

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

INVESTIGAÇÃO EXPERIMENTAL SOBRE A
TRANSMISSÃO AERÓGENA E NASO-NASAL DE
***Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Derby**
EM SUÍNOS

Carla Roberta Freschi

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

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2007

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CARLA ROBERTA FRESCHI – nasceu em São Paulo – SP, no dia 13 de junho de 1975. Formou-se em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV-UNESP) em dezembro de 1999. Durante o curso de graduação, foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Realizou estágio curricular no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves – CNPSA/EMBRAPA, Concórdia – SC, sob supervisão do Prof. Dr. Nelson Mores. Iniciou mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, em março de 2001, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, como bolsista da CAPES. Defendeu, em fevereiro de 2003, dissertação intitulada “Efeito de diferentes meios de enriquecimento seletivo e técnicas de extração de DNA de amostras de fezes suínas sobre a detecção de *Salmonella* Typhimurium pela reação em cadeia da polimerase (PCR)”. Em março do mesmo ano iniciou programa de doutoramento, que ora conclui, com a defesa desta tese.

***Agradeço principalmente a DEUS,
pois sem ele nada seria possível.
Dedico aos meus pais, José e Marta,
e a meu irmão, Júlio, porque sempre
me apoiaram e incentivaram.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando de Oliveira e Silva Carvalho, pela orientação e amizade ao longo desses anos.

À Fapesp, por ter financiado o projeto.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp, que me acolheu durante estes anos.

Aos amigos Renata, Guido, Daniela, Paulo, Cláudia e Ana, pela valiosa ajuda e paciência.

A todos que fizeram parte desta jornada, cujos nomes não foram citados para que eu não cometesse o erro de esquecer algum, muito obrigada.

SUMÁRIO

	Página
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas.....	viii
I – INTRODUÇÃO.....	1
II – REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Histórico da <i>Salmonella</i>	3
2.2. Etiologia e taxonomia do gênero <i>Salmonella</i>	4
2.3. Aspectos epidemiológicos.....	5
2.4. Métodos para identificação de <i>Salmonella</i>	6
2.5. <i>Salmonella</i> spp em suínos.....	8
2.6. Ocorrência de <i>Salmonella enterica</i> em granjas e abatedouros.....	11
2.7. Fontes de introdução de <i>Salmonella</i>	14
III – MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Isoladores e experimento.....	19
3.3. Amostra de <i>Salmonella</i> Derby e preparo do inóculo.....	23
3.4. Desenho experimental.....	24
3.5. Colheita de material.....	25
3.6. Bacteriologia.....	26
3.6.1. Experimento 1 (transmissão naso-nasal).....	26
3.6.1.1. Fezes.....	26
3.6.1.2. Tecidos.....	27
3.6.1. 3. Ração.....	28
3.6.2. Experimento 2 (transmissão aerógena).....	28
3.6.2.1. Fezes.....	28
3.6.2.2. Tecidos.....	29

3.6.2.3. Amostras de ar.....	29
3.6.2.4. Ração.....	29
3.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
3.7.1. Limiar de detecção da técnica da PCR.....	31
3.8. Análise dos resultados.....	31
IV – RESULTADOS.....	32
4.1. Experimento 1 (transmissão naso-nasal).....	32
4.1.1. Monitoramento pré-inoculação.....	32
4.1.2. Amostras do saco de dejetos.....	32
4.1.3. Amostras de necropsia.....	33
4.1.4. Histopatologia.....	34
4.2. Experimento 2 (transmissão aerógena).....	35
4.2.1. Monitoramento pré-inoculação.....	35
4.2.2. Amostras dos suabes retais, das fezes do piso e do ar.....	36
4.2.3. Amostras de necropsia.....	36
4.2.4. Histopatologia.....	39
4.3. Limiar de detecção da PCR.....	40
V – DISCUSSÃO.....	41
VI – CONCLUSÕES.....	45
VII – REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 – Câmara de isolamento de suínos. a) os tubos de conexão(acima, à direita e à esquerda); b) as luvas (em azul), usadas para manejo interno dos animais; c) o depósito de ração; d) o depósito de água; e) a câmara de fumigação (utilizada para introdução e retirada de materiais no sistema); f) fenda de conexão; g) saco de dejetos.....	21
2 - Montagem dos isoladores para estudo da transmissão naso-nasal.Observar a disposição entre o isolador infectado e o sentinela, e o fluxo de ar entre eles.....	21
3 – Vista da fenda de conexão (seta) entre as câmaras de isolamento dos animais infectados e os animais-sentinelas.....	22
4 – Montagem das câmaras de isolamento (isolador) para estudo da transmissão aérea. Observar a disposição linear permitindo conexões e passagem de ar entre os três ambientes. Verificar, na porção inferior e central de cada isolador, os dutos metálicos de dejetos revestidos com sacos plásticos, os quais constituíam os sacos de dejetos.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 – Resultados da detecção de <i>Salmonella</i> Derby ^{nal+} pelo isolamento bacteriológico (ISO) e pela PCR (PCR) a partir de amostras colhidas do saco de dejetos, no experimento de transmissão naso-nasal. Jaboticabal - SP, 2007.....	33
2 – Resultados da detecção de <i>Salmonella</i> Derby ^{nal+} pelo isolamento bacteriológico (ISO) e pela PCR (PCR) a partir de amostras de tecidos, no experimento de transmissão naso-nasal. Jaboticabal – SP, 2007.....	34
3 - Resultados da detecção de <i>Salmonella</i> Derby ^{nal+} pelo isolamento bacteriológico (ISO) e pela PCR (PCR) a partir de amostras do ar (A); fezes colhidas do piso do isolador (F); suabes retais individualmente colhidos dos suínos (S), no experimento de transmissão aerógena. Jaboticabal – SP, 2007.....	38
4 - Resultados da detecção de <i>Salmonella</i> Derby ^{nal+} pelo isolamento bacteriológico (ISO) e pela PCR (PCR) a partir de amostras de tecidos, no experimento de transmissão aerógena. Jaboticabal – SP, 2007.....	39

INVESTIGAÇÃO EXPERIMENTAL SOBRE A TRANSMISSÃO AERÓGENA E NASO-NASAL DE *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Derby EM SUÍNOS.

RESUMO – Os suínos e seus produtos são considerados importantes fontes de salmonelose humana. Desta forma, o controle das infecções nas granjas é considerado essencial para a prevenção de *Salmonella* na cadeia produtiva de suínos. No entanto, o maior entrave na profilaxia da infecção é, principalmente, a falta de conhecimentos sobre sua epidemiologia em sistemas de produção intensivos de criação de suínos, principalmente em relação às possíveis vias de transmissão desse agente. Este estudo testou a hipótese da transmissão naso-nasal (E1) e aerógena (E2) de *Salmonella* Derby na espécie suína. Os experimentos foram realizados em isoladores construídos em aço inoxidável e vidro e totalmente controlados. No E1, os isoladores dos suínos inoculados e dos suínos sentinela estavam conectados por pequena fenda que permitia apenas o contato naso-nasal. Em E2 os isoladores estavam conectados por condutores de ar que permitiam o fluxo de ar unidirecional do isolador 1 (suínos controle) ao isolador 3 (suínos sentinela), passando pelo isolador 2 (suínos inoculados). A duração de ambos experimentos foi de 15 dias. Nesse período, amostras dos sacos de dejetos, dos suabes retais, das fezes do piso e do ar foram colhidas diariamente e avaliadas quanto a presença de *Salmonella*. A hipótese de transmissão naso-nasal e aerógena de *S. Derby* não foi corroborada pelo isolamento e detecção do agente nos animais sentinela.

Palavras-chave: *Salmonella*, suínos, transmissão aerógena, transmissão naso-nasal

**EXPERIMENTAL INQUIRY ON AIRBORN AND NOSE-TO-NOSE
TRANSMISSION OF *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Derby
IN SWINE.**

ABSTRACT - Pork and pork products are recognized as one of the major sources for human salmonellosis. However, the infection control in the farms is considered essential for the *Salmonella* prevention in the productive swine chain. However, the most impediment in the infection prophylaxis is, mainly, the lack of knowledge on its epidemiology in intensives production systems, mainly related to the transmission possible ways of this agent.

This study has tested the hypothesis of nose-to-nose and airborne transmission of *Salmonella* Derby in the swine species. The trials were performed using stainless-steel and glass isolation cabinets and totally controlled. In the trial 1, inoculated pigs and sentinel pigs isolation cabinets were connected by small crack that allowed only the nose-to-nose contact. In the trial 2 isolation cabinets were connected by air ducts that allowed an unidirectional airflow from cabinet 1 (control pigs) to cabinet 3 (sentinel pigs), passing through cabinet 2 (inoculated pigs).

The duration of both trials were 15 days. At this period, slurry bags, rectal swabs, pooled faecal from the floor and air samples were collected daily and assessed by culture and PCR.

The nose-to-nose and airborne transmission hypothesis of *S. Derby* was not corroborated by the agent isolation and detection in the sentinel pigs.

Keywords: *Salmonella*, swine, airborne transmission, nose-to-nose transmisson

I. INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é uma enterobactéria encontrada em diferentes espécies animais, sendo os suínos susceptíveis a ampla variedade de sorotipos. O gênero *Salmonella* foi identificado como importante causa de doença há mais de um século, e atualmente, a salmonelose representa, a mais importante causa de toxinfecção alimentar em humanos, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento. As infecções por *Salmonella*, na espécie suína, são de grande preocupação para veterinários e produtores, pois além dos prejuízos causados pelo tratamento dos animais doentes, a presença do agente em carcaças e produtos pode representar fonte de contaminação para humanos.

O crescimento de produtos de origem animal no comércio internacional e a exigência crescente por produtos mais seguros, demandada pelos consumidores, têm contribuído para aumentar a qualidade sanitária dos produtos cárneos, constituindo-se objeto de competição entre mercados exportadores. 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.

Dessa forma, níveis baixos de prevalência de *Salmonella* na produção animal devem ser conseguidos, uma vez que há correlação direta entre os níveis de contaminação de carcaças por *Salmonella* nos abatedouros e sua prevalência nos animais de granjas.

Os suínos infectados pela grande maioria dos sorotipos de *Salmonella* não exibem sinais clínicos da doença, sendo, porém, portadores que podem excretar a

bactéria de forma intermitente, e portanto, os principais envolvidos na contaminação da carne suína e seus produtos. Logo, a epidemiologia da salmonelose em suínos deve levar em consideração dois aspectos distintos: a salmonelose como infecção clínica e a contaminação por *Salmonella* em carcaças suínas e seus produtos. A escassez de conhecimentos aliada a complexidade da epidemiologia de *Salmonella* nos sistemas intensivos de criação é o principal entrave para o controle desse patógeno na cadeia produtiva de suínos. Há, portanto, necessidade de maiores conhecimentos sobre a epidemiologia de *Salmonella* nos sistemas de criação, para implantar e viabilizar medidas de seu controle, nas fases que antecedem o abate. Estudos experimentais sobre a transmissão desse agente seriam de grande valia para a implementação de medidas de controle e estratégias de prevenção eficazes. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar a importância das vias aerógena e naso-nasal na transmissão de *Salmonella* Derby em suínos desmamados.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da *Salmonella*

As salmonelas foram identificadas como importantes causadoras de doença há mais de 100 anos (LAX et al., 1995). A salmonelose representa, em muitos países, a mais importante doença transmitida pelas carnes vermelha e avícola (DAVIES, 1997b). O gênero *Salmonella* recebeu esse nome em homenagem ao bacteriologista Daniel Elmer Salmon. Salmon & Smith (1886) isolaram o microorganismo posteriormente denominado *Salmonella* Choleraesuis, e este foi o sorotipo mais isolado de plantéis suínos durante anos. Atualmente, ampla variedade de sorotipos tem sido isolada de suínos, sendo *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Agona*, *S. Anatum* e *S. Infantis* os mais freqüentes. *Salmonella* é o grupo mais complexo da família *Enterobacteriaceae*, com mais de 2.400 sorotipos descritos no esquema Kauffman-White (KONEMAN et al., 2001). Nesse esquema, as salmonelas estão agrupadas (A, B, C etc.) com base nos antígenos somáticos O e subdivididas em sorotipos (1, 2 etc.) por seus antígenos flagelares.

A salmonelose é zoonose de importância mundial. A ampla distribuição do gênero *Salmonella* entre animais e sua permanência no ambiente contribuem para que esse microorganismo assuma papel de importância na saúde pública (WEISS et al., 2002). Nos Estados Unidos da América, segundo dados do *Center for Disease Control* (CDC), 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). Anualmente, nesse mesmo país, cerca de 4 milhões de pessoas são infectadas por *Salmonella*, gerando custos médicos de até 3,8 bilhões de dólares/ano, constituindo-se no mais oneroso agente infeccioso transmitido por alimentos contaminados (ISAACSON et al., 1999). No ano de 2004, só na União Européia, 192.703 casos de salmonelose humana foram registrados (EFSA, 2005). A necessidade de

cooperação global no controle da salmonelose foi enfatizada pela Organização Mundial da Saúde (BOGEL, 1991). Isso é facilmente compreendido, visto que as infecções por *Salmonella* também são difundidas através do comércio internacional de ração animal, animais vivos e alimentos (FORSHELL & WIERUP, 2006).

2.2. Etiologia e taxonomia do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence ao reino *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, ordem *Enterobacteriales*, família *Enterobacteriaceae* (KONEMAN et al., 2001). É grupo morfológica e bioquimicamente homogêneo, constituído de bacilos Gram-negativos, não esporulantes, geralmente móveis com flagelos peritríquios (exceto *S. Gallinarum*) e intracelulares e anaeróbios facultativos (EKPERIGIN & NAGARAJA, 1998).

As salmonelas não fermentam a lactose (exceto *S. enterica* subesp. *arizonae* e *S. enterica* subesp. *diarizonae*), fermentam glicose com produção de gás (exceto *S. Typhi*); não produzem indol, não degradam a uréia e descarboxilizam lisina e ornitina (KONEMAN et al., 2001).

O trato gastrointestinal de animais de sangue quente ou frio serve como principal reservatório dessas bactérias, as quais são eliminadas, principalmente, pela via fecal (HOOK & GUERRANT, 1980). Possuem requerimentos nutricionais simples, crescendo bem a 35° - 37°C, pH 6,5 - 7,5, mas não compete bem com outros microorganismos contaminantes de alimentos, porém são conhecidas amostras adaptadas a variação maior de pH (4,5 a 9,5) e temperatura (2°C a 54°C) (D'AOUST, 1997). São muito resistentes, sobrevivendo ao congelamento e à dessecação, podendo persistir por semanas, meses e até anos no meio ambiente (BOHM, 1993). Porém, são destruídas quando expostas a temperaturas de 55°C por uma hora ou 60°C por quinze a vinte minutos, por pasteurização a 71°C por quinze segundos e por cozimento se a temperatura interna do alimento

atingir 74° - 77°C (D'AOUST, 1997). São sensíveis à luz solar e à maioria dos desinfetantes (fenóis, clorados e iodados) (SOBESTIANSKY et al., 1999). Apesar de sua resistência, acredita-se que o animal portador seja a maior fonte de infecção tanto para humanos como para os animais (FEDORKA-CRAY, 1996).

Apesar das constantes modificações taxonômicas ocorridas nos últimos anos, atualmente, a taxonomia aceita é a proposta por POPOFF & LE MINOR (1997). Estudos do DNA mediante técnicas de hibridização mostraram que o gênero *Salmonella* está constituído por duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A primeira espécie contém seis subespécies – *S. enterica* subesp. *enterica*, *S. enterica* subesp. *salamae*, *S. enterica* subesp. *arizonae*, *S. enterica* subesp. *diarizonae*, *S. enterica* subesp. *houtenae* e *S. enterica* subesp. *indica* (POPOFF & LE MINOR, 1997).

A maioria dos sorotipos isolados do homem e de animais de sangue quente pertencem a subespécie *enterica* (subespécie 1) e o nome geralmente está relacionado ao local geográfico onde foi isolado pela primeira vez. Como os sorotipos não possuem nível taxonômico de espécie, seus nomes não pertencem ao domínio do “Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana” e por isso devem ser escritos com letra tipo romano, não em itálico, da seguinte forma: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorotipo Derby; para fins práticos: *Salmonella* Derby (CAFFER & TERRAGNO, 2001).

2.3. Aspectos epidemiológicos

As salmonelas apresentam características importantes que garantem sua ampla distribuição mundial, entre elas: grande número de hospedeiros, eficiente eliminação fecal pelos animais portadores, persistência no meio ambiente, e eficaz transmissão por ração, fomites, veículos, etc (SCHWARTZ, 1999). Os sorotipos de *Salmonella* podem ser divididos em dois grupos: sorotipo hospedeiro-adaptados,

geralmente associado a doença sistêmica ou quadro clínico severo e, sorotipo não-adaptados, que normalmente causam infecções subclínicas autolimitantes.

Entre os sorotipo hospedeiro-adaptados estão: *S. Typhi* (humanos), *S. Gallinarum* (aves), *S. Abortusovis* (ovinos) e *S. Dublin* (bovinos), normalmente associados a doença sistêmica ou quadro clínico severo (UZZAU et al., 2000). Os sorotipo não-adaptados freqüentemente são associados as infecções subclínicas ou gastroenterites autolimitantes, podendo afetar ampla variedade de hospedeiros (JOSEPH, 1988).

A principal forma de transmissão é pela via fecal-oral, porém há confirmação experimental da transmissão aerógena (OLIVEIRA et al., 2004) de *Salmonella enterica* na espécie suína. Outras fontes de infecção incluem roedores, insetos, humanos, e também ração e matéria-prima contaminada (McCHESNEY et al., 1995).

Suíños sadios são freqüentemente infectados com *Salmonella* sem apresentar qualquer sintoma da doença (SWANENBURG et al., 2001), tornando-se reservatórios do microorganismo e funcionando na cadeia epidemiológica como fonte de infecção para animais e humanos. Fatores de estresse (superpopulação, transporte, calor, etc), manejo (más condições sanitárias), estado imunológico ou nutricional e outras doenças intercorrentes influenciam o desenvolvimento da salmonelose.

A taxa de morbidade nos surtos de salmonelose geralmente é alta em suínos, ovinos e bezerros, algumas vezes alcançando 50% ou mais (SCHWARTZ, 1999).

2.4. Métodos para identificação de *Salmonella*

Os métodos tradicionais para o isolamento de *Salmonella enterica* são baseados em cultivos utilizando meios seletivos, e por caracterização das colônias suspeitas por testes bioquímicos e sorológicos (SOUMET et al., 1999).

O procedimento para isolamento de *Salmonella* geralmente possui quatro fases distintas: (1) pré-enriquecimento em meio não seletivo, para permitir a ressuscitação de qualquer célula injuriada e multiplicação dos “microorganismos-alvo” e outros presentes na amostra; (2) enriquecimento seletivo, que permite a sobrevivência ou crescimento de *Salmonella*, enquanto inibe outros microorganismos presentes no caldo seletivo; (3) plaqueamento utilizando ágar que restringem o crescimento de outras bactérias que não sejam *Salmonella*, com a finalidade de produzir isolados presuntivos; e (4) confirmação, onde colônias presuntivas são sujeitas a variedade de testes bioquímicos e sorológicos para confirmar que elas pertencem ao gênero *Salmonella* e determinar seu sorotipo (VAN DER ZEE & HUIS IN'T VELD, 2000).

Vários meios de pré-enriquecimento são citados, e sua escolha deve levar em consideração o tipo de amostra a ser analisada. Entre eles estão: caldo lactose, água peptonada tamponada, caldo GN-Hajna e caldo triptona de soja (TSB) (WALTMAN, 2000).

Entre os caldos de enriquecimento seletivo mais utilizados pelos laboratórios para o isolamento de *Salmonella* estão aqueles das famílias do selenito e tetrionato e o caldo Rappaport-Vassiliadis. Já os meios de plaqueamento podem ser divididos dentro de três grupos, de acordo com o agente seletivo. São eles : ágar com sais de bile (ágar deoxicolato-citrato, ágar *Salmonella-Shigella*, ágar enterico de Hektoen Enteric e ágar xilose-lisina-deoxicolato - XLD), ágar verde brilhante e ágar sulfato de bismuto (BUSSE, 1995).

Apesar dos métodos de cultivo tradicionais serem altamente utilizados, eles são laboriosos e consomem tempo (4 a 7 dias). Além disso, estas técnicas podem apresentar baixa sensibilidade quando o nível de contaminação das amostras for baixo (FRICKER, 1987; D'AOUST, 1992). Devido a essas desvantagens, vários métodos, mais rápidos e sensíveis, para a identificação de *Salmonella*, em diferentes tipos de amostras, têm sido desenvolvidos. A hibridização do DNA (STONE et al., 1994), anticorpos fluorescentes e ELISA-teste (THOMASON, 1971), são exemplos desse métodos. A técnica da reação em cadeia da

polimerase (PCR) representa maior avanço em termos de velocidade, sensibilidade e especificidade entre os métodos de diagnóstico, e seu uso tem sido aumentado para identificar várias espécies bacterianas em amostras clínicas e alimentares (STONE et al., 1994).

2.5. *Salmonella* sp. em suínos

As infecções por *Salmonella* sp. na espécie suína causam preocupação pois podem provocar septicemia e diarreia em animais desmamados e representar fonte de infecção para humanos, decorrente do consumo de carne contaminada (WILCOCK & SCHWARTZ, 1992).

A ubiquidade do gênero *Salmonella* possibilita exposições repetidas dos suínos a vários sorotipos presentes nas rações, água e fezes dos animais infectados (LAX et. al., 1995).

Nos suínos, poucos sorotipos causam doença clínica, entretanto, aqueles que não estão associados a esse quadro são os principais envolvidos na contaminação da carne suína e seus produtos (FEDORKA-CRAY & GRAY, 1996).

A salmonelose pode se apresentar clinicamente nos animais na forma entérica (localizada) com diarreia ou na forma generalizada, afetando vários sistemas, resultado de septicemia. Os sorotipos normalmente associados são o Typhimurium para as enterites e o Choleraesuis para as septicemias, entretanto existem registros de outros sorotipos associados à doença. *Salmonella* Choleraesuis foi o principal agente da salmonelose suína em muitas regiões do mundo, incluindo América do Norte, Ásia e Europa Oriental (SCHWARTZ, 1999). Curiosamente, sua importância tem diminuído vertiginosamente em algumas regiões, como Europa Ocidental e Escandinávia. Na Dinamarca não tem sido isolada há décadas (DAHL et al., 1997). Na Grã-Bretanha, foi o principal agente de salmonelose suína até 1970. A partir de 1995, *S. Typhimurium* passou a

responder por 65% dos episódios de salmonelose suína, seguido por *S. Derby* (GRESHAM, 1996).

As infecções causadas por *S. Typhimurium* e por outros sorotipos geralmente não são acompanhadas de sinais clínicos, ou se apresentam como doenças autolimitantes restritas ao trato digestivo.

O principal ciclo de infecção é fecal-oral, podendo a bactéria se alojar nos linfonodos, carregada por macrófagos e neutrófilos, e ser excretada quando o animal for submetido a fator estressante (EKPERIGIN & NAGAJARA, 1998). Para alcançar os linfonodos, *Salmonella* sp. resiste ao ácido clorídrico do estômago, à motilidade intestinal e à ação da microbiota local, invadindo a mucosa intestinal. Segundo BAUMLER et al. (2000), a comunicação entre as placas de Peyer (células M), concentradas no íleo, e a mucosa intestinal serve de porta de entrada para *Salmonella* sp., que, utilizando a fímbria polar, alcança os folículos linfóides. A colonização desse tecido contribui para o desenvolvimento da doença localizada e sistêmica. Por outro lado, a invasão precoce por meio das tonsilas já foi descrita (FEDORKA-CRAY et al., 1997).

A doença ocorre em número variável de animais, geralmente abaixo de 15%, com mortalidade entre 4% e 6%, normalmente em leitões com menos de 5 meses de idade (SOBESTIANSKY et al., 1999). Esses animais se infectam pela entrada de suínos portadores no rebanho, os quais excretam o microorganismo, que se torna amplamente disseminado. O período de incubação é de 24 a 48 horas. Na forma localizada, os leitões apresentam diarreia aquosa, amarelada e fétida durante 3 a 7 dias, podendo ser sanguinolenta e com presença de estrias de tecido necrótico. O quadro pode ser acompanhado de hipertermia moderada, anorexia e desidratação, com perda progressiva de peso, com mortalidade baixa (SCHWARTZ, 1999).

O animal infectado pode ou não desenvolver sinais clínicos da doença, entretanto o estado de portador e conseqüente disseminador de salmonela é a forma mais importante de manutenção do agente nos rebanhos e de sua entrada nos frigoríficos (SCHWARTZ, 1999). Neste último caso, sua importância está

relacionada à saúde pública, pois são as principais fontes de contaminação das carcaças nos abatedouros e passam despercebidos enquanto estão na propriedade. É possível que o ser humano adquira salmonelose mediante contato direto com animais infectados (GRESHAM, 1996). Entretanto, cerca de 95% dos casos de salmonelose humana são causados pela ingestão de alimentos contaminados (BAGGESEN & WEGENER, 1994; EKPERIGIN & NAGARAJA, 1998).

Sabe-se que os suínos infectados são a principal fonte de contaminação das carcaças (BORCH et al., 1996; SORENSEN et al., 2004). No entanto, a prevalência da infecção determinada ao abate pode não refletir a real prevalência na granja. Nesse caso, a prevalência na granja é normalmente superestimada, em função de muitos suínos infectarem-se durante o transporte ao frigorífico ou mesmo nas baias de descanso pré-abate (HURD et al., 2004). Além disso, a contaminação cruzada por outros animais na linha de abate ou pelo próprio ambiente do frigorífico também pode causar contaminação final das carcaças.

No Estado de São Paulo, entre 1950 e 1990, *S. Typhimurium*, *S. Agona* e *S. Infantis* foram os principais sorotipos isolados de casos de salmonelose humana (TAUNAY et al., 1996). Esses sorotipos também têm sido isolados de suínos criados intensivamente no Brasil (LANGENEGGER et al., 1983; MICHAEL et al., 2002; WEISS et al., 2002;), fato que caracteriza os suínos como reservatórios de salmonelas potencialmente patogênicas ao ser humano.

Nos Estados Unidos da América, são registrados anualmente, entre 40.000 e 60.000 casos de salmonelose humana, o que gera grandes gastos aos sistemas de saúde. ROBERTS (1989) estimou custo de U\$ 700 por caso clínico humano registrado nesse país. Segundo HALD & WEGENER (1999), entre as fontes de infecção para humanos na Dinamarca, 40% a 45% são provenientes de ovos e 10% a 15% de produtos suínos. Nesse mesmo país houve surto de infecção humana por *S. Typhimurium* cuja fonte de infecção estava relacionada à ingestão de carne suína contaminada (MAGUIRE et al., 1993).

No Brasil, a bibliografia disponível sobre os danos causados pela *Salmonella* à saúde pública é ainda muito escassa sem a possibilidade de qualquer análise econômica.

O processo de consolidação da indústria de produtos cárneos e sua tendência a alcançar mercados cada vez maiores e distantes, acarreta riscos de surgimento de surtos de salmonelose geograficamente dispersos (ALTEBRUSE et al., 1998). Existe demanda, principalmente entre os consumidores dos países industrializados, quanto à segurança dos produtos de origem animal (BLAHA, 2001). Associa-se a isso o fato da Dinamarca ter lançado, com sucesso, o programa de controle de *Salmonella* em rebanhos suínos, desencadeando pressão em outros países produtores para a implementação de medidas semelhantes. Assim, muitos países têm implantado medidas para a redução e o controle de *Salmonella* na cadeia produtiva da carne suína, visto que elas constituem instrumento de competição entre mercados exportadores de carne suína (EMBORG et al., 1996; MOUSING et al., 1997; DAVIES et al., 1998).

2.6. Ocorrência de *Salmonella enterica* em granjas e abatedouros

A ocorrência de *Salmonella enterica* nos sistemas intensivos de criação é bastante freqüente em vários países.

HARRIS et al. (1997), analisando amostras de ração e ingredientes destinados a suínos, identificaram sete dos treze sorotipos isolados de *Salmonella* (Worthington, Anatum, Heidelberg, Agona, Montevideo, Oranienberg e Derby) como os mais comumente isolados de suínos e seres humanos.

Em estudo realizado utilizando amostras do meio ambiente colhidas de granjas de terminação, LETELLIER et al. (1999) detectaram *Salmonella* em 70,7% (29/41) das granjas, e em cinco destas granjas o sorotipo Derby foi o mais isolado (37,1%).

BAGGESEN et al. (1996) isolaram *Salmonella* a partir de dejetos (34%), fezes (25%), baias (24%), equipamentos (19%) e sistema de ventilação (12%), comprovando que a disseminação deste agente pode ser grande na propriedade, principalmente onde a infecção é clínica.

No Rio Grande do Sul, também em granjas de terminação, 30% (3/10) foram positivas para *Salmonella*, e em duas dessas granjas, mais de 50% das amostras foram positivas; os sorotipos Agona, Bredeney, Derby, Lexington, London, Mbandaka, Panama e Schwarzengrund foram identificados (WEISS et al., 2002).

MICHAEL et al. (2002) relataram o isolamento de 14 sorotipos diferentes de *S. enterica* em uma única propriedade do Rio Grande do Sul: *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Tennessee*, *S. Heidelberg*, *S. Lexington*, *S. Rissen*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka*, *S. Gruposensis*, *S. Minnesota*, *S. Montevideo*, *S. Cerro* e *S. Orion*.

No Estado da Carolina do Norte (EUA), a frequência de isolamento do sorotipo Derby foi de 24,2% em granjas de terminação (GREBEYENES et al., 2002).

Segundo o Laboratório Nacional de Referência para *Salmonella* e *Shigella* da Espanha (LNRSSSE), a *Salmonella* Derby tem sido o sorotipo mais isolado de amostras animais, principalmente em suínos (VALDEZATE et al., 2005).

Na Bélgica, os sorotipos mais isolados de amostras ambientais de frigorífico foram *S. Typhimurium* (38,6%), *S. Livingstone* (21%) e *S. Derby* (21%) (BOTTELDOORN et al., 2003).

Níveis baixos de prevalência de *Salmonella* na produção animal devem ser mantidos (KRUSE, 1999), pois há correlação positiva entre os níveis de contaminação de carcaças por *Salmonella* e sua prevalência nos animais destinados ao abate (WIDDERS et al., 1996). A infecção de rebanhos tende a ser problema persistente nos sistemas de produção de suínos, uma vez que diversos fatores podem contribuir para a cadeia epidemiológica do agente, dificultando o seu controle (BLAHA, 2001).

No Brasil, tem sido relatada a presença de animais portadores de *Salmonella* spp. ao abate e contaminação do produto final. Estudo recente realizado no Rio Grande do Sul indicou que 55,66% (167/300) dos suínos foram positivos ao abate, amostrados a partir de conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos, em três frigoríficos com serviço de Inspeção Federal, onde os sorotipos mais prevalentes foram: Typhimurium (24,3%), Agona (19,9%), Derby (13,2%) e Bredeney (12%) (BESSA et al., 2004). Em trabalho semelhante, CASTAGNA et al. (2004) isolaram *Salmonella* de pelo menos uma das amostras colhidas em 79% (71/90) dos suínos avaliados. Ocorreu, ainda, associação positiva entre amostras de linfonodos mesentéricos e amostras de tonsilas colhidas em conjunto com linfonodos submandibulares. Os sorotipos mais isolados foram Typhimurium (28,9%), Bredeney (26,7%), Derby (16%), Infantis (7,0%), Panama (4,8%), Enteritidis (4,3%), Tennessee (3,2%), Agona (2,2%), Minnesota (1,6%), Montevideo (0,5%), Orion (0,5%) e Saint Paul (0,5%).

O isolamento freqüente de *Salmonella* em suínos em idade de abate no Brasil já havia sido observado por PESTANA & RUGAI (1943). A partir de conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos, NEIVA (1946) detectou infecção em 41,5% dos animais investigados.

Com exceção da Suécia, onde a prevalência de *Salmonella* na cadeia de produção suína tem sido extremamente baixa (THORBERG & ENGVALL, 2001), o agente é freqüentemente isolado de suínos e amostras de ambiente de frigoríficos em vários países.

Os suínos portadores de *Salmonella* são importante fonte de contaminação de carcaças, durante o processo de abate, visto que a contaminação cruzada pode ocorrer em qualquer ponto do abate (BORCH et al., 1996). Dessa forma, a redução das infecções nas granjas suínas é considerada ponto-chave no controle de *Salmonella* na carne suína.

2.7. Fontes de introdução de *Salmonella*

Considerada a complexidade da epidemiologia de *Salmonella*, decorrente da relação dinâmica entre agente, hospedeiros e fatores ambientais, conclusões definitivas sobre a transmissão e eliminação do agente dificilmente podem ser tomadas a partir de estudos realizados no campo (FUNK et al., 2001). A coordenação das atividades em todas as fases de produção é fator preponderante no sucesso de programas de controle. Tomando os princípios de programas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, e, considerando-se que a contaminação de carcaças e produtos industrializados está relacionada diretamente com a presença de portadores e excretos sadios entre os suínos, estes constituem-se no primeiro ponto crítico para a agroindústria. O controle desses portadores passa pelo monitoramento de fatores como qualidade da ração fornecida, do manejo e fatores de risco na granja e pela limpeza e desinfecção de baias de espera no frigorífico.

Algumas fontes de introdução de *Salmonella* enterica nas granjas são bem conhecidas e envolvem, principalmente, aquisição de animais infectados; água, ração e ingredientes contaminados; roedores, moscas, pássaros e mesmo funcionários ou visitantes (HEARD, 1969). No entanto, a importância de cada fonte potencial parece ser dinâmica e particular de cada granja (DAVIES & FUNK, 1999).

A prevalência de *Salmonella*, em suínos criados em sistemas intensivos, assume valores bastante variáveis, indicando a existência de importantes fatores de risco sobre a disseminação desse agente (DAVIES et al., 1997b). A diversidade de amostras das quais *Salmonella* pode ser isolada, o que pode originar ciclos de contaminação próprios de cada granja, sugere que estudos envolvendo possíveis fatores de risco associados à transmissão de *Salmonella* devam ser também avaliados experimentalmente.

A via oral de infecção, pela ingestão de ração contaminada por fezes contendo *Salmonella*, é considerada a mais importante (WILCOCK &

OLANDER, 1978). O suíno atua como um filtro biológico, concentrando e excretando salmonelas com diferentes propriedades infectantes (LINTON, 1979). Em virtude da *Salmonella* sobreviver e proliferar fora dos hospedeiros, parece ocorrer um contínuo ciclo de contaminação fecal-oral, originando um problema higiênico de difícil controle (BERENDS et al., 1996). Assim, a contaminação ambiental da creche e da terminação seriam as principais causas das infecções endêmicas por salmonelas nas granjas suínas (BERENDS et al., 1996; GRESHAM, 1996; DAVIES, 1998). Portanto, a redução da contaminação ambiental por meio de desinfecção e controle de moscas e roedores seriam as medidas mais efetivas no controle das infecções por *Salmonella* (GRESHAM, 1996).

Segundo WILCOCK & SCHWARTZ (1992), os fatores de risco para a apresentação clínica da salmonelose suína são: exposição a roedores, alimentos contaminados e suínos infectados e fatores estressantes, como transporte e superlotação, entre outros. No entanto, o esclarecimento dos fatores de risco associados à excreção da *Salmonella* sp., sem apresentação clínica, tem desafiado os pesquisadores.

HEARD (1969) observou que os fatores mais relevantes para a infecção de *Salmonella* no rebanho eram o movimento e a mistura de lotes.

Curiosamente, no entanto, o sistema de criação de suínos em sítios separados, utilizando manejo *all in-all out* (AIAO), recomendado para o controle de *Salmonella* (DAHL et al., 1997), parece não reduzir sua prevalência, quando comparado ao sistema convencional de criação, em fluxo contínuo e sem vazio sanitário entre os lotes de animais (DAVIES et al., 1997a). A prevalência de *Salmonella*, nos animais de terminação, alojados em baias de piso fenestrado, foi menor nos sistemas de criação empregando o manejo AIAO, quando comparada àquela dos sistemas de fluxo contínuo de criação (DAVIES et al., 1997b). A utilização de pisos fenestrados nas baias pode ser importante instrumento no controle de *Salmonella*, já que propicia remoção mais rápida e efetiva das fezes, além de evitar transferência de fezes de uma baia a outra.

Granjas com pisos fenestrados mostraram menor prevalência comparadas àquelas com sistema similar ao da lâmina d'água, utilizada no Brasil (DAVIES et al., 1997b; DAVIES, 1998). Esses resultados demonstram a complexidade da epidemiologia desse agente e a possibilidade de existência de outras vias de transmissão relevantes nos sistemas intensivos de criação de suínos.

A probabilidade de transmissão de uma determinada baia para as adjacentes é estimada em 90% (BERENDS et al., 1996). O contato naso-nasal entre suínos alojados em baias adjacentes foi significativamente associado à maior soroprevalência de *Salmonella* em 359 granjas de terminação na Alemanha, Dinamarca, Grécia, Holanda e Suécia (LO FO WONG et al., 2004). A separação de baias adjacentes por paredes compactas já tinha sido considerada alternativa eficiente no controle de *Salmonella* (VAN DER WOLF et al., 1998). A transmissão de *S. Typhimurium* foi demonstrada pelo contato naso-nasal entre animais infectados e sentinela, porém o mesmo não ocorreu com cepa de *S. Agona* (GARCIA, 2006).

Altas densidades, estresse de transporte e doenças nutricionais ou infecciosas concomitantes são fatores determinantes no aumento da eliminação de *Salmonella*, pelas fezes dos hospedeiros, e aquisição de infecções, pelos animais expostos. As secreções oro-faríngeas de animais infectados podem conter salmonelas, o que possibilita a infecção por contato direto (SCHWARTZ, 1999). O contato direto entre animais infectados e não infectados por *Salmonella* foi considerada a principal via de transmissão entre suínos criados intensivamente (LINTON et al., 1979). Os mesmos autores demonstraram que o aumento na incidência da infecção foi diretamente relacionado ao aumento na densidade animal. Esses achados podem sugerir que o aumento na densidade animal possibilita maior contato social entre animais, facilitando a transmissão de *Salmonella* por contato direto (FEDORKA-CRAY et al., 1994). No entanto, o estresse, decorrente do aumento da densidade de criação, pode determinar aumento na eliminação de *Salmonella* nas fezes dos animais infectados,

aumentando a pressão de contaminação no ambiente e favorecendo a transmissão por outras vias.

Adicionalmente, a aerização das secreções oro-faríngeas, fezes e partículas de poeira contaminadas por *Salmonella* torna possível a transmissão por aerossóis (SCHWARTZ, 1999). Alguns estudos experimentais já reproduziram, com sucesso, salmonelose mediante a infecção com aerossóis contendo *Salmonella* (MINEV et al., 1981), inclusive em animais esofagotomizados (FEDORKA-CRAY et al., 1995). WATHES et al. (1988), utilizando bovinos e ratos, demonstraram a necessidade de menores doses infectantes na produção de infecção pela via respiratória comparada à dose utilizada na via oral, fato também comprovado em frangos (HUMPHREY, 1998). Existem evidências de que a participação da via aerógena seja realmente importante na transmissão de *Salmonella* entre suínos criados em sistemas intensivos (HEARD & LINTON, 1966), uma vez que os aerossóis podem ser facilmente gerados a partir de fezes e da água durante a limpeza das baias ou o manejo dos dejetos (STÄRK, 1999). OLIVEIRA et al. (2005) concluíram que à pequena distância a transmissão aerógena de *S. Typhimurium* e *S. Agona* em suínos desmamados é possível. HARDMAN et al. (1991), analisando o perfil de transmissão de *Salmonella* num sistema intensivo de criação de bezerros, atribuíram ser a via aerógena a mais importante, comparada com a via oral. Estudos experimentais já comprovaram a importância dessa via na transmissão de *Salmonella* Enteritidis entre frangos (GAST et al., 1998; HOLT et al., 1998). Em estudo experimental utilizando câmaras fechadas e separadas apenas por condutores de ar, GAST et al. (1998) demonstraram a participação dos aerossóis na contaminação ambiental por *Salmonella* Enteritidis, potencializando, inclusive, a via oral de infecção. McDERMID & LEVER (1996) demonstraram que *Salmonella* Typhimurium apresentou 100% de viabilidade em aerossóis, comparada a 70% apresentada pela *Salmonella* Enteritidis. O frequente isolamento de *Salmonella* Enteritidis do ar de galpões de frango (LEVER & WILLIAMS, 1996) indica que a via aerógena de transmissão pode ser relevante também nas granjas suínas. Dessa forma, a real

importância dos aerossóis na transmissão de *Salmonella* entre suínos confinados necessita ser avaliada (DAVIES & FUNKS, 1999).

Variáveis associadas ao transporte e à permanência dos animais no frigorífico antes do abate constituem ponto-chave na epidemiologia de *Salmonella* em suínos. Estresse associado ao transporte pode causar não só aumento na eliminação de *Salmonella* nas fezes dos suínos infectados (SEIDLER et al., 2001), como maior susceptibilidade à infecção. A permanência prolongada nos frigoríficos antes do abate tem sido relacionada a aumento significativo no número de suínos infectados (MORGAN et al., 1987). A contaminação residual nas baias dos frigoríficos também representa risco de transmissão do agente para os animais (HURD et al., 2001).

O maior entrave no controle da salmonelose nas granjas é, principalmente, a falta de conhecimentos sobre a epidemiologia do agente (DAVIES, 1997a; LAUTNER, 1997). Informações sobre a transmissão desse agente em sistemas intensivos de criação seriam essenciais para se implantar e viabilizar medidas de controle de *Salmonella* nas fases pré-abate (DAVIES et al., 1997a; NIETFELD et al., 1998).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Seis animais de ambos os sexos, raça Landrace, pertencentes a mesma leitegada foram obtidos de única granja comercial e utilizados no experimento de transmissão naso-nasal e aerógena. A granja localizada na cidade de Colina, Estado de São Paulo, já havia fornecido animais para experimentos semelhantes, e foi mantida por apresentar bom aspecto sanitário e por não revelar ocorrência de *Salmonella enterica* em estudo prévio (OLIVEIRA et al., 2002). Para assegurar que os leitões não estavam infectados por *Salmonella*, foi conduzida fase de monitoramento na granja, que compreendeu uma visita durante a gestação da porca e uma visita após o nascimento dos leitões, quando amostras individuais de fezes das porcas e dos leitões foram colhidas e avaliadas por meio de isolamento bacteriológico e detecção pela PCR. Os leitões foram adquiridos após o desmame, aos 21 dias de idade, e então transferidos para a unidade experimental do Laboratório de Pesquisa em Suínos, *Campus* de Jaboticabal.

3.2. Isoladores e experimento

Foram utilizadas três câmaras de isolamento, móveis, medindo 0,8m de largura x 0,8m de altura x 1,3m de comprimento, desenvolvidas conforme especificações previamente descritas (TORREMORELL et al., 1997). As câmaras de isolamento são idênticas e construídas em aço inoxidável e vidro (Marconi Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil), equipadas com comedouros e bebedouros, os quais podem ser abastecidos pelo lado externo (Figura 1).

O posicionamento e as conexões entre as três câmaras de isolamento foram realizados conforme o propósito do estudo:

- ♦ Experimento 1 - Transmissão pelo contato naso-nasal (**E1**): as baias foram conectadas por pequena fenda, de largura regulável, a qual permitiu apenas e somente o contato naso-nasal entre animais infectados e não infectados. Mediante tal estratégia, avaliou-se a transmissão naso-nasal de *Salmonella* Derby (Figura 2 e 3).
- ♦ Experimento 2 - Transmissão pelo ar (**E2**): as câmaras foram conectadas por duto superior (0,8m de comprimento x 0,2m de diâmetro) o qual permitiu a passagem de ar unidirecional de uma das baias (contendo animais infectados) para a outra baia (animais sentinela), de modo que permitiu apenas a transferência de aerossóis. A direção do ar foi orientada pelo emprego de exaustor, o qual foi adaptado na parte superior da baia que continha os animais sentinela. O sistema fechado permitiu, ainda, o máximo controle em relação a moscas e outros insetos (Figura 4).



Figura 1 – Câmara de isolamento de suínos: a) tubos de conexão (acima, à direita e à esquerda); b) luvas (em azul), usadas para manejo interno dos animais; c) depósito de ração; d) depósito de água; e) câmara de fumigação (utilizada para introdução e retirada de materiais no sistema); f) fenda de conexão; g) saco de dejetos.



Figura 2 – Montagem dos isoladores para estudo da transmissão naso-nasal. Observar a disposição entre o isolador infectado e sentinela e o fluxo de ar entre eles.

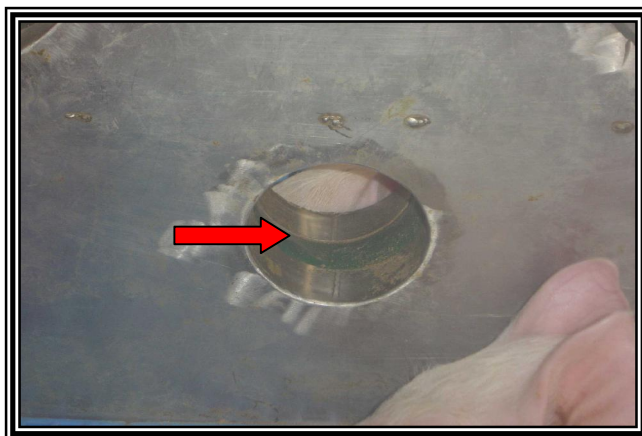


Figura 3 – Vista da fenda de conexão (seta) entre as câmara de isolamento dos animais infectados e os animais-sentinela.



Figura 4 – Montagem das câmaras de isolamento para estudo da transmissão aérea. Observar a disposição linear permitindo conexões e passagem apenas de ar entre os três ambientes.

Os animais receberam ração e água autoclavada, em ambos os experimentos. Uma pré-câmara de fumigação, com portas interna e externa, permitiu a colheita de amostras sem que os isoladores fossem abertos, evitando-se, dessa forma, a introdução no sistema de moscas ou amostras heterólogas de *Salmonella*. Tais colheitas, entretanto, só foram viáveis no E2, já que a disposição das câmaras, no caso E1, não permitiu a utilização da pré-câmara de fumigação, e desta forma as colheitas só puderam ser feitas no saco de dejetos. Pisos plásticos fenestrados propiciaram a retirada dos dejetos através de cilindro conectado a saco plástico em sua extremidade. As amostras foram colhidas utilizando-se luvas de borracha localizadas na lateral dos isoladores. Foi utilizada taxa de ventilação constante de 550m³/h (aproximadamente 1m³/suíno/min). Tanto o exaustor (ExhaustFlow500, Filtracom Ltda., Campinas, SP) como o ventilador (SterilFlow500, Filtracom Ltda.) incluíam pré-filtros e filtros absolutos (HEPA), com 99,97% de eficiência para retenção de partículas com 0,3µm. Termo-higômetros foram colocados no interior de cada isolador para colheita dos valores diários de temperatura e umidade relativa.

3.3. Amostra de *Salmonella* Derby e preparo do inóculo

Foi utilizada amostra de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Derby, originalmente isolada de suínos, e adquirida da coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, registro IAL nº 1124.

A amostra de *Salmonella* Derby foi tornada resistente ao ácido nalidíxico, com o propósito de se obter maior segurança nos resultados do experimento. Além da amostra marcada, os meios de plaqueamento para isolamento bacteriológico também continham ácido nalidíxico. Assim, a presença de amostras com características sugestivas de pertencerem ao gênero *Salmonella* nesses meios, tornaria os resultados mais confiáveis de se tratar da amostra de *S. Derby* em questão. A resistência foi conseguida da seguinte forma: culturas puras de *S.*

Derby foram inoculadas em caldo Luria-Bertani e incubadas a 37°C por 24 horas ou em mesa agitadora orbital a 37°C por 18 horas. O caldo foi então centrifugado a 1.500 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e uma alçada do precipitado foi transferida para caldo Luria-Bertani contendo 10µg/mL de ácido nalidíxico. O procedimento foi repetido com concentrações crescentes de ácido nalidíxico (20, 30, 40µg/mL), até se obter a concentração final de 50µg/mL.

Para a preparação do inóculo, culturas puras, resistentes ao ácido nalidíxico, foram semeadas em ágar nutriente (CM003, Oxoid) e incubadas a 37°C por 16 a 18 horas. Alíquotas foram então semeadas em ágar verde-brilhante modificado (CM329, Oxoid) suplementado com ácido nalidíxico (50µg/mL). Caldo Luria-Bertani pré-aquecido foi inoculado com uma colônia isolada e incubado em mesa agitadora orbital a 37°C por 18 horas. Os inóculos continham $4,8 \times 10^9$ e $1,2 \times 10^9$ UFC/mL, para E1 e E2, respectivamente, segundo quantificação realizada pela técnica de MILES & MISRA (1938). Alíquotas de 3mL foram usadas como inóculo oral, lentamente administradas na região da faringe, utilizando-se seringa estéril. Os grupos sentinela e controle receberam 3mL de caldo estéril, sem o inóculo. Os leitões foram submetidos a jejum alimentar e hídrico por 18 horas antes da inoculação e 30 minutos após a inoculação.

3.4. Desenho Experimental

Antes de cada experimento, os isoladores foram lavados com solução detergente, desinfetados com etanol 70% e então conectados, como mostrado anteriormente, conforme a via de transmissão a ser estudada. Os isoladores e os condutores de ar foram pulverizados internamente com solução de glutaraldeído 2% e amônia quaternária (AVT500, Polysell, Campinas, SP, Brasil). O sistema foi então fechado por 48 horas. O glutaraldeído foi utilizado por apresentar baixo poder corrosivo e ser considerado desinfetante e esterelizante químico de alto

poder de ação (RUTALA, 1995). Suabes das paredes internas dos isoladores e dos condutores de ar foram colhidos para análise bacteriológica após os procedimentos de limpeza e desinfecção e antes do alojamento dos animais.

No Experimento 1, dois suínos foram utilizados como controle (C1 e C2) e dois como sentinela (S3 e S4), os quais receberam 3 mL de caldo LB estéril e foram, então, colocados nos isoladores 1 (Is1) e 2 (Is2), respectivamente. Outros dois suínos foram inoculados com *S. Derby*^{nal+} (I5 e I6) e colocados no isolador 3 (Is3). O sistema foi fechado, e os animais mantidos nos isoladores até o 15º dia pós-infecção (DPI), quando foram eutanasiados e necropsiados. O experimento foi realizado entre os meses de setembro e outubro de 2006.

No Experimento 2, os suínos controle (C7 e C8) e sentinela (S9 e S10) receberam 3 mL de caldo LB estéril e foram alojados nos isoladores 1 (Is1) e 2 (Is2), respectivamente. Os animais 11 e 12 (I11 e I12) foram inoculados com *S. Derby*^{nal+} e colocados no isolador 3 (Is3). O sistema foi fechado, e os animais mantidos nos isoladores até o 15º dia pós-infecção (DPI), quando foram eutanasiados e necropsiados. O experimento foi realizado no mês de janeiro de 2007.

3.5. Colheita de material

No Experimento 1 (transmissão naso-nasal), amostras do saco de dejetos foram colhidas diariamente e em duplicata de cada isolador (Is1, Is2 e Is3) do 1º até o 15º DPI, e submetidas a análise bacteriológica e PCR.

Ao final do experimento, os suínos foram eutanasiados, necropsiados, e fragmentos de tonsilas palatinas, linfonodos (mandibulares, mesentéricos e íleo-cólicos), pulmão, fígado, baço, fragmentos do jejuno e íleo (10cm) e conteúdo cecal foram colhidos assepticamente, trocando-se as luvas e o instrumentário

entre as diversas colheitas. As amostras foram colocadas em sacos plásticos estéreis (BO1065WA, Whirl-pak, Nasco, Fort-Atkinson, WI, EUA) e mantidas sob refrigeração até o processamento bacteriológico. Amostras de tecidos também foram colhidas para análise histopatológica.

No Experimento 2 (transmissão aerógena), suabes retais (C7, C8, S9, S10, I11 e In2), fezes do piso (Is1, Is2 e Is3) e amostras de ar (Is1, Is2 e Is3) foram colhidos diariamente do 1º até o 15º DPI. Tubos com tampa rosqueável contendo meios de cultura, sacos plásticos estéreis para colheita de fezes e placas de ágar verde-brilhante modificado embaladas foram colocados na câmara de fumigação pela porta externa e pulverizados com glutaraldeído 2% e amônia quaternária (AVT500, Polysell). Após 1 hora, a porta interna da câmara de fumigação foi aberta, e a amostragem realizada. As amostras também foram submetidas a análise bacteriológica e PCR.

Ao final do experimento, os suínos foram eutanasiados, necropsiados, e fragmentos de tonsilas palatinas, linfonodos (mandibulares, mesentéricos e íleo-cólicos), pulmão, fígado, baço, fragmentos do jejuno e íleo (10cm) e conteúdo cecal foram colhidos assepticamente, trocando-se as luvas e o instrumentário entre as diversas colheitas. As amostras foram colocadas em sacos plásticos estéreis (BO1065WA, Whirl-pak, Nasco, Fort-Atkinson, WI, EUA) e mantidas sob refrigeração até o processamento bacteriológico. Amostras de tecidos também foram colhidas para análise histopatológica.

3.6. Bacteriologia

3.6.1. Experimento 1 (transmissão naso-nasal)

3.6.1.1. Fezes

Os suabes colhidos do saco de dejetos foram pré-enriquecidos em caldo GN-Hajna (GN broth, Hajna, 248610, Difco, Franklin Lakes, NJ, EUA) a 37°C por

24 horas. Posteriormente, alíquotas de 0,1mL dessa solução foram transferidas para tubos contendo 9,9mL de caldo Rappaport-Vassiliadis peptona de soja (RV, CM 866, Oxoid). Os tubos foram cultivados a 42°C em banho-maria por 24 horas. Após esse período, foram semeados em ágar xilose-lisina-tergitol 4 (Bacto XLT-4, 223420, Difco) e ágar verde-brilhante modificado (CM329, Oxoid), ambos suplementados com ácido nalidíxico (50µg/mL).

No ágar verde-brilhante modificado, colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Salmonella* apresentavam coloração rosada. No ágar xilose-lisina-tergitol 4, as colônias suspeitas eram negras ou com centro negro devido a produção de H₂S.

As colônias suspeitas presentes nos meios de plaqueamento acima mencionados, foram transferidas para ágar triplice-açúcar-ferro (TSI, CM277, Oxoid) e ágar ferro lisina (LIA, CM381, Oxoid). No ágar TSI os resultados bioquímicos típicos do gênero *Salmonella* foram superfície sem mudança de cor ou alcalina (vermelha) e extremidade ácida (amarela), com produção de gás (H₂S). No ágar LIA as reações típicas não provocaram mudança na coloração do meio, que permanecia púrpura (alcalina). As colônias sugestivas foram submetidas a aglutinação em lâmina utilizando anti-soro contra *Salmonella* Grupo B e somáticos (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

3.6.1.2. Tecidos

As amostras de tecido foram processadas de acordo com HURD et al. (2001). Os tecidos foram imersos em etanol 95%, flambados e transferidos para sacos plásticos estéreis. Água peptonada tamponada foi adicionada na proporção de 1:10, e cada amostra foi homogeneizada (260 rpm, 1 min) com auxílio de equipamento apropriado (Homogeneizador de amostras patogênicas, MA440/CF, Marconi). Após cultivo a 37°C por uma noite, alíquotas de 0,1mL foram transferidas para tubos contendo 9,9mL de caldo RV. As amostras foram

semeadas em ágar XLT-4 e ágar verde-brilhante modificado, ambos suplementados com ácido nalidíxico (50µg/mL), e incubadas por 24 horas a 37°C.

Isolados apresentando resultados bioquímicos característicos do gênero *Salmonella*, em ágar tríplice-açúcar-ferro (CM277, Oxoid) e ágar ferro lisina (CM381, Oxoid), foram submetidos a aglutinação em lâmina utilizando anti-soro contra *Salmonella* Grupo B e somáticos (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

3.6.1.3. Ração

As amostras de ração foram colhidas como controle experimental, com a finalidade de evitar a introdução de sorotipos heterólogos de *Salmonella*. Foram diluídos 25g de ração em 225mL de água peptonada tamponada a 2% e incubados a 37° C, por uma noite. Na manhã seguinte, uma alíquota de 100µL foi transferida para caldo RV e incubada em banho-maria a 42°C, por uma noite. Após isso, foi realizado o plaqueamento em ágar XLT4^{nal+}, e as placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Colônias identificadas presumivelmente como *Salmonella* foram transferidas para ágar tríplice-açúcar-ferro e ágar ferro lisina. Mediante resultado bioquímico indicativo, foi realizada prova sorológica utilizando soros polivalentes antiantígenos somáticos (anti-O) e do grupo B.

Todas as provas bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Suínos-Unesp/Jaboticabal.

3.6.2. Experimento 2 (transmissão aerógena)

3.6.2.1. Fezes

Os suabes retais foram inicialmente pré-enriquecidos em caldo GN-Hajna a 37°C por 24 horas. Posteriormente, alíquotas de 0,1mL dessa solução foram transferidas para tubos contendo 9,9mL de caldo Rappaport-Vassiliadis peptona de soja (RV, CM 866, Oxoid). Os tubos foram cultivados a 42°C em banho-maria por 24 horas. Após esse período, foram semeados em ágar xilose-lisina-tergitol 4

(Bacto XLT-4, 223420, Difco) e ágar verde-brilhante modificado (CM329, Oxoid), ambos suplementados com ácido nalidíxico (50 µg/mL). Amostras de fezes do piso (25g) foram pré-enriquecidas em 225mL de água peptonada tamponada 2% (CM509, Oxoid). Após incubação a 37°C por 18 horas, as amostras foram transferidas para o caldo RV e processadas como descrito anteriormente.

3.6.2.2. Tecidos

As amostras de tecido foram processadas como descrito anteriormente no experimento 1.

3.6.2.3. Amostras de ar

Amostras de ar foram colhidas de acordo com MITCHELL et al. (2002). Duplicatas de placas contendo ágar verde-brilhante modificado^{nal⁺} foram colocadas por 10 minutos na entrada do ducto de ar em cada isolador, e após retiradas, incubadas a 37°C por 24 horas. Isolados com resultados bioquímicos característicos do gênero *Salmonella* foram submetidos aos procedimentos acima descritos.

3.6.2.4. Ração

Amostras de ração foram processadas como descrito anteriormente no experimento 1.

Todas as provas bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Suínos / Unesp, *Campus* de Jaboticabal.

3.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foi utilizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a detecção de *Salmonella* nas fezes dos suínos dos grupos infectados, não infectados e controle de cada experimento. O caldo RV foi utilizado como DNA-molde na PCR, considerada sua maior eficácia comparada à de outros caldos seletivos (FRESCHI et al., 2005). Alíquotas de 1mL do caldo RV foram submetidas ao método de extração do DNA, conforme protocolo descrito por SOUMET et al. (1994). As alíquotas foram centrifugadas a 13.000 x *g* por 3 minutos, o *pellet* foi resuspendido em 100µl de água ultrapura e fervido por 10 minutos. Esse método de extração do DNA foi escolhido, porque em estudos realizados por FRESCHI et al. (2005), onde se comparou diferentes métodos de extração do DNA, o método da fervura/centrifugação além do parâmetro custo-benefício e rapidez, demonstrou ser bastante eficiente na detecção de *Salmonella*. Vale ressaltar que esse método só é recomendado para amostras que serão processadas em curto período.

A PCR foi realizada em volume final de 25µl, com 5µl de amostra de DNA adicionado a 20µl da mistura de reação contendo Tris HCL 10mM (pH 8,3), MgCl₂ 1,5mM, 50µM de cada deoxinucleotídeo (dNTP, Biotools, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1µM de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase (Biotools, Brasil). Foram utilizados primers específicos para o gene *rfb*, de *Salmonella* do sorogrupo B (5'-AGA ATA TGT AAT TGT CAG e 5'-TAA CCG TTT CAG TAG TTC) (KONGMUANG et al., 1994). A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf, Alemanha), utilizando desnaturação inicial por 10 minutos a 94°C, 40 ciclos a 94°C por 40 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR (10µl) foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1,5% e visualizados após coloração com brometo de etídeo. As amostras contendo fragmento de 882 bp foram consideradas positivas para *Salmonella*.

sorogrupo B (KONGMUANG et al., 1994). O marcador de peso molecular ϕ X147/HaeIII foi utilizado como padrão.

As reações da técnica da PCR foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Suínos / Unesp, *Campus* de Jaboticabal.

3.7.1. Limiar de detecção da técnica da PCR

Cultura pura de *Salmonella* Derby, com crescimento entre 12 - 18 horas a 37°C em caldo Luria-Bertani, foi diluída serialmente (1:10) no caldo RV. Essas amostras diluídas tiveram seu DNA extraído pelo método da fervura, e foram analisadas pela PCR para determinar o limiar de detecção da técnica.

3.8. Análise dos resultados

A partir do modelo experimental proposto, o contato naso–nasal entre os animais infectados e sentinelas (E1) e o movimento de ar entre os isoladores (E2) foi considerado o único mecanismo de dispersão de *Salmonella* no sistema. Portanto, o isolamento de *Salmonella* Derby^{nal+} dos animais sentinela, com perfis genotípicos indistinguíveis daqueles apresentados pela cepa do inóculo, foi considerado suficiente para corroborar a hipótese levantada, e portanto, nenhum teste estatístico foi realizado.

IV. RESULTADOS

4.1. Experimento 1 (transmissão naso-nasal)

4.1.1. Monitoramento pré-inoculação

Durante o período de monitoramento, tanto na granja como na unidade experimental, antes da inoculação, não foi detectada a presença de *Salmonella* nas amostras de fezes das porcas e dos leitões, através do isolamento bacteriológico e pela PCR. As amostras de suabes de arrastão colhidas dos isoladores e da superfície dos dutos de ar após a desinfecção também foram negativas no isolamento bacteriológico. As amostras da ração também mostraram resultados negativos.

Com o início do experimento, pôde-se observar que no primeiro e segundo dia pós-infecção, os animais inoculados (I5 e I6) apresentavam-se apáticos, encolhidos no canto da baia, com consumo menor de ração, quando comparados aos animais controle (C1 e C2) e sentinela (S3 e S4), que nada manifestaram. Os animais inoculados não apresentaram diarreia e já no terceiro dia pós-infecção mostravam comportamento e condição semelhante a dos animais controle e sentinela, assim permanecendo até o final do experimento.

4.1.2. Amostras do saco de dejetos

Amostras do saco de dejetos foram colhidas diariamente e em duplicata de cada câmara de isolamento (Is1, Is2 e Is3), porém, a bactéria não foi detectada em nenhum dos isoladores (Is1, Is2 e Is3), tanto no isolamento bacteriológico como na PCR (Tabela 1) durante todo o período do experimento (quinze dias).

Em presença de resultados negativos, seja na transferência da infecção, seja nas tentativas de detecção da bactéria nas análises realizadas no material colhido do saco de dejetos do isolador que abrigava os animais inoculados, optou-se pela repetição de todo o experimento. Desta vez o inóculo continha dose infectante maior que a utilizada na primeira vez ($4,8 \times 10^9$ UFC/mL). Porém, os

resultados mantiveram-se inalterados. Mais uma vez não foi possível identificar *Salmonella* em quaisquer das análises realizadas – cultivo bacteriológico ou PCR - nas amostras do saco de dejetos do isolador 3 (animais inoculados), durante todo o período experimental.

4.1.3. Amostras de necropsia

No 15º dia pós-infecção, os animais foram eutanasiados e necropsiados. O isolamento bacteriológico realizado nos tecidos (tonsilas palatinas, linfonodos mandibulares, mesentéricos e íleo-cólicos, pulmão, fígado, baço, jejuno, íleo e conteúdo cecal) colhidos durante a necropsia não revelou presença de *Salmonella* em nenhum dos tecidos dos animais controle (C1 e C2), sentinela (S3 e S4) e infectado (I5 e I6). Os resultados da PCR também foram negativos para esses tecidos em todos os animais (C1, C2, S3, S4, I5 e I6) (Tabela 2).

Tabela 1. Resultados da detecção de *Salmonella* Derby^{nal+} pelo isolamento bacteriológico (ISO) e pela PCR (PCR) a partir de amostras colhidas do saco de dejetos, no experimento de transmissão naso-nasal. Jaboticabal – SP, 2007.

DPI	Isolador 1 (controle)		Isolador 3 (inoculado)		Isolador 2 (sentinela)	
	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR
01	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-
03	-	-	-	-	-	-
04	-	-	-	-	-	-
05	-	-	-	-	-	-
06	-	-	-	-	-	-
07	-	-	-	-	-	-
08	-	-	-	-	-	-
09	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-

DPI, dias pós-infecção; (-), negativo

Tabela 2. Resultados da detecção de *Salmonella* Derby^{nal+} pelo isolamento bacteriológico (ISO) e pela PCR (PCR) a partir de amostras de tecidos, no experimento de transmissão naso-nasal. Jaboticabal – SP, 2007.

Tecidos	Suínos Controles (C)				Suínos Inoculados(I)				Suínos Sentinela(S)			
	C1		C2		I5		I6		S3		S4	
	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR
Tonsilas palatinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linf. mandibulares	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linf. mesentéricos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linf. Íleo-cólicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fígado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baço	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jejuno e íleo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conteúdo cecal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-), negativo

4.1.4. Histopatologia

Os resultados da análise histopatológica das amostras de tecido através da coloração de hematoxilina-eosina foram:

- ◆ Animais controle (C1 e C2):
 - ◆ tonsilas palatinas – presença de muita mitose;
 - ◆ linfonodos - nada digno de nota;
 - ◆ pulmão – apresentava-se com características normais;
 - ◆ fígado – C1 nada digno de nota; C2 evidência de estado inflamatório, com degeneração acentuada nos hepatócitos (degeneração hidrópica e necrose difusa dos hepatócitos);
 - ◆ baço – há bastante mitose (regeneração - normal), nada digno de nota;
 - ◆ íleo – C1 nada digno de nota; C2 há moderado infiltrado inflamatório na mucosa do intestino delgado e leve edema de submucosa.
- ◆ Animais infectados (I5 e I6):
 - ◆ tonsilas palatinas – igual aos animais controle, nada digno de nota;

- ♦ linfonodos – havia bastante eosinófilos com grânulos e alguns neutrófilos localizados na camada medular. O linfonodo apresentava-se reativo com células aumentadas;
- ♦ pulmão – nada digno de nota;
- ♦ fígado – nada digno de nota;
- ♦ baço – presença de neutrófilos ativos;
- ♦ íleo – presença de processo inflamatório muito grande, com perda da forma das placas de Peyer (células M).
- ♦ Animais sentinela (S3 e S4):
 - ♦ tonsilas palatinas – S3 nada digno de nota; S4, degeneração hidrópica nas células escamosas do epitélio da tonsila e presença de alguns neutrófilos;
 - ♦ linfonodos – presença de bastante eosinófilos na camada medular;
 - ♦ pulmão – nada digno de nota;
 - ♦ fígado – nada digno de nota;
 - ♦ baço – presença de bastante mitose (normal);
 - ♦ íleo – S3 leve edema de submucosa; S4 placas de Peyer misturadas às glândulas, hiperplasia das células caliciformes e leve edema de submucosa.

4.2. Experimento 2 (transmissão aerógena)

4.2.1. Monitoramento pré-inoculação

Durante o período de monitoramento na granja, as amostras de fezes colhidas das porcas e dos leitões não revelaram a presença de *Salmonella*, tanto no isolamento bacteriológico como pela PCR. Já na unidade experimental, antes da inoculação, não houve detecção da bactéria nas amostras de suabes retais dos leitões pela bacteriologia e PCR. As amostras de suabes de arrastão colhidas dos

isoladores e da superfície dos dutos de ar após a desinfecção, também foram negativas. Amostragem da ração também apresentou resultados negativos.

Assim como no experimento 1, os animais inoculados (I11 e I12) apresentaram nos três primeiros dias após a infecção, quadro de apatia, com ligeira hipertermia (nos dois primeiros dias), ficando encolhidos no canto da baia e com menor consumo de ração, quando comparados aos animais controle (C7 e C8) e sentinela (S9 e S10), porém, não apresentaram diarreia em nenhum momento do período experimental. Já ao quarto dia pós-infecção, os animais infectados (I11 e I12) apresentavam-se clinicamente normais, semelhantes aos animais controle (C7 e C8) e sentinela (S9 e S10).

4.2.2. Amostras dos suabes retais, das fezes do piso e do ar.

Salmonella não foi isolada pela bacteriologia ou detectada pela PCR em amostras de suabes retais dos animais controle (C7 e C8) no isolador 1 (Is1), assim como das amostras de fezes do piso e das amostras do ar durante os quinze dias pós-infecção (Tabela 3). Também não houve isolamento e detecção da bactéria das amostras colhidas dos animais-sentinela (S9 e S10) no Is2 nesse mesmo período (Tabela 3). Já nos animais infectados, suabes retais positivos foram isolados pela bacteriologia no primeiro e segundo dia pós-infecção no I11 e I12, assim como de amostras de fezes do piso no Is3 (Tabela 3). Pela PCR, houve detecção de *Salmonella* de amostras de suabe retal do I11 e fezes do piso (Is3) no primeiro e segundo dia pós-infecção. Já no I12 a PCR detectou *Salmonella* no primeiro, segundo e terceiro dia pós-infecção. Após o terceiro dia não houve isolamento e detecção da bactéria até o final do experimento. *Salmonella* não foi isolada das amostras de ar do Is3 durante todo o período do experimento (Tabela 3).

4.2.3. Amostras de necropsia

No 15º dia pós-infecção, os animais foram eutanasiados e necropsiados. As amostras de tecidos (tonsilas palatinas, linfonodos mandibulares, mesentéricos e

íleo-cólicos, pulmão, fígado, baço, jejuno, íleo e conteúdo cecal) colhidos durante a necropsia e submetidas ao isolamento bacteriológico e detecção pela PCR não revelaram presença de *Salmonella* em nenhum dos tecidos dos animais controle (C7 e C8), sentinela (S9 e S10) e infectado (I11 e I12) (Tabela 4).

Tabela 3. Resultados da detecção de *Salmonella* Derby^{nal+} pelo isolamento bacteriológico (ISO) e pela PCR (PCR) a partir de amostras colhidas do ar (A); fezes colhidas do piso do isolador (F); suabes retais individualmente colhidos dos suínos (S); no experimento de transmissão aerógena. Jaboticabal – SP, 2007.

DPI	Isolador 1 (controles)								Isolador 3 (inoculados)						Isolador 2 (sentinelas)									
	A1		F1		C7		C8		A3		F3		I11		I12		A2		F2		S9		S10	
	ISO	ISO	PCR	ISO	PRC	ISO	PCR	ISO	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR	
01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(-), negativo; (+), positivo

Tabela 4. Resultados da detecção de *Salmonella* Derby^{nal} pelo isolamento bacteriológico (ISO) e pela PCR (PCR) a partir de amostras de tecidos, no experimento de transmissão aerógena. Jaboticabal – SP, 2007.

Tecidos	Suínos Controle (C)				Suínos Inoculados (I)				Suínos Sentinela (S)			
	C7		C8		I11		I12		S9		S10	
	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR	ISO	PCR
Tonsilas palatinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linf. mandibulares	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linf. mesentéricos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linf. íleo-cólicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fígado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baço	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jejuno e íleo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conteúdo cecal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-), negativo

4.2.4. Histopatologia

Os resultados da análise histopatológica das amostras de tecido através da coloração de hematoxilina-eosina foram:

- ♦ Animais controle (C7 e C8):
 - ♦ tonsilas palatinas – presença de muita mitose;
 - ♦ linfonodos - nada digno de nota;
 - ♦ pulmão – nada digno de nota;
 - ♦ fígado – nada digno de nota;
 - ♦ baço – nada digno de nota;
 - ♦ íleo – nada digno de nota.
- ♦ Animais infectados (I11 e I12):
 - ♦ tonsilas palatinas – nada digno de nota;
 - ♦ linfonodos – presença de bastante eosinófilos com grânulos e alguns neutrófilos localizados na camada medular. O linfonodo apresentava-se reativo com células aumentadas;
 - ♦ pulmão – nada digno de nota;
 - ♦ fígado – nada digno de nota;

- ♦ baço – presença de neutrófilos ativos;
- ♦ íleo – presença de processo inflamatório muito grande, com perda da forma das placas de Peyer (células M).
- ♦ Animais sentinela (S9 e S10):
 - ♦ tonsilas palatinas – nada digno de nota;
 - ♦ linfonodos – nada digno de nota;
 - ♦ pulmão – nada digno de nota;
 - ♦ fígado - presença de degeneração hidrópica e necrose dos hepatócitos;
 - ♦ baço – presença de bastante mitose;
 - ♦ íleo – S9 presença de leve edema de submucosa; S10 não foi feito lâmina.

4.3. Limiar de detecção da PCR

O limiar de detecção da técnica da PCR observada nas diluições seriadas realizadas no caldo RV, a partir de cultura pura de *S. Derby*, foi de $3,6 \times 10^4$ UFC/mL.

V. DISCUSSÃO

Conforme demonstraram os resultados do presente estudo, não houve isolamento de *S. Derby*^{nal+} dos animais sentinela em ambos os experimentos, o que revela que não houve transferência da infecção, seja pela via aerógena, seja pelo contato naso-nasal. Esses achados não corroboram suposições anteriores que indicavam a possibilidade de transmissão aerógena (FEDORKA-CRAY et al., 1995; HEARD & LINTON, 1996; STARK, 1999) ou naso-nasal de *Salmonella enterica* na espécie suína (LINTON et al., 1979; FEDORKA-CRAY et al., 1994; LO FO WONG et al, 2004). Discordam, inclusive de observações já feitas pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Pesquisa de Suínos / Unesp, *Campus* de Jaboticabal, local em que foram conduzidos estes estudos.

Assim, OLIVEIRA et al. (2005) demonstraram experimentalmente, de maneira inédita, a importância da via aerógena como meio de transferência de infecção por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Agona, entre suínos desmamados. Em estudo subsequente GARCIA (2006) observou transferência pela via naso-nasal de infecções por *Salmonella* Typhimurium entre leitões da mesma faixa etária.

Em nosso ensaio realizado para avaliar a transferência naso-nasal de *Salmonella* Derby, utilizando-se de mesma metodologia e materiais que GARCIA (2006), a bactéria não foi isolada ou mesmo detectada pela PCR a partir das amostras colhidas do saco de dejetos dos três isoladores, incluindo o dos animais inoculados (Tabela 1). Mesmo nos exames realizados após o abate dos animais envolvidos neste ensaio, também não foi possível detectar a bactéria em qualquer um dos grupos envolvidos (Tabela 2). Teria ocorrido a infecção? Como demonstrar isso? Afinal, apenas a comprovação efetiva de infecção poderia validar o que foi observado no ensaio, ou seja, a não transferência de infecção do grupo inoculado para o grupo sentinela, por meio da via naso-nasal. Talvez seja razoável afirmar que houve sim o estabelecimento da infecção no grupo inoculado. Afinal, ela foi obtida no ensaio que avaliou a transferência aerógena da infecção. É

certo que foi algo super agudo, que não persistiu além do 3º dia pós-inoculação. Isto coincide com o que se evidenciou, não bacteriologicamente, mas clinicamente, entre os animais inoculados do ensaio de transferência naso-nasal. Estes animais revelaram-se apáticos e hipororéticos nos primeiros dias após a inoculação. Mas porque os resultados foram negativos? Seria porque a quantidade de células bacterianas eliminadas por esses animais foi tão pequena que não pode ser isolada ou detectada tanto pela bacteriologia como pela PCR? Seria porque as amostras não foram colhidas diretamente do reto dos animais? A desvantagem de amostras colhidas do saco de dejetos é que estão mais diluídas, já que estão misturadas a restos de ração e urina. Porém, GARCIA (2006) isolou *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Agona de amostras colhidas dos sacos de dejetos do isolador dos animais inoculados, em experimento realizado em nosso laboratório de pesquisa. A dose do inóculo também poderia ser considerada insuficiente para promover a infecção e a conseqüente eliminação da bactéria. No entanto, o experimento foi repetido com dose infectante maior, e o isolamento também não foi conseguido. No entanto, esses resultados servem para reforçar a idéia que *Salmonella* Derby possui baixa infectividade para suínos comparada a outros sorotipos já estudados. Junte-se a todas essas argumentações, o fato de que a bactéria não foi detectada nem após o abate dos animais. Todos os exames realizados em diversos tecidos, seja por cultivo bacteriológico ou PCR, resultaram negativos. Enfim, são apenas conjecturas, questões que merecem reavaliação em estudos futuros.

A amostra de *Salmonella* Derby foi escolhida em virtude de ser um sorotipo muito isolado de suínos em várias partes do mundo. Apesar disso, a amostra utilizada em nosso experimento revelou-se de pouca infectividade, patogenicidade e virulência entre suínos desmamados.

GARCIA (2006), avaliando a importância da transmissão naso-nasal de *S. Typhimurium* e *S. Agona* entre suínos desmamados, só comprovou a transmissão de *S. Typhimurium* aos animais sentinela. O isolamento foi possível por meio da

coleta de amostras de tecidos ao término do período experimental, que foi de vinte dias.

No atual ensaio, outros indicativos de que os animais inoculados sofreram ação da bactéria estão nos resultados da histologia. A presença de neutrófilos ativos no baço dos animais pode ser indicativo de infecção bacteriana. Aliado a isso, havia grande inflamação na mucosa intestinal, com perda da estrutura das placas de Peyer.

Outro achado não conclusivo, mas que chamou a atenção foi o achado na tonsila palatina do animal sentinela. A presença de degeneração hidrópica nas células escamosas do epitélio da tonsila, com presença de alguns neutrófilos, pode indicar que houve transmissão naso-nasal entre os animais.

A primeira confirmação experimental da transmissão aerógena de *Salmonella enterica* na espécie suína foi realizada por OLIVEIRA et al. (2005), em estudo desenvolvido no mesmo laboratório da presente pesquisa. A transmissão foi confirmada por amostras colhidas de fezes do piso à partir do 2º dia pós-inoculação nos animais sentinela. Estudo semelhante foi agora realizado utilizando-se cepa de *S. Derby*. Os resultados, porém, embora revelem que se obteve a infecção dos animais inoculados, não confirmam a transferência da infecção para os animais sentinela. Assim como nos suínos inoculados do experimento anterior, os animais inoculados apresentaram apatia e menor consumo de ração apenas nos primeiros dias, portanto é razoável supor que amostras de *Salmonella Derby* demonstram baixa infectividade.

A colheita individual de amostras de suabe retal permitiu determinar o início da eliminação de *Salmonella Derby* nas fezes dos suínos. Os animais inoculados (I11 e I12) eliminaram *Salmonella* já no primeiro dia pós-inoculação (Tabela 3), o que corrobora observações de FEDORKA-CRAY et al. (1994) e OLIVEIRA et al. (2005). Porém, no terceiro dia pós-inoculação, somente o animal 12 eliminou o patógeno, sendo detectado apenas pela PCR. Após o terceiro dia pós-inoculação, *Salmonella* não foi mais detectada, nem dos cultivos de amostras de tecidos realizados no décimo quinto dia pós-inoculação (Tabela 4).

Os resultados dos exames histológicos dos animais sentinela não forneceram qualquer indicativo de que a transferência de infecção possa ter ocorrido.

A complexidade da epidemiologia de *Salmonella enterica* em sistemas modernos de criação de suínos é considerada o principal entrave no controle da infecção por este patógeno. Os resultados deste estudo e de outros estudos já realizados pelo Laboratório de Pesquisa de Suínos / Unesp, *Campus* de Jaboticabal não apenas confirmam tal observação, como estimulam a continuidade desse trabalho.

VI. CONCLUSÕES

Com base no material, na metodologia e nas condições em que foram conduzidos esse trabalho pode-se concluir que:

1. A *Salmonella* Derby, diferentemente de outros sorotipos já estudados nesse laboratório, foi de baixa infectividade e patogenicidade para leitões desmamados;
2. A indução de infecção por *Salmonella* Derby, administrada por via oral nas doses de $4,8 \times 10^9$ e $1,2 \times 10^9$ UFC/mL, para o experimento da transmissão naso-nasal e aerógena, respectivamente, determinou infecção de curta duração em leitões desmamados;
3. A transferência aérea de *Salmonella* Derby, entre leitões desmamados parece não ser viável.

VII. REFERÊNCIAS

ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Suínos. Disponível em: <<http://www.abipecs.com.br/relatorios.php>>. Acesso em: 23 de janeiro de 2007.

ALTEKRUSE, S.F.; SWERDLOW, D.L.; WELLS, S.J. Factors in the emergence of food borne diseases. In: VASSALO, J. **The veterinary clinics of north america: food animal practice**. Philadelphia: W.B.Saunders, p.1-15, 1998.

BAGGESEN, D.L.; WEGENER, H.C. Phage types of *Salmonella* enterica spp. enterica serovar Typhimurium isolated from production animals and humans in Denmark. **Acta Vet. Scand.**, v. 35, n. 4, p. 349-354, 1994.

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

BAUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; HEFFRON, F. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**. CABI International, London, UK, 2000. cap. 4, p. 57-72.

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

BESSA, M. C.; COSTA, M; CARDOSO, M. Prevalence of *Salmonella* in slaughtered pigs in Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, n. 2, p. 80-84, 2004.

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, 2001. 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, 1991. p. 1-5.

BOHM, R. Behavior of selected *Salmonella* in the environment. **DTW Dtsh Tierarztl. Wochenschr.** 100, p. 275-278, 1993.

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.; HEYNDRICHX, M.; RIJPENS, 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.

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

CAFFER, M.I.; TERRAGNO, R. Manual de procedimientos para la caracterizacion de *Salmonella*. **Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas**. Buenos Aires, Argentina, 2001

CASTAGNA, S.M.F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M. Presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n. 3, p. 300-336, 2004.

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.

D'AOUST, J. Commercial diagnostic kits for the detection of foodborne Salmonella. In : CONGRESS REPORT, **SALMONELLA AND SALMONELLOSIS**, 1992, Ploufragan, France, 1992. p. 9-19.

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

DAVIES, P.R. Food safety and access to domestic and export markets. **Swine Health Prod.**, v.5, p.10-17, 1997a.

DAVIES, P.R. The relationship between *Salmonella* in swine and human infections. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 8., 1997, Foz do Iguaçu. **Anais ...** Foz do Iguaçu: ABRAVES, 1997b. p.137-144.

DAVIES, P.R.; MORROW, W.E.M; JONES, F.T. Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. **Epidemiol. Infect.**, v. 119, p. 237-344, 1997a.

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, 1997b.

DAVIES, P.R. Fecal shedding of *Salmonella* by pigs housed in buildings with open-flush gutters. **Swine Health Prod.**, v.6, p.101-106, 1998.

DAVIES, P.R.; BOVEE, F.G.E.M.; FUNK, J.A.; W.E.M. MORROW; JONES, F.T.; DEEN, J. Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple site production system. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 212, p. 1925-1929, 1998.

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, 1999. p. 1-11.

EKPERIGIN, H.E.; NAGAJARA, K.V. *Salmonella*. In: VASSALO, J. (Ed.). **The veterinary clinics of North America: Food animal practice**. Philadelphia: W.B. Saunders, v. 14, n. 1, p. 17-29, 1998.

EMBORG, H.D.; LORENSEN, L.; BECH-NIELSEN, S. How the danish surveillance system for *Salmonella* has influenced the microbiological quality of swine carcass meat. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY (IPVS), Bologna. **Proceedings...** 1996. p. 175.

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.J. The connection between Salmonella, swine, and food safety. In: PROCEEDINGS OF SWINE CONFERENCE, 1996, Nebraska. **Anais...** Nebraska: Lincoln, 1996. p. 25-45.

FEDORKA-CRAY, P.J.; GRAY, J.T. Current state of Salmonella in swine. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1996, Minnesota, USA. **Anais....** Minnesota, 1996. p. 15-26.,

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 dez. 2006.

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.; CARVALHO, L.F.; OLIVEIRA, C.J.B. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *S.*

Typhimurium in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 363-367, 2005.

FRICKER, C.R. The isolation of salmonellas and campylobacters. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 63, p. 99-116, 1987.

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.

GARCIA, T.B. **Transmissão experimental de *Salmonella Agona* e *Salmonella Typhimurium* entre suínos desmamados pelo contato naso-nasal.** 2006. 29 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, São Paulo, 2006.

GAST, R.K.; MITCHELL, B.W.; HOLT, P.S. Airborne transmission of *Salmonella enteritidis* infection between groups of chicks in controlled-environment isolation cabinets. **Avian Dis.**, v. 42, p. 315-320, 1998.

GREBEYENES, W.A.; DAVIES, P.R.; MORROW, W.E.; FUNK, J.A.; ALTIER, C. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from swine. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 4633-4636, 2002.

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.

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

HARDMAN, P.M.; WHATES, C.M.; WRAY, C. Transmission of salmonellae among calves penned individually. **Vet. Rec.**, v.129, p. 327-329, 1991.

HARRIS, I.T.; FEDORKA-CRAY, P.J.; GRAY, J.T.; THOMAS, L.A.; FERRIS, K. Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 210, p. 382-385, 1997.

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

HEARD, T. W.; LINTON, H.A. An epidemiologic study of *Salmonella* in a closed pig herd. **J. Hyg. Cam.**, v. 64, p. 411-417, 1966.

HOLT, P.S.; MITCHELL, B.W.; GAST, R.K. Airborne horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* in molted laying chickens, **Avian Dis.**, v. 42, p. 45-52, 1998.

HOOK, E.; GUERRANT, R. **Harrison's principles of internal medicine**. 9th ed. McGraw-Hill, New York, NY, 1980. p. 641-648.

HUMPHREY, T. Important and relevant attributes of the *Salmonella* organism. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD-BORN *SALMONELLA* IN POULTRY, 1998, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: American Association of Avian Pathologists, 1998. p. 43-48.

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.

JOSEPH, P.G. The Salmonella problem in animals and prospects for its control in livestock and man. **Trop. Biomed.**, v. 5, p. 1-8, 1988.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Enterobacteriaceae. **Diagnóstico Microbiológico** – Texto e Atlas Colorido, 5 ed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 2001. p. 177-262.

KONGMUANG, U.; LUK, J.M.C.; LINDBERG, A.A. Comparison of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2, and D by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 12, p. 3072-3074, 1994.

KRUSE, H. Globalization of the food supply-food safety implications. Special regional requirements: future concerns. **Food Control**, v. 10, p. 315-320, 1999.

LANGENEGGER, C.H.; ALFINITO, J.; LANGENEGGER, J. Salmonelas isoladas de suínos de abate do Estado do Pará. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 3, n. 3, p. 91-94, 1983.

LAUTNER, B. Quality assurance in the U.S. **Pig J.**, v. 39, p. 29-36, 1997.

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.

LE MINOR, L.; POPOFF, M.Y. Request for na opinion. Designation of *Salmonella enterica* spp. nov., nom. ver., as the type and only species of the genus *Salmonella*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 37, n. 4, p. 465-468, 1987.

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.

LINTON, A.H. Salmonellosis in pigs. **Br. Vet. J.**, v. 139, p. 109-112, 1979.

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.

MAGUIRE, H.C.F. et al. A largue outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 1, n. 10, p. 239-246, 1993.

McCHESNEY, D.G.; KAPLAN, G. and GARDNER, P. FDA survey determines *Salmonella* contamination. **Feedstuffs**, v. 7, p. 20-23, 1995.

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.

MINEV, M.; GRAVILOV, N.; NIKOLOV, N. Reproduction of salmonellosis in swine by aerosol infection. **Vet. Med. Nauki.**, v. 18, p. 48-56, 1981.

MITCHELL, B.W. et al. Reducing airborne pathogens, dust and *Salmonella* transmission in experimental hatching cabinets using an electrostatic space charge system. **Poult. Sci.**, v. 81, n. 1, p. 49-55, 2002.

MORGAN, I.R.; KRAUTIL, F.L.; CRAVEN, J.A. Effect of time in lairage on ceacal and carcass salmonella contamination of slaughter pigs. **Epidemiol. Infect.**, v. 98, n. 3, p. 323-330, 1987.

MOUSING, J. et al. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. **Prev. Vet. Med.**, v. 29, p. 247-61, 1997.

NEIVA, C. Incidência de salmonelas em suínos. **Mem. Inst. Butantan**, v. 7, p. 430-435, 1946.

NIETFELD, J.C.; KELLY, B.; DRITZ, S.S.; FEDER, I.; GALLAND, J.C. Comparison of conventional and delayed secondary enrichment for isolation of *Salmonella* spp. from swine samples. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 10, p. 285-287, 1998.

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.; GARCIA, T.B.; CARVALHO, L.F.O.S. Experimental aerogenic transmission of *Salmonella* Agona in weaned pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 18, 2004, Hamburgo, Alemanha. **Proceedings**.... Hamburgo, 2004. p. 653.

PESTANA, B.R.; RUGAI, E. O porco normal como portador de salmonelas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 3, p.232-235, 1943.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**. Institut Pasteur, Paris, France, 1997.

ROBERTS, T. Human illness costs of foodborne bacteria. **Am. J. of Agric. Econ.**, Lexington, v. 71, p. 468-474, 1989.

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, 1995. p. 227-295.

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

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

SEIDLER, T. et al. Transport stress-consequences for bacterial translocation, endogenous contamination and bactericidal activity of serum of slaughter pigs. **Berl. Munch. Tierarz. Wochensh.**, v. 114, n. 9-10, p. 375-377, 2001.

SOBESTIANSKY, J. BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L.F.; OLIVEIRA, S. **Clínica e Patologia Suína**, 2^a ed., Goiânia, Art3 Impressos Especiais, 1999. p. 464.

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.; FACH, P.; COLIN, P. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polimerase chain reaction. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 19, p. 294-298, 1994.

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. The role of infectious aerosols in disease transmission in pigs. **Vet. J.**, v.158, p. 154-161, 1999.

STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; MCVEY, S.; CHENGAPPA, M.M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n. 7, p. 1742-1749, 1994.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A.; KEUZENKAMP, D.A.; VAN KNAPEN, F. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical

control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 243-254, 2001.

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.

THOMASON, B.N. Rapid detection of *Salmonella* microcolonies by fluorescent antibody. **Appl. Microbiol.**, v. 22, p. 1064-1069, 1971.

THORBERG, B.M.; ENGVALL, A. Incidence of *Salmonella* in five Swedish slaughterhouses. **J. Food Prot.**, v. 64, n. 4, p. 542-545, 2001.

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.

VALDEZATE, A.V.; VIDAL, A.; HERRERA-LEÓN, S.; POZO, J.; RUBIO, P.; USERA, M.A.; CARVAJAL, A.; ECHEITA, M.A. *Salmonella* Derby clonal spread from pok. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 694-698, 2005.

VAN DER LEE, H.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Methods for the rapid detection of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). ***Salmonella in Domestic Animals***. CABI International, London, UK, 2000. cap. 22, p. 373-391.

VAN DER WOLF, P.J.; WOLBERS, W.B.; ELBERS, A.R.W.; VAN DER HEIJDEN, H.M.J.F.; VAN SCHIE, F.W. Risk factors for *Salmonella* in slaughter-pigs in the Netherlands. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 15., 1998, Birmingham, Inglaterra. **Proceedings...** Birmingham , 1998. p. 68.

WALTMAN, W.D. Methods for the cultural isolation of Salmonella. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). ***Salmonella in Domestic Animals***. CABI International, London, UK, 2000. cap. 21, p. 355-372.

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.

WIDDERS, P.; COATS, K.J.; MORGAN, I.R. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE ECOLOGY OF *SALMONELLA* IN SWINE, 1., 1996, Ames. **Proceedings...** Ames, 1996. p. 165.

WILCOCK, B.; OLANDER, H. Influence of oral antibiotic feeding on the duration and severity of clinical disease, growth performance, and pattern of shedding in swine inoculated with *Salmonella Typhimurium*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.172, n. 4, p. 472-477, 1978.

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