

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Salmonella enterica***  
**SUBSPÉCIE *enterica* SOROTIPO PANAMA E TENTATIVA**  
**DE TRANSMISSÃO NASO-NASAL EM LEITÕES**  
**DESMAMADOS**

**Luís Guilherme de Oliveira**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando O. S. Carvalho**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, *Campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2008

O48i Oliveira, Luís Guilherme de  
Infecção experimental por *Salmonella enterica* subspécie *enterica*  
sorotipo Panama e tentativa de transmissão naso-nasal em leitões  
desmamados / Luís Guilherme de Oliveira. -- Jaboticabal, 2008  
xii, 56 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: Luiz Fernando de Oliveira e Silva Carvalho

Banca examinadora: Geraldo Camilo Alberton, Adolorata  
Aparecida Bianco Carvalho

Bibliografia

1. Infecção experimental. 2. *Salmonella* Panama. 3. Suínos.  
4. Transmissão naso-nasal I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.981.49:636.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da  
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus  
de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



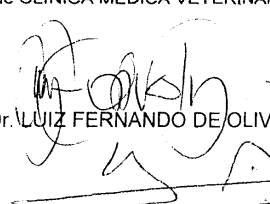
### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Salmonella enterica*  
SUBSPÉCIE *enterica* SOROTIPO PANAMA E TENTATIVA  
DE TRANSMISSÃO NASO-NASAL EM LEITÕES DESMAMADOS

**AUTOR:** LUÍS GUILHERME DE OLIVEIRA

**ORIENTADOR:** Dr. LUIZ FERNANDO DE OLIVEIRA E SILVA CARVALHO

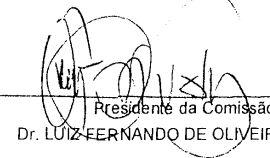
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA  
VETERINÁRIA área de CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:

  
Dr. LUIZ FERNANDO DE OLIVEIRA E SILVA CARVALHO

  
Dr. GERALDO CAMILO ALBERTON

  
Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO

Data da realização: 19 de fevereiro de 2008.

  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. LUIZ FERNANDO DE OLIVEIRA E SILVA CARVALHO

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**LUÍS GUILHERME DE OLIVEIRA** – natural de Santo Antônio da Platina – Paraná, nascido no dia 20 de maio de 1981. Graduiu-se em Medicina Veterinária na Universidade Federal do Paraná (UFPR – *Campus* Palotina) em fevereiro de 2004. Durante o curso de graduação, foi, por três anos consecutivos, bolsista de projeto de extensão rural, além de monitor das disciplinas de suinocultura e bovinocultura de corte. Realizou estágio curricular na empresa SEARA Alimentos S.A., onde, no ano de 2004 e 2005, exerceu cargo de médico veterinário do departamento de assistência técnica de suínos, unidade de Forquilha – SC, sendo responsável pela sanidade de suínos do sistema de produção integrado desta unidade. Fez curso de especialização (*Lato Sensu*) MBA – Gestão Empresarial na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), concluído em julho de 2005. Iniciou mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, em março de 2006, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/ UNESP, como bolsista da CAPES.

***“Aí onde estão as nossas aspirações, o nosso trabalho, os nossos amores – aí está o lugar do nosso encontro cotidiano com Cristo. É no meio das coisas mais materiais da terra que nos devemos santificar, servindo a Deus e a todos os homens. Na linha do horizonte, meus filhos, parecem unir-se o céu e a terra. Mas não: onde de verdade se juntam é no coração, quando se vive santamente a vida diária...”***

**São Josemaría Escrivá: da homilia *Amar o mundo apaixonadamente*, 8-X-1967.**

***Agradeço imensamente a Deus, pelas  
graças concedidas nessa jornada...  
Dedico a minha mãe, Maura, e a toda  
minha família que sempre me  
amaram, incentivaram e apoiaram  
durante toda minha vida...***

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, que por seu Amor proporciona tantos momentos felizes e realizações; e Nossa Senhora, Santa Mãe de Deus, por suas intercessões;*

*A minha Família, em especial a minha mãe Maura, o meu irmão João Fábio, a minha cunhada Vanessa, as sobrinhas Gabriela e Rafaela, que sempre estiveram ao meu lado fazendo de nossa família um lar feliz e abençoado;*

*Ao Prof. Dr. Luiz Fernando de Oliveira e Silva Carvalho, pela orientação, amizade e confiança; Ao Prof. Dr. Geraldo C. Alberton e Profa. Dra. Adolorata A. B. Carvalho, pelo auxílio na correção da dissertação;*

*Ao companheiro de trabalho e amigo Guido C. I. H. Masson, que fez parte diretamente de toda a execução deste trabalho;*

*Ao Celso J. B. Oliveira, Carla Freschi e Daniela Gomes, pois com o auxílio técnico e experiência por eles transmitida foi possível à realização deste trabalho;*

*A equipe do Laboratório de Pesquisa em Clínica e Cirurgia Veterinária, Renata, Cláudia, Ana e Paulo, pelos auxílios prestados no laboratório;*

*A Dra. Jalusa Kich da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e ao Instituto Adolfo Lutz – SP, pelo suporte laboratorial;*

*Aos estagiários, Joyce Leite, Luiz Cândido e Seth Baker, pela dedicação nos trabalhos desenvolvidos;*

*Ao meu amigo João Humberto T. de Castro, pois seu incentivo, amizade e exemplo me ajudaram em diversos momentos durante minha vida acadêmica;*

*A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp, que me acolheu neste período; e a CAPES pela concessão de bolsa do mestrado;*

*Aos meus amigos, Fábio Dias, Maurício Nonino, João Sanches Aneas, Luciane Laskoski, Maria de Jesus Soares, Pe. Milton Kenan, Pe. Paulinho, Bruno(Mok), Erico (Japa), aos moradores da república Antro do HV, e a todos que fizeram parte desta jornada, cujos nomes não foram citados, mas que contarão sempre com o meu profundo e sincero agradecimento. O meu muito obrigado pela amizade de vocês...!!!*

## SUMÁRIO

|                                                                           | <b>Página</b> |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Lista de Figuras.....                                                     | x             |
| Lista de Quadros.....                                                     | xi            |
| Lista de Tabelas.....                                                     | xii           |
| RESUMO.....                                                               | xiii          |
| ABSTRACT.....                                                             | xiv           |
| <br><b>1. Introdução.....</b>                                             | <br><b>1</b>  |
| <br><b>2. Revisão de literatura.....</b>                                  | <br><b>3</b>  |
| 2.1. Breve histórico da <i>Salmonella</i> sp.....                         | 3             |
| 2.2. Importância da infecções por <i>Salmonella</i> sp.....               | 3             |
| 2.3. O gênero <i>Salmonella</i> .....                                     | 5             |
| 2.4. A epidemiologia da salmonelose.....                                  | 7             |
| 2.5. Introdução de <i>Salmonella</i> sp. no sistema de produção.....      | 9             |
| 2.6. Fatores e análise de risco.....                                      | 11            |
| 2.7. Formas de ocorrência de <i>Salmonella enterica</i> em suínos.....    | 12            |
| 2.8. Métodos diagnósticos de <i>Salmonella</i> sp.....                    | 14            |
| <br><b>3. Objetivos.....</b>                                              | <br><b>17</b> |
| <br><b>4. Material e métodos.....</b>                                     | <br><b>18</b> |
| 4.1. Seleção da granja fornecedora dos animais.....                       | 18            |
| 4.2. Seleção dos animais.....                                             | 19            |
| 4.3. Descrição dos isoladores.....                                        | 20            |
| 4.4. Lavagem e desinfecção dos isoladores.....                            | 22            |
| 4.5. Montagem do sistema.....                                             | 23            |
| 4.6. Água e ração experimental.....                                       | 24            |
| 4.7. Amostra de <i>Salmonella</i> utilizada na infecção experimental..... | 25            |

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.8. Preparo e administração do inóculo.....                                      | 27        |
| 4.9. Colheita de amostras.....                                                    | 27        |
| 4.10. Bacteriologia.....                                                          | 29        |
| 4.11. Teste de ELISA.....                                                         | 32        |
| <br>                                                                              |           |
| <b>5. Resultados.....</b>                                                         | <b>33</b> |
| 5.1. Período pré-inoculação.....                                                  | 33        |
| 5.1.1. Seleção da granja.....                                                     | 33        |
| 5.1.2. Resultados do monitoramento ambiental.....                                 | 34        |
| 5.1.3. Resultados do monitoramento dos animais no período pré-<br>inoculação..... | 35        |
| 5.2. Período pós-inoculação.....                                                  | 36        |
| 5.2.1. Monitoramento pós-inoculação.....                                          | 36        |
| 5.2.2. Necropsia e exames microbiológicos <i>post mortem</i> .....                | 37        |
| 5.3. Teste de ELISA.....                                                          | 38        |
| 5.4. Antibiograma e Sorotipificação.....                                          | 39        |
| <br>                                                                              |           |
| <b>6. Discussão.....</b>                                                          | <b>40</b> |
| <br>                                                                              |           |
| <b>7. Conclusão.....</b>                                                          | <b>43</b> |
| <br>                                                                              |           |
| <b>8. Referências.....</b>                                                        | <b>44</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                             | <b>Página</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Figura 1.</b> Isolador usado no experimento.....                                                                                                         | 21            |
| <b>Figura 2.</b> Vista interna, por uma das câmaras, do orifício que permite o contato naso-nasal entre os animais.....                                     | 22            |
| <b>Figura 3.</b> Ilustração esquemática da montagem dos isoladores.....                                                                                     | 24            |
| <b>Figura 4.</b> Câmara de passagem – vista externa.....                                                                                                    | 28            |
| <b>Figura 5.</b> Colheita de amostras de tecidos para o isolamento microbiológico.....                                                                      | 29            |
| <b>Figura 6.</b> Esquema representativo do protocolo de isolamento bacteriológico utilizado para detecção de <i>Salmonella</i> Panama <sup>Nal+</sup> ..... | 31            |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                                                                                                            | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Quadro 1.</b> Desenho experimental utilizado para estudo da transmissão pela via naso-nasal de <i>Salmonella</i> Panama entre leitões desmamados....                                                    | 19     |
| <b>Quadro 2.</b> Antibiógrama da cepa de <i>Salmonella</i> Panama <sup>Nal<sup>+</sup></sup> antes da inoculação.....                                                                                      | 26     |
| <b>Quadro 3.</b> Resultado da avaliação do grau de vulnerabilidade da granja produtora de suínos à entrada de patógenos externos. Modelo proposto pela Instrução Normativa nº 19 de 2002 - MAPA, 2002..... | 33     |
| <b>Quadro 4.</b> Resultados dos testes de ELISA realizados nos animais pré e pós-inoculação.....                                                                                                           | 39     |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                        | <b>Página</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Tabela 1.</b> Composição percentual da ração usada na alimentação dos animais experimentais.....                                                                                                                                    | 25            |
| <b>Tabela 2.</b> Resultados das análises de isolamento bacteriológico para <i>Salmonella</i> sp. no monitoramento ambiental.....                                                                                                       | 35            |
| <b>Tabela 3.</b> Resultados da detecção de <i>Salmonella</i> sp. pelo isolamento bacteriológico a partir de amostras de suabes retais colhidos individualmente dos suínos no período de adaptação.....                                 | 35            |
| <b>Tabela 4.</b> Resultados da detecção de <i>Salmonella</i> Panama <sup>nal+</sup> pelo isolamento bacteriológico a partir de amostras de suabes retais colhidos individualmente dos suínos nos isoladores. Jaboticabal-SP, 2007..... | 37            |
| <b>Tabela 5.</b> Resultados da detecção de <i>Salmonella</i> Panama <sup>nal+</sup> pelo isolamento bacteriológico a partir de amostras de tecidos. Jaboticabal-SP, 2007.....                                                          | 38            |

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Salmonella enterica* SUBSPÉCIE *enterica*  
SOROTIPO PANAMA E TENTATIVA DE TRANSMISSÃO NASO-NASAL EM  
LEITÕES DESMAMADOS**

**RESUMO** – A transmissão pela via fecal-oral é considerada o mais importante meio de disseminação de *Salmonella* sp. entre os suínos. Foi comprovada que a transmissão de *Salmonella* sp. através do contato naso-nasal entre suínos pode ser viável. Porém, alguns experimentos não conseguiram demonstrar tal transmissão em determinados sorotipos de *Salmonella enterica*. Este ensaio teve como objetivo produzir infecção experimental de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Panama e verificar a importância da via naso-nasal na transmissão entre leitões desmamados. Seis leitões recém-desmamados foram adquiridos de granja previamente selecionada, livre de *Salmonella* sp. Análises bacteriológicas confirmaram que todos os animais estavam livres de contaminação por *Salmonella* sp. Utilizaram-se baias isoladoras que proporcionavam o contato naso-nasal e eliminavam a possibilidade de outras vias de transmissão e de contaminação externa. Três grupos foram formados: controle, sentinela e infectados. Os leitões do grupo controle e do grupo sentinela receberam, individualmente, por via oral, solução estéril, enquanto que leitões do grupo infectado receberam inóculo contendo  $2,16 \times 10^{10}$  UFC de *Salmonella* Panama. Foram alojados nos isoladores respectivos e retirados depois de 14 dias, período no qual amostras de fezes eram colhidas e avaliadas diariamente. Os animais foram necropsiados e amostras de tecidos colhidas. Realizaram-se testes bacteriológicos, ELISA e sorotipificação. Houve infecção sistêmica por *Salmonella* Panama nos animais do grupo infectado, porém os resultados revelaram não haver a transmissão pela via naso-nasal entre leitões desmamados, pois em nenhum momento o agente foi isolado dos animais sentinelas.

**Palavras-chave:** infecção experimental, *Salmonella* Panama, suínos, transmissão naso-nasal.

**EXPERIMENTAL INFECTION FOR *Salmonella enterica* SUBSPECIE *enterica*  
SEROVAR PANAMA AND TENTATIVE OF NOSE-TO-NOSE TRANSMISSION IN  
WEANED PIGS**

**ABSTRACT** - The faecal-oral transmission is considering the most important route for transmission of *Salmonella* sp. between pigs. It has been proven that the *Salmonella* sp. transmission through the nose-to-nose contact among pigs can be viable. However, current data could not demonstrate such transmission in certain serovars of *Salmonella enterica*. This study aimed to produce experimental infection of *Salmonella enterica* serovars Panama and verifies the importance of the nose-to-nose contact in the transmission among weaned pigs. Six recently-weaned pigs were acquired from farm previously selected; free from *Salmonella* sp. Bacteriological analysis ruled out previous *Salmonella* sp contamination in all selected subjects. Isolations cabinets were used that provided the nose-to-nose contact and to eliminated the presence of other transmission routes and of outside contamination. Three groups were formed: control, sentinel and infected. The pigs of the control group and of the sentinel group, received, individually, orally sterile solution, while pigs of the infected group received solution containing  $2,16 \times 10^{10}$  CFU of *Salmonella* Panama. They were housed in the respective isolations cabinets and removed from it after 14 days, period in which samples of faeces were collected and submitted to daily analysis. The animals were necropsied and samples of tissues were collected. They were tested by bacteriological analysis, ELISA and serovars typification. There was systemic infection for *Salmonella* Panama in the animals of the infected group; however there was non transmission by nose-to-nose contact among weaned pigs, justifying the non isolation of the agent in the sentinel group at any moment.

**Keywords:** experimental infection, *Salmonella* Panama, swine, nose-to-nose transmission.

## 1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva da carne suína está constantemente sendo desafiada pela *Salmonella* sp. Encontram-se duas razões para a crescente preocupação em relação às infecções por este agente em suínos. A primeira é a doença clínica, provocada principalmente pelos sorotipos Choleraesuis e Typhimurium, que podem causar um quadro de gastroenterites e septicemias, porém esta forma parece não estar sendo relatada no Brasil ultimamente. A segunda, intrínseca à ubiquidade do agente, é que os suínos podem infectar-se por grande número de sorotipos e atuar como fonte de infecção da salmonelose humana, decorrente do consumo de carne contaminada.

A salmonelose tornou-se a zoonose mais importante nos países desenvolvidos. Segundo dados epidemiológicos, os ovos, a carne de aves e seus derivados são as principais fontes de salmonelose humana, seguidos pela carne de suíno. O Brasil ocupa hoje o quarto lugar tanto na produção como na exportação mundial de carne suína (ABIPECS, 2007). Comparativamente aos demais países, o Brasil é aquele que apresenta maiores condições de expandir sua indústria suinícola. Além das vantagens comparativas, o Brasil necessita desenvolver suas vantagens competitivas, o que inclui qualidade sanitária de seus produtos, pois a ausência de padrões de qualidade torna-se prejudicial à comercialização.

Verifica-se a necessidade de estabelecer estratégias de controle da *Salmonella* sp. em toda a cadeia alimentar e, em especial, na produção primária. Nas criações animais, a adoção de medidas gerais de higiene e manejo é básica para reduzir a prevalência deste patógeno, se bem que elas sejam insuficientes. Não há dúvida de que taxas de prevalência de *Salmonella* sp. na produção animal devem ser mantidas as menores possíveis, pois há correlação direta entre as taxas de contaminação de carcaças por *Salmonella* sp. e sua frequência nos animais destinados ao abate.

No entanto, o maior entrave no controle das infecções por *Salmonella* sp. nas granjas é, principalmente, a falta de conhecimentos sobre a epidemiologia da infecção nos sistemas modernos de criação de suínos. As práticas de manejo adotadas nesses sistemas têm mostrado ineficiência no controle deste patógeno. Informações sobre o desenvolvimento das infecções sem sinais clínicos são limitadas e pouco divulgadas e são frutos das observações de agroindústrias em seus protocolos de monitorias internas. Então, os estudos experimentais sobre a transmissão desse agente são de grande valia para a implementação de medidas de controle e estratégias de prevenção eficazes.

As secreções orofaríngeas de animais infectados podem conter salmonelas, o que possibilita a transmissão por contato direto. O contato direto entre animais infectados e não infectados por *Salmonella* sp. é considerado a principal via de transmissão entre suínos criados intensivamente. Estudos experimentais indicam diferenças entre os sorotipos de *Salmonella* sp. na transmissão pelo contato naso-nasal. Trabalhos que usaram de metodologia semelhante provaram que a *S. Typhimurium* pode ser transmitida pelo contato naso-nasal enquanto que a *S. Derby* e *S. Agona* não (OLIVEIRA et al., 2007; FRESCHI, 2007).

Contudo, conhece-se a diversidade de sorotipos de *Salmonella* sp. que podem estar presente nos suínos. A maior dúvida seria responder se, experimentalmente, outro sorotipo seria capaz de tal transmissão. Com o objetivo de elucidar esta questão, foi idealizado e realizado o experimento aqui apresentado, que propõem avaliar a importância do contato naso-nasal na transmissão de *Salmonella* Panama entre suínos desmamados. Na expectativa de oferecer subsídios que possam orientar a elaboração de medidas de controle de *Salmonella* em sistemas intensivos de criação de suínos, em especial aquelas relacionadas ao manejo de baias com parede vazada.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Breve histórico da *Salmonella* sp.**

A história das salmonelas pode ser remontada desde 1643 quando Thomas Willis descreveu, de uma forma primitiva, a febre tifóide. Em 1718, Junker começou a clarear sobre a etiologia das febres tifóides; porém, foi em 1880, com muita discussão científica, que Carl Joseph Eberth e Ferdinand Klebs conseguiram explicar a etiologia da febre tifóide e por fim a todas as outras teorias. Então a *Salmonella* ficou por muito tempo conhecida como “bacilo de Eberth” (LEDERMANN, 2003).

No século XX as investigações de Schotmuller e, logo em seguida, de Bryon e Kayser, iniciaram a separação dos agentes causadores das febres tíficas, incorporando e diferenciando outras espécies. Começam outras descobertas que foram incrementando mais espécies ao gênero *Salmonella*. Atualmente, tem-se usado mais o conceito das variedades sorológicas da *Salmonella enterica*. O nome de *Salmonella* vem de uma homenagem ao médico patologista e bacteriologista dos Estados Unidos, doutor Daniel Elmer Salmon (LEDERMANN, 2003). SALMON & SMITH (1886) isolaram o microrganismo posteriormente denominado *Salmonella Choleraesuis*, e este foi o sorotipo mais isolado de plantéis suínos durante anos.

### **2.2. Importância das infecções por *Salmonella* sp.**

A história desta bactéria já demonstra sua importância há séculos, sendo relatada conhecidamente com causadora de doença há muitos anos (LAX et al., 1995). A salmonelose representa, em muitos países, a mais importante doença transmitida pelas carnes vermelha e avícola (DAVIES et al., 1997). A infecção por *Salmonella enterica*, veiculada por alimentos, continua sendo uma preocupação atual na maioria dos países. Apesar de haver surtos associados ao consumo dos

mais variados alimentos, sem dúvida os produtos de origem animal têm um papel de destaque como via de transmissão para o consumidor (CARDOSO, 2006).

A salmonela ganhou destaque no cenário mundial, principalmente quando o assunto é produto de origem animal. Nota-se que a demanda de alimentos no mundo sofreu mudanças, indo de uma produção de *commodities*, visando atingir a uma massa de consumidores (quantidade), para uma produção de produtos de qualidade, objetivando segmentação (FONSECA, 2002). Os conceitos de qualidade e segurança podem ser considerados como uma questão de agregação de valor mercadológico em um primeiro momento, porém acredita-se que esta preocupação inerente à qualidade venha a atingir a massiva produção agro alimentar, pois também é um caso de segurança alimentar.

Existe uma demanda, principalmente entre os consumidores dos países industrializados, quanto à segurança dos produtos de origem animal (BLAHA, 2001). Entre os riscos potenciais destaca-se a salmonelose, que é considerada uma das mais importantes zoonoses transmitidas por alimentos devido à contaminação de carcaças e de produtos cárneos, inclusive os de origem suína (WILCOCK & SCHWARTZ, 1992; JAKABI et al., 1999).

Conforme dados do *Center for Disease Control* (CDC), entidade ligada ao governo dos Estados Unidos, durante o período de 1973 a 1987, bactérias do gênero *Salmonella* foram responsáveis por 43% dos surtos de doença em seres humanos causados por agentes bacterianos presentes em alimentos contaminados, e por 51,3% dos casos clínicos de doenças dessa categoria (BEAN, 1996). Considerando a prevalência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) causadas por *Salmonella sp.*, registrou-se, também nos Estados Unidos, 32.610 casos anuais, entre 1993 e 1999 (MEAD et al., 1999); enquanto na União Européia ocorreram 73.006 casos no ano de 2001 (O'BRIEN & VALK, 2003). Há registros que nos Estados Unidos a infecção por essa bactéria gera custos médicos na ordem de 3,8 bilhões de dólares/ano, sendo mais oneroso agente infeccioso transmitido por alimentos contaminados (ISAACSON et al., 1999).

No ano de 2004, na União Européia, 192.703 casos de salmonelose humana foram registrados (EFSA, 2006). A participação de produtos de origem suína na ocorrência de salmonelose foi estimada entre 15% e 20% dos casos registrados na Holanda, Alemanha e Dinamarca (BORCH et al., 1996; BEREND et al., 1996). A necessidade de cooperação global no controle da salmonelose foi enfatizada pela Organização Mundial da Saúde (BOGEL, 1991). Este fato é facilmente compreendido, visto que as infecções por *Salmonella* sp. também são difundidas através do comércio internacional de ração animal, animais vivos e alimentos (FORSHELL & WIERUP, 2006).

No Brasil não existe tabulação de dados para todas as unidades da federação, mas tomando o Rio Grande do Sul como exemplo, o gênero *Salmonella* tem sido o mais isolado nos surtos de DTAs, perfazendo 34,1% dos surtos investigados entre 1998 e 2001 (SES, 2002, citado por CARDOSO, 2006). Ainda no Rio Grande do Sul, o sorotipo Enteritidis tem sido igualmente o mais identificado nos alimentos envolvidos em surtos (GEIMBA et al., 2004).

Além de sua importância em saúde pública e o impacto sobre o comércio, verifica-se que, embora não sendo importante causa de doença clínica nos rebanhos, a *Salmonella* pode levar a perdas econômicas também na granja. Dados indicam que a *Salmonella* pode aumentar o custo de produção devido, principalmente, ao aumento do tempo até a venda e ao consumo excessivo de ração. Desta forma, grupos de suínos com uma soroprevalência tida de baixo risco têm sido apontados como de melhor eficiência de produção do que grupos de moderado ou alto risco epidemiológico (GORTON et al., 1996).

### **2.3. O gênero *Salmonella***

O gênero *Salmonella* representa grupo morfológica e bioquimicamente homogêneo, com microrganismos Gram-negativos, móveis ou imóveis, não formadores de esporos e anaeróbicos facultativos. Pertencem à família *Enterobacteriaceae* com ampla distribuição mundial e variedade de hospedeiros.

Inclui duas espécies, divididas em sub-espécies e classificadas em mais de 2.500 sorotipos, de acordo com os antígenos presentes na parede bacteriana, flagelos e cápsula.

Do ponto de vista de segurança dos alimentos a *S. enterica* subsp. *enterica* inclui todos os sorotipos já associados a ocorrência de salmonelose humana, além de muitos outros também considerados como patogênicos ao ser humano e que, no conjunto, representam cerca de 60% dos sorotipos já identificados. Do ponto de vista epidemiológico, convencionou-se dividir os sorotipos em adaptados e não-adaptados a um determinado hospedeiro. Os sorotipos adaptados constituem a minoria, caracterizando-se por ocasionar preponderantemente uma infecção septicêmica e clinicamente evidente no hospedeiro ao qual estão adaptados (CARDOSO, 2006).

Alguns exemplos de adaptados a um único hospedeiro são: *S. Typhi* (humanos), *S. Dublin* (bovinos), *S. Pullorum* (aves) e *S. Choleraesuis* (suínos). Entretanto, a maioria dos sorotipos compõe o grupo dos não-adaptados que causam principalmente infecções sub-clínicas nos hospedeiros portadores e são os principais causadores de salmonelose humana. Entre esses sorotipos, encontra-se a *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipo Panama, também referida como *S. Panama*. Este sorotipo foi associado a surto de meningite severa em crianças correlacionado a ingestão de leite contaminado (CHEN et al., 2005).

Na presença de substrato adequado este microrganismo pode multiplicar-se em temperaturas entre 7°C e 45°C. Pode sobreviver ao congelamento e a dessecação e persistir por semanas, meses e até anos em material orgânico. Sua sobrevivência diminui em pH inferior a 5,0, sendo rapidamente inativado por ação do calor, da luz solar, assim como por fenóis, cloro e desinfetantes a base de lodo. A capacidade de sobreviver no meio ambiente, assim como a existência de animais portadores, favorecem a distribuição do gênero mundialmente. O fato do agente se adaptar a diferentes hospedeiros e se disseminar com facilidade propicia a ocorrência da infecção (GAST et al., 2003).

## 2.4. A epidemiologia da salmonelose

O desafio no controle da *Salmonella* sp. nos sistemas intensivos de criação recai principalmente sobre a complexidade de sua epidemiologia. O problema parece tão complexo que mesmo a adoção de práticas modernas de criação, como utilização do desmame precoce e sistema de criação todos dentro - todos fora, parece não ser suficiente para reduzir os números de infecções (FUNK et al., 2001). Algumas fontes de introdução de *Salmonella* sp. em granjas são bem conhecidas e envolvem, principalmente, aquisição do animais infectados; água, rações e ingredientes contaminados; vetores, como roedores e pássaros, e mesmo funcionários ou visitantes (HEARD, 1969). No entanto, a importância relativa de cada fonte potencial parece ser dinâmica e particular de cada granja (DAVIES & FUNK, 1999).

É importante considerar os ciclos internos de contaminação por *Salmonella* sp. que parecem ser característicos de cada granja (CARLSON & BLAHA, 2001). Devido ao fato da *Salmonella* sp. ser eliminada nas fezes dos animais infectados, a via fecal-oral é considerada a base da transmissão do patógeno (FEDORKA-CRAY et al., 2000). Em experimentos com suínos inoculados nota-se que há eliminação de grande número de bactérias nas fezes por períodos prolongados (WOOD et al., 1989). Suínos suscetíveis, quando colocados em ambiente contendo fezes contaminadas, geralmente adquirem a infecção (FEDORKA-CRAY et al., 1994, HURD et al., 2001). Adicionalmente, a transmissão através do contato naso-nasal é admitida em função da presença do patógeno nas secreções oro-faríngeas (SCHWARTZ, 1999).

Investigações sobre possíveis fatores de risco de infecção por *Salmonella* sp. em plantéis suínos consideram, basicamente, essas duas vias de transmissão na análise epidemiológica. Através da administração oral de *S. Typhimurium* em bezerros esofagotomizados, DE JONG & EKDAHL (1965) demonstraram a importância das vias hematogena e linfática na disseminação do agente.

Resultados bem semelhantes foram observados na espécie suína, evidenciando a importância do trato respiratório superior, pulmões e tonsilas como portas de entrada da *Salmonella enterica*. A *S. Typhimurium* foi isolada dos linfonodos mesentéricos de suínos esofagotomizados 3 horas após instilação nasal do inóculo (FEDORKA-CRAY et al., 1995).

O fato da *Salmonella* ser frequentemente isolada de partículas de poeira em granjas suínas (RAJIC et al., 2005), e sua capacidade de manter-se viável por longos períodos em aerossóis (McDERMID & LEVER, 1996) sugerem a possibilidade de transmissão aerógena entre suínos. De fato, a principal forma de transmissão é pela via fecal-oral, porém há confirmação experimental da transmissão aerógena (OLIVEIRA et al., 2006) de *Salmonella enterica* na espécie suína, em frangos (LEVER & WILLIAMS, 1996), ratos e bezerros (WATHES et al., 1988).

Em relação ao momento da infecção dos animais, *Salmonella* sp. pode estar presente em todas as fases de produção. Entretanto, segundo estudos conduzidos no Brasil (SILVA et al., 2003; SCHWARZ et al., 2006), a fase de terminação tem sido identificada como a mais frequentemente envolvida na infecção dos rebanhos suínos, a exemplo do que foi também descrito por LETELLIER et al. (1999) em rebanhos canadenses e BAHNSON (2005) em unidades de produção de suínos americanas.

Estudos têm sido conduzidos no sentido de dimensionar o problema de infecção por salmonelas nos rebanhos suínos brasileiros e propor alternativas para o seu controle. SCHWARZ et al., 2006, em um trabalho realizado no Rio Grande do Sul, verificou a positividade para *Salmonella* e foram identificados 71,65% de suínos portadores (isolamento em linfonodos mesentéricos) e 77,85% de suínos positivos na avaliação sorológica. Estudos realizados na indústria demonstraram que 88% de amostras de massa de embutidos e 50% de cortes de pernil produzidos em frigorífico onde a prevalência de animais portadores eram elevada, tinham a presença de *Salmonella* sp. (CASTAGNA et al, 2004).

Devido aos suínos poderem ser infectados por *Salmonella* em até 30 minutos de uma exposição mínima ao agente (HURD et al., 2004), a alta prevalência de isolamento de *Salmonella sp.* poderia ser atribuída à infecção dos animais nas baias de espera (ISAACSON et al. 1999, ROSTAGNO et al., 2003, KORSAC et al., 2003), ao efeito do estresse de manejo e ao transporte no período pré-abate (ROSTAGNO, 2002). No entanto, estudos conduzidos por FUNK et al. (2001), identificaram as granjas produtoras de suínos como a origem mais freqüente de rebanhos que chegam infectados ao abate.

KICH et al. (2005) em seus estudos de soroprevalência em granjas do sul do país notou que, em 65 granjas terminadoras, havia uma prevalência de 57,6% de animais positivos no teste de ELISA-LPS. Em um estudo longitudinal, acompanhando 28 rebanhos, do nascimento ao abate, conduzido por SCHWARZ et al. (2005), a maternidade foi excluída como fase de risco para infecção de leitões por salmonelas, enquanto a creche e principalmente a terminação, foram identificadas como as fases responsáveis pela infecção dos animais. Portanto, estes seriam os setores na granja onde se devem priorizar as intervenções relacionadas ao programa de controle nas unidades de produção animal.

## **2.5. Introdução de *Salmonella sp.* no sistema de produção**

Na cadeia de produção de suínos a *Salmonella sp.* pode ser introduzida em diferentes estágios. Nos estágios primários, as fontes de infecção podem ser animais pertencentes ao próprio grupo, animais de outros grupos da mesma granja ou fatores externos, que funcionam como vias de transmissão, como ração, pessoas ou roedores. Durante o transporte, os caminhões contaminados e no abatedouro a contaminação cruzada, a partir de animais excretores, são pontos importantes de contaminação (VAN DER GAAG et al., 2004).

A alimentação tem sido apontada como risco significativo de introdução de *Salmonella* (STARK et al., 2002), sendo a ração contaminada considerada via de

transmissão. Dessa forma, tem sido demonstrada a relação entre sorotipos encontrados em amostras de ração com aqueles recuperados de animais (FEDORKA-CRAY et al., 1997). A utilização de farinhas de origem animal é apontada como a principal fonte de introdução de *Salmonella* sp. na ração. Pesquisas estimam que 15% a 30% de todas infecções no período de terminação podem ser atribuídas à 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 (BERENDS et al., 1996).

Os esforços para manter a ração animal livre de contaminação por *Salmonella* requerem não somente o tratamento térmico, mas também proteção da ração final do contato com reservatórios como pássaros e roedores, materiais contaminados ou contaminação residual em caminhões (FEDORKA-CRAY et al., 1997). Roedores e outros animais presentes em propriedades, bem como a água e o ambiente constituem importantes fatores para a epidemiologia da infecção em suínos.

Outro ponto importante é a introdução de animais no plantel, o que constitui um grande risco para a introdução de *Salmonella* sp. nas granjas. LETELLIER et al. (1999) encontraram 15,9 % das fêmeas de reposição e 21,9% das unidades de terminação de leitoas positivas para *Salmonella* sp. no Canadá. No Rio Grande do Sul, SILVA et al. (2003) encontraram uma prevalência média de 32% de leitoas de reposição positivas.

Enquanto isso, alguns estudos detectaram um pico de excreção de *Salmonella* sp. na creche, apontando essa fase zootécnica como importante no ciclo de infecção do sistema de produção (KRANKER et al., 2002). Outros identificaram a terminação como a fase de maior importância epidemiológica (SILVA et al., 2003).

## 2.6. Fatores e análise de risco

Análises de riscos fazem parte dos estudos epidemiológicos e propostas de controle de diversas síndromes e patógenos, podendo abranger diversas áreas da cadeia de produção e comercialização de produtos de origem animal (SCHWARZ & CARDOSO, 2006).

Vários estudos têm incrementado dados para as avaliações de risco, como no estudo realizado por NOLLET et al. (2005), que avaliaram 62 rebanhos Belgas abatidos em quatro diferentes frigoríficos, identificando instalações com piso contínuo como fator de risco na infecção por salmonelas. Entre os fatores estudados por BUSH et al. (1999), foi identificado ração não farelada e mistura de ração fora da granja como risco maior de ocorrência de *Salmonella* sp.

A mistura de animais de diferentes origens, conforme observações de QUESSY et al. (1999) está correlacionada com a presença da *Salmonella* sp. Da mesma forma, o uso de ração peletizada demonstrou associação positiva com soro-positividade nos estudos de LO FO WONG et al. (2004). NIELSEN et al. (1995) observaram que é rara a infecção em fêmeas e leitões novos; o problema parece se restringir à difusão horizontal nas terminações. Principalmente nos sistemas de criação em múltiplos sítios, a infecção em fase precoce dos animais não é responsável por mais de 10% do total dos casos observados na terminação (DAVIES & FUNK, 1999). Por outro lado, a partição sólida entre baias é uma medida que pode inibir a difusão da infecção nas diferentes fases da criação (DAHL et al.; 1997).

Foi conduzido por KICH et al. (2005) um estudo transversal, onde fatores associados à prevalência de suínos sorologicamente positivos para *Salmonella* sp. nos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul foram identificados. Houve a possibilidade de identificar a associação da maior soroprevalência com o seguinte conjunto de variáveis nas granjas terminadoras: uso de ração peletizada, distribuição de dejetos a menos de 100 metros do local de captação de água, não utilização de comedouro do modelo comedouro/bebedouro, transporte com freteiro

misturando animais de várias granjas. Já 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, foram os fatores de risco encontrados.

O programa de controle da Dinamarca, que há dez anos implementa manejo de logística e biossegurança diferenciado em todos os rebanhos do país a partir de um programa nacional (ALBAN et al., 2002), poderia servir como exemplo.

## **2.7. Formas de ocorrência de *Salmonella enterica* em suínos**

Considerada a grande variabilidade de sorotipos de *Salmonella* e as diferentes espécies animais, admite-se que a evolução da infecção classifique os sorotipos em dois grandes grupos, os adaptados e os não adaptados, conforme já descrito anteriormente. Os sorotipos adaptados geralmente determinam quadro clínico severo subsequente à infecção, e não são isolados de outras espécies. Os sorotipos não adaptados, que compõem o grupo das salmonelas paratíficas, determinam infecções com evolução subclínica e podem infectar diversas espécies animais (CARDOSO, 2006).

No caso da espécie suína, admite-se que a *S. Cholerasuis* representa sorotipo adaptado, sendo responsável por 99% dos episódios de salmonelose clínica que afetam esta espécie animal (UZZAU et al., 2000). Em alguns países, como no Brasil, sua importância tem diminuído. Na Dinamarca este sorotipo não é isolado há décadas (DAHL et al., 1997), o que tem favorecido a importância de outros sorotipos. A *Salmonella* Typhimurium passou a responder por 65% dos episódios na Grã-Bretanha, seguido por *S. Derby* (GRESHAM, 1996).

No suínos, a doença pode se manifestar, clinicamente, como uma septicemia aguda ou como uma enterocolite aguda ou crônica (SOBESTIANSKY et al., 1999). Suínos que sobrevivem à septicemia aguda podem desenvolver

sinais clínicos devido às lesões localizadas, como pneumonia, hepatite, enterocolite e, ocasionalmente, meningoencefalite. Animais com enterocolite poderão desenvolver um definhamento crônico. Os suínos podem recuperar-se totalmente, mas alguns poderão permanecer como portadores e excretadores intermitentes por meses (SCHWARTZ, 1999).

Porém, são os sorotipos que não causam doença clínica no suíno os que têm maior importância para a segurança alimentar, uma vez que o animal portador não apresenta sinais clínicos, mas é uma fonte permanente de eliminação do agente desde a granja até o processamento industrial. Os sorotipos não adaptados, salmonelas paratíficas, na maioria das vezes, são imperceptíveis dentro do sistema de produção. Contudo, são responsáveis por condenação de carcaças e devolução de carregamentos destinados à exportação, constituindo grandes perdas aos produtores e exportadores envolvidos (GRESHAM, 1996).

Os principais sorotipos não-adaptados isolados dos casos de salmonelose humana registrados no Estado de São Paulo, no período de 1950 a 1990, foram *S. Typhimurium*, *S. Agona* e *S. Infantis* (TAUNAY et al., 1996), sorotipos esses também isolados de suínos em criações estudadas (WEISS et al., 2002; MICHAEL et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002), o que caracteriza a espécie suína como uma importante fonte de infecção para diversos sorotipos de *Salmonella* sp. potencialmente nocivas ao ser humano.

É conhecido que os suínos infectados são a principal fonte de contaminação das carcaças (BORCH et al., 1996; SORENSEN et al., 2004). Contudo, a prevalência da infecção, determinada ao abate através da colheita de órgãos ou fezes, pode não refletir a real prevalência da infecção na granja. Nessas circunstâncias, a prevalência na granja é normalmente superestimada, pois muitos suínos podem se infectar durante o transporte ao frigorífico ou mesmo nas baias de descanso pré-abate (HURD et al. 2004; ROSTAGNO et al., 2003). Ademais, contaminações geradas por outros animais na linha de abate ou pelo próprio ambiente do frigorífico, podem responder por até 30% da contaminação final das carcaças (BORCH et al., 1996; BOTTELDOORN et al., 2003).

## 2.8. Métodos diagnósticos de *Salmonella* sp.

A prevalência de *Salmonella* sp. pode ser medida por testes sorológicos e bacteriológicos (VAN DER GAAG et al., 2004). As amostras podem focar as granjas que produzem animais para o abate ou os rebanhos que distribuem fêmeas e leitões para outras granjas, e que podem contribuir para a disseminação da *Salmonella* sp. (SANDBERG et al., 2002).

O isolamento microbiológico é o método mais utilizado para detecção de *Salmonella* por ser muito difundido, por ser seguro e relativamente barato. Este constitui uma ferramenta valiosa e, até o momento, insubstituível, considerada a importância das informações epidemiológicas baseadas em características fenotípicas e genotípicas identificáveis pela cultura. Entretanto, a intermitência da eliminação de *Salmonella* nas fezes, e períodos longos de análise, são os fatores que podem comprometer a utilização do isolamento como técnica de rotina para o monitoramento de *Salmonella* em granjas suínas (FUNK et al., 2000).

O controle poderá iniciar pela determinação da fase crítica de infecção dos animais (creche, crescimento e terminação ou pré-abate) e pela intervenção nos fatores de risco identificados. Havendo ou não manifestação clínica da infecção, faz-se necessário o uso de métodos diagnósticos que permitam a identificação de lotes infectados, sendo que o isolamento microbiológico e a sorologia têm sido a base dos programas de controle (CARDOSO, 2006).

O isolamento pode ser conduzido colhendo-se amostras de fezes individuais ou de grupos de animais alojados em diferentes baias na granja e pode, de acordo com o plano de amostragem, detectar a presença de *Salmonella* no lote ou determinar a prevalência de animais excretadores. Amostragens para isolamento podem ser conduzidas também ao abate, por meio da colheita de conteúdo intestinal ou de linfonodos mesentéricos (CARDOSO, 2006).

O método consiste no cultivo das amostras pelo emprego de meios de cultura seletivos. Após incubação as colônias suspeitas são submetidas a testes

bioquímicos e sorológicos (SOUMET et al., 1999). Dentre os caldos de enriquecimento seletivo estão os das famílias tetracionato e caldo Rappaport-Vassiliadis. O caldo Rappaport-Vassiliadis tem demonstrado maior sensibilidade para isolamento microbiológico de *Salmonella enterica* de fezes de suínos naturalmente infectados (BAGER & PETERSEN, 1991; FEDER et al., 1998), o que o torna caldo de enriquecimento frequentemente utilizado em muitos laboratórios que processam amostras de fezes suínas.

DAVIES et al. (2000) demonstraram a superioridade de protocolos que utilizam enriquecimento primário em caldo tetracionato Muller-Kauffmann ou GN-Hajna, e, posteriormente, enriquecimento secundário em caldo Rappaport-Vassiliadis diretamente ou após enriquecimento das amostras em água peptonada a 2%. Existe um estudo que demonstrou que o desempenho do caldo Rappaport-Vassiliadis no isolamento de *Salmonella* de fezes de aves foi significativamente menor que o do meio Rappaport-Vassiliadis semi-sólido modificado (RVSM) (VOOGT et al., 2001).

A sorologia pode ser uma ferramenta fundamental para um programa de controle, pois pode auxiliar rápida e corretamente na identificação de rebanhos positivos (ALBAN et al., 2002). Assim, se o objetivo for identificar todos os rebanhos que foram expostos à *Salmonella* sp., a sorologia pode ser aplicada, ao invés do isolamento microbiológico (SANDBERG et al., 2002). Portanto, o teste sorológico fornece uma estimativa do número de animais que foram, em algum momento da produção, expostos ao agente. O método de ELISA mais difundido baseia-se na utilização de antígenos O de sorotipos de *Salmonella* pertencentes a diversos sorogrupos (mix-ELISA) e tem sido amplamente utilizado na categorização de granjas, dentro dos programas de controle de *Salmonella* em diversos países (NIELSEN et al., 1995; BLAHA, 2001).

No Brasil, a EMBRAPA Suínos e Aves de Concórdia – SC desenvolveu e validou um teste de ELISA (ELISA-Typhimurium), para ser utilizado nos rebanhos brasileiros, classificando-os por nível de infecção. Este teste foi desenvolvido baseado em antígenos lipolissacarídeos (LPS) da parede celular de uma amostra

de *Salmonella* Typhimurium. Apresenta reação cruzada com os sorotipos Agona, Derby, Panama e Bredney (KICH et al., 2006).

Existe um desafio na questão de associar a sorologia com o isolamento microbiológico, pois os resultados sorológicos de um rebanho podem ser interpretados diferentemente, conforme o ponto de corte aplicado ao avaliar o teste (ALBAN et al., 2002). Outro ponto a ser considerado é que o isolamento de *Salmonella* sp. indica infecção e excreção, enquanto a sorologia positiva pode indicar a transmissão silenciosa no rebanho (VAN WINSEN et al., 2001). Portanto, as estimativas de prevalência de *Salmonella* obtidas por sorologia e bacteriologia podem diferir, como demonstrados em alguns estudos (FEDORKA-CRAY et al., 1997 e SILVA et al., 2003).

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Avaliar a possibilidade de transmissão pela via naso-nasal de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Panama em leitões desmamados.

#### Objetivos específicos

Induzir infecção experimental por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Panama em leitões desmamados.

Verificar, usando modelo e metodologia experimental confiáveis, se há ou não transmissão pela via naso-nasal de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Panama.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Seleção da granja fornecedora dos animais

Para a realização do presente estudo, foram utilizados leitões de granja previamente selecionada. O objetivo da seleção era aumentar a possibilidade de aquisição de animais realmente livres de *Salmonella* sp. A granja selecionada, desta forma, deveria atender aos princípios de biossegurança. Para a classificação das granjas utilizou-se o questionário do Ministério da Agricultura indicado para a avaliação das Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas (GRSC) presente na Instrução Normativa nº 19 de 2002 (MAPA, 2002).

Esta avaliação é usada para classificação das granjas quanto ao grau de vulnerabilidade a patógenos externos, sendo avaliados os seguintes aspectos:

- a) granja “A”: bem protegida - de 0 a 5,0 pontos, desde que não tenha nenhum critério com pontuação 2 ou 3;
- b) granja “B”: vulnerabilidade baixa - até 8,0 pontos, desde que não tenha nenhum critério com pontuação 3 e não se enquadre como granja “A”;
- c) granja “C”: vulnerabilidade moderada - de 8,0 a 12,0 pontos, desde que não se enquadre como granja “B”, e
- d) granja “D”: altamente vulnerável - com 13,0 ou mais pontos.

Foram avaliadas cinco granjas, num raio de 100 km do *Campus* de Jaboticabal. Selecionou-se a Granja Santa Paula, localizada no município de Colina – SP.

Outro fator considerado para a escolha dessa granja foi que em estudos anteriores nela conduzidos, não houve isolamento de *Salmonella* sp. (OLIVEIRA et al., 2007; FRESCHI, 2007).

#### 4.2. Seleção dos animais

A porca e o piso da cela parideira foram avaliados, objetivando confirmar a não exposição dos leitões à *Salmonella* sp. Da porca, foram colhidas amostra de sangue, para sorologia, e fezes do reto, para avaliação microbiológica. Com o mesmo propósito, colheu-se amostra de resíduos do piso da cela parideira.

Os animais foram escolhidos aleatoriamente de uma única leitegada, sendo quatro fêmeas e dois machos, com 21 dias de idade e pesando 5,2 kg, em média.

Foram levados ao Laboratório de Pesquisa em Suínos do Departamento de Clínica e Cirurgia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias *Campus* de Jaboticabal — Unesp, alojados em gaiolas suspensas e individuais e monitorados bacteriologicamente. O monitoramento foi feito durante sete dias, sendo realizadas a avaliação microbiológica de amostras retais no primeiro, quarto e sétimo dias, e a avaliação sorológica, confirmando a condição livre de *Salmonella* sp.

As gaiolas individuais de alojamento, utilizadas no período de monitoramento pré-inoculação, foram previamente lavadas e desinfetadas. Amostras da ração e água fornecida aos leitões foram colhidas para avaliação microbiológica.

Concluído o período de monitoramento, os seis leitões foram aleatoriamente distribuídos em três grupos e alojados nos isoladores (Quadro 1).

**Quadro 1.** Desenho experimental utilizado para estudo da transmissão pela via naso-nasal de *Salmonella* Panama entre leitões desmamados

| Leitões Utilizados | <u>Distribuição nos Isoladores</u> |                   |                   |
|--------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                    | <i>Isolador 1</i>                  | <i>Isolador 2</i> | <i>Isolador 3</i> |
| 6 leitões          | 2 leitões                          | 2 leitões         | 2 leitões         |
| <b>Tratamentos</b> | Controle                           | Inoculados        | Sentinelas        |

### 4.3. Descrição dos isoladores

Foram empregados isoladores de aço inoxidável (0,80m x 0,80m x 1,30m), completamente fechados e especialmente projetados para estudos epidemiológicos, ou seja, para uma das três vias de transmissão de patógenos (ar, água ou contato naso-nasal). O modelo foi desenvolvido a partir de protótipo desenvolvido por TORREMORELL et al. (1997), para estudos de transferência aérea de microrganismos, sendo produzido por empresa do setor de equipamentos para laboratórios (Marconi Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP) (Figura 1).

Para o estudo de transmissão direta através do contato naso-nasal cada isolador possui uma pequena janela de forma circular com 10 cm de diâmetro localizado a 10 cm do piso, que permite, pela proximidade e abertura destas janelas, o contato naso-nasal entre os leitões de cada isolador (Figura 2).

Depósitos para ração e para água, ambos com tampas herméticas, permitem abastecimentos sem a necessidade de abertura do sistema. Uma câmara de passagem, com portas interna e externa e luvas de canos longos, em borracha e adaptadas às paredes laterais do equipamento, possibilitem o acesso e a colheita de amostras a partir dos leitões sem a necessidade de abertura da porta superior da câmara. Pisos plásticos superiores fenestrados favorecem a drenagem de excreções para o piso inferior; este, de aço inoxidável e de formato cônico, conduz as fezes e a urina dos animais, que são colhidas em tubo plástico, flexível e estéril, o qual além de reter as excreções, pode ser ligado e cortado, permitindo a análise de seu conteúdo.

A ventilação é feita através de dutos estéreis (0,20m de diâmetro), que conectam os isoladores com as unidades ventiladoras e exaustoras. A taxa de ventilação é ajustada para 550 m<sup>3</sup>/h (aproximadamente 1m<sup>3</sup>/leitão/min), que induz pressão positiva no interior das câmaras. Ambas as unidades, a exaustora (Exaustflow500, Filtracom Ltda, Campinas, SP) e a ventiladora (Sterilflow500,

Filtracom Ltda) são equipadas com pré-filtros e filtros absolutos tipo HEPA, com 99,97% de eficiência para partículas de até 0,3 micrômetros.



**Figura 1.** Isolador usado no experimento<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Observar (1) a entrada de ar do sistema, (2) a saída de ar, (3) o reservatório de água, (4) as luvas de borracha para manipulação interna, (5) o orifício para conexão com outro isolador (contato naso-nasal), (6) o saco para a coleta dos dejetos e (7) a caixa de passagem, dotada de portas interna e externa.

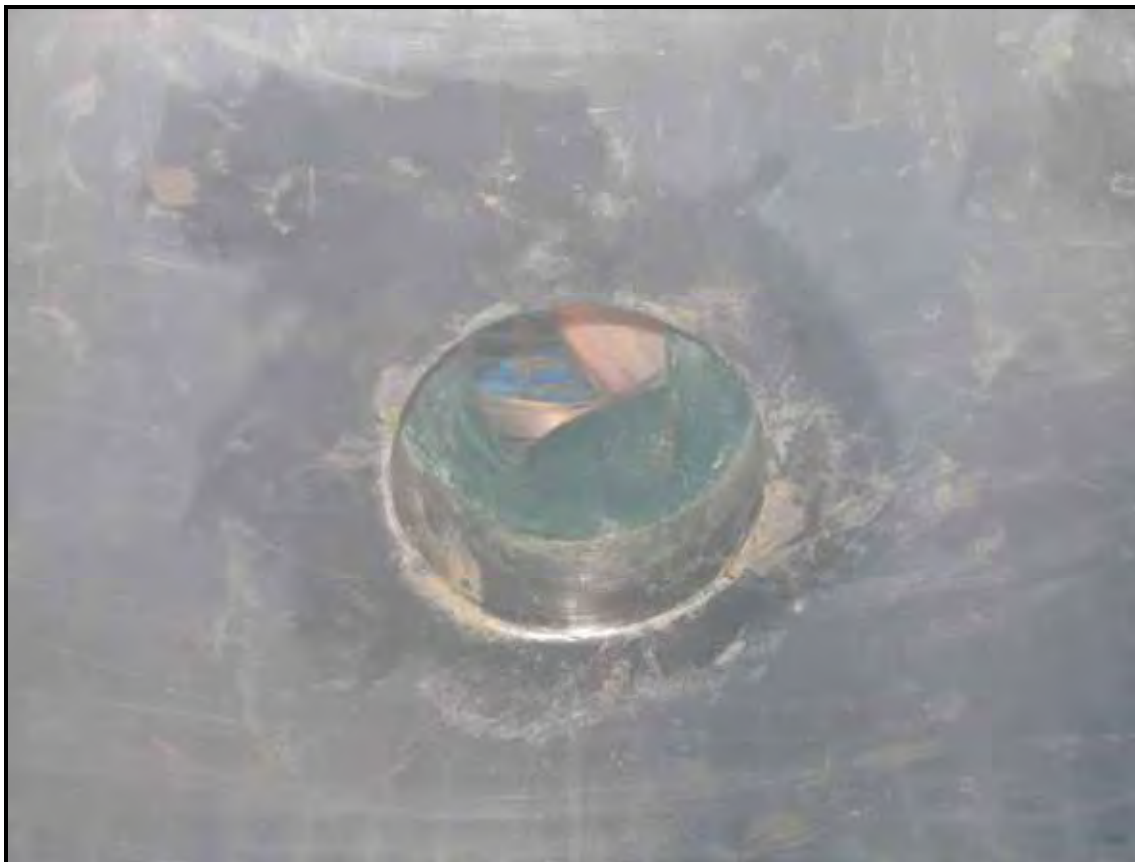


**Figura 2.** Vista interna, por uma das câmaras, do orifício que permite o contato naso-nasal entre os animais

#### **4.4. Lavagem e desinfecção dos isoladores**

A lavagem e desinfecção dos isoladores foram criteriosas, sendo que o procedimento de lavagem foi feito uma vez e desinfecção repetido por três vezes, com intervalo de um dia. Utilizou-se primeiramente solução detergente juntamente com água pressurizada na lavagem do equipamento; assim que as superfícies secaram, foram submetidas à desinfecção com etanol a 70% e subsequente uso de solução comercial de glutaraldeído a 2% e amônia quaternária (AVT500, Polysell, Campinas, SP).

Após a última pulverização das superfícies internas dos isoladores, estes permaneceram completamente fechados por dois dias. Procedeu-se, então, à fumigação com o sistema fechado, um dia antes da entrada dos animais. A escolha do glutaraldeído baseou-se no fato de não ser agressivo para superfícies metálicas, ser aceito como esterilizante químico em ambientes hospitalares e ter eficiência comprovada contra *Salmonella* sp. (RUTALA, 1995).

Para a garantia da esterilidade para a *Salmonella* sp. foi realizado após este procedimento de limpeza e desinfecção, uma colheita de material através de suabes para o isolamento microbiológico nas paredes, piso e cochos. O resultado foi negativo quanto à presença deste microrganismo.

#### **4.5. Montagem do sistema**

Pela Figura 3 pode-se compreender como foi montado e utilizado o sistema de isoladores. A direção do fluxo de ar, no sentido do isolador 3 (leitões sentinela) para o 2 (leitões inoculados), impediu a que os leitões sentinela fossem infectados por contaminação aérea. Admitiu-se que se fosse registrada a transferência da infecção, o agente teria sido transferido exclusivamente através do contato naso-nasal entre os animais. Os animais controle foram mantidos em isolador exclusivo, sem qualquer conexão com os demais.

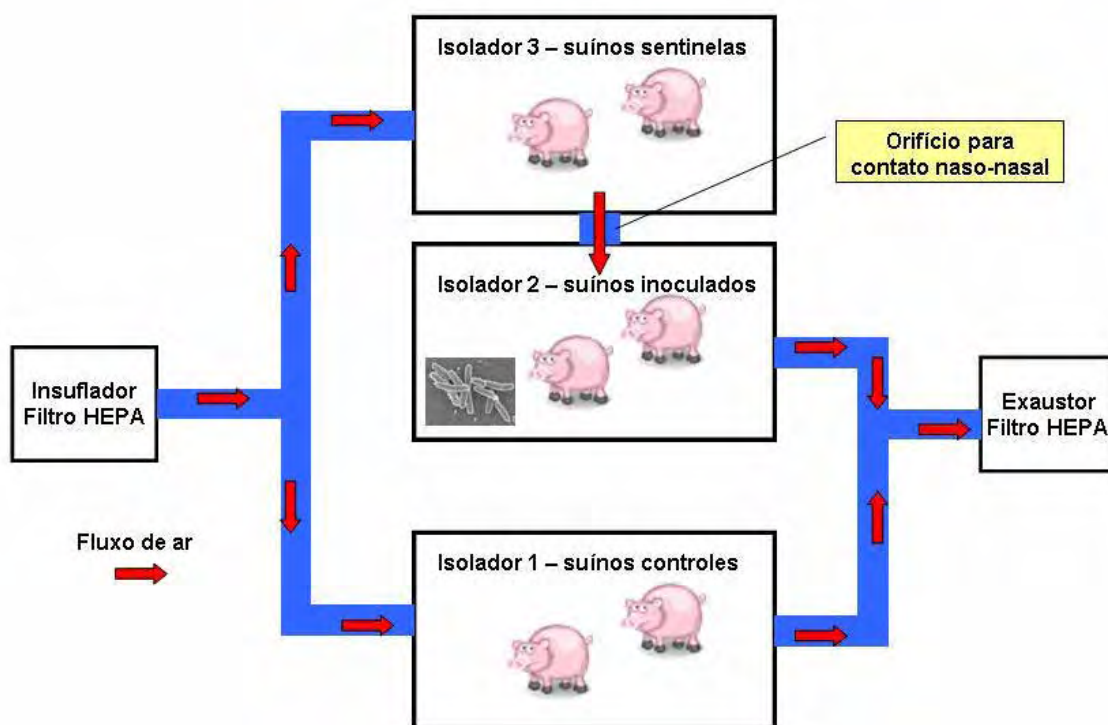


**Figura 3.** Ilustração esquemática da montagem dos isoladores<sup>2</sup>

#### 4.6. Água e ração experimental

Toda a água fornecida aos animais era previamente autoclavada e colocada no reservatório de água do sistema que conectava a um bebedouro interno no isolador. A água utilizada provinha de poço artesiano sendo livre de tratamento com cloro.

<sup>2</sup> Descreve o fluxo de ar no sentido do isolador 3 para o 2, possibilitando somente a transmissão pelo contato naso-nasal.

A ração experimental foi formulada livre de farinhas de origem animal e antibiótico promotores de crescimento. Preparada na fábrica de rações da FCAVJ-UNESP possuía formulação apropriada para leitões em fase de creche (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição percentual da ração usada na alimentação dos animais experimentais

| <b>Ração Experimental</b> |               |
|---------------------------|---------------|
| <b>Ingredientes</b>       | <b>(KG)</b>   |
| Milho                     | 54,35         |
| Farelo de soja            | 32,63         |
| Soro de leite             | 5,00          |
| Açúcar                    | 1,00          |
| Óleo                      | 2,94          |
| Fosfato bicálcico         | 1,74          |
| Calcáreo                  | 0,70          |
| Sal                       | 0,44          |
| Lisina                    | 0,51          |
| Treonina                  | 0,20          |
| Metionina                 | 0,10          |
| Triptofano                | 0,02          |
| Vitaminas                 | 0,10          |
| Minerais                  | 0,25          |
| Antioxidante              | 0,02          |
| <b>TOTAL</b>              | <b>100,00</b> |

Tanto a água quanto a ração foram submetidas à análise bacteriológica para presença de *Salmonella* sp. Foram realizadas duas análises no período pré-inoculação e outras três no período pós-inoculação.

#### **4.7. Amostra de *Salmonella* utilizada na infecção experimental**

Amostras de *Salmonella enterica*, sorotipo Panama, cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA Aves e Suínos de Concórdia – SC e mantidas em sua coleção sob nº 8193, foram usadas na preparação do inóculo.

Esta cepa foi originalmente isolada de animais de campo, mais especificamente de linfonodo mesentérico de suíno e já possuía perfil de resistência a alguns antibióticos.

No setor de microbiologia do Laboratório de Pesquisa em Suínos, objetivando a marcação da amostra inoculada, esta cepa foi selecionada para resistência ao ácido nalidíxico. Isto foi realizado, conforme a seqüência de procedimentos indicada - (a) colônia pura de *S. Panama* da placa de ágar nutriente de estoque foi inoculada em caldo Luria Bertani e incubada em mesa agitadora orbital a 37°C por 18 horas; (b) o caldo foi centrifugado a 1.500 rpm por 20 minutos e, após descarte do sobrenadante, uma alçada do precipitado foi transferida para caldo Luria Bertani contendo 10µg/mL de ácido nalidíxico; (c) repetiu-se o procedimento com concentrações crescentes de ácido nalidíxico (20, 30, 40µg/mL), até obter a concentração final de 50µg/mL. Antes do preparo do inóculo, a cepa foi submetida a antibiograma (Quadro 2).

**Quadro 2.** Antibiograma da cepa de *Salmonella* Panama<sup>Nal<sup>+</sup></sup> antes da inoculação

| Princípio Ativo               | Concentração       | Resultado  |
|-------------------------------|--------------------|------------|
| Gentamicina                   | 10 µg              | Sensível   |
| Florfenicol                   | 30 µg              | Sensível   |
| Cefotaxina                    | 30 µg              | Sensível   |
| Cefalotina                    | 30 µg              | Sensível   |
| Ciprofloxacina                | 5 µg               | Sensível   |
| Ceftriaxona                   | 30 µg              | Sensível   |
| Polimixina                    | 300 µg             | Sensível   |
| Tetraciclina                  | 30 µg              | Resistente |
| Estreptomicina                | 10 µg              | Resistente |
| Ácido Nalidíxico              | 30 µg              | Resistente |
| Ampicilina                    | 10 µg              | Resistente |
| Cloranfenicol                 | 30 µg              | Resistente |
| Sulfametoxazol + Trimetoprima | 23,75 µg + 1,25 µg | Resistente |
| Novobiocina                   | 30 µg              | Resistente |

#### 4.8. Preparo e administração do inóculo

Os inóculos foram preparados de acordo com WOOD *et al.* (1991). Culturas puras de *Salmonella* Panama<sup>Nal<sup>+</sup></sup> foram plaqueadas em ágar nutriente e ágar verde brilhante modificado contendo 50µg de ácido nalidíxico. Uma única colônia foi transferida para o caldo Luria Bertani contendo ácido nalidíxico (50 µg/mL). Após cultivo a 37 °C por 18 horas, separaram-se duas alíquotas de três mililitros cada, que foram utilizadas para a inoculação dos leitões. A concentração de bactérias no inóculo, determinada pela técnica de *drop-counting* (MILES & MISRA, 1938) foi de  $2,16 \times 10^{10}$  UFC/mL.

Os leitões foram mantidos em jejum alimentar e hídrico por 18 horas antes da administração do inóculo. Ração e água foram fornecidas 30 minutos após a inoculação. Inóculos ou placebo foram administrados oralmente, utilizando-se seringas estéreis descartáveis. Os suínos controle (C1 e C2) e sentinela (S3 e S4) receberam solução de caldo Luria Bertani estéril (3 mL) e foram imediatamente colocados nos isoladores 1 (Iso 1) e 3 (Iso 3), respectivamente. Os suínos I5 e I6 receberam o inóculo contendo *Salmonella* Panama<sup>Nal<sup>+</sup></sup> e foram alojados no isolador 2 (Iso2). O sistema foi fechado e assim mantido por 14 dias.

#### 4.9. Colheita de amostras

Colheitas de amostras foram realizadas diariamente de todos os animais. Mediante do emprego de suabes, amostras de fezes fossem colhidas diretamente do reto. Este procedimento era feito passando o material através da câmara de passagem (Figura 4). Os suabes, protegidos no interior de embalagens plásticas, eram colocados no interior da câmara e pulverizados com amônia quaternária e glutaraldeído a 2% (AVT 500, Polysell). Duas horas após, a porta interna da câmara era aberta e os suabes eram utilizados na colheita das amostras. Voltavam à câmara de passagem, cuja porta interna era fechada, permitindo que o material fosse retirado, sem qualquer risco de contaminação do sistema.

Amostras de sangue de todos os leitões foram colhidas no período pré-inoculação, conforme já referido. Repetiu-se tal procedimento ao final do período experimental. Separou-se o soro e, em ambos os casos as amostras foram mantidas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises, realizadas por teste de ELISA, no Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA Suínos e Aves.

Ao final dos 14 dias nos isoladores, os animais foram submetidos à eutanásia e em seguida necropsiados, conforme indicado por SOBESTIANSKY et al. (2005). Linfonodos mandibulares, tonsilas, pulmões, fígado, baço, linfonodos íleo-cólicos, linfonodo mesentérico, jejuno, íleo e conteúdo do ceco foram imediatamente inspecionados e removidos. Colhidas assepticamente, utilizando-se instrumental cirúrgico e luvas esterilizados (Figura 5), as amostras de tecido foram colocadas em sacos plásticos esterilizados (BO1065WA, Whirl-pak, Nasco, Fort-Atkinson, WI, EUA) e mantidas sob refrigeração, até serem analisadas.



**Figura 4.** Câmara de passagem – vista externa



**Figura 5.** Colheita de amostras de tecidos para o isolamento microbiológico<sup>3</sup>

#### **4.10. Bacteriologia**

Os suabes retais eram imediatamente colocados em tubos com 10 mL de caldo GN-Hajna para enriquecimento primário (37°C, 24 horas). Após este enriquecimento, alíquotas de 0,1 mL e 1 mL foram transferidas para os caldos Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetracionato Müller-Kauffmann (TT), respectivamente, prosseguindo-se por incubação por 24 horas a 41 °C no RV e 48 horas a 37 °C no TT. Na sequência, uma alcada dos mesmos foi transferida para placas contendo ágar xilose-lisine-tergitol (XLT-4) (Bacto XLT-4, 223420, Difco) e

---

<sup>3</sup> Necropsia realizada no Laboratório de Pesquisa em Suínos – Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária - FCAVJ-UNESP

verde brilhante modificado (VBM) (Oxoid, CM329), ambos contendo ácido nalidíxico (50µg/mL), as quais ficaram incubadas por mais 24 horas a 37 °C (FRESCHI, 2007).

As amostras de tecido foram processadas de acordo com protocolo descrito por HURD *et al.* (2001). Os tecidos, logo após a colheita foram flambados e transferidos para sacos plásticos estéril. Água peptonada tamponada a 2% (Oxoid, CM509) foi adicionada, no volume de 200 mL a cada amostra, as quais foram homogeneizadas utilizando-se homogeneizador de amostras patogênicas (MA440/CF, Marconi, Piracicaba, SP) a 260 rpm por 1 minuto. As amostras foram incubadas à 37°C por 24 horas. Posteriormente, alíquotas de 0,1 mL e 1 mL foram transferidos aos caldos RV e TT, seguindo mesmo procedimento feito para amostras de suabes.

Nas placas de XLT-4 e VBM, as colônias apresentando características morfológicas próprias ao gênero *Salmonella* foram transferidas para tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (Oxoid, CM277) e ágar lisina (LIA) (Oxoid, CM381). Todas as cepas presuntivamente identificadas como *S. enterica* foram confirmadas utilizando-se soro polivalente flagelar O (poli-O) e anti-antígeno do Grupo D (anti-D) (Probac do Brasil, São Paulo, SP). O protocolo de isolamento utilizado está ilustrado na Figura 6.

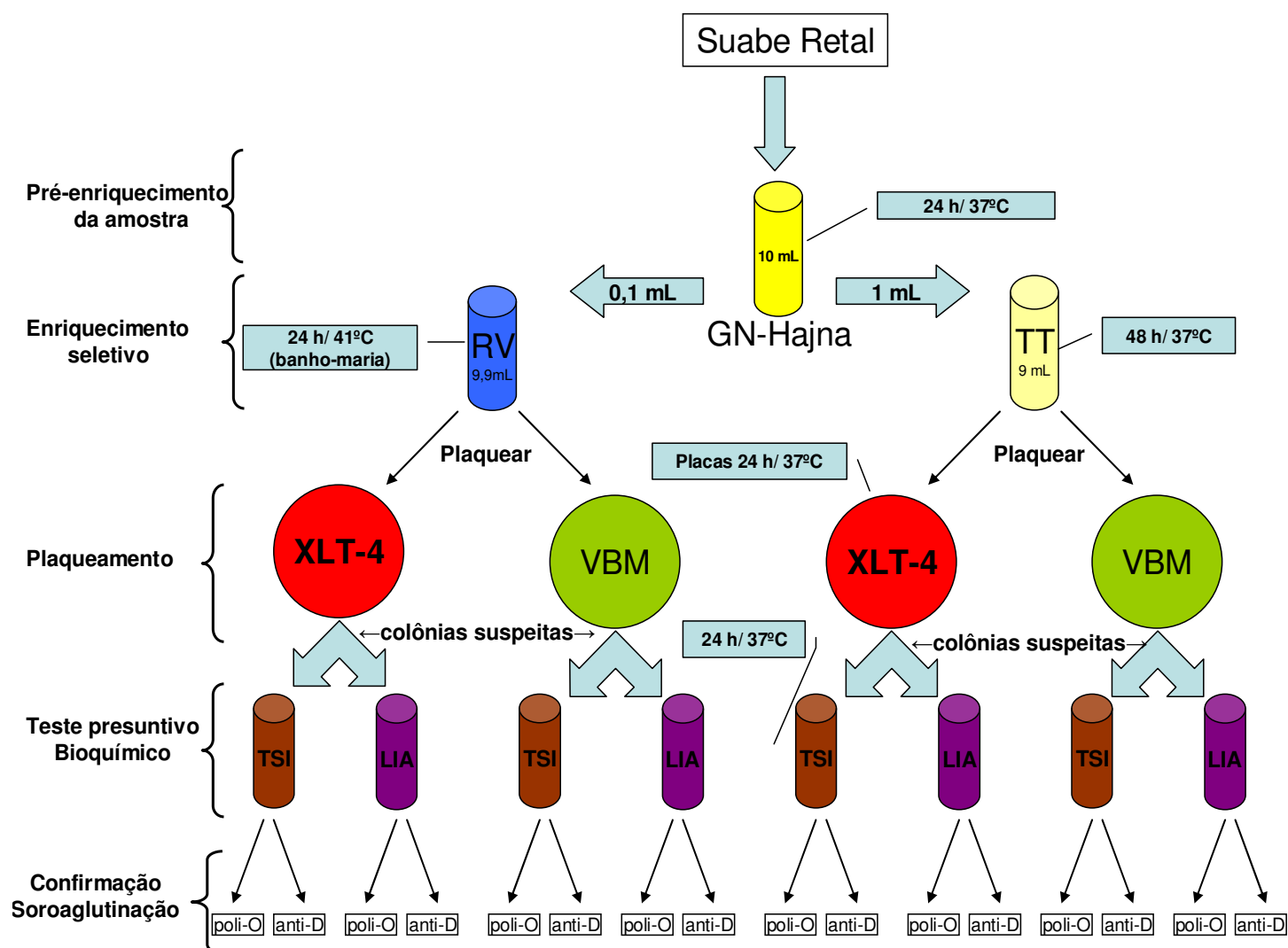


**Figura 6.** Esquema representativo do protocolo de isolamento bacteriológico utilizado para detecção de *Salmonella Panama*<sup>NaI+</sup>

#### **4.11. Teste de ELISA**

O teste de ELISA indireto para o monitoramento da infecção por *Salmonella* em suínos foi desenvolvido pela EMBRAPA Suínos e Aves, Concórdia – SC, com a finalidade de monitorar rebanhos para a infecção pelos sorotipos de *Salmonella* mais prevalentes em suínos no sul do Brasil. Este teste foi produzido a partir de antígeno lipopolissacarídeo de *Salmonella* Typhimurium e apresenta reação cruzada para os sorotipos Agona, Derby, Bredney e Panama.

Neste trabalho foram colhidas amostras de sangue em dois momentos: na chegada dos leitões ao Laboratório, no início do período de monitoramento pré-inoculação (21º dia de idade), e ao final do período experimental (42º dia de idade). Colheu-se, ainda na granja, amostra da porca, mãe dos leitões utilizados neste estudo. O material foi enviado ao Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA que gentilmente realizou os testes ELISA.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Período pré-inoculação

#### 5.1.1. Seleção da granja

Os resultados da aplicação de questionário, realizado para a seleção da granja que forneceria os animais experimentais, conforme critérios indicados pelo MAPA, 2002 – Instrução Normativa nº 19, elegeu a Granja Santa Paula, localizada no município de Colina – SP. A pontuação atingida pela granja (4 pontos), classifica-a como granja “A” – bem protegida, conforme Quadro 3, a seguir.

**Quadro 3.** Resultado da avaliação do grau de vulnerabilidade da granja produtora de suínos a entrada de patógenos externos. Modelo proposto pela Instrução Normativa nº 19 de 2002 - MAPA, 2002

| Variáveis                                                                                              | Critérios                                                     | Pontuações | Obtido na granja |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------|------------------|
| 1. Distância com a unidade de produção de suínos mais próxima não certificada ou abatedouro de suínos. | Maior de 3,5 km                                               | 0          | 0                |
|                                                                                                        | De 1 a 3,5 km                                                 | 1          |                  |
|                                                                                                        | De 500 m a 1 km                                               | 2          |                  |
|                                                                                                        | menor de 500m                                                 | 3          |                  |
| 2. Densidade de rebanhos suínos em um raio de 3,5 Km                                                   | 1 rebanho                                                     | 0          | 0                |
|                                                                                                        | 2 a 3 rebanhos                                                | 1          |                  |
|                                                                                                        | 4 ou mais rebanhos                                            | 2          |                  |
| 3. Granjas fornecedoras de suídeos para reposição do plantel.                                          | reposição própria ou por histerectomia                        | 0          | 1                |
|                                                                                                        | 1 fornecedor                                                  | 1          |                  |
|                                                                                                        | 2 fornecedores                                                | 2          |                  |
|                                                                                                        | 3 ou mais fornecedores                                        | 3          |                  |
| 4. Distância de rodovia que transporta suínos                                                          | maior de 500m                                                 | 0          | 0                |
|                                                                                                        | de 300m a 500m                                                | 1          |                  |
|                                                                                                        | menor de 300m                                                 | 2          |                  |
| 5.1 Qualidade do isolamento da granja - cercas                                                         | ótima – cerca dupla intercalada com cinturão verde            | 0          | 1                |
|                                                                                                        | muito boa – cerca de tela afastada pelo menos 50m dos galpões | 1          |                  |
|                                                                                                        | boa – cerca de tela com menos de 50m dos galpões              | 2          |                  |
|                                                                                                        | razoável – apenas cerca não telada                            | 3          |                  |

|                                                        |                                                                                                                          |   |          |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------|
| 5.2 Qualidade do isolamento da granja – cinturão verde | distância entre as instalações e a linha externa do cinturão verde de no mínimo 50m                                      | 0 | 0        |
|                                                        | distância entre as instalações e a linha externa do cinturão verde menor que 50 m.                                       | 1 |          |
|                                                        | não possui cinturão verde                                                                                                | 2 |          |
| 6. Controle de visitas na granja                       | ocasional com vazio sanitário de 72 h, sistema de banho com troca de roupas e calçados e banheiro com área suja e limpa. | 0 | 1        |
|                                                        | ocasional com vazio sanitário de 48 h, sistema de banho com troca de roupas e calçados e banheiro com área suja e limpa. | 1 |          |
|                                                        | ocasional com vazio sanitário de 24 h, sistema de banho com troca de roupas e calçados e banheiro com área suja e limpa. | 2 |          |
| 7. Existência de quarentenário                         | sim, distante no mínimo 500m com cinturão verde ou não introduz suínos no rebanho.                                       | 0 | 1        |
|                                                        | sim, mas com menos de 500m do rebanho ou sem cinturão verde.                                                             | 1 |          |
|                                                        | Introduz os suínos de reposição sem fazer quarentena                                                                     | 2 |          |
| 8. Ração fornecida aos animais                         | não usa farinhas de origem animal                                                                                        | 0 | 0        |
|                                                        | usa farinhas de origem animal                                                                                            | 2 |          |
| 9. Origem da ração fornecida aos animais               | fábrica própria na propriedade                                                                                           | 0 | 0        |
|                                                        | fábrica de terceiros                                                                                                     | 1 |          |
| 10. Transporte do alimento usado na granja             | graneleiro ou caminhão que não transporta suínos.                                                                        | 0 | 0        |
|                                                        | caminhão que transporta suínos                                                                                           | 2 |          |
| <b>Pontuação total obtida na granja</b>                |                                                                                                                          |   | <b>4</b> |

### 5.1.2. Resultados do monitoramento ambiental

A Tabela 2 mostra os resultados dos isolamentos microbiológicos realizados para monitoramento inicial pré-inoculação para a presença de contaminação por *Salmonella* sp. As análises foram feitas no período pré-inoculação envolvendo amostras da mãe dos leitões (suabe retal), do ambiente de

criação (piso da cela parideira), das gaiolas individuais, dos isoladores e da água e ração fornecida aos leitões. Conforme exposto na Tabela 2, todos os resultados foram negativos para presença de *Salmonella* sp.

**Tabela 2.** Resultados das análises de isolamento bacteriológico para *Salmonella* sp. no monitoramento ambiental

| <b>Material</b>                                        | <b>Frequência</b> | <b>Resultado</b> |
|--------------------------------------------------------|-------------------|------------------|
| Suabe retal da porca mãe                               | 1 vez             | Negativo         |
| Suabe da cela de maternidade (granja de origem)        | 1 vez             | Negativo         |
| Suabe das gaiolas individuais (período pré-inoculação) | 3 vezes           | Negativo         |
| Suabe dos isoladores (3) pos lavagem e desinfecção     | 1 vez             | Negativo         |
| Ração                                                  | 5 vezes           | Negativo         |
| Água                                                   | 5 vezes           | Negativo         |

### 5.1.3. Resultados do monitoramento dos animais no período pré-inoculação

No período pré-inoculação foi feita três colheitas de fezes através de suabes retais para análise microbiológica, com intervalo de dois dias cada. Nesta análise os meios de cultura para isolamento não continham ácido nalidíxico (50µg/mL). Todos os resultados foram negativos quanto à presença de *Salmonella* sp. (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resultados da detecção de *Salmonella* sp. pelo isolamento bacteriológico a partir de amostras de suabes retais colhidos individualmente dos suínos no período de adaptação

| <b>Dias de Colheita</b> | <b>Leitão<br/>1</b> | <b>Leitão<br/>2</b> | <b>Leitão<br/>3</b> | <b>Leitão<br/>4</b> | <b>Leitão<br/>5</b> | <b>Leitão<br/>6</b> |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>1º</b>               | -                   | -                   | -                   | -                   | -                   | -                   |
| <b>2º</b>               | -                   | -                   | -                   | -                   | -                   | -                   |
| <b>3º</b>               | -                   | -                   | -                   | -                   | -                   | -                   |

( - ), negativo; ( + ), positivo

## 5.2. Período pós-inoculação

### 5.2.1. Monitoramento pós-inoculação

No período de monitoramento pós-inoculação, os leitões encontravam-se dentro dos isoladores, e foram feitas diariamente, respeitando sempre o intervalo de 24 horas, as colheitas de fezes através de suabes retais, durante os 14 dias.

Não foram encontradas amostras positivas para *Salmonella* sp. nas amostras dos suabes colhidos dos leitões controles (C1 e C2) e dos leitões sentinelas (S3 e S4), no entanto, nos leitões inoculados, o leitão I6, 24 horas após a inoculação, ou seja, na primeira colheita foi possível isolar a *Salmonella* Panama<sup>Nal+</sup>, sendo que já havia iniciado a excreção do microrganismo. Dos leitões infectados (I5 e I6), com discreta intermitência, foram isolados *Salmonella* Panama<sup>Nal+</sup> em praticamente todas as colheitas (Tabela 4).

Pôde-se observar durante todo o período pós-inoculação que os leitões inoculados (I5 e I6) apresentavam sinais clínicos aparentes de uma infecção entérica, pois desenvolveram um quadro de diarreia. Porém esta diarreia aparentemente era leve (ou branda), pois os leitões inoculados tinham comportamento e desenvolvimento corporal semelhantes aos demais e, no consumo de ração e água não foi notado diferença entre os grupos.

**Tabela 4.** Resultados da detecção de *Salmonella* Panama<sup>nal+</sup> pelo isolamento bacteriológico a partir de amostras de suabes retais colhidos individualmente dos suínos nos isoladores. Jaboticabal-SP, 2007

| Dia             | Isolador 1<br>(animais controle) |    | Isolador 2<br>(animais inoculados) |    | Isolador 3<br>(animais sentinelas) |    |
|-----------------|----------------------------------|----|------------------------------------|----|------------------------------------|----|
|                 | C1                               | C2 | I5                                 | I6 | S3                                 | S4 |
| 1 <sup>o</sup>  | -                                | -  | -                                  | +  | -                                  | -  |
| 2 <sup>o</sup>  | -                                | -  | +                                  | -  | -                                  | -  |
| 3 <sup>o</sup>  | -                                | -  | -                                  | +  | -                                  | -  |
| 4 <sup>o</sup>  | -                                | -  | -                                  | -  | -                                  | -  |
| 5 <sup>o</sup>  | -                                | -  | +                                  | -  | -                                  | -  |
| 6 <sup>o</sup>  | -                                | -  | +                                  | +  | -                                  | -  |
| 7 <sup>o</sup>  | -                                | -  | +                                  | +  | -                                  | -  |
| 8 <sup>o</sup>  | -                                | -  | +                                  | +  | -                                  | -  |
| 9 <sup>o</sup>  | -                                | -  | +                                  | +  | -                                  | -  |
| 10 <sup>o</sup> | -                                | -  | +                                  | +  | -                                  | -  |
| 11 <sup>o</sup> | -                                | -  | +                                  | -  | -                                  | -  |
| 12 <sup>o</sup> | -                                | -  | -                                  | -  | -                                  | -  |
| 13 <sup>o</sup> | -                                | -  | +                                  | -  | -                                  | -  |
| 14 <sup>o</sup> | -                                | -  | -                                  | +  | -                                  | -  |

( - ), negativo; ( + ), positivo

### 5.2.2. Necropsia e exames microbiológicos *post mortem*

Os animais foram eutanasiados e necropsiados no 14<sup>o</sup> dia pós-inoculação. No exame macroscópico dos órgãos durante a necropsia não foi encontrada nenhuma alteração. Foram coletados os tecidos para o isolamento microbiológico. Para os animais dos grupos controle e sentinela não foram isolados *Salmonella* sp. em nenhuma das amostras examinadas, diferente dos animais do grupo inoculado, onde quase a totalidade das análises revelaram-se positivas (Tabela 5).

**Tabela 5.** Resultados da detecção de *Salmonella* Panama<sup>nal+</sup> pelo isolamento bacteriológico a partir de amostras de tecidos. Jaboticabal-SP, 2007

| Tecidos                        | Animais controles |    | Animais inoculados |    | Animais sentinelas |    |
|--------------------------------|-------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|
|                                | C1                | C2 | I5                 | I6 | S3                 | S4 |
| <b>Linfonodos Mandibulares</b> | -                 | -  | +                  | +  | -                  | -  |
| <b>Tonsilas</b>                | -                 | -  | +                  | +  | -                  | -  |
| <b>Pulmão</b>                  | -                 | -  | +                  | +  | -                  | -  |
| <b>Fígado</b>                  | -                 | -  | +                  | +  | -                  | -  |
| <b>Baço</b>                    | -                 | -  | +                  | +  | -                  | -  |
| <b>Linfonodos Íleo-Cólicos</b> | -                 | -  | +                  | +  | -                  | -  |
| <b>Linfonodos Mesentérios</b>  | -                 | -  | +                  | +  | -                  | -  |
| <b>Jejuno</b>                  | -                 | -  | +                  | +  | -                  | -  |
| <b>Íleo</b>                    | -                 | -  | +                  | +  | -                  | -  |
| <b>Conteúdo do Ceco</b>        | -                 | -  | -                  | +  | -                  | -  |

( - ), negativo; ( + ), positivo

### 5.3. Teste de ELISA

Foram enviadas a EMBRAPA Suínos e Aves as amostras de soro para realização do teste ELISA. Estas amostras eram da porca mãe, dos animais no primeiro dia pré-inoculação (logo após o desmame), e dos animais ao final do período no isolador, na ocasião da necropsia. Os resultados encontram-se no Quadro 4.

**Quadro 4.** Resultados dos testes de ELISA realizados nos animais pré e pós-inoculação

| Protocolo<br>ELISA<br>Typhi20307 | Amostras | Identificação             | Interpretação |
|----------------------------------|----------|---------------------------|---------------|
|                                  | 1        | Porca Mãe                 | positivo      |
|                                  | 2        | pré-inoculação - Leitão 1 | positivo      |
|                                  | 3        | pré-inoculação - Leitão 2 | positivo      |
|                                  | 4        | pré-inoculação - Leitão 3 | negativo      |
|                                  | 5        | pré-inoculação - Leitão 4 | negativo      |
|                                  | 6        | pré-inoculação - Leitão 5 | negativo      |
|                                  | 7        | pré-inoculação - Leitão 6 | positivo      |
|                                  | 8        | pós-inoculação - C1       | negativo      |
|                                  | 9        | pós-inoculação - C2       | negativo      |
|                                  | 10       | pós-inoculação - S3       | negativo      |
|                                  | 11       | pós-inoculação - S4       | negativo      |
|                                  | 12       | pós-inoculação - I5       | negativo      |
|                                  | 13       | pós-inoculação - I6       | negativo      |

#### 5.4. Antibiograma e Sorotipificação

Uma das amostras de *Salmonella* Panama<sup>NAL+</sup> recuperada dos tecidos de um dos animais inoculados foi submetida a antibiograma e sorotipificação.

O antibiograma resultou no mesmo perfil de resistência aos antibióticos que a bactéria havia revelado no primeiro exame realizado por ocasião do preparo do inóculo. Na sorotipificação determinou-se que a amostra era *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Panama, conforme resultados fornecidos pelo Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo – SP.

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho objetivou-se avaliar, sob condições experimentalmente induzidas, a importância do contato naso-nasal na transmissão de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Panama, entre leitões desmamados. Não foi possível demonstrar, conforme evidencia os resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5, a transmissão do agente entre o grupo de leitões infectados e o grupo de leitões sentinela.

Como pode ser visto, três pares de leitões foram alojados isoladamente, cada qual em uma câmara de isolamento. Os leitões controles ocuparam uma das câmaras, que recebeu aeração própria. Os leitões infectados e sentinelas ocuparam cada qual uma câmara e a aeração, para estes dois grupos, foi conjunta – o ar inicialmente entrava na câmara dos animais sentinela e desta passava para a câmara contígua, que alojava os leitões infectados. A transferência do ar era feita através de um orifício que permitia a comunicação entre as duas câmaras.

O orifício era elevado do piso e com diâmetro adequadamente projetado, permitia apenas que os animais de uma baia tocassem, com o focinho, os animais da baia contígua. Admitiu-se com este planejamento experimental, que se a infecção fosse transferida dos animais infectados para os animais sentinela, o fato seria decorrente do contato naso-nasal ocorrido entre os animais dos dois grupos.

A real origem da infecção, no caso, poderia decorrer do contato com secreções nasais ou com as fezes que, muito freqüentemente, podem estar presentes no focinho dos animais. As salmonelas podem ser facilmente isoladas de descargas nasais de suínos infectados (SCHWARTZ, 1999). Há comprovação de que os tecidos linfóides nasais associados (NALT) são importantes locais de invasão para *S. Typhimurium* em suínos (FEDORKA-CRAY et al., 1995). O comportamento de fuçar dos suínos habitualmente favorece a presença de material fecal nas cavidades nasais (BASKERVILLE e DOW, 1973).

A infecção, entretanto, não se transferiu fato que corrobora observações de FRESCHI (2007) em seu estudo com a *S. Derby* e OLIVEIRA (2007) com *S. Agona*, ao mesmo tempo em que contrariam achados de OLIVEIRA (2007) com a *S. Thyphimurium*. Muitas seriam as causas a justificar os resultados observados. A não infecção dos leitões inoculados, o não contato entre os leitões das duas baias, a baixa virulência ou o baixo título de eliminação do agente nas fezes seriam, possivelmente, as justificativas mais plausíveis.

Como demonstram os resultados apresentados na Tabela 4, a infecção dos leitões foi satisfatoriamente induzida. Já no primeiro dia pós-inoculação foi possível isolar o agente das fezes dos animais inoculados e sua eliminação nas fezes persistiu durante todo o período, o que corrobora observações de FEDORKA-CRAY et al. (1994), OLIVEIRA et al. (2006), OLIVEIRA et al. (2007) e FRESCHI (2007). Foi possível evidenciar a intermitência na eliminação da salmonela. Interessante é observar que do 6º dia pós inoculação até o 10º dia os dois animais inoculados excretaram salmonela constantemente, sugerindo um pico de excreção.

Os resultados mostrados na Tabela 5 revelam que não apenas a infecção se efetivou, mas se difundiu além dos limites gastrentéricos, já que a bactéria inoculada pode ser recuperada de linfonodos e diversos órgãos internos, duas semanas após a inoculação. Obteve-se, pois, uma infecção sistêmica, fato que caracteriza o sorotipo como relativamente virulento.

Uma diferença importante dos outros ensaios realizados foi que a cepa utilizada (*Salmonella* Panama) era oriunda de isolados de linfonodos mesentéricos de animais a campo e a dose inoculada foi maior que as usadas nos demais experimentos ( $2,16 \times 10^{10}$  UFC/ml).

O modelo experimental empregado, já foi testado anteriormente (FRESCHI, 2007; OLIVEIRA et al., 2007). Porém neste ensaio havia uma diferença. No sistema usado nos trabalhos anteriores não era possível fazer a colheita de fezes diretamente no reto dos animais, pois a montagem do sistema não permitia, somente foi feita a colheita de fezes a partir do saco de dejetos. Para este estudo

os isoladores foram adaptados, de modo a viabilizar colheitas diárias de fezes diretamente do reto dos animais.

Os resultados obtidos por OLIVEIRA (2007), que observaram a transferência da infecção pela via naso-nasal de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium, indicam a aplicabilidade do modelo (validade para outros sorotipos). Também estes resultados sugerem que o contato naso-nasal entre os leitões ocorre. Afora esta observação vale ressaltar que em todos os estudos onde foi empregado o presente modelo, foi possível observar que os animais das duas baias se tocavam várias vezes ao dia.

O teste de ELISA realizado detectou a presença de anticorpos maternos em 3 dos 6 leitões no período pré inoculação, assim como na porca mãe, evidenciando o contato da porca em alguma ocasião de sua vida com a *Salmonella* sp. e a transferência dessa imunidade aos leitões. Os isolamentos microbiológicos realizados no período pré inoculação asseguram que naquele momento não havia circulação do patógeno. Já ao final do experimento todos os animais foram negativos, inclusive os infectados, resultado que corrobora com VAN DER WOLF et al. (2001) e VAN DER GAAG et al. (2004), que demonstraram a soroconversão para *Salmonella* sp. aos 21 dias pos infecção, sendo que neste ensaio foram 14 dias pos inoculação.

A eliminação de quantidades insuficientes do agente nas fezes ou a sua baixa transmissibilidade, possivelmente representem as melhores justificativas para os resultados obtidos neste trabalho. Este e outros trabalhos já realizados (FRESCHI, 2007; OLIVEIRA et al., 2007), todos conduzidos com igual propósito e metodologia, fazem supor que a biologia e características dos diversos sorotipos de *Salmonella* sp. é realmente diversificada e muitos outros estudos devem ser conduzidos até que se obtenha a necessária compreensão deste importante tema.

## 7. CONCLUSÃO

Com base no material e metodologia empregados no presente estudo foi possível demonstrar que:

- A infecção experimental de suínos com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Panama é viável, podendo produzir infecção sistêmica em leitões jovens.
- Não foi possível demonstrar a transferência naso-nasal do agente entre leitões desmamados.

## 8. REFERÊNCIAS

ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Suínos. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em: 3 de outubro de 2007.

ALBAN, L.; STEGE, H.; DAHL, J. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish Salmonella surveillance-and-control program. **Prev. Vet. Med.**, n. 53, p. 133 – 146, 2002.

BAGER, F.; PETERSEN, J. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of Salmonella from pigs. **Acta Vet. Scand.**, v. 32, p. 473-81, 1991.

BAHNSON, P.B. et al. Association between on-farm and slaughter plant detection of Salmonella in market-weight swine. **J. Food Protect.**, v. 68, p. 246-250, 2005.

BASKERVILLE, A.; DOW, C. Pathology of experimental pneumonia in pigs produced by *Salmonella cholerae-suis*. **J. Comp. Pathol.** n. 83, p. 207-215, 1973.

BEAN, N.H. Surveillance for foodborne disease outbreaks-USA, 1988-1991. **CDC Surveillance Summaries**, p. 1-66, 1996.

BERENDS, B.R; URLINGS, H.A.P.; SNIDJERS, J.M.A. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. **Int. J. Food Microbiol.**, v.30, p.37-53, 1996.

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

BOGEL, K. Global cooperation in the control of salmonellosis. In: SYMPOSIUM ON THE DIAGNOSIS AND CONTROL OF SALMONELLA (G.H. Snoeyenbos, ed.), San Diego, California, 29 october, 1991. **Proceedings...** United States Animal Health Association, Richmond, Virginia, p. 1-5.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect of foodborne bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 30, n. 1-2, p. 9-25, 1996.

BOTTELDOORN, N.; HEYNDRIX, M.; RIJSENS, N.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, I. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination on the slaughterhouse. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, n. 5, p. 891-903, 2003.

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

CARLSON, A.R.; BLAHA, T. In-herd prevalence of *Salmonella* in 25 selected Minnesota swine farms. **J. Swine Health Prod.**, v.9, p. 7-10, 2001.

CARDOSO, M. Doenças transmitidas por alimentos de origem suína. In: SIMPOSIO UFRGS SOBRE MANEJO, REPRODUCAO E SANIDADE SUINA, 1, 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2006. p. 92-103.

CASTAGNA, S.M.F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* ao abate e contaminação de embutidos frescal. **Acta Sci. Vet.**, v. 32, p. 141-147, 2004.

CHEN, T.; THIEN, P.; LIAW, S.; FUNG, C.; SIU, L.K. First report of *Salmonella enterica* serotype Panama meningitis associated with consumption of contaminated breast milk by a neonate. **J. Clinical Microbiol.**, Oct. 2005, p. 5400-5402, 2005.

DAHL, J.; WINGSTRAND, B.; NIELSEN, B. Elimination of *Salmonella* Typhimurium infection by the strategic movement of pigs. **Vet. Rec.**, v. 140, n. 26, p.679-681, 1997.

DAVIES, P.R.; MORROW, W.E.M.; JONES, F.T.; DEEN, J.; FEDORKA-CRAY, P.J.; GRAY, J.T. Risk of shedding of *Salmonella* by market-age hogs in a barn with open flush gutters. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.210, p.386-389, 1997.

DAVIES, P.R.; FUNK, J. Epidemiology and control of salmonella in pork-some of the questions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3., 1999, Washington DC. **Proceedings**. Washington: Biomedical Communications Center, p. 1-11, 1999.

DAVIES, P.R.; TRUKSON, P.K., FUNK, J.A. et al. Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faces of naturally infected pigs. **J. Appl. Microbiol.**, v. 89, p. 169-177, 2000.

DE JONG, H.; EKDAHL, M.O. Salmonellosis in calves-the effect of dose rate and other factors on transmission. **NZ Vet. J.**, v. 13, p. 59-64, 1965.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. **EFSA J.**, v. 310, n. 10, p. 23-95, 2006.

FEDORKA-CRAY, P.J.; WHIPP, S.C.; ISAACSON, R.E.; NORD, N; LAGER, K. Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. **Vet. Microbiol.**, v. 41, p. 333-344, 1994.

FEDORKA-CRAY, P.J.; KELLEY, L.C.; STABEL, T.J.; GRAY, J.T.; LAUFER, J.A. Alternative routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. **Infect. Immunol.**, v. 63, p. 2658-2664, 1995.

FEDORKA-CRAY, P.; McKEAN, J.D.; BERAN, G.W. Prevalence of *Salmonella* in swine and pork: A farm to consumer study. **ISU Swine Research Report**, 1997. Disponível em: <<http://www.wxtension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports/asl-1507.pdf>>. Acesso em: 15 outubro de 2007.

FEDORKA-CRAY, P.J.; GRAY, J.T; WRAY, C. *Salmonella* infections in pigs. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.) **Salmonella in domestic animals**. Oxford: Oxford University Press, p. 191-207, 2000.

FEDER, I. *et al.* Evaluation of enrichment techniques for the isolation of *Salmonella choleraesuis* from swine faeces. **J. Microbiol. Methods**, v. 33, p. 143-151, 1998.

FONSECA, M. F. C. Cenários no SAA no Século XXI: Algumas Tensões e Negociações Encaradas pelo Enfoque Orgânico e Agroecológico. Conferência virtual global sobre produção orgânica de bovinos de corte. Embrapa, set.-out. De 2002. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congressovirtual/pdf/portugues/05pt02.pdf>>. Acesso em 3 de outubro de 2007.

FORSHELL, L.P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.

FRESCHI, C.R. **Investigação experimental sobre a transmissão aerógena e naso-nasal de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Derby em suínos.** 2007. 60 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista-UNESP, Jaboticabal, 2007.

FUNK, J.A.; DAVIES, P.R.; NICHOLS, M.A. The effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine faces. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, p. 412-418, 2000.

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

GAST, R.K. *Salmonella* infections. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W. **Diseases of Poultry**, 11 ed. Ames, Iowa University Press, cap. 16, p. 567-613, 2003.

GEIMBRA, M.P.; TONDO, E.C.; OLIVEIRA, F.A.; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **J. Food Protect.**, v. 67, p. 1229-33, 2004.

GORTON, S.J.; KLIEBENSTEIN, J.B.; BERAN, G.W. Cost of on-farm microbial testing for *Salmonella*: An application by farm size and prevalence level. ISU Swine Research Report, 1996. Disponível em: <[www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports](http://www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports)>. Acesso em: 10 de outubro de 2007.

GRESHAM, A.C.J. An old disease of increasing significance-*Salmonella* infection in pigs in Great Britain. **Pig J.**, v. 37, p. 59-64, 1996.

HEARD, T. W. Housing and salmonella infections. **Vet. Rec.**, v. 85, n. 18, p. 482-484, 1969.

HURD, H.S. et al. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, n.8, p. 1194-1197, 2001.

HURD, H.S. et al. Estimation of the *Salmonella enterica* prevalence in finishing swine. **Epidemiol. Infect.**, v. 132, n. 1, p. 127-135, 2004.

ISSACSON, R.E.; FIRKINS, L.D.; WEIGEL, R.M.; ZUCKERMANN, F.A.; DIPIETRO, J.A. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella* Typhimurium among experimentally infected pigs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 60, p. 1155-1158, 1999.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Rev. do Inst. Adolfo Lutz**. 58: 47-51, 1999.

KICH, J.D.; MORES, N.; PIFFER, I.; COLDEBELLA, A.; AMARAL, A.; RAMMINGER, L.; CARDOSO, M. Fatores de risco associados com a prevalência sorológica de *Salmonella* em granjas comerciais de suínos no sul do Brasil. **Ciênc. Rur.**, v. 35, p. 398-405, 2005.

KIRCH, J.D.; SCHWARZ, P.; CARDOSO, M.; TRIQUES, N.J.; VIZZOTTO, R.; RAMENZONI, M.L. O uso da Sorologia (ELISA) para monitorar a infecção por *Salmonella* em rebanhos suínos. EMBRAPA – Comunicado Técnico. 2006. Disponível em: [www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod\\_publicacao=928](http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=928) -. Acesso em: 15 de outubro de 2007.

KORSAK, N. et al. *Salmonella* contamination of pigs and pork in an integrated pig production system. **J. Food Protect.**, v. 66, p. 1126-1133, 2003.

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 EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 4, 2001, Leipzig, Germany. **Proceedings...** p. 237-243.

KRANKER, S. et al. Longitudinal investigation of *Salmonella* Typhimurium in integrated swine herds. In: IPVS CONGRESS, 17, 2002, Iowa. **Proceedings...** p.317.

LAX, A.J.; BARROW, P.A.; JONES, P.W.; WALLIS, T.S. Current perspectives in salmonellosis. **Br. Vet. J.**, v. 151, p. 351-377, 1995.

LEDERMANN, W.D. Una historia del bacilo de Eberth desde Junker hasta Germanier. **Rev. Chil. Infect.** Edición aniversario 2003., p. 58-61, 2003.

LETELLIER, A.; MESSIER, S.; PARÉ, J.; MÉNARD, J.; QUESSY, S. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. **Vet. Microbiol.**, v. 67, p. 299-306, 1999.

LEVER, M.S.; WILLIAMS, A. Cross infection of chicks by airborne transmission of *Salmonella enteritidis* PT4. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 347-349, 1996.

LO FO WONG, D.M.A. et al. Herd level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. **Pre. Vet. Med.**, v. 62, n. 4, p. 253-266, 2004.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 19 de 2002. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>>. Acesso em: 25 de outubro de 2007.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESSE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, n. 5, p. 607-25, 1999.

McDERMID, A.S.; LEVER, M.S. Survival of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *S. Typhimurium* Swindon in aerosols. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 107-109, 1996.

MICHAEL, G.B.; SIMONETI, R.; CARDOSO, M.R.I.; COSTA, M. Sorotipos de *Salmonella* isolados em uma propriedade de suínos de terminação no sul do Brasil. **Ciênc. Rur.**, v. 32, n. 3, p. 525-527, 2002.

MILES, A.A.; MISRA, S. S. The estimation of the bactericide power of the blood. **J. Hyg.**, v. 38, p. 732-739, 1938.

NIELSEN, B. et al. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. **Vet. Microbiol.**, v. 47, p. 205-218, 1995.

NOLLET, N.; HOUF, K.; DEWULF, J.; DUCHATEAU, L.; DE ZUTTER, L.; DE KRUIF, A.; MAES, D. Distribution of *Salmonella* strains in farrow-to-finish pig herds: a longitudinal study. **J. Food Protect.**, v. 68(10), p. 2012-21, 2005.

O'BRIEN, S.J.; VALK, H. Salmonella- "old" organism, continued challenges. **Euro Surveill.**, v. 8, n. 2, p. 29-31, 2003.

OLIVEIRA, C.J.B.; CARVALHO, L.F.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T. Dunging gutters filled with fresh water had no effect on the prevalence of *Salmonella enterica* on Brazilian swine farms. **Prev. Vet. Med.**, v. 55, p. 173-178, 2002.

OLIVEIRA, C.J.B.; CARVALHO, L.F.O.S.; GARCIA, T.B., Experimental airborne transmission of Salmonella Agona and Salmonella Typhimurium in weaned pigs. **Epidemiol. Infect.**, 134 (1), p. 199-209, 2006.

OLIVEIRA, C.J.B.; GARCIA, T.B.; CARVALHO, L.F.O.S.; GIVISIEZ, P.E.N. Nose-to-nose transmission of Salmonella Typhimurium between weaned pigs. **Vet. Microbiol.**, 125 (3-4), p. 355-361, 2007.

QUESSY, S.; LETELLIER, A.; NADEAU, E. Risk factors associated with the presence of *Salmonella* in swine herds in Quebec. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY E CONTROL OF SALMONELLA IN PORK, 4, 1999, Washington. **Proceedings...** Urbana-Champaign: University of Illinois, 1999, 381 p. 165-168.

RAJIC, A. et al. Longitudinal study of Salmonella species in 90 Alberta swine finishing farms. **Vet. Microbiol.**, v. 105, p. 47-56, 2005.

RUTALA, W.A. Antisepsis, disinfection, and sterilization in hospitals and related institutions. In: MURRAY, P.R. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**, 6. Ed. Washington: ASM Press, p. 227-295. 1995.

ROSTAGNO, M. et al. *Salmonella* infection in market swine during pre-slaughter holding. In: IPVS CONGRESS, 17, 2002, Iowa. **Proceedings**. IPVS, p. 319. 2002.

ROSTAGNO, M. et al. Pres-slaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4489-4492. 2003.

SALMON, D.E.; SMITH, T. The bacterium of swine plague. **Am. Mon. Microbiol. J.**, v. 7, p. 204, 1886.

SANDBERG, M. et al. An evaluation of the Norwegian Salmonella surveillance and control program in live pig and pork. **Int. J. Food Microbiol.**, n. 72, p. 1-11, 2002.

SCHWARZ, P.; BESSA, M.C.; KICH, J.; MICHAEL, T.; BERNARDI, M.L.; BARCELLOS, D.E.S.N.; CARDOSO, M. The correlation between serology and isolation of *Salmonella* in pigs at slaughter in southern Brazil. **Safe Pork**. p. 292-293. 2005.

SCHWARZ, P.; CARDOSO, M. Fatores de risco e controle da infecção por *Salmonella* em suínos: situação no Brasil. In: SIMPOSIO UFRGS SOBRE MANEJO, REPRODUCAO E SANIDADE SUINA, 1, 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2006. p. 104-111.

SCHWARZ, P.; HIROSEF.; KOLB, J.; CALVERYRA, J.; BARCELLOS, D.E.S.N.; CARDOSO, M. Longitudinal study of *Salmonella enterica* infection in a swine herd in southern Brazil. In: IPVS CONGRESS, 2006, Copenhagen. **Proceedings...** IPVS, p. 287.

SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis. In: STRAW, B.E. et al. (Ed.). **Diseases of swine**, 9 ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., p. 535-551, 1999.

SILVA, L.E.; GORTADI, C.; MOSTARDEIRO, P.; SANTIN, K.; VIZZOTO, R.; KICH, J.; NADVORINI, A.; CARDOSO, M. Estudo longitudinal da infecção por *Salmonella* em um sistema de produção de suínos. In: CONGRESSO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 11, Goiânia. **Anais...** Goiânia. 2003.

SOBESTIANSKY, J. BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L.F.; OLIVEIRA, S. **Clínica e Patologia Suína**, 2<sup>a</sup> ed., Goiânia, p. 464, 1999.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORENO, A.M.; SOBESTIANSKY, A.; POLEZE, E. **Suínos – Colheita e remessa de materiais para laboratórios para fins de diagnóstico**, 1 ed. Goiânia. 2005.

SORENSEN, L.L. et al. The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. **Vet. Microbiol.**, v. 101, n. 2, p. 131-141, 2004.

SOUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, V.; DROUIN, P.; SALVAT, G.; COLIN, P. Identification by multiplex PCR-based assay of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains from environmental swabs of poultry houses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 1-6, 1999.

STÄRK, K.D.C. et al. Differences and similarities among experts opinions on *Salmonella* enteric dynamics in swine pre-harvest. **Prev. Vet. Med.**, n. 53, p. 720, 2002.

TAUNAY, A.E. et al. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 38, p. 315-322, 1996.

TORREMORELL, M.; PIJOAN, C.; JANNI, K.; WALKER, R.; JOO, H.S. Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 58, p.828-832, 1997.

UZZAU, S. et al. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiol. Infect.**, v. 125, n. 2, p. 229-255, 2000.

VAN DER GAAG, M.A.; VOS, F.; SAATKAMP, H.W. et al. A state-transition simulation model for the spread of *Salmonella* in the pork supply chain. **Europ. J. Oper. Res.**, v.156, p.782-798, 2004.

VAN DER WOLF, P.J.; WOLBERS, W.B.; ELBERS, A.R. et al. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. **Vet. Microbiol.**, v.78, p.205–219, 2001.

VAN WINSEN, R.L. et al. Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. **Vet. Microbiol.**, v. 80, p. 267-74. 2001.

VOOGT, N. *et al.* Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 89-92, 2001.

WATHES, C.M.; ZAIDAN, W.A.R.; PEARSON, G.R.; HINTON, M.; TODD, N. Aerosol infection of calves and mice with *Salmonella typhimurium*. **Vet. Rec.**, v. 123, p. 590-594, 1988.

WEISS, L.H.N.; NONIG, R.B.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Ocorrência de *Salmonella* sp em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 22, n. 3, p. 104-108, 2002.

WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis. In: LEMAN, A.D.; STRAW, B.E.; MENGELING, S.D.; TAYLOR, D. **Diseases of swine**. 7<sup>a</sup> ed. Iowa State University Press, p. 570, 1992.

WOOD, R.L.; POSPISCHIL, A.; ROSE, R. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, p. 1015-1021, 1989.

WOOD, R.L., et al. Experimental establishment of persistent infection in swine with a zoonotic strain of *Salmonella* Newport. **Am. J. Vet. Res.**, v. 52, p. 813-819, 1991.