comercial), de ambos os sexos, em cada fase de produção, definidas por idades e expressas em semanas (uma a quatro; cinco a seis; sete a 13; 14 a 22 e >24 semanas). Os animais estavam alojados em baias coletivas e individuais.

A escolha do material para obtenção do fluido oral foi feita de acordo com a metodologia descrita por Prickett et al. (2008) com modificações. Para a

viabilidade do método, foram adotados os seguintes critérios: capacidade de absorção do material, facilidade no preparo, praticidade na utilização do material e disponibilidade no mercado.

Foram avaliadas diferentes cordas de algodão com 3cm e 5cm de diâmetro (Figura 1A). As cordas foram posicionadas pelo operador dentro das baias individuais e coletivas, próxima dos animais na altura do dorso (Figura 1B). Após o período de mastigação de 2, 5 e 10 minutos, a recuperação da amostra foi feita da seguinte forma: as cordas umedecidas pelo fluido oral foram colocadas individualmente em sacos plásticos, sendo o líquido extraído por compressão da extremidade úmida da corda dentro do próprio saco plástico (Figura 1C). A parte inferior do canto do saco plástico foi cortada e o fluido drenado para um tubo de ensaio (Figura 1D).



Figura 1. A) Cordas de algodão com 5cm de diâmetro, utilizada no estudo. B) Animal mastigando a corda posicionada na altura do dorso. C) Extração do fluido oral da corda para o saco plástico. D) Drenagem do fluido do saco para um tubo de ensaio.

Durante o fornecimento das cordas o comportamento dos animais foi observado de forma direta, por um único observador pelo método *ad libitum* (DECLARO, 2004) e registrado por fotos, vídeos e anotações em planilhas. As variáveis comportamentais avaliadas foram agitação, agressividade, prostração, interesse, atração e indiferença pela corda.

Os parâmetros de avaliação da qualidade da amostra foram transparência e turbidez. As amostras foram encaminhadas ao laboratório acondicionadas em caixa de isopor sobre refrigeração. No laboratório a amostra foi clarificada por centrifugação a 1.500 rpm por 3 min e estocada em alíquotas de 1mL à temperatura de -20°C até a realização das análises.

Resultados e Discussão

A aplicação do método das cordas de algodão para a coleta do fluido oral nos suínos, nas diferentes fases de produção, foi realizada com sucesso. O método das cordas de algodão representa diversas vantagens sobre a forma de obtenção das amostras tradicionais como o sangue. Dentre elas o método não é invasivo, maior segurança para o animal e o operador, reduz o tempo de trabalho, baixo custo, além disso, não requer treinamento específico e equipamentos especiais para a coleta (PRICKETT et al., 2008; KITTAWORNAT et al., 2012). Em contrapartida, a coleta de sangue por punção venosa ou no seio orbital causa um enorme desconforto e risco ao animal e ao operador (BARBOSA, 2005)

O material de eleição para o preparo das cordas foi o algodão que, diferente de outros materiais, especialmente, os sintéticos possuem alta capacidade de absorção. A literatura cita o uso de diferentes dispositivos para coleta do fluido oral como haste com extremidade de algodão e almofadas de algodão (CHALOUPKOVÁ et al., 2007; DALLA COSTA et al., 2008; HILLMANN et al., 2008). Os resultados mostraram que a corda com maior diâmetro (~5 cm) apresentou-se mais adequada para a coleta do fluido oral, sendo possível a recuperação da amostra um volume igual ou superior a 3mL.

O comprimento das cordas foi definido de acordo com a distância entre o operador e o animal. Neste experimento, o comprimento de 50 cm foi suficiente para coletar o fluido oral nas diferentes instalações (bairas individuais e coletivas). Recomenda-se que adaptações sejam feitas de acordo com a necessidade do estudo, bem como o espaço disponível entre o operador e o animal.

Para fixar a corda à mão do operador foi necessário realizar um nó simples na extremidade anterior à corda e proximal ao operador (Figura 1A). Essa estratégia foi decorrente dos animais

tenderem a puxar a corda durante a mastigação.

O tempo de escolha para a exposição das cordas aos animais foi de 5 min. Nos protocolos de técnicas moleculares (SAMBROOK e RUSSEL, 1988) e imunoenzimáticas (KITTAWORNAT et al., 2012), bem como a recuperação de patógenos, o volume de 3ml de amostra é suficiente para realizar análises laboratoriais e manter amostra para as contraprovas (BARBOSA, 2005).

A coleta do fluido oral em animais alojados em baias individuais e coletivas teve 100% de aceitação. O suíno é um animal de conhecida curiosidade e natureza exploratória, essa característica favorece o interesse do mesmo em se aproximar e mastigar a corda (GRANDIN e JOHNSON, 2010). Além disso, é comum nos atuais SPS encontrar alojamentos sem material para exploração (cama, serragem, feno) e enriquecimento ambiental, o que vem a facilitar o interesse do animal em mastigar a corda.

Na avaliação comportamental verificou-se que 100% dos animais mostraram-se atraídos pela corda de algodão. O experimento não utilizou estratégias adicionais para incentivar o animal à mastigação das cordas tais como estímulos gustativos, olfativos e diferentes cores das cordas, o que poderia onerar o procedimento de coleta e interferir na qualidade do fluido coletado.

Os animais foram naturalmente atraídos pelas cordas, enquanto um operador previamente treinado a segurava. Verificou-se o interesse dos animais em relação à corda, bem como a aceitação e a realização da mastigação em diferentes fases de produção, alojamento, com ou sem alimento disponível e aglomeração dos animais.

Nas baias coletivas todos os animais mostraram-se interessados pela corda, havendo competição para mordê-la. Para as coletas de fluido oral em baias com

grande população de animais e que visam um material que represente a coletividade é necessário que se estabeleçam diferentes pontos de coleta. Esses pontos devem ser planejados para que todos os animais de um determinado local possam ter acesso à corda e mastigá-la. Além disso, a distribuição das cordas em diferentes locais diminui a competição entre os animais.

As observações revelaram que somente os animais muito jovens, na faixa etária de um a quatro semanas de vida, não aceitaram a corda. No momento da exposição da mesma, os animais se mantiveram aglomerados em um canto da baía, evitando o contato com a corda. Acredita-se que os animais apresentaram medo em relação à corda pelo fato de a mesma ser um objeto desconhecido ou mesmo pela presença do operador no momento da coleta. Os autores O'Connor et al. (2010) relataram que mesmo após um período de adaptação de sete dias com o material de coleta, não foi possível coletar um volume de material suficiente para a realização do teste de cortisol salivar em suínos com quatro semanas de idade.

De acordo com as observações comportamentais, os animais tanto em baias individuais, quanto em baias coletivas foram receptivos em relação à corda. A alimentação *ad libitum* não altera o interesse do animal em relação à corda. No entanto, o fluido oral poderá sofrer alteração na coloração caso o animal se alimente momentos antes da coleta. Recomenda-se que para o diagnóstico laboratorial, tendo o fluido oral como matriz, deve-se evitar o arraçoamento nos momentos que antecedem a coleta, sob risco de alterar o resultado. Esses cuidados são corroborados com as recomendações do fabricante Kit SALIMETRICS usado para detectar e quantificar o cortisol salivar em humanos (SALIMETRICS, 2013).

Após o período de exposição das cordas aos animais, o líquido extraído foi avaliado macroscopicamente (Figuras 2A e 2B). Foi verificada a transparência do fluido, bem como a ausência de resíduos. A ausência de resíduos, provavelmente, pode estar associada à estratégia estabelecida para a coleta do fluido oral cerca de 1 hora antes do arraçoamento.

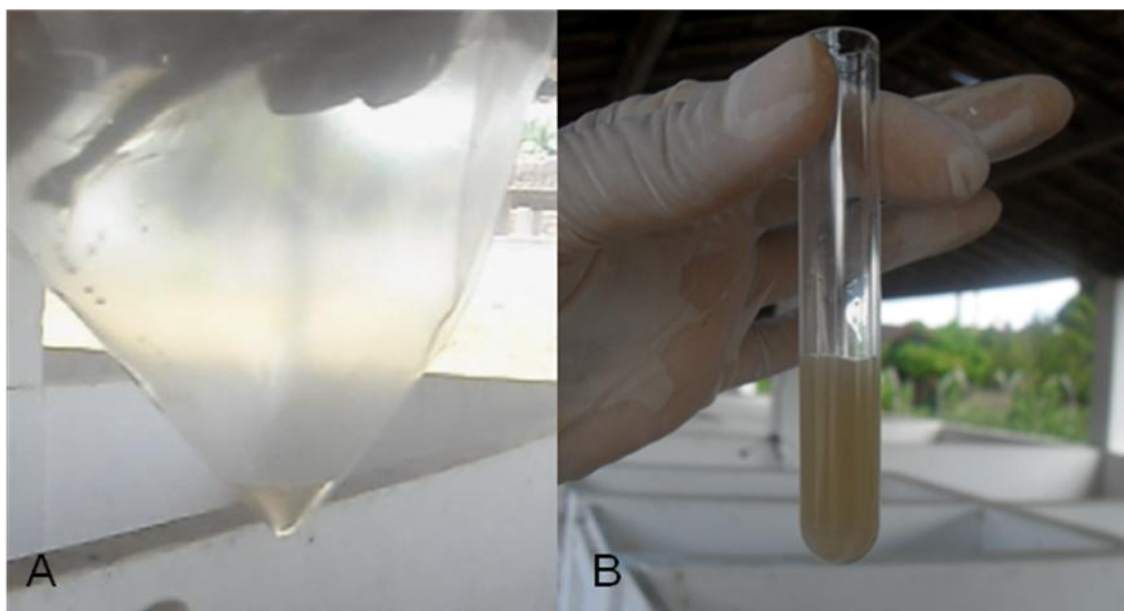


Figura 2. A) Fluido oral extraído das cordas de algodão após a mastigação pelos animais. B) Fluido oral drenado para o tubo de ensaio. Notar a ausência de resíduos.

Conclusão

A utilização do método das cordas de algodão é recomendada para a coleta do fluido oral em suínos em decorrência da simplicidade, segurança e de promover o bem-estar do animal. Além disso, o método garante a obtenção de amostras em quantidade e qualidade nas diferentes faixas etárias do ciclo de produção. O uso do fluido oral está ampliando as perspectivas nos testes laboratoriais, monitoramento das infecções no rebanho e no cuidado com o animal.

Agradecimentos

Ao Médico Veterinário Dr. Armindo Monteiro da Estação de Experimental de Carpina de UFRPE pelo apoio durante a realização do experimento.

Referências

ATKINSON, J. et al. Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.694, p.11-12, 1993.

BAPTISTA, R.I.A.A. **Avaliação comportamental e fisiológica de suínos em baias individuais e gaiolas metabólicas**. 2012. 144 f. (Mestrado em Ciência Veterinária) Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE.

BARBOSA, C.N. **Circovirus suíno – 2 em suídeos brasileiros: detecção viral pela imunohistoquímica e estudos sorológicos**. 2005. 96 f. (Doutorado em Ciência Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, MG.

CHALOUPKOVÁ, H. et al. Preweaning housing effects on behavior and physiological measures in pigs during the suckling and fattening periods. *Journal of Animal Science*, v.85, p.1741-1749, 2007.

COSTA, G. et al. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in oral-fluid samples obtained from experimentally infected pigs. *Journal of Swine Health and Production*, v.20, p.78-81, 2012.

DELIMA, A.J. et al. Origin and function of cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol*, v.31, p.55-76, 2000.

DALLA COSTA, O.A. et al. Tempo de jejum na granja sobre o perfil hormonal e os parâmetros fisiológicos em suínos de abate pesados. *Ciência Rural*, v.38, n.8, p.2300-2306, 2008.

DEL-CLARO, K. **Comportamento Animal. Uma Introdução à Ecologia Comportamental**. Jundiaí: Livraria Conceito, 2004. v.1. 132p.

DETMER, S.E. et al. Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.23, p.241-247, 2011.

HILLMANN, E. et al. Effects of weight, temperature and behaviour on the circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs. *Animal*, v.2, p.405-409, 2008.

HUMPHREY, S.P.; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, v.85, p.162-169, 2001.

GIMÉNEZ-LIROLA, L.G. et al. Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection. *Journal of Microbiological Methods*, v.92, p.113-121, 2013.

GRANDIN, T.; JOHNSON, C. **O bem-estar dos animais – Proposta de uma vida melhor para todos os bichos**. São Paulo: Rocco, 2010. 334p.

ISAKI, L. et al. Response of vaccinated swine to group E *Streptococcus* exposure. *Cornell Veterinarian*, v.63, p.579-588, 1973.

KITTAWORNAT, A. et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: Will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Research*, v. 154, p.170-176, 2010.

KITTAWORNAT, A. et al. Ring test evaluation of the repeatability and reproducibility of a Porcine reproductive and respiratory syndrome virus oral fluid antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.24, p.1057-1063, 2012.

MALUMUD, D.; RODRIGUEZ-CHAVEZ, R. Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent. Clinics North America*, v.55, p.159-178, 2010.

MANDEL, I.D. The diagnostic uses of saliva. *Journal Oral Pathology Medicine*, v.19, p.119-125, 1990.

MCKIE A. et al. Novel methods for the detection of microbial antibodies in oral fluid. **Lancet Infect Disease.** v.2, p.18–24, 2002.

O’CONNOR. E. A. et al. The impact of chronic environmental stressors on growing pigs, Sus scrofa (Part 1): stress physiology, production and play behavior. **The Animal Consortium,** v. 4, n.11, p.1899-1909, 2010.

PRICKETT J.R. et al. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. **Journal of Swine Health and Production.** v.1, p.86–91, 2008.

PRICKETT, J.R., ZIMMERMAN, J. The development of oral fluid-based diagnostics and

applications in veterinary medicine. **Animal Health Research Reviews.** v.11, p.207-216. 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual.** 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Press. 2001, p.345.

SALIMETRICS. Salivary Cortisol: enzyme immunoassay kit. Disponível em: <<http://www.salimetrics.com/analytes/cortisol>>. Acesso em: 28 ago. de 2013.

SCHAEFER R. et al. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v.33, p.61-73, 2013.

STRAW, B. E et al. **Diseases of Swine.** 9th ed. Iowa State University. p.1172. 2007.

STRECKFUS, C.F. et al. Saliva as a diagnostic fluid. **Oral Diseases.** v.8, p.69-76, 2002.