

PESQUISA DE *Salmonella* sp. EM SUÍNOS ABATIDOS SOB INSPEÇÃO MUNICIPAL.

Juliana Velasco

Adriano Bruzza

Verônica Schmidt

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Porto Alegre, RS.

veronica.schmidt@ufrgs.br

RESUMO

A pesquisa de micro-organismos nos alimentos é de vital importância, uma vez que, além de causadores de toxinfecções alimentares, servem de barreira às exportações e diminuem o tempo de vida de prateleira de produtos alimentícios. Garantir a inocuidade dos alimentos, assim como monitorar a contaminação dos produtos, é crucial para a saúde pública. Para garantir um alimento com qualidade e inocuidade é necessário uniformizar toda a cadeia produtiva desde a obtenção da matéria-prima até o produto final. No presente estudo, pesquisou-se a presença de *Salmonella* em amostras de linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal, bem como em quatro pontos da carcaça (papada, barriga, lombo e pernil), em 25 suínos abatidos em abatedouro-frigorífico sob inspeção municipal, provenientes de unidades produtivas que utilizam sobras alimentares como ração dos suínos. Verificou-se a presença de *S. Saintpaul* em conteúdo intestinal (4%) e linfonodos mesentéricos (12%), perfazendo um total de quatro (16%) suínos portadores; bem como a presença de *S. Saintpaul* e *S. Enteritidis* em suabes de papada (8,0%). Em 18 isolados de *Salmonella* observou-se resistência a tetraciclina

(66,6%), sulfá + trimetopim (38,8%), cloranfenicol (27,7%), nitrofurantoína (22,2%), cefalotina (22,2%), ampicilina (0,1%) e ácido nalidíxico (0,05%). A presença de suínos portadores de salmonela indica a necessidade de medidas preventivas no processo produtivo destes animais. Entretanto, a presença do agente na carcaça é indicativa de falhas na aplicação das boas práticas durante o abate.

Palavras-chave: Carcaça suína. Contaminação. Antimicrobianos.

ABSTRACT

The search for microorganisms in foods is of vital importance, since in addition to causing food poisoning, they serve as a barrier to exports and decrease the shelf life of food products. Ensuring food safety, as well as monitoring the contamination of products, is crucial for public health. In order to ensure food quality and food safety it is necessary to standardize the entire production chain, from obtaining the raw material to the final product. The current study investigated the presence of Salmonella in mesenteric lymph node samples and intestinal contents as well as four housing points (jowl, belly, loin and pork leg).

Twenty-five slaughtered pigs under municipal inspection, and finished in productive units using leftovers in pig feeding, were sampling. It was verified the presence of Salmonella in swabs of jowls (8.0%), identifying the serovars Saintpaul and Enteritidis and S. Saintpaul in intestinal content samples (4%) and mesenteric lymph nodes (12%), totaling four (16%) pigs carriers. It was determined the antimicrobial resistance profile of 18 isolates of Salmonella observing tetracycline resistance (66.6%) sulfá and trimethoprim (38.8%), chloramphenicol (27.7%), nitrofurantoin (22.2 %), cephalothin (22.2%), ampicillin (0.1%), and nalidixic acid (0.05%). The presence of carriage pigs indicates the need of preventive measures in the production process of these animals. However, the agent's presence in the housing is indicative of failures in the application of good practices during slaughter.

Keywords: Porcine carcass. Contamination. Antimicrobials.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior exportador de carne suína do mundo, produzindo em torno 3.227 mil toneladas

por ano, considerado um mercado em plena expansão (ABIEPCS, 2012).

A carne suína é considerada uma excelente fonte de proteínas, vitaminas e minerais para o consumidor. A evolução genética da espécie suína resultou na redução em 31% da gordura, 10% do colesterol e 14% de calorias, tornando a carne suína brasileira mais magra e nutritiva, além de saborosa (ABIEPCS, 2012). Como consequência, o crescimento da produção de suínos tem sido em cerca de 4% ao ano, sendo os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul os principais produtores de carne suína do País. Atualmente, o Brasil representa 10% do volume exportado de carne suína no mundo, chegando a lucrar mais de US\$ 1 bilhão por ano (BRASIL, 2010).

A carne suína, bem como outros produtos cárneos, pode se tornar carreadora de micro-organismos patogênicos ao homem, sendo que as

doenças transmitidas por alimentos (DTAs) estão entre as maiores causadoras de enfermidades na população mundial. As DTAs constituem um sério problema de saúde pública em diversos países e tem como fonte de infecção a ingestão de água e alimentos contaminados (NOTERMNS & HOOGENBOOM-VERDEGAL, 1992), pela manipulação e conservação inapropriadas e contaminações cruzadas entre alimentos crus e processados (COSTALUNGA & TONDO, 2002).

As bactérias estão entre os principais agentes causadores de DTAs, sendo *Salmonella* sp. a prevalente nos casos de surtos. Estima-se que 15 a 20% dos casos de salmonelose humana possam estar relacionados à ingestão de produtos de origem suína (BERENDS et al., 1998; EFSA, 2010).

Considera-se que o número de suínos portadores de salmonelas que

entra na linha de abate de um abatedouro-frigorífico é o primeiro ponto crítico de controle (PCC) nos programas de qualidade de carcaças suínas (BERENDS et al., 1996), uma vez que os suínos podem se infectar com apenas 30 minutos de contato com salmonelas (HURD et al., 2002). Deste modo, a baia de espera torna-se um importante ponto crítico a ser avaliado, uma vez que o ambiente contaminado, associado ao estresse pré-abate, permite a invasão do trato gastrointestinal e linfonodos após duas horas de contato com o micro-organismo (HURD et al., 2001).

Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi determinar a ocorrência de suínos portadores de salmonelas na linha de abate de um abatedouro-frigorífico sob inspeção municipal e sua relação com a presença do micro-organismo em pontos da carcaça.

MATERIAL E MÉTODOS

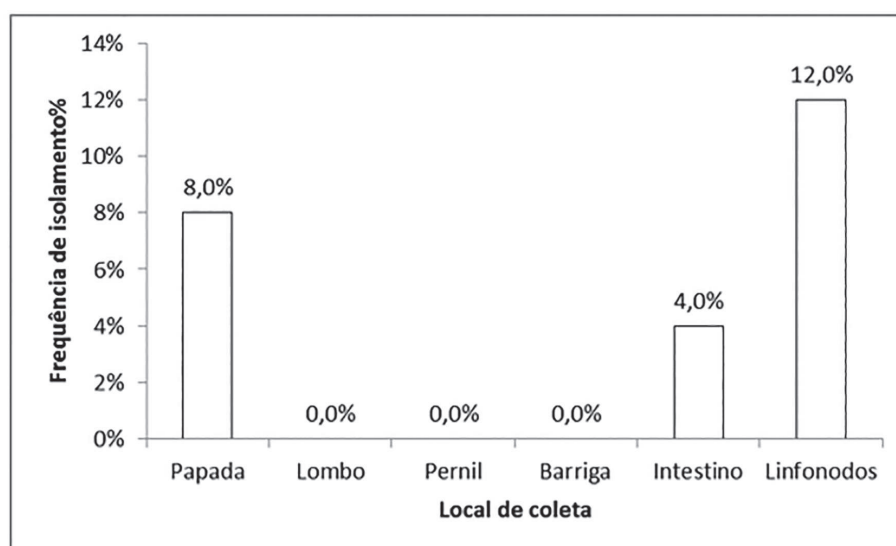
O estudo foi realizado em um abatedouro-frigorífico sob Inspeção Municipal (SIM), no estado do Rio Grande do Sul, com capacidade de abate para cinco suínos por dia. Na Figura 1 está representado o fluxograma do abate adotado no estabelecimento.

No período de coletas, de agosto de 2012 a janeiro de 2013, em intervalos de 21 dias, realizaram-se cinco visitas ao estabelecimento. Coletaram-se amostras de conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos, totalizando 25 amostras de cada. A coleta dos linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal foi realizada como descrito por Bessa et al. (2004).

Posteriormente, no interior da câmara fria, amostraram-se quatro regiões da carcaça: lombo, papada, pernil e barriga, utilizando-se *swabs* e moldes de 100 cm², como descrito por Pissetti et al. (2012). Logo após, os *swabs* foram acondicionados em

Figura 1 – Fluxograma do abate de suínos em abatedouro-frigorífico sob inspeção municipal em Porto Alegre, RS.



Figura 2 - Frequência de *Salmonella* sp. por sítio de isolamento da carcaça suína.

embalagens plásticas contendo água peptonada a 0,1% e mantidos em caixas isotérmicas até a chegada ao laboratório para pesquisa qualitativa de *Salmonella* sp.

Os suínos abatidos eram provenientes de unidades produtivas que utilizavam sobras alimentares como ração animal, integrando um Programa de Reaproveitamento de Resíduos na Alimentação de Suínos (JU-FFO, 2013).

Pesquisa de *Salmonella*

Pesaram-se 25 g de conteúdo intestinal e de linfonodos mesentéricos, os quais foram acrescidos de 225 mL de água peptonada tampoadada, homogeneizados durante 60 segundos em homogeneizador e incubados a 37°C, por 24 horas (etapa de pré-enriquecimento). Após, aliquotas de 1 e 0,1 mL de cada amostra foram inoculadas, respectivamente, em 9 mL de caldo Tetrationato Müller-Kauffmann e em 9,9 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, e incubados em banho-maria a 42°C, por 24 horas (enriquecimento seletivo). De cada tubo de enriquecimento

seletivo, utilizando-se alça de platina, retiraram-se alíquotas que foram semeadas em placa de petri contendo ágar Xilose Lisina Tergitol-4 (XLT4) e ágar Verde Brilhante, Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS) com Novobiocina 0,004%. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 a 48 horas. As colônias suspeitas no meio seletivo foram submetidas a provas bioquímicas e sorológicas (soro *Salmonella* Polivalente Somático - Probac), conforme Michael et al. (2003). As amostras confirmadas foram enviadas à Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), para sorotipificação. A detecção de *Salmonella* spp. foi realizada conforme a IN nº 62 (BRASIL, 2003).

Perfil de resistência a Antimicrobianos

Para determinação do perfil de resistência realizou-se antibiograma de acordo com CLSI (2013). Para tanto, os isolados confirmados como *Salmonella* foram repicados em Agar Tripton de Soja (TSA) e incubados a 37°C, por 24 h. Após, uma porção da massa bacteriana foi suspensa e

homogeneizada em solução salina a 0,85% estéril, sendo a turbidez da suspensão comparada à do padrão da escala de McFarland. Com auxílio de swabs embebidos nessa suspensão bacteriana, as amostras foram estriadas em placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton em três direções, girando a placa em ângulos de 100 Graus após cada estria. Após, realizou-se a aplicação dos discos impregnados com antimicrobianos: Norfloxacin (10µg), amicacina (30µg), ciprofloxacina (5 µg), amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg), levofloxacina (5 µg), azitromicina (15 µg), sulfametaxol + trimetropim (25 µg), tetraciclina (30 µg), doxiciclina (30 µg), cefalotina (30 µg) e ácido nalidíxico (15 µg). As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após a incubação, as placas foram examinadas para verificar se houve contaminações e efetuar a leitura dos halos. A inspeção dos halos foi feita com auxílio de um halômetro ou paquímetro e comparadas com a tabela de desempenho padrão de susceptibilidade a antibióticos, sendo classificados como sensíveis ou resistentes.

Análise estatística

A análise dos resultados foi realizada de forma descritiva. O cálculo da frequência de aparecimento de *Salmonella* por região analisada foi realizado por meio de cálculo de percentagem. O programa utilizado foi Microsoft Excel 2013.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 25 suínos amostrados, em seis (24%) identificou-se a presença de salmonelas; destes, a presença de salmonelas foi determinada em linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal, perfazendo um total de quatro (16%) suínos portadores. Nos *swabs* de carcaça, apenas na região da papada foi identificada a presença de salmonelas (Figura 2).

A prevalência de suínos portadores de salmonelas em estudos realizados no Brasil tem sido variável, dependendo da região e do sistema de produção. No Mato Grosso do Sul, Silva et al. (2009) observaram prevalência semelhante (16,6%) ao presente estudo e em São Paulo, Matsubara (2005) verificou prevalência de 5,4%. Já, no Rio Grande do Sul, foram observadas prevalências de 62,5% a 85,0% (BESSA et al., 2004, SCHWARZ et al., 2009), superiores ao encontrado no presente estudo.

Entre os fatores de risco à contaminação por salmonelas encontra-se a alimentação, uma vez que em sistemas integrados de produção, onde a

alimentação é baseada em ração concentrada, a presença de salmonelas pode variar de 1,7% a 7,1% (PELLEGRINI, 2012).

No estudo de Juffo et al. (2013), os animais eram provenientes de unidades de produção que integram o projeto de utilização de sobras alimentares na alimentação de suínos, as quais demonstraram ser isentas de salmonelas.

Nos isolados de *swabs* de papada, identificou-se *S. Saintpaul* e *S. Enteritidis* sendo que também nas amostras de conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos, determinou-se a presença do sorovar Saintpaul.

Também Matsubara (2005) observou maior percentual de isolamentos de salmonelas na região da papada (56,2% das amostras positivas). Entretanto, o autor verificou a presença do micro-organismo, ainda, nas regiões do peito e pernil.

O sorotipo Saintpaul é reconhecidamente um agente patogênico, responsável por apresentar quadros agudos de diarreias e enterites, levando pacientes a internações e até mesmo ao óbito. Por se tratar de alto grau de tecnificação no processamento agroindustrial, a contaminação por agentes patogênicos está atrelada ao processo de boas práticas propriamente dito. Distúrbios gastrointestinais são muito comuns nas granjas de suínos e de aves, onde agentes com importância patogênica infectam parte dos lotes que serão abatidos e,

consequentemente, os consumidores dos seus produtos e subprodutos (JACKSON & COCKCROFT, 2007).

Em maio de 2008, o estado do Novo México, nos Estados Unidos, notificou 19 casos de quadros diarreicos agudos em pacientes atendidos, sendo sete destes diagnosticados como salmonelose com sorotipo Saintpaul (BEHRAVESH et al., 2011). A vigilância epidemiológica dos Estados Unidos, em consequência do surto, ampliou a investigação dos casos notificados nos meses subsequentes e chegou a isolar o agente em vegetais crus (tomates, pimentas e pepinos) servidos em restaurantes (BEHRAVESH et al., 2011).

Estudos realizados no Brasil têm registrado isolamentos dos sorovares Derby (SILVA et al., 2009), Tiphymurium (SCHWARZ et al., 2009, SILVA et al., 2009) Agona e Panama (SCHWARZ et al., 2009). Quanto ao sorovar Saintpaul, este foi registrado em suínos ao abate (KI et al., 2007) e embutidos (CASTAGNA et al., 2004), em percentuais que variam de 13,8 a 22%.

A associação da prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e a contaminação de embutidos tipo frescal foi demonstrada por Castagna (2004). Entretanto, no presente estudo não se observou concomitância entre a presença de portadores e os isolamentos na carcaça. Contudo, falhas nos procedimentos de abate e higienização favoreceram

Tabela 1 - Frequências de resistência de sorovares de *Salmonella*.

Número de amostras	Sorovar	Perfil de resistência
1	Saintpaul	DA – TET
4	Saintpaul	DA
1	Enteritidis	DA e NAL

Legenda: NAL = ácido nalidixico; TET = tetraciclina; DA = Clindamicina.

a contaminação cruzada no ambiente e a probabilidade de haver a contaminação da carne durante o processo de abate é alta (SILVA, 2004), havendo a necessidade de realizar procedimentos corretos e padronizados, prevenindo a contaminação cruzada com higiene permanente e controle minucioso dos pontos considerados críticos, segundo RDC 12 (BRASIL, 2001).

Embora *Salmonella* seja considerada potencialmente patogênica para humanos, a maioria dos surtos tem sido relacionados a alguns sorovares, sendo *S. Enteritidis* um dos mais frequentes (SCHLOSSER, 2000). No Brasil, os sorovares Typhimurium e Enteritidis foram frequentemente isolados em casos de infecção alimentar para humanos (ESPER et al., 1998; JAKABI et al., 1999), demonstrando a possibilidade do suíno ter papel importante na transmissão de salmonelose para humanos (BESSA et al., 2004).

Quando testados frente a antimicrobianos, verificou-se que os seis isolados foram resistentes a Clindamicina; sendo um isolado de Saintpaul resistente a Tetraciclina e o isolado de Enteritidis, resistente ao Ácido Nalidíxico (Tabela 1).

Resistência de *S. Enteritidis* ao ácido nalidíxico foi anteriormente demonstrada (CASTAGNA et al., 2001; MATSUBARA, 2005). Entretanto, resistência a um maior número de princípios ativos foi verificada em relação aos isolados do presente estudo, como sulfonamida, tetraciclina, cotrimoxazol e ampicilina, antimicrobianos frequentemente utilizados no manejo dos animais nas granjas (CASTAGNA et al., 2001).

O surgimento de bactérias resistentes a antimicrobianos tem recebido considerável atenção nos últimos anos (YAN, et al, 2003) uma vez que os antimicrobianos da linha humana usados em comum com a linha veterinária têm causado grandes

impactos na resistência bacteriana, como exemplos, sulfonamidas, tetraciclina, lincosaminas, cefalosporinas e penicilinas (TEUBER, 2001). O perfil de resistência a antimicrobianos tem sido usado como referência adicional no processo de tipificação das linhagens bacterianas. Concomitantemente, o monitoramento da resistência fornece dados sobre a situação das populações bacterianas em diferentes áreas geográficas e ao longo do tempo (FEDORKA-CRAY et al, 1999).

CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados observados, a implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) em abatedouros-frigoríficos deverá ser rigorosamente monitorada uma vez que os cuidados de vigilância dos agentes causadores de toxinfecções alimentares devem ser permanentes.

REFERÊNCIAS

- ABIEPCS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína **Relatório ABIEPCS 2012**. Disponível em: <http://www.abiepcs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIEPCS_relatorio_2012_pt.pdf> Acesso em: 30/11/2014.
- BEHRAVESH, CB; MODY, RK; JUNGK, J. 2008 Outbreak of Salmonella Saintpaul Infections Associated with Raw Produce. **The New England Journal of Medicine**. v.364, p.918-927, 2011.
- BERENDS, BR; URLINGS, HAP; SNIJDERS, JMA. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding Salmonella spp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, 30:37-53, 1996.
- BERENDS, BR et al. Impact on human health of Salmonella ssp. on pork

in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. **International Journal of Food Microbiology**, 44(3):219-229, 1998.

BESSA, MC; COSTA, M; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* em suínos abatidos em frigoríficos do RS. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 24(2):80-84, Abr/Jun, 2004.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária. RDC nº 12/2001. **Regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 05 jun. 2017.

BRASIL- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Instrução Normativa Nº 62/2003. **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 05 jun. 2017.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.

Suínos: Mercado Interno, 2010. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em 15/04/2012.

CASTAGNA, SMF et al. Resistência a antimicrobianos de amostras de *Salmonella* sp. isoladas de suínos abatidos no estado do Rio Grande do Sul. **Arq da Faculdade de Veterinária**, 29:44-49, 2001.

CASTAGNA, SMF et al. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32(2):141-147, 2004.

COSTALUNGA, S; TONDO, EC. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33:342 – 346, 2002.

EFSA. Quantitative Microbiological Risk Assessment on *Salmonella* in

- slaughter and brether pigs: Final Report. **EFSA Journal** 2010, 437p. Disponível em: <www.efsa.europa.eua>, 2010.
- ESPER, MRNR et al. *Salmonella*: Sorotipos identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1997. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 57:45-50, 1998.
- FEDORKA-CRAY, PJ et al. National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Results for Swine. 1999 In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 3 **Proceeding**. Washington: Adix, 1999. p. 248-249.
- HURD, HS et al. Rapid Infection in Market-Weight Swine Following Exposure to a *Salmonella* Typhimurium-Contaminated Environment. **Applied Environmental Bacteriology**, 62: 1194-1197, 2001.
- HURD, HS et al. Measuring *Salmonella* prevalence in finish swine; evaluation of three methods In: IPVS CONGRESS, 17, 2002, Iowa. **Proceedings**. Iowa: IPVS, p313. 2002.
- JACKSON, PGG; COCKCROFT, PD. **Handbook of Pig Medicine**. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2007. 296p.
- JAKABI, M et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.58, p.47-51, 1999.
- JUFFO, DLEE. **Resíduos Sólidos Orgânicos: Da Geração em estabelecimentos de Produção de Alimentos em um Shopping à Destinação Final na Alimentação de Suínos**. 70f. 2013. Dissertação (Mestrado) – programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- JUFFO, DLEE et al. Estudo nutricional e microbiológico de resíduos sólidos orgânicos utilizados na alimentação de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.42, n.1223, 2014.
- KICH, JD et al. Development and application of an enzymelinked immunosorbent assay to detect antibodies against prevalent *Salmonella* serovars in swine in southern **Brazilian Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation**, 19:510-517, 2007.
- MATSUBARA, EN. **Condição higiênico-sanitária de meias-carcaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise da utilização de lista de verificação para avaliar Boas Práticas no abate de suínos**. 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br> Acesso em 30/12/2012
- MICHAEL, GB et al. Comparison of Different Selective Enrichment Steps to Isolate *Salmonella* sp. from Feces of Finishing Swine. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34:138–142, 2003.
- NOTERMANS, S; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, AH. Existing and emerging foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, 15(3-4): 197-205, 1992.
- SCHWARZ, P et al. *Salmonella enterica*: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arq Bras Med Vet Zootec**, 61(5):1028-1034, 2009.
- SILVA, LE. Infecção por *Salmonella* spp em suínos. **Suinocultura em foco** – Favet - UFRGS. Ano IV, n.11, p.4-5, Porto Alegre, 2004.
- SILVA, MC et al. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**, 39(1):266-268, 2009.
- SCHLOSSER, W et al. Analysis of *Salmonella* serotypes from selected carcasses and raw ground products sampled prior to implementation of the pathogen reduction; Hazard analysis and critical control point final rule in the US. **International Journal of Food Microbiology**, 58:107-111, 2000.
- PELLEGRINI, DCP. **Avaliação de pontos de contaminação por *Salmonella* sp. E coliformes totais durante preparo de dietas para suínos**. 145f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- PISSETTI, C et al. Detecção de *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* em carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento. **Acta Scientiae Veterinariae**, 40(4):1071, 2012.
- TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, 4(5):493-499, 2001.
- YAN, SS et al. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, 4:189-204, 2003.