

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

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Salmonella* Dublin EM
BEZERROS BUBALINOS: ESTUDO CLÍNICO,
LABORATORIAL E TERAPÊUTICO**

André Marcos Santana

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2012

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

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Salmonella* Dublin EM
BEZERROS BUBALINOS: ESTUDO CLÍNICO,
LABORATORIAL E TERAPÊUTICO**

André Marcos Santana

**ORIENTADOR: Prof. Dr. José Jurandir Fagliari
CO-ORIENTADORA: Dra. Daniela Gomes da Silva**

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

Jaboticabal – São Paulo - Brasil

Fevereiro de 2012

Santana, André Marcos
S232i Infecção experimental com *Salmonella* Dublin em bezerros
bubalinos: Estudo clínico, laboratorial e terapêutico / André Marcos
Santana. -- Jaboticabal, 2012
xxvi, 122 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: José Jurandir Fagliari
Co-orientadora: Daniela Gomes da Silva
Banca examinadora: Roberto Calderon Gonçalves, Júlio Augusto
Naylor Lisbôa, Mario Roberto Hatayde, Fernando Antonio de Ávila
Bibliografia

1. *Bubalus bubalis*. 2. Diarréia. 3. Florfenicol. 4. Hemogasometria.
5. Perfil bioquímico sérico 6. Proteinograma. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.981.49:636.293.2

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Salmonella* Dublin EM BEZERROS
BUBALINOS: ESTUDO CLÍNICO, LABORATORIAL E TERAPÊUTICO

AUTOR: ANDRÉ MARCOS SANTANA

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. DANIELA GOMES DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOSE JURANDIR FAGLIARI

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. ROBERTO CALDERON GONÇALVES

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Prof. Dr. JULIO AUGUSTO MAYLOR LISBOA

Departamento de Clínica Veterinária / Centro de Ciências Agrárias / Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. MARIO ROBERTO HATAYDE

Departamento de Clin e Cir Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE AVILA

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 07 de fevereiro de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉ MARCOS SANTANA - nascido em 04 de agosto de 1981, em Ilha Solteira, Estado de São Paulo, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, em fevereiro de 2001, concluindo-o em dezembro de 2005. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica da FAPESP de setembro de 2003 a julho de 2005, tendo desenvolvido os trabalhos intitulados “Hemograma e proteinograma sérico de búfalas (*Bubalus bubalis*) sorologicamente reagentes e de não reagentes á Brucelose” e “Contituíntes do soro sanguíneo de Veados-Catingueiro (*Mazama Gouazoubira*) criados em cativeiro”. Realizou, de março de 2006 a Fevereiro de 2008, como bolsista da CAPES, mestrado em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal e no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, Campos de São José do Rio Preto, área de concentração em genética animal, defendendo dissertação intitulada “Contribuição ao mapeamento do cromossomo 9 do búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) utilizando painel de células somáticas híbridas irradiadas”. cursou o doutorado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, de março de 2008 a fevereiro de 2012 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como bolsista da FAPESP.

DEDICATÓRIA

Este Doutorado é a recompensa de uma luta de vários anos. Representa tudo que conquistei até hoje e me permite seguir adiante com força e dignidade, mais acima de tudo com humildade. Por isso, dedico este Doutorado a meus pais, Marcos e Regina. Descobri em vocês a força da amizade, da humildade e da honestidade. Obrigado por toda a dedicação, vocês sempre serão meus verdadeiros mestres e estarão para sempre dentro do meu coração.

À minha irmã Clarissa, nossa futura Médica Veterinária e de quem tanto me orgulho.

À minha noiva e futura esposa Camila. Você me trouxe paz. Você é a pedra na qual eu me sustento e você me faz feliz. Você mudou minha vida para sempre e nada mais faz sentido sem você. Você é um anjo que veio me salvar. Te amo até o infinito.....

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, pela amizade, orientação e ensinamentos durante todo o período de graduação e pós-graduação. Por despertar meu interesse pelo mundo da pesquisa científica. Por me dar a oportunidade de crescer profissionalmente e pessoalmente, por me receber e me acolher de braços abertos, pela confiança que em mim depositou.

À Dra. Daniela Gomes da Silva, pela amizade e ensinamentos, pela dedicação com que me orientou durante todo o período de realização deste trabalho.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos (Processo: 2008/50388-7) e do auxílio financeiro (Processo: 2009/12350-0).

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante os primeiros seis meses de Doutorado.

Aos meus colegas de laboratório Lucas José Luduverio Pizauro, Priscila Arrigucci Bernardes, Kalina Maria de Medeiros Gomes Simplício, Virna Clemente, Daniela Rodrigues Silva, Diana Cifuentes, Giovana Lima, Cecília Rodrigues Alves Silveira e Ana Paula Reiff Janini pelo convívio e fundamental ajuda na execução deste experimento.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, ao Prof. Dr. Roberto Calderon Gonçalves, ao Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisboa, ao Prof. Dr. Mario Roberto Hatayde e ao Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila por participarem como membros da banca de defesa e sugerirem alterações valiosas que contribuíram para a melhor qualidade da tese final.

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila por permitir o uso do Laboratório de Microbiologia para execução da leitura dos ensaios de PCR.

Aos funcionários do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Renata Lemos Nagib Jorge, Paulo César da Silva e Cláudia Aparecida da Silva Nogueira, pelo auxílio na execução das análises laboratoriais.

Aos funcionários do Setor de Grandes Animais do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” pelo auxílio com o manejo durante a parte prática do experimento.

As minhas avós, Iracema (*in memorian*) e Izaura (*in memorian*), por todo apoio que sempre me deram.

Ao meu tio Fernando (*in memorian*) e minha tia Marly, pela amizade e carinho e ao meu primo Fernando, que considero um dos poucos verdadeiros amigos que tenho.

Aos meus amigos da época da República Magnata (Kojak, Jessé, Cauby, Naim, Fui-Eu, Zé Pequeno e Tinoco) e da República Taverna (Papada, Gracinha, Mocinha, Chinês, Rhola, Xibata, Jane, Urubu, Placebo e Koréia) e aos meus grandes amigos Chacal e Pixera, pela amizade e pela ajuda nas horas de incerteza e dificuldade.

Aos meus grandes amigos Pressão, Boka, Marcão, Consuelo e Mirto, que convivem comigo há tantos anos e que me sinto privilegiado por ter conhecido. Em especial, ao meu grande amigo Pressão, que considero meu irmão, pela confiança depositada em mim ao me escolher como padrinho de seu filho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS	xv
1.INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS	10
3.2 PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DO INÓCULO DE <i>SALMONELLA</i> DUBLIN	10
3.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	11
3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	12
3.5 EXAME FÍSICO	12
3.6 COLHEITAS E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	13
3.7 COLHEITA DE SUABES RETAIS	14
3.8 LOCAL E TIPOS DE ANÁLISES LABORATORIAIS	14
3.8.1 <i>Local de análises laboratoriais</i>	14
3.8.2 <i>Tipos de análises laboratoriais</i>	14
3.8.2.1 Hematologia	14
3.8.2.2 Hemogasometria	15
3.8.2.3 Perfil bioquímico	15
3.9 EXAME BACTERIOLÓGICO	16
3.9.1 <i>Isolamento de Salmonella Dublin</i>	16
3.9.2 <i>Deteção de Salmonella Dublin pela reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	17
3.10 EXAME ANATOMOPATOLÓGICO (MACROSCÓPICO E MICROSCÓPICO).....	18
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 EXAME FÍSICO.....	20
4.1.1 <i>Frequência cardíaca</i>	20
4.1.2 <i>Frequência respiratória</i>	22
4.1.3 <i>Temperatura retal</i>	24
4.1.4 <i>Escore da consistência das fezes</i>	28
4.1.5 <i>Grau de desidratação, comportamento e apetite</i>	33
4.2 HEMATOLOGIA	33
4.2.1 <i>Contagem de hemácias, teor de hemoglobina e volume globular</i>	33
4.2.2 <i>Contagem de leucócitos</i>	39
4.2.3 <i>Contagem de plaquetas</i>	45
4.3 PERFIL BIOQUÍMICO	46
4.3.1 <i>Hemogasometria</i>	46
4.3.1.1 pH e concentração de bicarbonato sanguíneo (HCO_3^-)	47
4.3.1.2 Pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) e total de dióxido de carbono (tCO_2)	50
4.3.1.3 Excesso de base	53
4.3.1.4 Intervalo aniônico (Anion Gap - AG).....	55
4.3.2 <i>Minerais</i>	57
4.3.2.1 Concentração sérica de cloretos	57
4.3.2.2 Concentração sérica de magnésio	59
4.3.2.3 Concentração sérica de fósforo.....	61
4.3.2.4 Concentração sérica de cálcio total.....	63
4.3.2.5 Concentração sérica de ferro	64
4.3.3 <i>Íons</i>	67
4.3.3.1 Concentração sérica de sódio	67
4.3.3.2 Concentração sérica de potássio	69
4.3.3.3 Concentração sérica de cálcio ionizado	70
4.3.4 <i>Catabólitos e enzimas</i>	72
4.3.4.1 Concentração sérica de ureia e creatinina	72

4.3.4.2	Concentração sérica de bilirrubina total e direta	75
4.3.4.3	Atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST)	78
4.3.4.4	Atividade sérica de gamaglutamiltransferase (GGT)	79
4.3.4.5	Atividade sérica de creatinacinase (CK)	81
4.3.4.6	Concentração plasmática de glicose	83
4.4	PROTEINOGRAMA SÉRICO E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE FIBRINOGENIO	84
4.4.1	<i>Proteinograma sérico</i>	84
4.4.2	<i>Concentração plasmática de fibrinogênio</i>	91
4.5	EXAMES PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> DUBLIN A PARTIR DE SUABES RETAIS	94
4.5.1	<i>Isolamento de Salmonella Dublin</i>	94
4.5.2	<i>Deteção de Salmonella Dublin pela PCR</i>	96
4.5.3	<i>Comparação entre os resultados do isolamento bacteriológico e da detecção pela PCR e comparação dos caldos de enriquecimento seletivo (SC, TMK e RV) na identificação de Salmonella Dublin a partir de amostras de suabes retais</i>	98
4.5.3.1	<i>Comparação entre o isolamento bacteriológico e a detecção pela PCR na identificação de Salmonella Dublin a partir de amostras de suabes retais</i>	98
4.5.3.2	<i>Comparação dos caldos de enriquecimento seletivo (SC, TMK e RV) na detecção de Salmonella Dublin a partir de amostras de suabes retais</i>	101
4.5.3.2.1	<i>Isolamento de Salmonella Dublin</i>	101
4.5.3.2.2	<i>Deteção de Salmonella Dublin pela PCR</i>	101
4.6	ACOMPANHAMENTO DOS BEZERROS BUBALINOS APÓS A FASE AGUDA DA INFECÇÃO	102
4.6.1	<i>Exame Físico</i>	102
4.6.2	<i>Isolamento de Salmonella Dublin</i>	103
4.6.3	<i>Exame anatomopatológico e isolamento de Salmonella Dublin a partir de órgãos</i>	104

4.6.3.1 Exame anatomopatológico (macroscópico e microscópico).....	105
4.6.3.2 Isolamento de <i>Salmonella</i> Dublin a partir de órgãos	107
5. CONCLUSÕES.....	109
6. REFERÊNCIAS	110

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Médias e desvios padrão da frequência cardíaca (bpm) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....21
- Tabela 2.** Médias e desvios padrão da frequência respiratória (mpm) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 23
- Tabela 3.** Médias e desvios padrão da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 e 168 horas após a infecção. 26
- Tabela 4.** Médias e desvios padrão do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 35

- Tabela 5.** Médias e desvios padrão do teor de hemoglobina (g/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....37
- Tabela 6.** Médias e desvios padrão do volume globular (%) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....38
- Tabela 7.** Médias e desvios padrão do número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 41
- Tabela 8.** Médias e desvios padrão do número de linfócitos ($/\mu\text{L}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 43

- Tabela 9.** Médias e desvios padrão do número total de neutrófilos segmentados (μL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 44
- Tabela 10.** Médias e desvios padrão do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 45
- Tabela 11.** Médias e desvios padrão do valor do pH sanguíneo de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 48
- Tabela 12.** Médias e desvios padrão da concentração sanguínea de bicarbonato (HCO_3^-) (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 49

- Tabela 13.** Médias e desvios padrão da pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2)(mmHg) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 51
- Tabela 14.** Médias e desvios padrão do teor de dióxido de carbono (tCO_2) (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 52
- Tabela 15.** Médias e desvios padrão do excesso ou déficit de base (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 54
- Tabela 16.** Médias e desvios padrão do valor de intervalo aniônico (AG) (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 56

- Tabela 17.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de cloretos (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 58
- Tabela 18.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de magnésio (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 60
- Tabela 19.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de fósforo (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 62
- Tabela 20.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de cálcio total (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 63

- Tabela 21.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de ferro ($\mu\text{g/dL}$) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 66
- Tabela 22.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de sódio (mMol/L) de bezerros bubalinos de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 68
- Tabela 23.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de potássio (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 69
- Tabela 24.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de cálcio ionizado (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 71

- Tabela 25.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de ureia (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 73
- Tabela 26.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de creatinina (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 74
- Tabela 27.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de bilirrubina total (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 76
- Tabela 28.** Médias e desvios padrão da concentração sérica de bilirrubina direta (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 77

- Tabela 29.** Médias e desvios padrão da atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 78
- Tabela 30.** Médias e desvios padrão da atividade sérica de gamaglutamiltransferase (GGT) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 80
- Tabela 31.** Médias e desvios padrão da atividade sérica de creatinacina (CK) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 82
- Tabela 32.** Médias e desvios padrão da concentração plasmática de glicose (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 83

- Tabela 33.** Médias e desvios padrão das concentrações sérica de proteína total (g/dL) e das frações protéicas (mg/dL), obtidas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 88
- Tabela 34.** Médias e desvios padrão da concentração plasmática de fibrinogênio (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 93
- Tabela 35.** Detecção de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais obtidos de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com aproximadamente 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2), antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental, pelo isolamento bacteriológico. 95
- Tabela 36.** Detecção de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais obtidos de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin e submetidos a tratamento com florfenicol (G3), antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental, pelo isolamento bacteriológico.....96
- Tabela 37.** Detecção de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais obtidos de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com aproximadamente 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2), antes da

inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental, pela PCR. 97

Tabela 38. Detecção de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais obtidos de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin e submetidos a tratamento com florfenicol (G3), antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental, pela PCR. 98

Tabela 39. Detecção de *Salmonella* Dublin em amostras de suabes retais de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC pelo isolamento bacteriológico e PCR associados aos caldos de enriquecimento seletivo selenito cistina (SC), tetracionato Muller-Kauffmann (TT) e Rappaport-Vassiliadis (RV). 100

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Frequência cardíaca (bpm) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 22
- Figura 2.** Frequência respiratória (mpm) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 24
- Figura 3.** Temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 e 168 horas após a infecção. 27
- Figura 4.** Temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) no período vespertino de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 12, 36, 60, 84, 108, 132 e 156 horas após a infecção. 28

- Figura 5.** Escore da consistência das fezes de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora), 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 e 168 horas após a infecção. 30
- Figura 6.** Fezes normais (A), diarreia moderada (B) e diarreia grave (C e D) de bezerros bubalinos submetidos à infecção experimental com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin. 31
- Figura 7.** Fezes com presença de sangue de bezerros bubalinos submetidos à infecção experimental com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin. 32
- Figura 8.** Fezes com presença de fragmentos de mucosa intestinal de bezerros bubalinos submetidos à infecção experimental com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin. 32
- Figura 9.** Número de hemácias ($\times 10^6/\text{mL}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 36
- Figura 10.** Teor de hemoglobina (g/dL) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da

inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....37

Figura 11. Volume globular (%) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 38

Figura 12. Número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....42

Figura 13. Número de linfócitos ($/\mu\text{L}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....43

Figura 14. Número de neutrófilos segmentados ($/\mu\text{L}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....44

- Figura 15.** Número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....46
- Figura 16.** Variação do pH sanguíneo de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 49
- Figura 17.** Variação da concentração sanguínea de bicarbonato (HCO_3^-) (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 50
- Figura 18.** Pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) (mmHg) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 52
- Figura 19.** Teor de dióxido de carbono (tCO_2) (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados

experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....53

Figura 20. Variação do excesso ou déficit de base (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 55

Figura 21. Variação do valor de intervalo aniônico (AG) (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 56

Figura 22. Variação da concentração sérica de cloretos (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....58

Figura 23. Variação da concentração sérica de magnésio (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e

bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....60

Figura 24. Variação da concentração sérica de fósforo (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....62

Figura 25. Variação da concentração sérica de cálcio total (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....64

Figura 26. Variação da concentração sérica de ferro (μ g/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....66

Figura 27. Variação da concentração sérica de sódio (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de

S. Dublin e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....68

Figura 28. Variação da concentração sérica de potássio (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....70

Figura 29. Variação da concentração sérica de cálcio ionizado (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 71

Figura 30. Variação da concentração sérica de ureia (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....73

Figura 31. Variação da concentração sérica de creatinina (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da

inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.....74

Figura 32. Variação da concentração sérica de bilirrubina total (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental.....76

Figura 33. Variação da concentração sérica de bilirrubina direta (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 77

Figura 34. Variação da atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 79

Figura 35. Variação da atividade sérica de gamaglutamiltransferase (GGT) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a

tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 81

Figura 36. Variação da atividade sérica de creatinacinase (CK) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção. 82

Figura 37. Variação da concentração plasmática de glicose (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental.....84

Figura 38. Exemplo de corrida eletroforética de amostras de soro de bezerros bubalinos infectado experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin em gel de poliacrilamida corado com azul de comassie.....90

Figura 39. Traçado eletroforético do proteinograma sérico de bezerro infectado experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin.....91

Figura 40. Variação da concentração plasmática de fibrinogênio (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3)

antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas
após a infecção. 93

Figura 41. Linfonodos mesentéricos aumentados (A e B) e congestão de alças
intestinais (C e D) em bezerros submetidos à infecção
experimental com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin. 107

INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Salmonella* Dublin EM BEZERROS BUBALINOS: ESTUDO CLÍNICO, LABORATORIAL E TERAPÊUTICO

RESUMO - O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações clínicas e laboratoriais de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com *Salmonella* Dublin e verificar efeito do tratamento com antibiótico florfenicol. Também teve como objetivo avaliar a eficiência da reação em cadeia da polimerase (PCR) comparativamente ao exame bacteriológico no diagnóstico da salmonelose. Para isso, foram utilizados três grupos experimentais (n=6): controle (grupo 1), que receberam, por via oral, 10 ml de caldo BHI; sem tratamento (grupo 2) e tratados com florfenicol (grupo 3), que receberam, por via oral, 10⁸ UFC de *S. Dublin* suspensas em 10 ml de BHI. Os bezerros foram submetidos ao exame físico antes da inoculação e a cada 24 horas até o sétimo dia após infecção. Diariamente, foram colhidas amostras de sangue para a realização de hemograma e testes bioquímicos (inclusive proteinograma e hemogasometria) e colhidos suabes retais para identificação de *S. Dublin* por exame bacteriológico e PCR. A infecção experimental induziu hipertermia e diarreia. A inoculação também provocou leucopenia e neutropenia, hipofosfatemia, aumento das concentrações das proteínas fibrinogênio, ceruloplasmina e haptoglobina e diminuição das concentrações de ferro. Os bezerros tratados não apresentaram cura clínica e bacteriológica concluindo-se que o florfenicol não foi efetivo no combate à *S. Dublin*. A PCR mostrou-se superior ao isolamento bacteriológico na detecção de *S. Dublin*. Adicionalmente, a eliminação da bactéria nas fezes dos animais infectados após o período de sintomatologia confirma o estado de portador desses animais.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, diarreia, florfenicol, hemogasometria, perfil bioquímico sérico, proteinograma.

EXPERIMENTAL *Salmonella* Dublin INFECTION IN BUFFALO CALVES: CLINICAL, LABORATORIAL AND THERAPEUTIC STUDY

SUMMARY - The aim of the study was to evaluate clinical and laboratorial changes in experimentally *Salmonella* Dublin-infected buffalo calves and the effect of florfenicol antibiotic treatment. Also, the aim of the study was to compare the performance of standard microbiological techniques and polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of *S. Dublin*. Three experimental groups, with six calves, were formed: control group (G1), that orally received 10 ml of BHI broth; without any treatment group (G2) and treated with florfenicol group (G3), that orally received 10^8 CFU of *S. Dublin* suspended in 10 ml of BHI broth. All calves were submitted to physical examination before experimental inoculation and at every 24 hours up to the 7th day after infection. Daily blood samples were collected for hematological and biochemical analysis (including proteinogram and hemogasometry). Daily rectal swabs were collected for the isolation of *S. Dublin* by standard microbiological techniques and PCR. The experimental infection induced hyperthermia and diarrhea. The inoculation also caused leukopenia and neutropenia, hypophosphatemia, increase of the fibrinogen, ceruloplasmin and haptoglobin concentrations and decrease of the iron concentrations. Calves treated showed no clinical and bacteriological cure, concluding that florfenicol was not effective against *S. Dublin*. PCR had better performance in the isolation of *S. Dublin* when compared with standard microbiological techniques. Additionally, elimination of the bacteria in the feces of infected animals after a period of symptoms confirms the carrier status of buffalo calves.

Keywords: *Bubalus bubalis*, diarrhea, florfenicol, hemogasometry, serum biochemical profile, proteinogram.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, o crescimento da população bubalina a partir da década de sessenta foi bastante expressivo, e segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Pesquisa Pecuária Municipal (IBGE), a população bubalina brasileira somou, em 2009, 1,1 milhão de animais. Segundo indicações da ANUALPEC 2009, o maior efetivo se concentra na região norte do país (64,0%), principalmente no Estado do Pará (39,6% do total nacional) e do Amapá (18,9% do total nacional), seguidos da região sul (11,4%), nordeste (10,7%), sudeste (9,4%) e centro-oeste (6,2%), com destaque, na região sudeste, para o Estado de São Paulo, com aproximadamente 77 mil animais.

Segundo a federação internacional de laticínios (IDF, 2010), a produção mundial de leite bubalino, em 2009, foi de 90 milhões de toneladas, 23 milhões de toneladas a mais que o estimado em 2000, representando 13% da produção mundial de leite. No Brasil estima-se que a média de produção anual seja de 92,3 milhões de litros de leite de búfala, com produção de 18,5 mil toneladas de derivados a partir de 45 milhões de litros de leite (BERNARDES, 2007).

As maiores taxas de mortalidade em búfalos ocorrem em animais jovens. Segundo SUNIL CHANDRA & MAHALINGAM (1994), registros em várias fazendas mostraram que as perdas com animais jovens podem chegar a 22,2% no primeiro ou entre o quarto e sexto mês de vida, devido a agentes virais, bacterianos e deficiências nutricionais, sendo que uma das causas mais importantes de mortalidade consiste na chamada “diarreia neonatal dos bezerros”, doença multifatorial, resultante da interação entre bezerro, ambiente e agente etiológico (BENESI, 2004).

Em estudos realizados durante ocorrências de diarreias em neonatos de búfalas, diferentes patógenos foram detectados, como rotavírus, coronavírus e calicivírus (GIGLIO et al., 1994), *E. coli* e *Cryptosporidium* (CAVIRANI et al., 1997), *Clostridium perfringens* tipo A, C e D, *Pasteurella*, *Klebsiella*, *Proteus vulgaris* e *Citrobacter* (SHARMAN & KUMAR, 2003). Em muitos casos a causa apontada foi a colibacilose

associada à salmonelose, com incidência de 54 a 58% e de 13 a 14%, respectivamente (FAGIOLO et al., 2005).

Em bezerros, os distúrbios decorrentes das diarreias devem-se à ação local e sistêmica de enterotoxinas e endotoxinas bacterianas, à inflamação causada pelo agente etiológico e à atrofia das vilosidades intestinais. Tais condições resultam em hipersecreção e malabsorção intestinal, bem como em transtornos hematológicos, bioquímicos e hemogasométricos, de gravidade variável (CAMBIER et al., 2001). As perdas econômicas ocorrem devido à morte dos animais, custos com tratamento e atrasos no ganho genético dos rebanhos. Segundo SUNIL CHANDRA & MAHALINGAM (1994), as doenças entéricas em bezerros de búfalas podem ser responsáveis por até 23,7% das mortes que ocorrem em neonatos. De acordo com RIBEIRO et al. (2000), bezerros de búfalas geralmente apresentam diarreia durante as primeiras quatro semanas de vida.

Dentre as causas de diarreia em bezerros, a salmonelose é uma das mais importantes (HOUSE et al., 2001), sendo que, em bovinos, a enfermidade causada pela *S. Dublin* induz altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo considerado o sorotipo adaptado à espécie bovina (VELING et al., 2002). Segundo LÁU (1999), dentre os diversos sorotipos isolados em búfalos o mais encontrado é a *S. Dublin*. Relatos mostram que a diarreia causada pelas salmoneloses em neonatos de búfalas podem ser responsáveis por 13 a 14% do total de casos, com mortalidade variando de 40 a 72% (FAGIOLO et al., 2005).

Salmonella é uma bactéria pertencente à Família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativa, intracelular facultativa, não-formadora de esporos, aeróbia ou anaeróbia facultativa, geralmente móvel. As salmonelas fermentam a glicose produzindo gases (exceto *S. Typhi*), não fermentam a lactose e não produzem urease (QUINN et al., 2005). Para um crescimento ótimo, requer temperatura de 35°C a 37°C e pH de 6,5 a 7,5 (EKPERIGIN & NAGARAJA, 1998).

Atualmente, a classificação das bactérias do gênero *Salmonella* é baseada em estudos moleculares, sendo que o gênero é dividido em duas espécies (*S. enterica* e *S. bongori*), sendo que a espécie *S. enterica*, responsável pela maioria das infecções em

animais domésticos, possui seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*). Entretanto, essa classificação tem pouco significado prático e na rotina utiliza-se o esquema de Kaufmann e White, que divide as salmonelas em sorotipos, baseado na composição antigênica da bactéria (FORSHELL & WIERUP, 2006). No caso da *Salmonella*, existem três tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) (EKPERIGIN & NAGARAJA, 1998).

A principal porta de entrada para a infecção é a cavidade oral, pela ingestão de água e alimentos contaminados. Após sua ingestão, *Salmonella* alcança o intestino, onde atinge o íleo distal e o ceco, aderindo à mucosa intestinal por meio de mecanismos mediados pelas fímbrias. Após a adesão, a salmonela invade o epitélio intestinal, induzindo a ruptura e o afastamento das microvilosidades, permitindo endocitose e migração através das células. Esse processo induz uma reação inflamatória local que leva a uma enterite fibrinopurulenta e necrosante localizada principalmente no íleo (SANTOS et al., 2002a). A destruição de enterócitos e rompimento da integridade da mucosa levam a quadros de diarreia e desidratação, favorecendo a absorção de endotoxinas e permitindo a secreção de água, eletrólitos, bicarbonato e proteínas para o lúmen gastrointestinal, causando graves desequilíbrios hidro-eletrolíticos e ácido-básico. Essas alterações são acompanhadas por diarreia, hipertermia, anorexia, depressão e choque (EKPERIGIN & NAGARAJA, 1998), sendo a taxa de mortalidade inversamente proporcional à idade dos animais atingidos (SANTOS et al., 2002a).

Em muitos casos, a resposta inflamatória limita-se ao intestino e assim não ocorre a infecção sistêmica. Acredita-se que a capacidade da salmonela de invadir a corrente sanguínea e causar lesão tecidual está relacionada com a interação do sorotipo envolvido e o hospedeiro em questão. Segundo HEFFERNAN et al. (1987), a sobrevivência da *S. Dublin* no interior das células fagocíticas, principalmente macrófagos, é considerado componente essencial na determinação da virulência dessa bactéria. Nos casos em que a resposta imune não é capaz de limitar a salmonela ao trato gastrointestinal, elas são transportadas aos linfonodos mesentéricos e a outros

órgãos, causando lesões que podem levar a quadros de pneumonia, meningite, poliartrite, osteíte e gangrena, dentre outras complicações.

As formas de manifestação clínica da salmonelose podem variar de septicemias superagudas a infecções assintomáticas. De maneira geral, em bovinos, sob condições experimentais, a infecção com 10^4 a 10^7 UFC causa diarreia transitória que persiste por 48 a 192 horas, enquanto doses entre 10^8 a 10^{11} UFC causam doença septicêmica de evolução aguda, com morte em curto espaço de tempo (SANTOS et al., 2002b). Estudo realizado por SILVA et al. (2008a) com bezerros de 10 a 15 dias de idade permitiu concluir que doses de 10^8 UFC são suficientes para causar infecção experimental com *S. Dublin*, com aparecimento de sinais clínicos característicos. Em búfalos, os principais sinais clínicos são anorexia, hipertermia, diarreia e desidratação. A diarreia é profusa, aquosa e bastante fétida, com presença de muco e sangue. Nos casos em que as endotoxinas bacterianas são absorvidas, a diarreia é acompanhada de hipertermia, dores abdominais, apatia, anorexia, fraqueza e respiração acelerada, sendo que a morte pode ocorrer de quatro a sete dias (FAGIOLLO et al., 2005).

A secreção de enterotoxinas pela *Salmonella* sp no trato intestinal induz hipersecreção, além da marcante inflamação local com destruição de células absortivas, levando a aumento no volume de líquidos eliminados nas fezes, caracterizando os quadros de diarreia. Estas perdas de líquidos, acompanhadas pela perda de eletrólitos e de bicarbonato, levam ao desenvolvimento de desidratação, desequilíbrio eletrolítico e acidose metabólica. Neste contexto, os exames laboratoriais são de grande valia no diagnóstico e prognóstico das salmoneloses, auxiliando nas determinações do grau de hemoconcentração (volume globular), do nível de perfusão renal (taxa de ureia e creatinina), dos desequilíbrios iônicos (concentrações séricas de sódio, potássio e cloretos) e ácido-básicos (hemogasometria), entre outras alterações decorrentes da infecção (BENESI, 2004).

Bezerros bovinos infectados experimentalmente por *S. Typhimurium* apresentaram aumento do volume globular, da contagem de hemácias e do teor de hemoglobina, hipoglicemia, desidratação, acidose metabólica, elevação das concentrações sanguíneas de ureia, creatinina, fibrinogênio, diminuição das

concentrações de CO₂ total, cálcio, proteína total, albumina, hiponatremia, hipocloremia (SANTOS et al., 2002b). ÁVILA et al. (2008), estudando bezerros neonatos infectados por *S. Typhimurium*, observaram hipocalemia e hipocalcemia no decorrer da infecção.

SILVA et al. (2010a), estudando bezerros de 10 a 15 dias infectados por *S. Dublin*, verificaram leucocitose a partir de 24 horas após a infecção experimental. Verificaram, também, que as principais alterações bioquímicas ocorridas em relação ao grupo controle foram aumentos do teor plasmático de fibrinogênio, redução das concentrações de albumina, ferro, glicose, magnésio e proteína total e diminuição das atividades séricas de fosfatase alcalina (ALP) e creatinacinase (CK).

A acidose metabólica desenvolve-se em bezerros diarréicos devido à perda de bicarbonato pelo trato intestinal e à produção de ácidos orgânicos no cólon. Adicionalmente, a diminuição das perfusões tecidual e renal resulta na produção de ácido láctico e na diminuição da excreção urinária de íons hidrogênio, respectivamente, exacerbando a acidose metabólica (GROVE-WHITE & MICHELL, 2001). SILVA et al. (2010a), estudando bezerros de 10 a 15 dias infectados por *S. Dublin*, verificaram ligeiras diminuições do pH sanguíneo, do excesso de base e da concentração de HCO₃⁻ a partir de 72 horas após a infecção, compatível com quadro discreto de acidose metabólica. Verificaram, também, redução na concentração sanguínea de sódio às 120 e 144 horas após a inoculação, aspecto atribuído à perda desse eletrólito nas fezes (KANEKO et al., 2008).

O leucograma, quando bem analisado e interpretado representa um valioso dado complementar para o diagnóstico, evolução e prognóstico das doenças infecciosas. Relata-se, em búfalos, leucocitose em casos de abscesso cutâneo, mastite crônica, tuberculose, otite, miíase cutânea, laringite, metrite e enterite (ZARGHAN et al., 1997).

O fracionamento eletroforético representa um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas sanguíneas (KANEKO et al., 2008). A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo e permite a detecção de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 tipos diferentes de proteínas, incluindo as imunoglobulinas e proteínas de fase aguda, necessitando

diminutas quantidades de amostra (GORDON, 1995). Em contrapartida, outras técnicas como as realizadas em filmes de agarose (MATTEWS, 1982) ou fitas de celulose (FAGLIARI et al., 1983; FAGLIARI et al., 1991) possibilitam a separação de, somente, 5 a 7 grupos de proteínas.

SILVA et al. (2011), analisando o proteinograma sérico de bezerros bovinos de 10 a 15 dias infectados por *S. Dublin*, utilizando a técnica SDS-PAGE, detectaram 30 diferentes proteínas. Destas proteínas, observaram aumento das concentrações séricas de ceruloplasmina, haptoglobina, glicoproteína ácida e proteína de peso 34.000 Da, a partir de 24 horas após a inoculação. Já ÁVILA (2009), estudando bezerros bovinos infectados por *S. Typhimurium* encontrou aumento significativo nas concentrações séricas apenas da glicoproteína ácida.

SATIJA et al. (1979) identificaram 11 bandas de proteínas séricas no soro de búfalos normais submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida. Entretanto, apesar da importância dessas proteínas de fase aguda no diagnóstico e prognóstico de doenças, na literatura consultada não há relato de estudos referentes ao proteinograma sérico obtido pela técnica SDS-PAGE de bubalinos infectados por *Salmonella*. Desta forma, o uso da técnica SDS-PAGE pode ser de grande valia no diagnóstico e prognóstico de doenças nesta espécie.

O método referencial para diagnóstico da salmonelose em bezerros e animais adultos é o isolamento bacteriológico da *Salmonella* sp nas fezes, por meio da análise de características morfológicas e testes bioquímicos e posterior sorotipagem, realizada pelo teste de aglutinação em lâmina para detecção dos antígenos O (somático) e H (flagelar) (QUINN et al., 2005). Nos casos de óbito, com sinais de septicemia, recomenda-se também a colheita de fragmentos do íleo, ceco, cólon, linfonodos mesentéricos, vesícula biliar e sangue para realização de cultura (REBHUN, 2000). SILVA et al. (2008b), analisando amostras de fezes de 14 bezerros, verificaram que o caldo de enriquecimento seletivo selenito cistina (SC) obteve 100% de eficiência na recuperação da *S. Dublin*, sendo que com os caldos tetrationato Muller-Kauffman (TMK) e Rappaport-Vassiliadis (RV), a recuperação foi de 69% e 23%, respectivamente.

Nos últimos anos, o aprimoramento de técnicas moleculares utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR), com amplificação e posterior identificação de fragmentos específicos de DNA, pode servir como subsídio valioso em investigações epidemiológicas bem como auxiliar na determinação da virulência de um isolado pela identificação de genes associados a propriedades patogênicas (QUINN et al., 2005). Apesar disso, tais técnicas estão sujeitas a uma série de interferências, sobretudo quando a amostra é representada por fezes, as quais podem conter diversos tipos de agentes inibitórios da PCR (FEDER et al., 2001), sendo necessários, para a utilização adequada desta técnica, maiores estudos relacionados ao processamento de amostras de fezes e à etapa de extração de DNA dessas amostras.

O enriquecimento em meio seletivo antes da etapa de extração do DNA tem sido considerado um procedimento promissor para detecção de *Salmonella* sp em amostras de fezes, pois, além de ser uma etapa comum ao isolamento bacteriológico, permite a multiplicação da bactéria-alvo e, também, dilui células mortas e substâncias inibidoras da PCR (KNUTSSON et al., 2002). No entanto, SILVA et al. (2010b), comparando o isolamento bacteriológico convencional em relação à PCR na detecção de *S. Dublin* em amostras de fezes de bezerros infectados experimentalmente com a bactéria, observaram superioridade do isolamento bacteriológico convencional em relação à PCR, sendo que o caldo SC foi a melhor opção de enriquecimento seletivo para ambas as técnicas.

As medidas preventivas são de fundamental importância no combate à diarreia em bezerros neonatos. Porém, o grande número de animais portadores assintomáticos e sintomáticos, que eliminam *Salmonella* sp nas fezes, muitas vezes dificulta o controle e erradicação do agente nas propriedades. Desta forma, a antibioticoterapia é recomendada para bezerros, já que estes, diferentemente dos animais adultos, dificilmente excretam *Salmonella* sp nas fezes após recuperarem-se da enfermidade (STEVENS et al., 1967).

Pouco se sabe em búfalos, porém em bezerros bovinos, antibióticos como sulfametoxazol associado ao trimetoprim, cefalosporinas, ampicilinas, aminoglicosídeos e cloranfenicol e análogos são recomendados no tratamento das salmoneloses

(ANDRADE, 2002). Dentre estas, o florfenicol, análogo estrutural do cloranfenicol, mostrou-se bastante eficiente. Um aspecto vantajoso é que o florfenicol não causa anemia aplástica, frequentemente associada ao uso de seu análogo (VARMA et al., 1997), sendo muitas vezes não recomendado o uso de cloranfenicol em animais de produção, por permanecer na forma residual nos subprodutos animais, sendo tóxico para humanos (ANDRADE, 2002). SILVA et al. (2010c), estudando bezerros de 10 a 15 dias infectados por *S. Dublin*, verificaram que o tratamento com florfenicol reduziu a eliminação fecal do agente e melhorou o quadro clínico dos bezerros, reduzindo a mortalidade.

Considerando-se o significado econômico e a importância em Saúde Pública, revestem-se de grande interesse os conhecimentos sobre as alterações clínicas provocadas pela infecção experimental de bezerros bubalinos com *Salmonella* Dublin e dos métodos terapêuticos utilizados no tratamento da salmonelose, para minimizar as perdas econômicas provocadas por essa enfermidade e reduzir a excreção do agente nas fezes dos animais.

2. OBJETIVOS

1. Avaliar as alterações clínicas e laboratoriais de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com *S. Dublin*.
2. Avaliar o efeito do tratamento de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com *S. Dublin*, utilizando-se o antibiótico florfenicol.
3. Avaliar a eficiência da reação em cadeia da polimerase (PCR) comparativamente ao exame microbiológico no diagnóstico da salmonelose em bezerros bubalinos infectados experimentalmente com *S. Dublin*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Características dos animais

Foram utilizados 18 bezerros bubalinos sadios da raça Murrah, com 10 a 25 dias de idade, obtidos de um rebanho comercial da região de Marília–SP, sendo que todos os bezerros adquiridos receberam colostro após o nascimento. Durante o período experimental, os bezerros foram alojados em abrigos individuais (1,30 m x 1,50 m x 1,45 m) suspensos a 0,4 m do chão e localizados numa área externa, de piso de concreto, do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária. Os bezerros receberam quatro litros de leite *in natura* pasteurizado tipo A¹ ao dia, divididos em dois repastos (às 7:00 e às 16:00 horas), além de ração apropriada², feno e água à vontade.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da FCAV-UNESP-Campus de Jaboticabal (Protocolo nº 010885-08).

3.2 Preparação e administração do inóculo de *Salmonella* Dublin

O inóculo para a indução da infecção experimental (desafio) foi preparado a partir de uma amostra de *Salmonella* Dublin (registro IOC 3101/03), originalmente isolada de fezes de bovinos infectados durante surto de salmonelose e arquivada no Centro de Referência de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos-RJ, e naturalmente resistente ao ácido nalidíxico (Nal^I). O inóculo foi preparado de acordo com o preconizado por FECTEAU et al. (2003), com algumas modificações. Inicialmente foi feito o cultivo da bactéria em 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*)³, durante 24 horas a 37°C, em cultura sob agitação. Após o crescimento, foram realizadas diluições seriadas de razão 10 a partir de uma alíquota dessa cultura em tubos contendo caldo BHI, mantidos em banho de gelo. O

¹ Leituensp

² Frivitelina 18/70

³ Oxoid

restante da cultura foi armazenado sob refrigeração e foi utilizada para o preparo do inóculo. Em seguida, fez-se o plaqueamento de cada uma das diluições em ágar nutriente³ e, após o período de incubação de 24 horas a 37°C, foi realizada a contagem de colônias pela técnica de MILES & MISRA (1938), de forma a se determinar a concentração de colônias/mL nas diluições seriadas e na cultura original, armazenada sob refrigeração. Cada bezerro recebeu, aproximadamente, 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC), adicionadas em 10 ml de caldo BHI, administradas por via oral, com auxílio de seringa estéril, imediatamente antes da primeira mamada do dia. Após o preparo, o inóculo foi mantido sob refrigeração em caixa isotérmica com gelo, até o momento da administração.

3.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A bactéria utilizada para a preparação do inóculo foi submetida ao teste de sensibilidade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton³, pelo método de discos de difusão de Kirb-Bauer (BAUER et al., 1966), utilizando-se discos⁴ tratados com os antibióticos florfenicol (cefar), gentamicina, ampicilina, doxiciclina, cloranfenicol, trimetoprim/sulfametoxazol, ceftiofur, ácido nalidíxico, tetraciclina e eritromicina.

A suspensão bacteriana foi inoculada em caldo triptona de soja³ e ajustada para o padrão McFarland de turbidez de 0,5. Posteriormente, os inóculos foram semeados em ágar Mueller-Hinton utilizando suabes estéreis. Após um período de 3 a 5 minutos, os discos contendo antibióticos foram colocados na superfície do ágar, respeitando-se uma distância mínima de 24 mm entre os mesmos. As cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas como controle. As placas de cultura foram invertidas e colocadas em estufa a 37°C, 15 minutos após a colocação dos discos, e a leitura realizada 16 a 18 horas após a incubação. A interpretação dos resultados se baseou no diâmetro das zonas de completa inibição, conforme recomendação do NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2001).

⁴ Cecon

O antibiograma foi realizado para verificar se a cepa de *Salmonella* Dublin utilizada no preparo do inóculo era sensível ao antibiótico florfenicol (antibiótico escolhido para o tratamento dos bezerros do grupo 3) e também para verificar se as salmonelas excretadas pelos bezerros após a inoculação oral apresentavam o mesmo padrão de sensibilidade ou resistência aos antibióticos testados com a cepa utilizada no preparo do inóculo.

3.4 Grupos Experimentais

Os 18 bezerros foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, constituídos por seis bezerros, submetidos aos seguintes tratamentos:

Grupo 1: administração oral de 10 mL de caldo BHI.

Grupo 2: administração oral de 10^8 UFC de *S. Dublin* suspensas em 10 mL de caldo BHI.

Grupo 3: administração oral de 10^8 UFC de *S. Dublin* suspensas em 10 mL de caldo BHI e tratamento intramuscular com 20 mg de florfenicol⁵/kg de peso ao início dos sinais clínicos da infecção, em 2 doses, com intervalo de 48 horas.

3.5 Exame físico

Os bezerros foram submetidos ao exame físico (FEITOSA, 2008) imediatamente antes da inoculação e a cada 12 horas para avaliação da consistência das fezes e da temperatura retal e diariamente para os demais parâmetros (frequência cardíaca, frequência respiratória, comportamento, grau de desidratação e apetite dos animais), ao longo de sete dias após a infecção experimental.

Os animais receberam escores da consistência das fezes: 0 = normal (fezes firmes), 1 = diarreia discreta (fezes pastosas), 2 = diarreia moderada a grave (fezes tendendo a líquidas ou líquidas); do comportamento: 0 = normal, 1 = apático e 2 = decumbente (animal com dificuldade para permanecer em estação); do grau de

⁵ Nuflor

desidratação: 0 = ausente (turgor de pele normal e olhos brilhantes), 1 = leve (turgor de pele levemente diminuído e olhos não retraídos), 2 = moderada a grave (turgor de pele diminuído e olhos retraídos) e do apetite: 0 = normal, 1 = diminuído e 2 = ausente (TREMBLAY, 1990).

Os animais pertencentes ao G3 receberam a primeira dose de antibiótico florfenicol entre 72 e 96 horas após a inoculação e a segunda dose entre 120 e 144 horas após a inoculação, de acordo com o aparecimento de diarreia característica de salmonelose e/ou de aumento da temperatura retal (temperatura $\geq 40,0$ °C).

3.6 Colheitas e preparação das amostras de sangue

As colheitas de sangue foram realizadas imediatamente antes da inoculação (0 hora) e a partir daí, diariamente até o final do experimento (24 a 168 horas após a inoculação), ao sétimo dia após a inoculação. A colheita das amostras de sangue foi realizada mediante a punção da veia jugular, após antissepsia local com álcool iodado, utilizando-se o sistema de colheita a vácuo⁶ e agulha 25 x 8 mm. Imediatamente antes da inoculação de *S. Dublin* foram colhidas: amostras de 5 mL de sangue em frascos de vidro siliconizados, contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), para a realização de hemograma; amostras de 5 mL de sangue em frascos com anticoagulante fluoretado, para a avaliação da glicemia e amostras de 10 mL de sangue em frascos sem anticoagulante, para as análises bioquímicas do soro sanguíneo. Para as análises hemogasométricas, foram colhidas amostras de sangue em seringas plásticas⁷ de 1 mL, contendo heparina sódica⁸ como anticoagulante, e mantidas sob refrigeração até a chegada no laboratório, de acordo com as recomendações propostas por LISBÔA et al. (2001).

As amostras colhidas com anticoagulante fluoreto foram centrifugadas a 1.000 x g durante cinco minutos, obtendo-se o plasma necessário à dosagem de glicose. As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas a 1.000 x g durante 10

⁶ Vacutainer

⁷ Becton Dickinson

⁸ Cristália

minutos, após a retração do coágulo, obtendo-se alíquotas de 1,5 mL de soro, que foram armazenadas em tubos tipo *Eppendorf*, previamente identificados, e congeladas (-20°C) até o momento da realização das análises.

3.7 Colheita de suabes retais

A colheita de suabes retais de cada bezerro foi realizada imediatamente antes da inoculação e, em seguida, diariamente, até o sétimo dia após a inoculação, para avaliar a presença de *Salmonella* (SANTOS et al., 2002a). As amostras, colhidas em triplicatas, foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos estéreis e levadas ao laboratório sob refrigeração.

3.8 Local e tipos de análises laboratoriais

3.8.1 Local de análises laboratoriais

As amostras de sangue total, de plasma e de soro sanguíneo foram analisadas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias–UNESP-Câmpus de Jaboticabal.

3.8.2 Tipos de análises laboratoriais

3.8.2.1 Hematologia

De cada amostra de sangue venoso, colhida com anticoagulante EDTA, foram aferidos os dados relativos às contagens de hemácias, leucócitos, plaquetas, teor de hemoglobina e volume globular em aparelho automático⁹. A contagem diferencial de

⁹ pocH – 100 iV Diff

leucócitos foi realizada a partir da contagem em esfregaço sanguíneo corado¹⁰ de 100 células, em microscopia óptica (GARCIA-NAVARRO, 1994).

3.8.2.2 Hemogasometria

As variáveis hemogasométricas: pH, concentração de bicarbonato sanguíneo (HCO_3^-), pressão parcial de gás carbônico (pCO_2), dióxido de carbono total (tCO_2), excesso ou déficit de base e intervalo aniônico (*Anion Gap*) (AG), avaliadas nas amostras de sangue venoso heparinizado, foram mensuradas em um analisador automático¹¹ de pH e gases sanguíneos.

3.8.2.3 Perfil bioquímico

Foram avaliadas as concentrações séricas de cloretos (método de Labtest), magnésio (método de Labtest), fósforo (método de Daly e Ertingshausen modificado), cálcio total (método CPC), sódio, potássio e cálcio ionizado (método do íon seletivo)¹², proteína total (método do biureto), albumina (método verde de bromocresol), ureia (método enzimático UV), creatinina (método Labtest), bilirrubina total e direta (método de Sims-Horn) e ferro (método de Goodwin modificado) e as atividades séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) (método cinético UV-IFCC), gamaglutamiltransferase (GGT) (método de Szaz modificado) e creatinacinase (CK) (método IFCC). Os testes foram realizados utilizando-se conjuntos de reagentes de uso comercial. As leituras dos parâmetros bioquímicos foram realizadas em espectrofotômetro¹³ semi-automático, com comprimentos de onda específicos para cada constituinte. As taxas de glicose foram mensuradas pelo método de GOD-Trinder.

¹⁰ Corante de Rosenfeld modificado

¹¹ Omni C

¹² 9180 Electrolyte Analyzer

¹³ Labquest

Os teores plasmáticos de fibrinogênio foram obtidos pelo método de precipitação pelo calor e leitura em refratômetro¹⁴ (MILLAR et al., 1971).

O proteinograma sérico foi obtido pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE), proposta por WEBER & OSBORN (1969).

3.9 Exame bacteriológico

A presença de *Salmonella* nas fezes foi detectada por meio de cultura bacteriológica e pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir suabes colhidos diretamente do reto dos animais. A cultura bacteriológica e a PCR foram realizadas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal.

3.9.1 Isolamento de *Salmonella* Dublin

O isolamento de *Salmonella* Dublin a partir das amostras de suabes retais foi realizado de acordo com as recomendações de SANTOS et al. (2002a), com algumas modificações. Os suabes colhidos foram colocados em tubos contendo 10 mL de caldo tetracionato Muller-Kauffmann³ (TMK), caldo selenito-cistina³ (SC) e caldo Rappaport-Vassiliadis³ (RV), sendo estes cultivados por 24 horas a 37°C. Posteriormente, uma alçada de cada um dos caldos de enriquecimento seletivo foi semeada em ágar verde brilhante modificado³, contendo 50 µg/ml de ácido nalidíxico. Colônias apresentando morfologia característica do gênero *Salmonella*, foram bioquimicamente testadas, utilizando-se os meios de cultura tríplice açúcar ferro agar³ (TSI) e lisina ferro agar³ (LIA). Após a comprovação bioquímica, foi realizada soroaglutinação em lâmina, utilizando-se soro polivalente anti-antígenos somáticos (anti-O)¹⁵ de *Salmonella* e soro anti-antígenos somáticos do sorogrupo D¹⁵, no qual se inclui *S. Dublin*.

¹⁴ ATAGO

¹⁵ Probac do Brasil

3.9.2 Detecção de Salmonella Dublin pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

Alíquotas de 1,5 mL dos caldos de enriquecimento seletivo SC, TMK e RV foram armazenadas a -20°C e posteriormente foram utilizadas na preparação do DNA molde para a PCR. A extração do DNA dos caldos foi realizada pelo método de *salting-out*, conforme metodologia de SILVA et al. (2010b).

Inicialmente uma alíquota de 500 µL de cada amostra dos caldos de enriquecimento foi transferida para microtubo tipo *Eppendorf* de 1,5 mL, centrifugada¹⁶ a 15.000 x g por 6 minutos a 23°C e ressuspendida em 100 µL de água destilada estéril. Em seguida, adicionaram-se 500 µL de solução de TKM2 (gelada), a qual consiste numa solução de 250 µL de Tris-HCL (pH 7,6 1M), 250 µL de KCl (1M), 250 µL de MgCl₂ (1M), 200 µL de EDTA (0,5M) e 10 µL de NaCl (1M). A solução foi homogeneizada e adicionaram-se 100 µL de SDS a 10% pré-aquecidos a 55°C. Novamente a solução foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 55°C por 45 minutos. Em seguida, adicionaram-se 350 µL de NaCl 6M saturado e a solução foi homogeneizada e centrifugada (15.000 x g por 30 minutos a 23°C). O sobrenadante foi transferido para um tubo de 2 mL contendo 1 mL de álcool isopropílico gelado. Em seguida o tubo foi colocado no freezer a -80°C durante 20 minutos. Após centrifugação da amostra (15.000 x g por 10 minutos a 23°C), descartou-se o álcool e adicionaram-se, ao precipitado, 500 µL de etanol a 70%. A solução foi homogeneizada no vórtex e posteriormente centrifugada (15.000 x g por 5 minutos a 23°C). Descartou-se o etanol e ressuspendeu-se o precipitado em 50 µL de solução tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0).

Os ensaios de PCR tipo multiplex foram feitos de acordo com a metodologia proposta por ITOH et al. (1997), com algumas modificações. A PCR foi realizada em placas de polipropileno¹⁷, onde foram adicionados 2,0 µL de solução tampão 10X (Tris

¹⁶ Eppendorf 5804

¹⁷ PCR-96M2-HSC

200 mM, KCl 500 mM, pH 8,4), 0,7 µL de DNTP¹⁸ (70 µM cada), 1,0 µL MgCl₂ (2 mM), 1,0 µL de cada “primer”¹⁸ (0,4 µM cada), 1 U de taq DNA polimerase¹⁸, 5 µL da amostra de DNA e água ultra-pura estéril¹⁸ para totalizar o volume de reação. Cada ensaio continha um controle positivo e um controle negativo, no qual a amostra de DNA a ser analisada era substituída por 5 µL de DNA molde extraído a partir de cultura pura de *Salmonella* Dublin e 5 µL de água ultra-pura, respectivamente.

Os pares de “primers” utilizados (RE1: 5'-CTTGGGAGTAATCTTGCC-3', RE2: 5'-TATACTGCCGTACTGCCT-3', FC1 : 5'-TGATCTCTTTAAGACCACTA-3' e FC2 : 5'-ACATCCGTCGCGCCAGTGGC-3') são direcionados aos genes *rfbE* e *fliC* de *Salmonella* pertencente ao sorogrupo D (ITO et al., 1997).

A amplificação foi realizada em termociclador¹⁹ através de 35 ciclos a: 95°C por 30 segundos (desnaturação), 56°C por 30 segundos (pareamento) e 72°C por 30 segundos (extensão).

Após a amplificação foram adicionados às amostras 3 µL de solução de azul de bromofenol (Tris 0,1 M pH 6,8, 0,02% azul bromofenol, 50% glicerol). Os produtos da PCR (10 µL) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TEB (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM, ácido bórico 89 mM, contendo GelRed²⁰) para visualização de amplificadores de 307 e 225 pb. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal e processada a 75 V por aproximadamente 90 minutos. Como marcador de peso molecular utilizou-se DNA ladder 100 pb²¹. Os fragmentos de DNA foram visualizados pela incidência de luz UV e analisados em fotodocumentador²²

3.10 Exame anatomopatológico (macroscópico e microscópico)

Sete animais dos três grupos (um do G1, dois do G2 e quatro do G3) foram sacrificados e posteriormente submetidos à necrópsia, o qual foi realizado no

¹⁸ Invitrogen

¹⁹ MyCycler

²⁰ Uniscience

²¹ GeneRuler 100 bp DNA Ladder

²² Vilber lourmat

Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal. Nesta ocasião, foram colhidos fragmentos de tonsilas, linfonodos submandibulares, pulmões, fígado, baço, intestino delgado e grosso, linfonodos mesentéricos e rins para a realização de exames histopatológicos (WINTER, 1969; VASCONCELOS, 1988). Esses fragmentos de tecidos colhidos durante a necrópsia foram fixados em formalina a 10% tamponada, em pH 7,0 e então incluídos em parafina para a realização de cortes histológicos corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). Os cortes histológicos foram avaliados em microscopia óptica de luz (BEHMER et al., 1976; BACHA JUNIOR & BACHA, 2000).

3.11 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para comparação entre pares de médias, com auxílio do programa estatístico computadorizado Statistical Analysis System (SAS – Versão 9.1). Para as variáveis subjetivas (consistência das fezes, grau de desidratação, comportamento e apetite) foi empregada a análise de variância não paramétrica, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparação entre pares de medianas, com auxílio do programa estatístico computadorizado GraphPad Prism (Versão 3.0).

Os resultados do isolamento bacteriológico e da PCR, durante o período experimental (0 a 168 horas pós-infecção - PI), foram comparados pelo teste do qui-quadrado de McNemar. A concordância entre o isolamento bacteriológico e a PCR foi determinada pelo coeficiente de associação Kappa (ZAR, 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Exame físico

Os resultados do exame físico dos bezerros bubalinos do grupo controle (G1), infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3), imediatamente antes da inoculação (0 hora) e a cada 12 horas (temperatura retal e escore da consistência das fezes) ou a cada 24 horas (frequência cardíaca e frequência respiratória), ao longo de sete dias após a infecção experimental, são mostrados nas Tabelas enumeradas de 1 a 3 e nas Figuras enumeradas de 1 a 8.

4.1.1 Frequência cardíaca

No grupo controle (G1), observou-se diminuição da frequência cardíaca no decorrer do experimento, sendo que, diminuição expressiva entre 0 hora e 24 horas após o início do experimento ocasionou diferenças significativas entre 0 hora e todos os momentos seguintes à infecção (Tabela 1 e Figura 1).

No G2, também se verificou diminuição da frequência cardíaca às 24 horas PI, sendo que entre 24 e 168 horas PI esses valores se estabilizaram abaixo dos valores obtidos no momento antes da inoculação (0 hora). Essa oscilação levou a diferenças significativas entre 0 hora e 120 horas PI.

No G3, foi observado aumento da frequência cardíaca às 72 horas PI, sendo que de 96 a 168 horas PI, os valores voltaram próximos aos encontrados nos momentos iniciais da infecção. O aumento da frequência cardíaca às 72 horas PI resultou em diferenças significativas entre este momento e 144 e 168 horas PI.

Embora verificados maiores valores de frequência cardíaca no momento antes da inoculação (G1 e G2) e às 72 horas PI (G3), todos os valores encontrados no decorrer do experimento estão dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie bovina (DIRKSEN et al., 1993) e dentro daqueles encontrados por SILVA

(2007) em bezerros bovinos do grupo controle e antes da inoculação experimental com *Salmonella* Dublin. Desta forma, embora quadros de salmonelose possam causar aumento da frequência cardíaca, como relatado por RADOSTITS et al. (2002) em bovinos, as alterações observadas nos bezerros bubalinos provavelmente estão relacionadas a variações individuais e a adaptação dos animais no decorrer do experimento.

Tabela 1. Médias e desvios padrão da frequência cardíaca (bpm) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	94,0±8,29 ^{Aa}	80,0±18,5 ^{ABa}	60,0±12,6 ^{Bab}
24	69,2±12,5 ^{Ab}	61,0±7,97 ^{Aab}	60,7±20,5 ^{Aab}
48	62,5±8,60 ^{Ab}	61,2±10,6 ^{Aab}	62,0±23,3 ^{Aab}
72	58,0±8,37 ^{Ab}	69,0±14,1 ^{ABab}	79,7±30,3 ^{Ba}
96	57,8±8,82 ^{Ab}	64,0±12,9 ^{Aab}	60,7±21,5 ^{Aab}
120	53,5±4,81 ^{Ab}	57,7±13,7 ^{Ab}	59,3±27,6 ^{Aab}
144	50,0±2,19 ^{Ab}	60,2±18,6 ^{Aab}	52,0±18,2 ^{Ab}
168	51,5±2,17 ^{Ab}	63,8±21,1 ^{Aab}	57,3±13,1 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

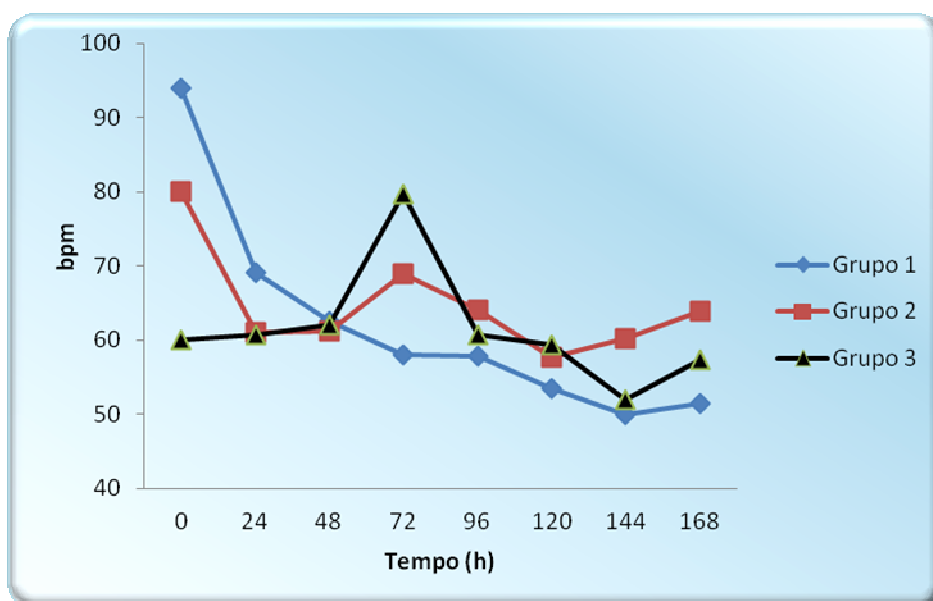


Figura 1. Frequência cardíaca (bpm) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.1.2 Frequência respiratória

Após a indução da infecção experimental não se constatou variação significativa da frequência respiratória ao longo do tempo, dentro dos grupos (Tabela 2 e Figura 2). No entanto, no momento antes da inoculação, a frequência respiratória, no G2, estava acima dos valores encontrados dentro do grupo no decorrer da infecção e também acima dos valores obtidos 0 hora no G1 e G3. Em consequência, foram observadas diferenças significativas entre o G2 em relação ao G1 e G3 em 0 hora.

Embora verificados maiores valores de frequência respiratória no momento antes da inoculação, no G2, todos os valores encontrados no decorrer do experimento estão dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie bovina (DIRKSEN et al., 1993) e dentro daqueles encontrados por SILVA (2007) em bezerros bovinos do grupo controle e antes da inoculação experimental com *Salmonella* Dublin. Desta forma, as

alterações na frequência respiratória observadas nos bezerros bubalinos do G2 provavelmente estão relacionadas a variações individuais e à adaptação dos animais no decorrer do experimento, já que se tratava do primeiro dia de experimento.

Tabela 2. Médias e desvios padrão da frequência respiratória (mpm) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	27,3±8,78 ^{Ba}	40,7±12,7 ^{Aa}	21,3±2,07 ^{Ba}
24	24,2±7,96 ^{Aa}	26,0±3,35 ^{Ab}	21,3±4,13 ^{Aa}
48	24,3±8,89 ^{Aa}	24,7±7,58 ^{Ab}	20,7±4,68 ^{Aa}
72	26,2±12,5 ^{Aa}	25,8±10,3 ^{Ab}	19,7±6,25 ^{Aa}
96	23,8±7,00 ^{Aa}	22,3±4,46 ^{Ab}	18,0±3,35 ^{Aa}
120	25,5±6,86 ^{Aa}	23,2±5,46 ^{Ab}	18,7±6,02 ^{Aa}
144	19,5±3,78 ^{Aa}	26,7±6,65 ^{Ab}	19,3±4,68 ^{Aa}
168	21,5±3,08 ^{Aa}	21,7±4,93 ^{Ab}	19,3±3,01 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

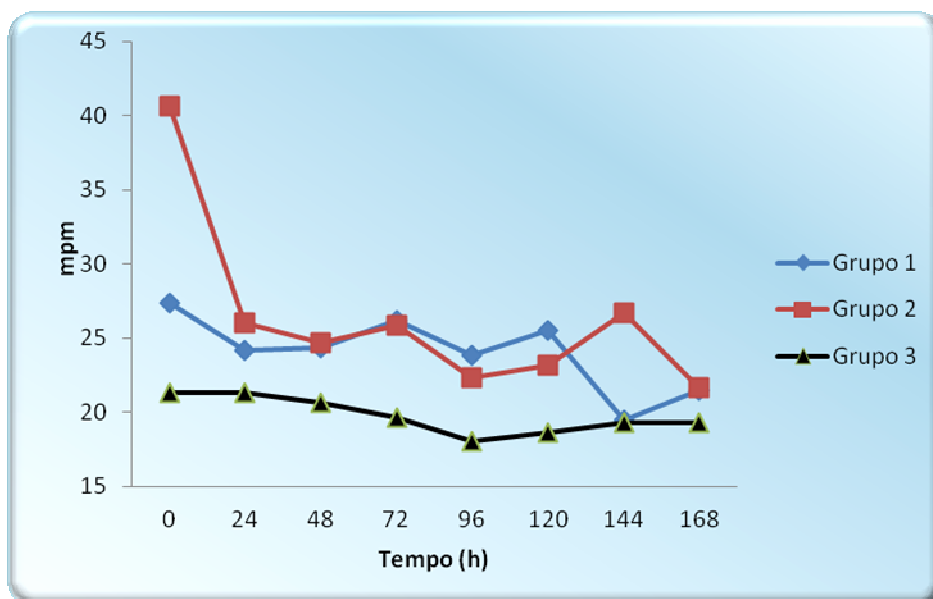


Figura 2. Frequência respiratória (mpm) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.1.3 Temperatura retal

As temperaturas retais médias dos bezerros do grupo controle (G1) apresentaram-se estáveis ao longo do período experimental, com menores temperaturas no período da manhã e maiores temperaturas no período da tarde (Tabela 3 e Figura 3).

Nos bezerros do G2 e do G3, observou-se aumento de temperatura retal média a partir de 60 horas PI, atingindo valores máximos entre 60 e 132 horas PI no G2 e entre 60 e 84 horas PI no G3. A partir de 132 horas PI, no G2, e 108 horas PI, no G3, a temperatura retal média comessou a diminuir até o final do experimento (Tabela 3 e Figuras 3 e 4).

No G2, os primeiros sinais de hipertermia foram observados às 60 horas PI, sendo que entre 60 e 132 horas PI, cinco bezerros apresentaram hipertermia variando

de 40,0 a 41,0°C. A partir de 144 horas PI, a temperatura retal de todos os bezerros deste grupo já havia voltado a valores fisiológicos. Já SILVA et al. (2008a), em seus estudos, observaram os primeiros sinais de hipertermia às 24 horas após a inoculação de bezerros bovinos com 10^8 UFC de *S. Dublin* (36 horas antes dos bezerros bubalinos), sendo que 50 % (3/6) dos bezerros infectados ainda apresentavam hipertermia às 168 horas PI.

No G3, os primeiros sinais de hipertermia também foram observados às 60 horas PI, sendo que entre 60 e 108 horas PI, quatro bezerros apresentaram hipertermia variando de 40,0 a 41,4°C. No entanto, a partir de 120 horas PI (24 a 48 horas após a aplicação da primeira dose do medicamento), a temperatura retal dos animais deste grupo já havia voltado a valores fisiológicos. Assim sendo, o período de ocorrência de hipertermia dos bezerros tratados foi de 48 horas (60 a 108 horas PI), menor que dos bezerros não tratados, que foi de 72 horas (60 a 132 horas PI). Estes achados foram semelhantes aos encontrados por SILVA et al. (2010c), estudando bezerros bovinos infectados com *S. Dublin* e tratados com florfenicol, e FECTEAU et al. (2003) e ÁVILA (2009), estudando bezerros bovinos infectados com *S. Typhimurium* e tratados, respectivamente, com ceftiofur e florfenicol, onde os bezerros também apresentaram menos dias de hipertermia em relação aos não tratados.

Tabela 3. Médias e desvios padrão da temperatura retal (°C) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	38,7±0,32 ^{Aa}	38,0±1,69 ^{Aa}	36,9±0,55 ^{Aa}
12	39,3±0,32 ^{Aa}	38,3±0,00 ^{Aa}	38,8±0,40 ^{Aa}
24	38,4±0,51 ^{Aa}	37,8±0,59 ^{Aa}	37,4±0,81 ^{Aa}
36	38,9±0,34 ^{Aa}	38,5±0,40 ^{Aa}	38,8±0,42 ^{Aa}
48	38,2±0,33 ^{Aa}	37,8±1,56 ^{Aa}	37,6±0,97 ^{Aa}
60	38,8±0,29 ^{Aa}	39,4±1,23 ^{Aa}	39,7±1,28 ^{Aa}
72	37,8±0,48 ^{Aa}	38,2±1,95 ^{Aa}	38,5±1,39 ^{Aa}
84	39,0±0,26 ^{Aa}	39,6±0,78 ^{Aa}	39,8±1,19 ^{Aa}
96	37,7±0,44 ^{Aa}	38,1±0,49 ^{Aa}	37,8±1,20 ^{Aa}
108	39,0±0,18 ^{Aa}	39,6±0,86 ^{Aa}	39,0±0,81 ^{Aa}
120	37,9±0,14 ^{Aa}	37,8±0,56 ^{Aa}	36,9±1,08 ^{Aa}
132	38,9±0,19 ^{Aa}	39,4±0,58 ^{Aa}	38,8±0,60 ^{Aa}
144	38,1±0,42 ^{Aa}	37,9±0,68 ^{Aa}	36,6±1,11 ^{Aa}
156	39,0±0,23 ^{Aa}	39,1±0,45 ^{Aa}	38,5±0,35 ^{Aa}
168	38,3±0,29 ^{Aa}	37,5±0,75 ^{Aa}	37,1±0,29 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

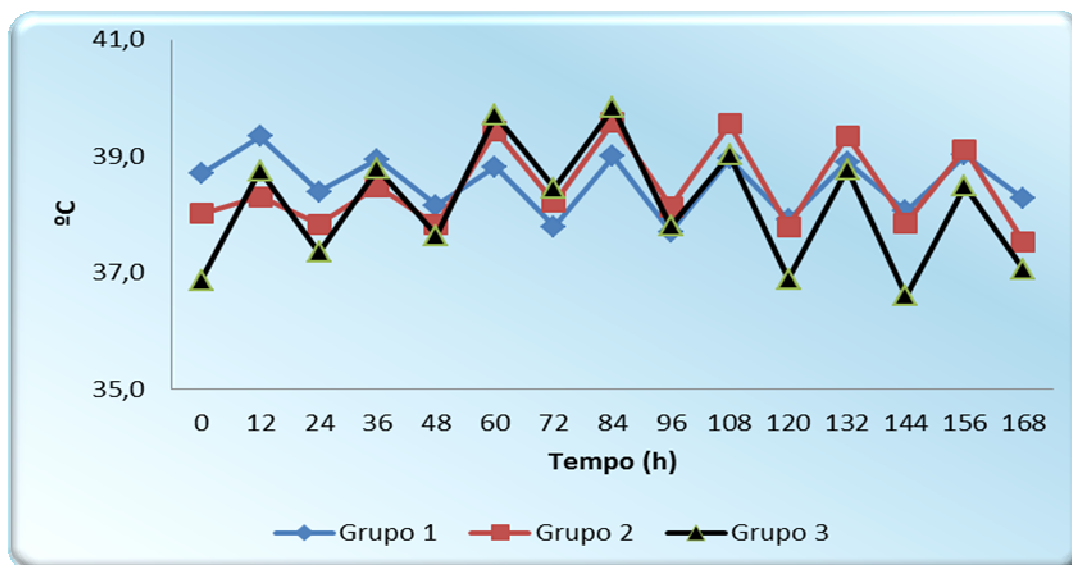


Figura 3. Temperatura retal (°C) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 e 168 horas após a infecção.

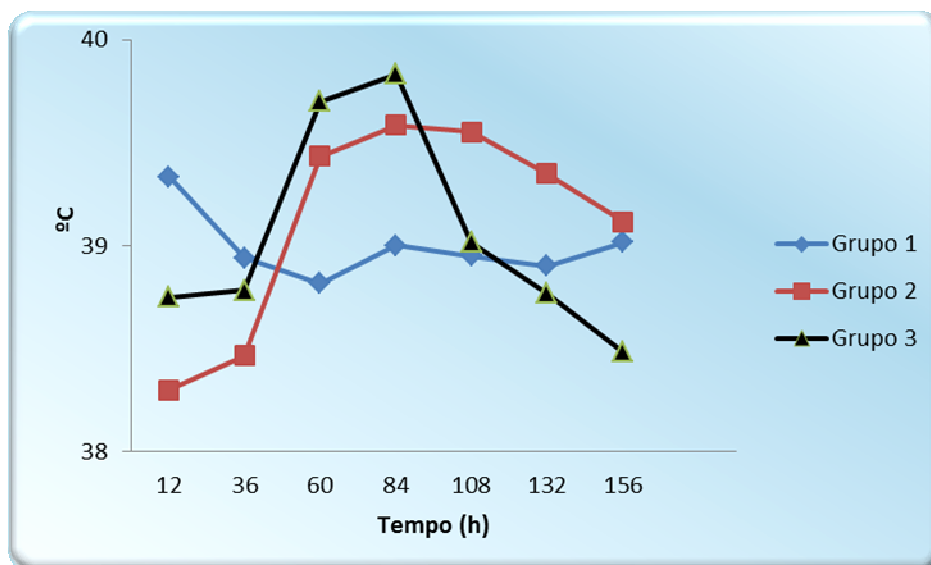


Figura 4. Temperatura retal (°C) no período vespertino de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de S.Dublin e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 12, 36, 60, 84, 108, 132 e 156 horas após a infecção.

4.1.4 Escore da consistência das fezes

Nos animais do grupo controle (G1) a consistência das fezes oscilaram entre fezes normais e diarreia discreta (grau 1), não característica de salmonelose, sem presença de muco e estrias de sangue, sendo provavelmente causada por fatores relacionados à adaptação ao leite. O mesmo foi observado até 24 horas PI no G2 e até 12 horas PI no G3, onde os bezerros também apresentaram diarreia discreta sem presença de muco e estrias de sangue, não característica de quadros de salmonelose (Figura 5).

No G2, os quadros de diarreia característica da doença iniciaram-se às 96 horas PI (dois animais apresentaram diarreia discreta). A partir de 96 horas PI, os episódios de diarreia se intensificaram, bem como a gravidade, sendo que o pico ocorreu às 168 horas PI, onde cinco animais apresentavam diarreia (quatro bezerros com diarreia grave), levando a um aumento significativo do escore neste momento (Figura 5). No

entanto, entre 216 horas (9 dias) e 264 horas (11 dias) PI, como discutido posteriormente (item 4.6.1, p.101), todos os bezerros infectados se recuperaram e não apresentaram mais sinais clínicos de salmonelose. De forma diferente, SILVA et al. (2008a), em seus estudos, observaram que os quadros de diarreia em bezerros bovinos inoculados com *S. Dublin* iniciaram-se às 12 horas após a infecção experimental (84 horas antes dos bezerros bubalinos do G2), sendo esta diarreia grave, com presença de muco e/ou estrias de sangue. Ainda verificaram que os episódios de diarreia continuaram até o final do experimento, às 168 horas PI e que dois bezerros vieram a óbito antes do final do experimento, devido a complicações resultantes de septicemia.

No G3, os quadros de diarreia começaram às 24 horas PI (72 horas antes do início no G2), com três bezerros (dois com diarreia discreta e um com diarreia grave). A partir de 24 horas PI, os episódios de diarreia, bem como a gravidade, aumentaram, atingindo o pico em 144 a 168 horas PI. Neste intervalo, foram observados seis episódios de diarreia discreta e onze de diarreia grave. É importante observar que, após o início do tratamento (72 a 96 horas PI), verificou-se maior incidência de episódios de diarreia grave (grau 2), sendo que quatro bezerros tratados apresentaram desprendimento de mucosa intensa a partir de 84 horas PI, que continuou até às 168 horas PI (Figuras 5 e 8). Desta forma, devido à piora do quadro clínico dos bezerros bubalinos neste grupo, os animais só se recuperaram da diarreia, como discutido posteriormente (item 4.6.1, p.101), entre 288 horas (12 dias) e 504 horas (21 dias) PI, não apresentando mais sinais clínicos de salmonelose.

De forma diferente ao encontrado nos bezerros bubalinos do G3, SILVA (2007) observou melhora da consistência das fezes nos animais infectados com *S. Dublin*, após o início do tratamento com antibiótico florfenicol, notadamente a partir das 108 horas PI. FECTEAU et al. (2003) também verificaram que bezerros infectados com 10^9 UFC de *Salmonella* Thyphimurium e tratados com ceftiofur apresentaram menos dias de diarreia. Desta forma, a instituição do tratamento com florfenicol nos bezerros bubalinos, ao invés de diminuir o tempo de ocorrência de diarreia (como ocorreu com a temperatura retal), levou a um aumento da gravidade dos quadros de diarreia, com

ocorrência inclusive de despreendimento de mucosa, aumentando o período de diarreia em até dez dias em relação ao G2.

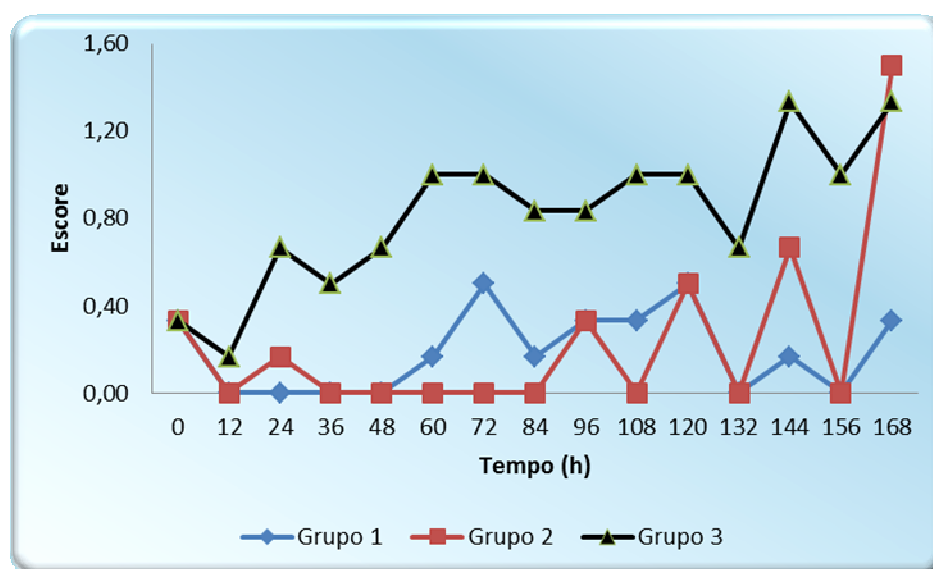


Figura 5. Escore da consistência das fezes de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora), 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 e 168 horas após a infecção.

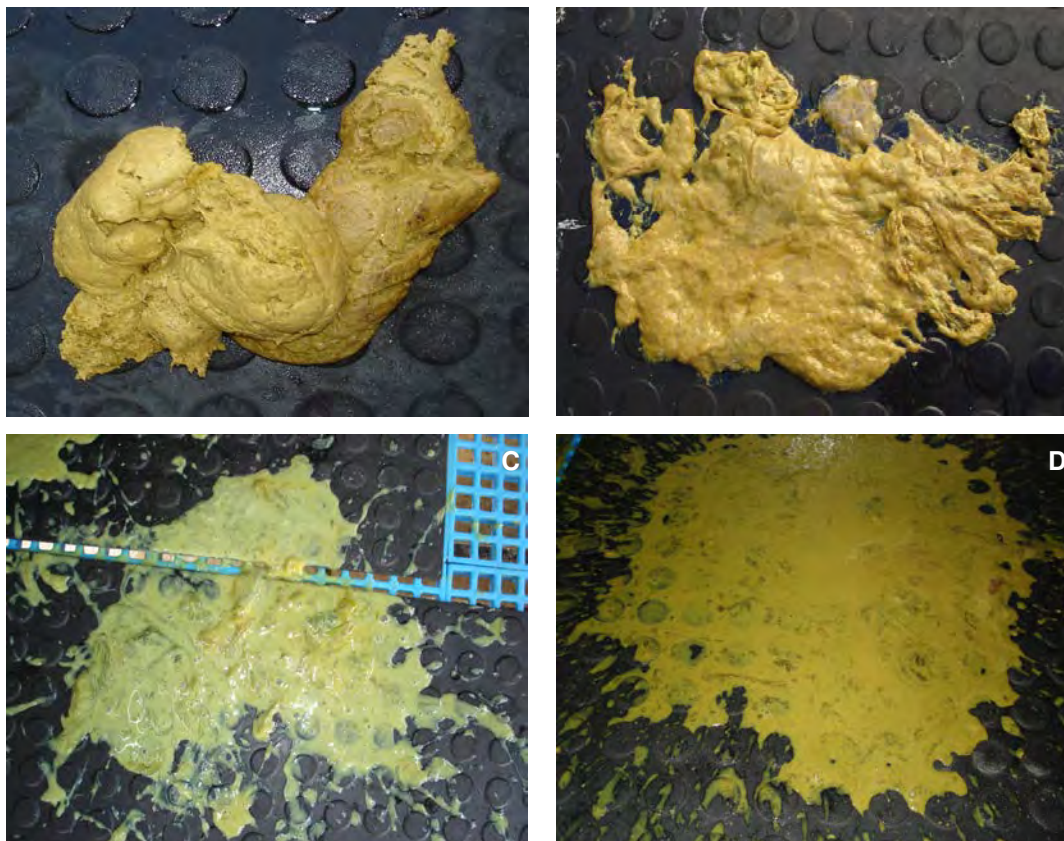


Figura 6. Fezes normais (A), diarreia moderada (B) e diarreia grave (C e D) de bezeros bubalinos submetidos à infecção experimental com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin.

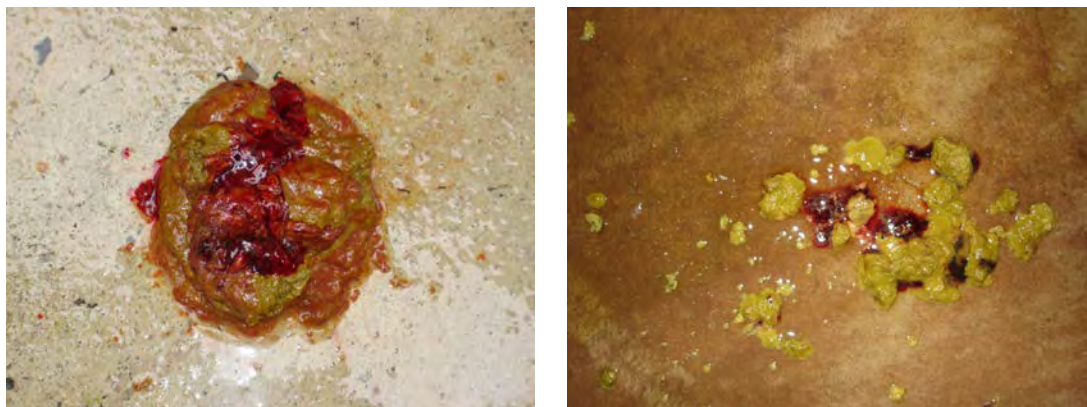


Figura 7. Fezes com presença de sangue de bezerros bubalinos submetidos à infecção experimental com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin.

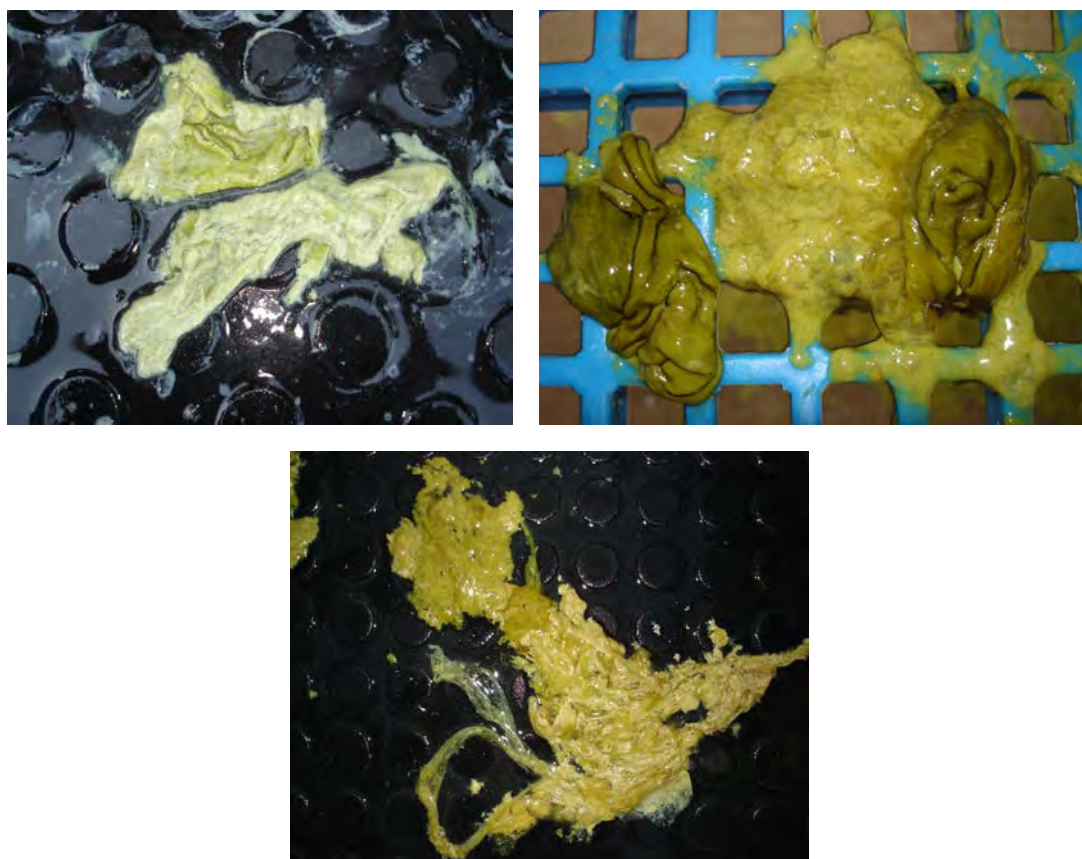


Figura 8. Fezes com presença de fragmentos de mucosa intestinal de bezerros bubalinos submetidos à infecção experimental com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin.

4.1.5 Grau de desidratação, comportamento e apetite

A desidratação é um dos achados clínicos mais comuns em animais com salmonelose e está relacionada, principalmente, à gravidade da diarreia (RADOSTISTS et al., 2002). No entanto, embora os animais infectados tenham apresentado diarreia grave, apenas observaram-se episódios isolados de grau leve de desidratação no decorrer do experimento, diferindo dos encontrados por SILVA et al (2008a), que observaram sinais de desidratação a partir de 36 horas após a inoculação.

Em relação ao comportamento e apetite observados ao longo do período experimental, não houve variações visíveis no grupo controle. No G2, apenas observou-se ausência de apetite em um bezerro, às 120 horas PI. No G3, verificou-se apatia e apetite ausente nos momentos finais da infecção (120 a 168 horas PI), após o tratamento, onde se observou maior incidência de episódios de diarreia grave e intenso desprendimento de mucosa. De forma diferente, SILVA (2007) verificou que os animais que receberam tratamento apresentaram sinais de apatia e apetite ausente limitados a um curto espaço de tempo, melhorando após a instituição do tratamento.

4.2 Hematologia

Os resultados da contagem de hemácias, teor de hemoglobina, volume globular e da contagem de leucócitos, linfócitos, neutrófilos segmentados, e plaquetas dos bezerros bubalinos do grupo controle ou dos grupos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin são mostrados nas Tabelas enumeradas de 4 a 10 e nas Figuras enumeradas de 9 a 15.

4.2.1 Contagem de hemácias, teor de hemoglobina e volume globular

Os valores médios da contagem de hemácias, teores de hemoglobina e volume globular não oscilaram no G1 e no G2 (Tabelas 4 a 6 e Figuras 9 a 11). Diferente do verificado no G2, SANTOS et al. (2002b) observaram aumento significativo dos teores

de hemoglobina (24 a 72 horas PI) e volume globular (24 horas PI) dos bezerros infectados com *Salmonella* Typhimurium, sendo que estes autores atribuíram o aumento destes parâmetros à desidratação dos animais. Desta forma, é importante ressaltar que, nos casos de ocorrências de diarreias com perda de sangue, como verificado no G2, diminuição significativa do número de hemácias pode ser ocultada por um quadro de hemoconcentração. No entanto, isso não ocorreu nos bezerros do G2, já que apenas observaram-se episódios isolados de grau leve de desidratação no decorrer do experimento, sendo que adicionalmente as concentrações séricas de proteína total apresentaram discretas variações ao longo do período experimental neste grupo (discutido no item 4.4.1, p.82). Desta forma, a ocorrência de diarreia com perda de sangue nas fezes não influenciaram a contagem de hemácias, teores de hemoglobina e volume globular no G2.

No G3, observou-se diminuição do número de hemácias, teor de hemoglobina e volume globular a partir de 96 horas PI, atingindo menores valores às 120 horas PI. Desta forma, às 120 horas PI, os teores de hemoglobina diferiram de forma significativa em relação a 0 hora e 72 horas PI. Já o volume globular, às 120 horas PI, sofreu queda de 4,1% em relação ao momento antes da inoculação, resultando em diferenças significativas em relação a 0 hora. No período final do experimento, às 144 e 168 horas PI, as três variáveis continuaram abaixo dos valores encontrados no momento antes da inoculação.

No decorrer do experimento, no G3, verificou-se uma piora do escore da consistência das fezes, sendo que, a partir de 84 horas PI, observou-se o despreendimento de mucosa intestinal, agravando a perda de sangue nas fezes, o que pode explicar, em parte, as alterações. No entanto, NEUMANN (2003) relata que em doenças inflamatórias a eritropoiese é comprometida já que geralmente a concentração sérica de ferro está baixa. Adicionalmente, WEISS & GOODNOUGH (2005) e THEURL et al. (2006) relatam que a produção de mediadores inflamatórios pode inibir de forma direta ou indireta a eritropoiese, através de dois mecanismos: bloqueando a resposta da eritropoetina à anemia e diminuindo as concentrações séricas de ferro. Assim sendo, é importante ressaltar que, nos bezerros bubalinos do G3, observou-se

diminuição dos níveis de ferro sérico de 72 a 168 horas PI, permanecendo abaixo dos valores encontrados em 0 hora (discutido no item 4.3.2.5, p.63). Desta forma, é possível que estas alterações tenham influenciado negativamente a eritropoiese e, aliado à perda de sangue nas fezes, tenham levado à redução do número de hemácias, teores de hemoglobina e volume globular neste grupo.

Tabela 4. Médias e desvios padrão do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	9,48 $\pm$ 1,30 ^{Aa}	10,5 $\pm$ 1,49 ^{Ba}	10,8 $\pm$ 1,41 ^{Ba}
24	9,84 $\pm$ 1,23 ^{Aa}	10,7 $\pm$ 1,36 ^{Aa}	10,7 $\pm$ 1,19 ^{Aa}
48	9,80 $\pm$ 0,92 ^{Aa}	10,6 $\pm$ 1,27 ^{Aa}	10,6 $\pm$ 1,29 ^{Aa}
72	10,2 $\pm$ 1,11 ^{Aa}	10,8 $\pm$ 1,32 ^{Aa}	10,7 $\pm$ 1,49 ^{Aa}
96	9,84 $\pm$ 1,03 ^{Aa}	10,6 $\pm$ 1,55 ^{Aa}	10,4 $\pm$ 1,22 ^{Aa}
120	10,1 $\pm$ 0,98 ^{Aa}	10,3 $\pm$ 1,44 ^{Aa}	9,89 $\pm$ 1,29 ^{Aa}
144	9,99 $\pm$ 1,20 ^{Aa}	10,4 $\pm$ 1,40 ^{Aa}	10,2 $\pm$ 1,38 ^{Aa}
168	10,1 $\pm$ 1,09 ^{Aa}	10,4 $\pm$ 1,22 ^{Aa}	10,3 $\pm$ 1,38 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

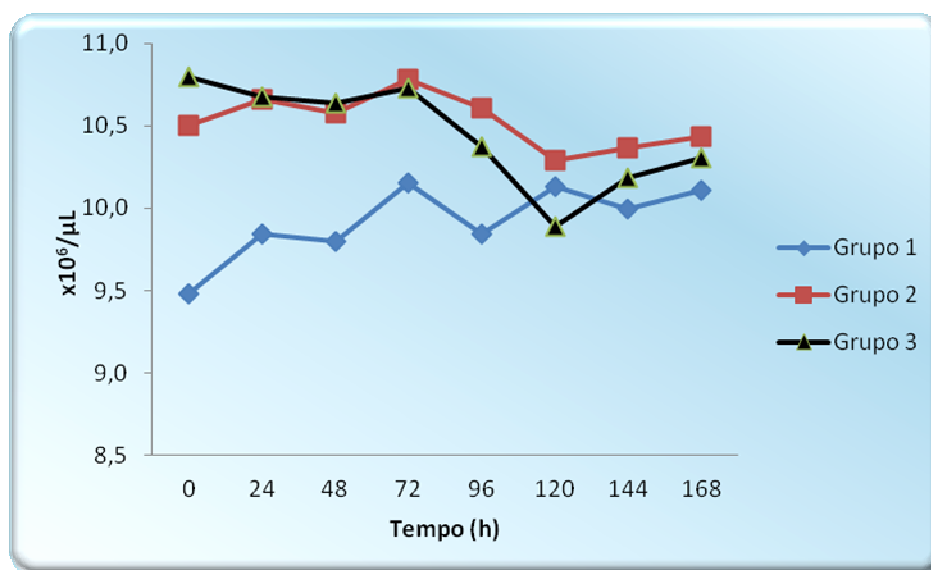


Figura 9. Número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tabela 5. Médias e desvios padrão do teor de hemoglobina (g/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	13,7±1,56 ^{Aa}	14,0±1,66 ^{Aa}	16,1±2,58 ^{Ba}
24	14,1±1,61 ^{Aa}	14,4±1,54 ^{Aa}	15,9±2,42 ^{Bab}
48	14,0±1,30 ^{Aa}	14,2±1,43 ^{Aa}	15,8±2,47 ^{Bab}
72	14,5±1,87 ^{Aa}	14,5±1,43 ^{Aa}	16,0±2,71 ^{Ba}
96	14,1±1,51 ^{Aa}	14,4±1,81 ^{Aba}	15,3±2,29 ^{Bab}
120	14,4±1,39 ^{Aa}	13,7±1,75 ^{Aa}	14,7±2,29 ^{Ab}
144	14,3±1,70 ^{ABa}	13,8±1,78 ^{Ba}	15,0±2,51 ^{Aab}
168	14,3±1,66 ^{Aa}	14,1±1,49 ^{Aa}	15,2±2,17 ^{Aab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

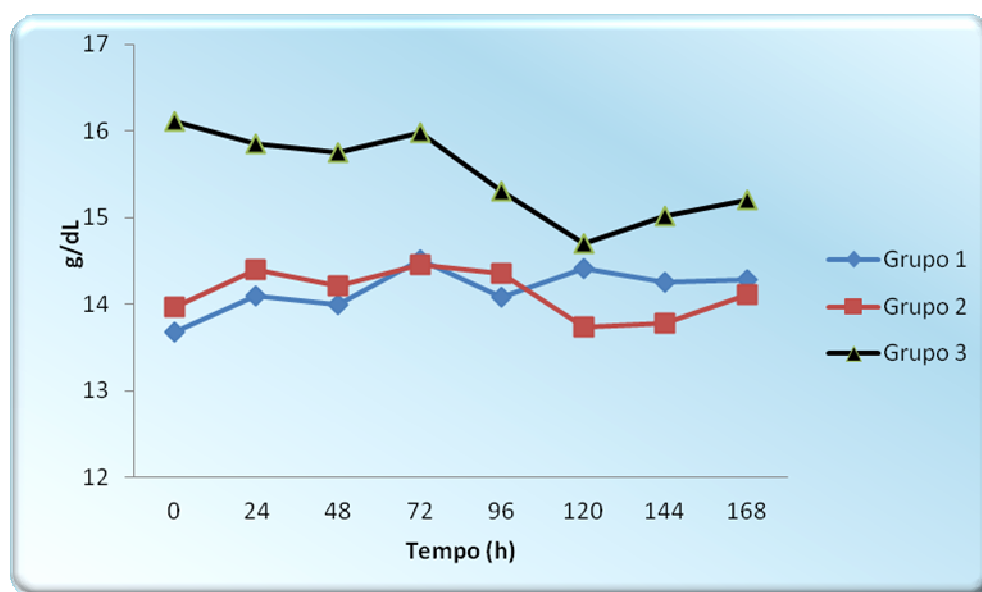


Figura 10. Teor de hemoglobina (g/dL) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tabela 6. Médias e desvios padrão do volume globular (%) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	42,3±6,46 ^{Aa}	45,5±4,81 ^{Aa}	42,8±6,85 ^{Aa}
24	44,1±6,75 ^{ABa}	46,2±4,18 ^{Aa}	42,3±6,11 ^{Bab}
48	43,5±5,24 ^{Aa}	45,8±5,05 ^{Aa}	42,0±6,18 ^{Aab}
72	44,6±5,81 ^{ABa}	46,4±4,91 ^{Aa}	42,0±6,96 ^{Bab}
96	43,6±5,76 ^{ABa}	45,2±5,84 ^{Aa}	40,5±6,03 ^{Bab}
120	44,8±4,89 ^{Aa}	43,6±6,15 ^{Aa}	38,7±5,80 ^{Bb}
144	44,3±6,52 ^{Aa}	44,0±6,35 ^{Aa}	39,5±6,61 ^{Bab}
168	43,3±6,18 ^{ABa}	44,3±5,89 ^{Aa}	39,8±5,65 ^{Bab}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

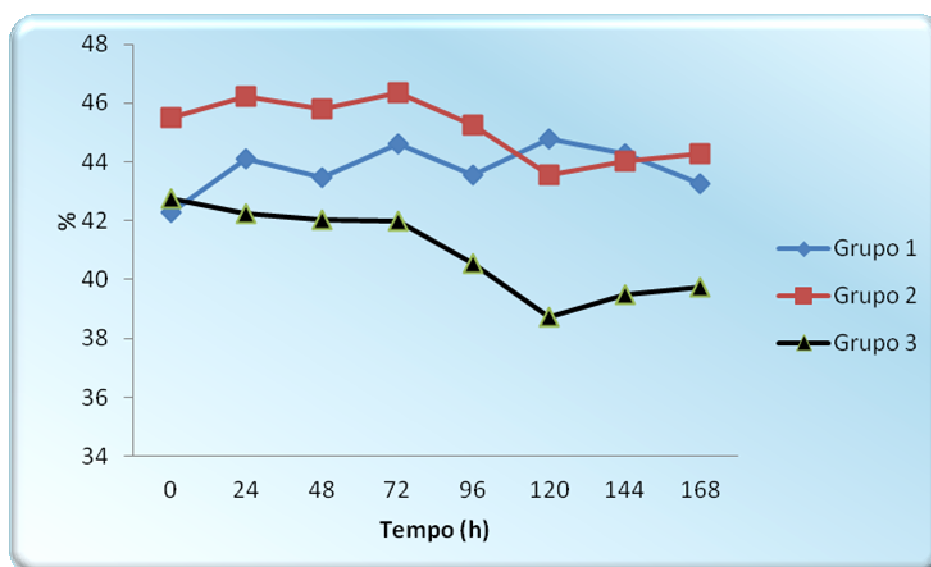


Figura 11. Volume globular (%) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.2.2 Contagem de leucócitos

Nos animais sadios (G1) verificou-se leve diminuição do número de leucócitos no decorrer da infecção, devido a diminuição do número de neutrófilos segmentados, já que o número de linfócitos sofreu poucas oscilações no decorrer dos momentos (Tabelas 7 a 9 e Figuras 12 a 14).

No G2, observou-se diminuição do número de leucócitos a partir de 72 horas PI, sendo que entre 96 e 168 horas PI, o número de leucócitos estabilizou-se abaixo dos valores encontrados em 0 hora. Em relação ao número de linfócitos, foram verificadas poucas oscilações no decorrer do experimento. De forma diferente, o número de neutrófilos segmentados sofreu queda às 72 e 96 horas PI, sendo que, a partir de 96 horas PI, os valores se estabilizaram, abaixo dos valores encontrados em 0 hora, até o final da infecção experimental. Desta forma, a diminuição do número de neutrófilos segmentados a partir de 72 horas PI foi o principal achado no G2 e foi responsável pela queda do número de leucócitos também a partir de 72 horas PI.

No estabelecimento da resposta imune inespecífica estão inseridas as reações da resposta de fase aguda (RFA). Esta cadeia de eventos se inicia com a ativação de macrófagos presentes no tecido lesionado, que liberam uma série de mediadores químicos, entre eles as citocinas, ativando a migração de neutrófilos e células mononucleares até o sítio de inflamação (GONZALEZ et al. 2007). Assim sendo, sugere-se que a diminuição do número de neutrófilos segmentados no G2 ocorreu, em parte, devido à intensa migração de neutrófilos circulantes até a mucosa intestinal colonizada pela *S. Dublin*.

No entanto, o sistema imune de bezerros recém nascidos é imaturo e segundo RADOSTITS et al. (2002) bezerros necessitam de anticorpos transmitidos pelo colostro por até seis semanas, período em que o animal entra em contato com agentes infecciosos presentes no ambiente que estimulam gradualmente o desenvolvimento do seu próprio sistema imune. Desta forma, sugere-se que a queda do número de neutrófilos segmentados no G2 ocorreu devido à intensa migração de neutrófilos

circulantes até a mucosa intestinal e também devido à pequena reserva de granulócitos encontrada na medula óssea dos bezerros, incapazes de produzir e liberar neutrófilos maduros com a rapidez necessária para substituir os neutrófilos maduros recrutados na corrente sanguínea. Reforçando, SANTOS et al. (2002a) relataram redução da contagem de neutrófilos maduros nas primeiras 48 horas PI experimental de bezerros bovinos com *S. Typhimurium*, sendo que, às 24 horas PI, verificaram aumento do número de neutrófilos imaturos e metamielócitos. Desta forma, estes autores atribuíram a queda do número de leucócitos à pequena reserva de granulócitos na medula óssea dos bezerros.

No G3, diferente do G2, observou-se aumento do número de leucócitos de 0 a 72 horas PI, atingindo valores máximos às 72 horas PI, sendo que em todos os momentos após o início do tratamento, as contagens voltaram a valores próximos aos encontrados em 0 hora. Neste grupo, as alterações encontradas no número de leucócitos ocorreram devido a oscilações no número de neutrófilos segmentados, já que o número de linfócitos permaneceu constante no decorrer de todo o experimento. Assim sendo, observou-se aumento da contagem de neutrófilos segmentados entre 0 hora e 72 horas PI, sendo que este tipo celular, nos momentos após o tratamento, também voltou a valores próximos aos encontrados em 0 hora.

Segundo ÁVILA (2009), além da infecção experimental com *Salmonella Typhimurium* em bezerros bovinos ser capaz de induzir o aumento da contagem de leucócitos dos animais, o tratamento a base do antibiótico florfenicol teve efeito inibitório sobre o crescimento da bactéria, com consequente retorno à normalidade no leucograma dos animais. No entanto, embora as contagens de leucócitos e neutrófilos segmentados tenham retornado aos valores basais no G3 após o tratamento, observou-se que os quadros de diarreia, ao contrário do encontrado por ÁVILA (2009), se agravaram após a aplicação do florfenicol, sendo que a bactéria continuou a ser eliminada até 16 dias PI (discutido no item 4.6.2, p.102). Assim sendo, a queda do número de neutrófilos segmentados, após o tratamento, assim como no G2, pode ter ocorrido devido à intensa migração de neutrófilos e células mononucleares até o sítio

de inflamação aliado à incapacidade dos bezerros de produzirem e liberarem granulócitos para a corrente sanguínea de forma rápida.

Tabela 7. Médias e desvios padrão do número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	11,3 $\pm$ 2,68 ^{Aa}	11,5 $\pm$ 3,18 ^{Aa}	12,6 $\pm$ 1,83 ^{Aa}
24	11,3 $\pm$ 2,65 ^{Aa}	10,7 $\pm$ 4,42 ^{Aa}	12,5 $\pm$ 2,41 ^{Aa}
48	10,8 $\pm$ 2,49 ^{Aa}	11,2 $\pm$ 3,74 ^{Aa}	12,9 $\pm$ 2,92 ^{Aa}
72	10,6 $\pm$ 1,71 ^{ABa}	9,58 $\pm$ 4,40 ^{Aa}	13,8 $\pm$ 3,01 ^{Ba}
96	10,4 $\pm$ 1,48 ^{ABa}	8,33 $\pm$ 2,87 ^{Aa}	12,4 $\pm$ 2,15 ^{Ba}
120	10,0 $\pm$ 1,91 ^{Aa}	8,13 $\pm$ 2,44 ^{Aa}	11,8 $\pm$ 2,14 ^{Aa}
144	9,88 $\pm$ 2,03 ^{ABa}	8,43 $\pm$ 2,53 ^{Aa}	12,4 $\pm$ 2,32 ^{Ba}
168	10,5 $\pm$ 2,41 ^{Aa}	8,62 $\pm$ 2,18 ^{Aa}	12,4 $\pm$ 3,51 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

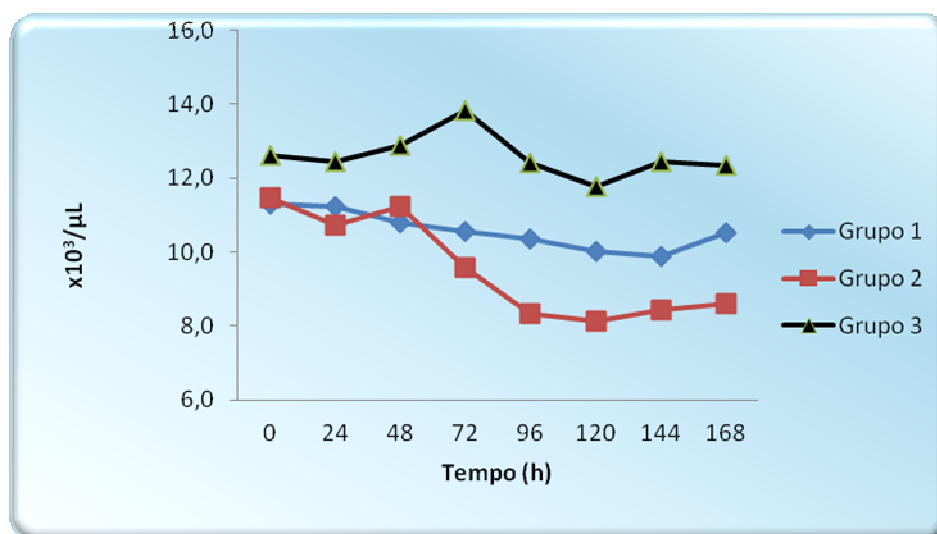


Figura 12. Número de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tabela 8. Médias e desvios padrão do número de linfócitos (μL) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	7.234 $\pm$ 1.172 ^{ABa}	5.639 $\pm$ 903 ^{Aa}	8.526 $\pm$ 876 ^{Ba}
24	7.628 $\pm$ 1.033 ^{Aa}	7.117 $\pm$ 3.457 ^{Aa}	8.344 $\pm$ 2.120 ^{Aa}
48	7.105 $\pm$ 1.236 ^{ABa}	6.161 $\pm$ 2.441 ^{Aa}	8.486 $\pm$ 1.908 ^{Ba}
72	7.273 $\pm$ 1.341 ^{ABa}	5.495 $\pm$ 1.890 ^{Aa}	8.103 $\pm$ 1.790 ^{Ba}
96	7.400 $\pm$ 810 ^{ABa}	5.268 $\pm$ 1.413 ^{Aa}	8.386 $\pm$ 2.002 ^{Ba}
120	7.224 $\pm$ 955 ^{ABa}	5.273 $\pm$ 1.619 ^{Aa}	8.089 $\pm$ 1.706 ^{Ba}
144	7.091 $\pm$ 1.145 ^{ABa}	5.289 $\pm$ 967 ^{Aa}	8.374 $\pm$ 1.685 ^{Ba}
168	7.737 $\pm$ 1.892 ^{ABa}	6.253 $\pm$ 997 ^{Aa}	8.639 $\pm$ 1.472 ^{Ba}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

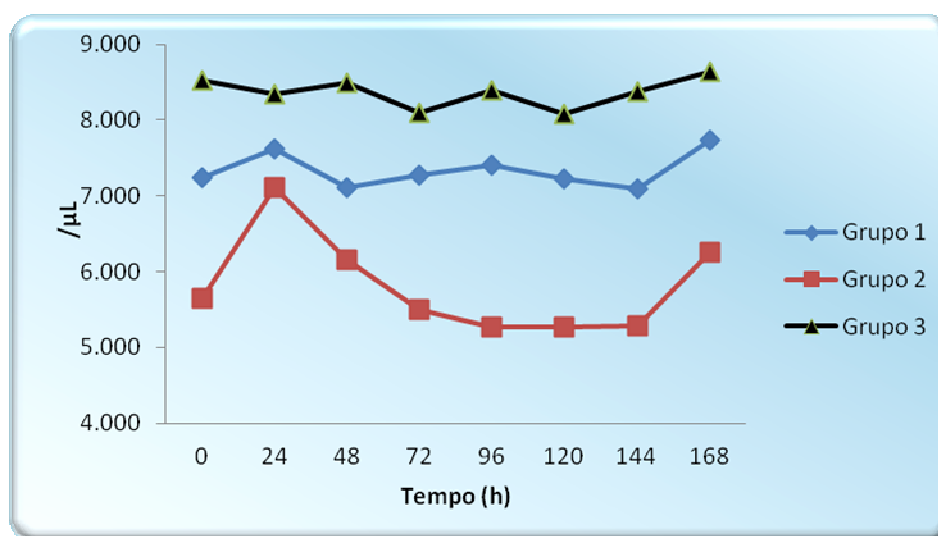


Figura 13. Número de linfócitos (μL) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tabela 9. Médias e desvios padrão do número total de neutrófilos segmentados (/μL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	3.821±1.721 ^{Aa}	5.139±2.616 ^{Aab}	3.481±2.213 ^{Aa}
24	3.502±2.054 ^{Aa}	3.375±1.572 ^{Aab}	3.602±1.142 ^{Aa}
48	3.509±1.616 ^{Aa}	5.043±1.919 ^{Aa}	4.062±2.026 ^{Aa}
72	3.086±1.197 ^{Aa}	3.631±3.259 ^{Aab}	5.081±1.962 ^{Aa}
96	2.603±1.235 ^{Aa}	2.065±1.140 ^{Aab}	3.538±1.603 ^{Aa}
120	2.562±1.118 ^{Aa}	1.883±1.147 ^{Aab}	3.615±1.997 ^{Aa}
144	2.651±1.267 ^{Aa}	1.933±1.589 ^{Ab}	4.040±1.087 ^{Aa}
168	2.552±1.244 ^{Aa}	1.841±1.598 ^{Ab}	4.243±2.239 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

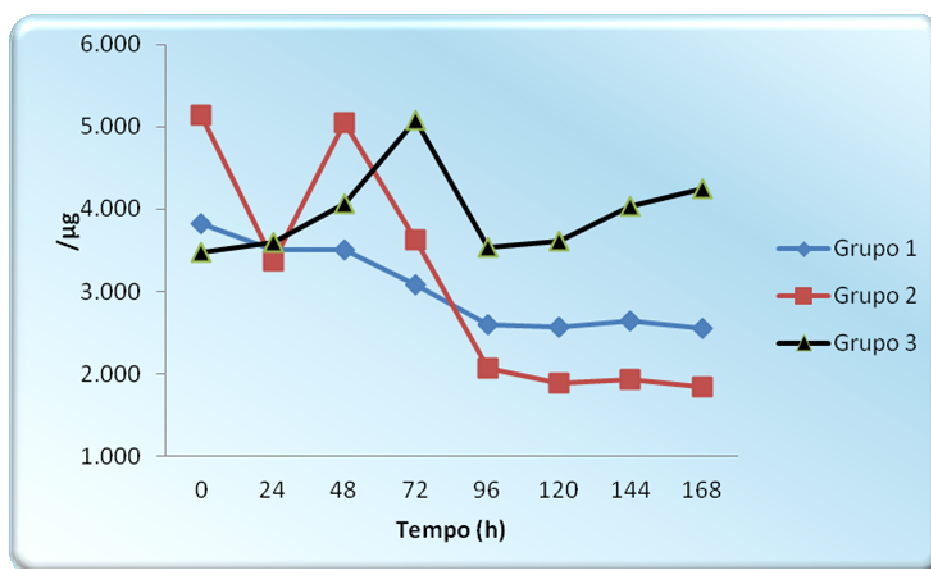


Figura 14. Número de neutrófilos segmentados (/μL) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Em geral, o número de neutrófilos bastonetes, monócitos, basófilos e eosinófilos sofreram alterações pouco expressivas durante todo o experimento e mantiveram-se dentro dos valores de referência propostos por WOOD & QUEIROZ-ROCHA (2010) em bovinos.

4.2.3 Contagem de plaquetas

Nos animais do grupo controle (G1), o número de plaquetas manteve-se constante no decorrer da infecção. Já no G2, observou-se diminuição contínua desde o momento antes da infecção até 96 horas PI, sendo que, a partir deste momento, o número de plaquetas começou a aumentar novamente, voltando, ÀS 168 horas PI, a valores próximos aos encontrados antes da inoculação. No G3, observou-se queda no número de plaquetas de 48 horas até 168 horas PI (Tabela 10 e Figura 15).

Os achados nos bezerros bubalinos infectados (G2 e G3) foram semelhantes aos de SANTOS et al. (2002b), que também verificaram diminuição do número de plaquetas entre 48 e 72 horas após a infecção experimental de bezerros com *Salmonella Typhimurium*.

Tabela 10. Médias e desvios padrão do número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	548±132 ^{Aa}	671±47,5 ^{ABa}	850±195 ^{Ba}
24	550±139 ^{Aa}	651±85,7 ^{ABa}	856±170 ^{Ba}
48	575±128 ^{Aa}	599±128 ^{Aa}	895±163 ^{Ba}
72	581±106 ^{Aa}	589±198 ^{ABa}	822±193 ^{Ba}
96	555±104 ^{Aa}	558±196 ^{Aa}	744±159 ^{Aa}
120	531±143 ^{Aa}	597±136 ^{Aa}	718±125 ^{Aa}
144	506±105 ^{Aa}	612±106 ^{ABa}	781±88,2 ^{Ba}
168	580±129 ^{Aa}	626±121 ^{Aa}	694±287 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

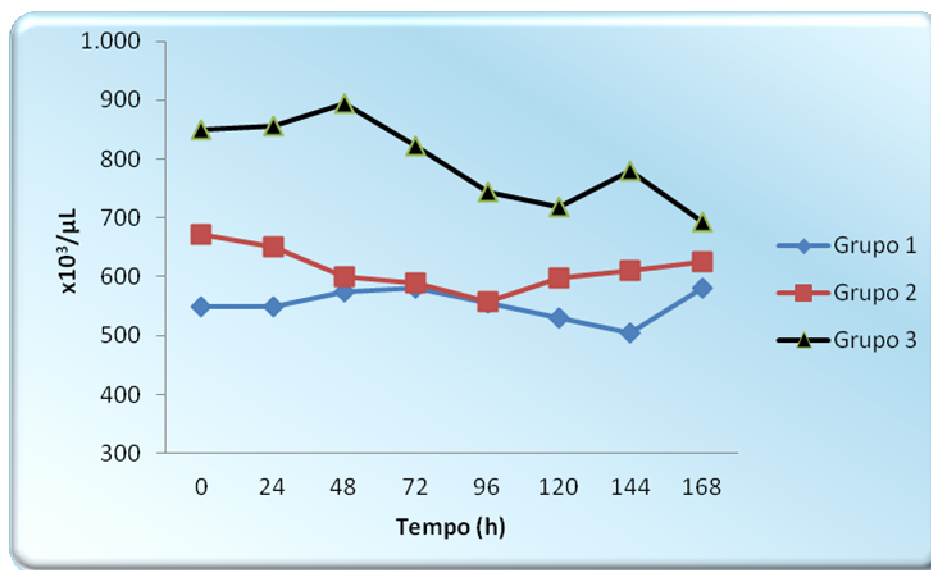


Figura 15. Número de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3 Perfil Bioquímico

4.3.1 Hemogasometria

Os valores do pH sanguíneo, concentração de bicarbonato sanguíneo (HCO_3^-), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2), total de dióxido de carbono (tCO_2), excesso de base e intervalo aniônico (anion gap - AG) dos bezerros bubalinos do grupo controle (G1) ou dos grupos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin são mostrados nas Tabelas enumeradas de 11 a 16 e nas Figuras enumeradas de 16 a 21.

4.3.1.1 pH e concentração de bicarbonato sanguíneo (HCO_3^-)

Os valores do pH sanguíneo e HCO_3^- do grupo controle (G1) não variaram no decorrer do experimento, estando dentro dos valores de referência para bovinos sadios recém-nascidos (KANEKO et al., 2008; KASARI & NAYLOR, 1985; KASARI, 1990) e próximos aos encontrados por LISBÔA et al. (2002) em bezerros bovinos recém-nascidos de 0 a 30 dias de vida (Tabelas 11 e 12 e Figuras 16 e 17).

No G2, observou-se aumento dos valores do pH e de HCO_3^- entre 0 e 72 horas PI e entre 0 e 96 horas PI, respectivamente. A partir de 72 e 96 horas PI verificou-se, respectivamente, diminuição dos valores do pH e HCO_3^- , que retornaram a valores próximos aos encontrados nos momentos iniciais da infecção. No entanto, essas variações foram pouco expressivas e dentro de valores considerados normais para bovinos sadios (KANEKO et al., 2008) e bezerros bovinos recém-nascidos sadios (KASARI & NAYLOR, 1985; KASARI, 1990) e próximos aos encontrados por LISBÔA et al. (2002) em bezerros bovinos recém-nascidos de 0 a 30 dias de vida.

No G3, verificou-se um aumento dos valores do pH sanguíneo entre 0 hora e 72 horas PI, sendo que, de forma diferente, os valores de HCO_3^- sofreram queda no mesmo período. Após o tratamento (72 a 96 horas PI), ocorreu queda do pH, atingindo, às 144 horas PI, valores próximos aos encontrados em 0 hora. Já em relação ao HCO_3^- , notou-se aumento após o tratamento, sendo que as concentrações retornaram, às 168 horas PI, a valores próximos aos encontrados no início da infecção. No entanto, essas variações também foram pouco expressivas e dentro de valores considerados normais para bovinos sadios (KANEKO et al., 2008) e bezerros bovinos recém-nascidos sadios (KASARI & NAYLOR, 1985; KASARI, 1990) e próximos aos encontrados por LISBÔA et al. (2002) em bezerros bovinos recém-nascidos de 0 a 30 dias de vida.

De acordo com REBHUN (2000), a salmonelose bovina pode provocar acentuada diminuição do valor do pH sanguíneo nos animais com diarreia grave, devido à perda fecal de bicarbonato. No entanto, embora os bezerros bubalinos do G2 e do G3 tenham apresentado quadros de diarreia grave no decorrer do experimento, com piora

no decorrer da infecção, as perdas de bicarbonato nas fezes não foram suficientes para causar alterações expressivas do pH que pudessem caracterizar um quadro de acidose metabólica. Diferentemente, SILVA et al (2010a) verificaram ligeiras diminuições do pH a partir de 72 horas após a infecção, achados estes compatíveis com quadro discreto de acidose metabólica. Ainda SILVA et al. (2010a) verificaram que nos animais que receberam tratamento com florfenicol, o aumento da concentração do bicarbonato sanguíneo após o tratamento provavelmente estava relacionado à redução da intensidade e duração da diarreia.

Tabela 11. Médias e desvios padrão do valor do pH sanguíneo de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	7,37±0,03 ^{Aa}	7,35±0,01 ^{Aa}	7,32±0,04 ^{Aa}
24	7,39±0,01 ^{Aa}	7,37±0,02 ^{Aa}	7,34±0,04 ^{Aa}
48	7,39±0,02 ^{Aa}	7,36±0,03 ^{Aa}	7,34±0,03 ^{Aa}
72	7,38±0,04 ^{Aa}	7,39±0,05 ^{Aa}	7,37±0,05 ^{Aa}
96	7,37±0,02 ^{Aa}	7,38±0,02 ^{Aa}	7,35±0,03 ^{Aa}
120	7,36±0,03 ^{Aa}	7,38±0,01 ^{Aa}	7,33±0,02 ^{Aa}
144	7,37±0,02 ^{Aa}	7,37±0,04 ^{ABa}	7,31±0,03 ^{Ba}
168	7,38±0,03 ^{Aa}	7,36±0,02 ^{Aa}	7,32±0,04 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

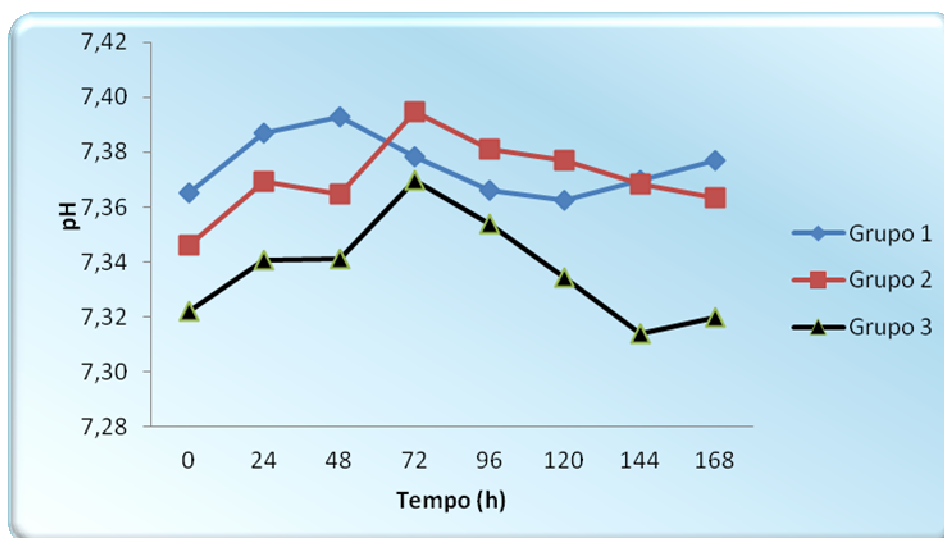


Figura 16. Variação do pH sanguíneo de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tabela 12. Médias e desvios padrão da concentração sanguínea de bicarbonato (HCO_3^-) (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	25,0±1,52 ^{Aa}	23,6±3,37 ^{Aa}	25,0±2,97 ^{Aa}
24	26,4±4,72 ^{Aa}	23,5±2,12 ^{Aa}	25,5±3,09 ^{Aa}
48	26,4±4,72 ^{Aa}	23,5±2,12 ^{Aa}	24,9±2,91 ^{Aa}
72	25,6±0,98 ^{Aa}	24,3±1,62 ^{Aa}	23,1±2,01 ^{Aa}
96	26,3±1,08 ^{Aa}	25,1±1,17 ^{Aa}	23,6±2,25 ^{Aa}
120	25,9±0,98 ^{Aa}	23,5±2,35 ^{Aa}	23,3±1,56 ^{Aa}
144	25,0±1,40 ^{Aa}	24,1±3,37 ^{Aa}	23,2±2,55 ^{Aa}
168	25,1±1,51 ^{Aa}	24,0±2,21 ^{Aa}	24,5±3,09 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

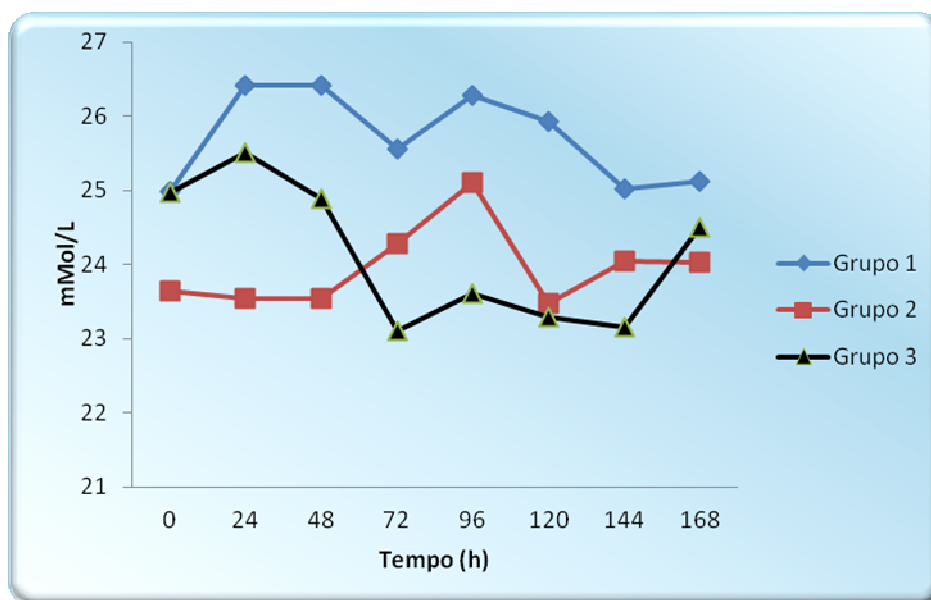


Figura 17. Variação da concentração sanguínea de bicarbonato (HCO_3^-) (mEq/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.1.2 Pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) e total de dióxido de carbono (tCO_2)

Os valores de pCO_2 e tCO_2 no grupo controle (G1) pouco variaram no decorrer do experimento, estando dentro dos valores de referência para bovinos saudáveis (KANEKO et al., 2008) e bezerros bovinos recém-nascidos saudáveis (HASKINS, 1977) (Tabelas 13 e 14 e Figuras 18 e 19).

No G2, os valores de pCO_2 e tCO_2 também pouco variaram no decorrer do experimento, concordando com achados de LEAL (2005), que não constatou alteração significativa da pCO_2 em bezerros diarreicos. Diferentemente, GONÇALVES et al. (1991) verificaram diminuição da pCO_2 em bezerros com diarreia.

No G3, notou-se diminuição da $p\text{CO}_2$ e do $t\text{CO}_2$ entre 0 e 72 horas PI, sendo que, a partir de 96 horas PI verificou-se um aumento destes parâmetros, que voltaram a valores próximos aos encontrados no início da infecção. No entanto, estas oscilações não foram expressivas, estando dentro dos valores de referência para bovinos sadios (KANEKO et al., 2008) e bezerros bovinos recém-nascidos sadios (HASKINS, 1977)

De maneira geral, a concentração sanguínea de bicarbonato pode ser estimada pelo total de dióxido de carbono, que é medido de forma indireta através da $p\text{CO}_2$ (KANEKO et al., 2008). De acordo com KANEKO et al. (2008), um dos mecanismos de compensação da acidose metabólica é o aumento da ventilação, que promove a redução da $p\text{CO}_2$, porém limitada a um curto período de tempo. Desta forma, queda das concentrações de bicarbonato costumam ser seguidas de queda compensatória da $p\text{CO}_2$, e conseqüentemente, de queda no $t\text{CO}_2$, fato observado no G3, já que as concentrações de bicarbonato, embora não capazes de alterar o pH de forma expressiva, também sofreram queda entre 0 e 72 horas PI e aumento a partir de 96 horas PI.

Tabela 13. Médias e desvios padrão da pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$)(mmHg) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	44,9±5,06 ^{Aa}	44,1±5,32 ^{Aa}	49,1±3,37 ^{Aa}
24	42,2±3,71 ^{Aa}	42,1±4,07 ^{Aa}	48,0±2,15 ^{Aa}
48	43,6±3,00 ^{Aa}	44,8±4,82 ^{Aa}	47,0±4,54 ^{Aa}
72	44,5±5,07 ^{Aa}	40,8±4,51 ^{Aa}	40,9±4,26 ^{Aa}
96	47,0±3,71 ^{Aa}	43,4±3,44 ^{Aa}	43,5±6,05 ^{Aa}
120	46,8±3,26 ^{Aa}	40,9±4,37 ^{Aa}	44,8±3,18 ^{Aa}
144	44,4±3,87 ^{Aa}	42,7±6,08 ^{Aa}	46,8±6,67 ^{Aa}
168	43,7±3,04 ^{Aa}	43,2±3,08 ^{Aa}	48,7±6,15 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

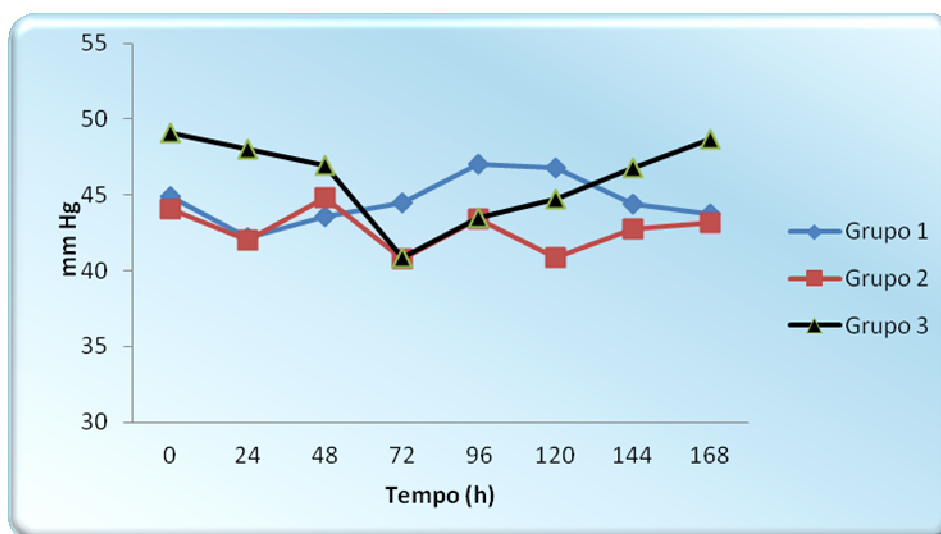


Figura 18. Pressão parcial de dióxido de carbono (pCO₂) (mmHg) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tabela 14. Médias e desvios padrão do teor de dióxido de carbono (tCO₂) (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	22,6±0,83 ^{Aa}	21,3±3,06 ^{Aa}	22,3±2,18 ^{Aa}
24	22,4±1,52 ^{Aa}	21,2±2,03 ^{Aa}	22,8±2,05 ^{Aa}
48	23,3±1,06 ^{Aa}	22,3±2,27 ^{Aa}	22,2±2,54 ^{Aa}
72	22,8±1,04 ^{Aa}	21,4±1,40 ^{Aa}	20,5±1,40 ^{Aa}
96	23,5±1,16 ^{Aa}	22,4±0,96 ^{Aa}	21,2±1,98 ^{Aa}
120	23,1±0,94 ^{Aa}	21,2±1,69 ^{Aa}	21,2±1,31 ^{Aa}
144	22,5±1,73 ^{Aa}	21,6±2,33 ^{Aa}	21,1±2,36 ^{Aa}
168	22,4±1,68 ^{Aa}	21,5±1,79 ^{Aa}	22,3±2,83 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

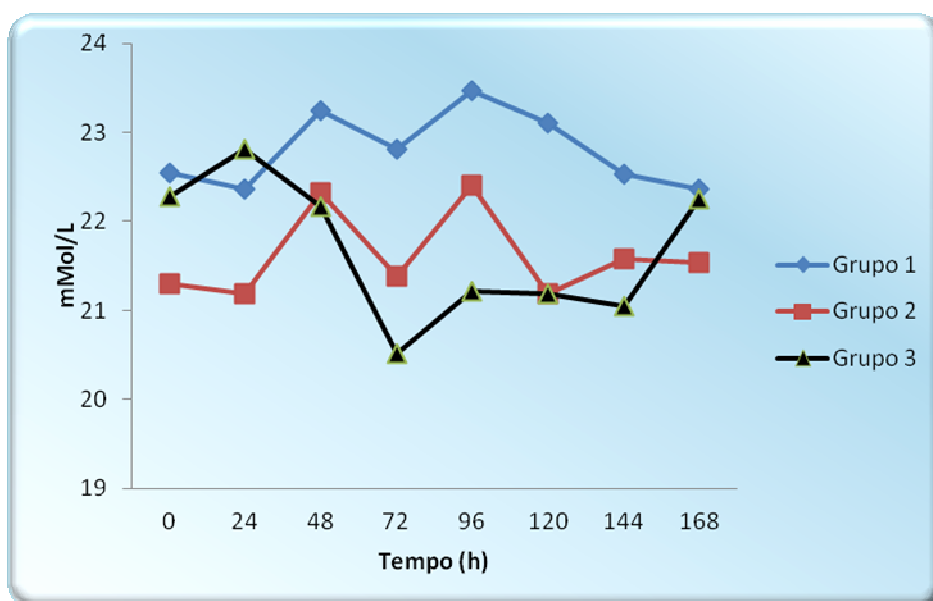


Figura 19. Teor de dióxido de carbono (tCO₂) (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.1.3 Excesso de base

No G1, os animais iniciaram (às 0 e 24 horas PI) e terminaram (às 144 e 168 horas PI) o experimento com déficit de base, sendo que de 48 a 120 horas PI, observou-se excesso de base neste grupo. Já no G2, observou-se uma dinâmica igual à do G1 no decorrer do experimento. No entanto, embora tenham sido notados valores maiores às 48, 72 e 96 horas PI, este grupo apresentou déficit de base durante todo o experimento (Tabela 15 e Figura 20).

Os bezerros do G3, assim como os do G2, apresentaram déficit de base durante todo o experimento, sendo que no G3 o déficit de base foi mais expressivo. A partir de 72 horas PI, houve diminuição dos valores, que permaneceram, até o final do experimento, abaixo dos encontrados em 0 hora. SILVA et al. (2010a) também verificaram diminuições da quantidade de base a partir de 72 horas após a infecção. A

esse respeito, OCAL et al. (2006), GOKCE et al. (2006) e GUZELBEKTES et al. (2007) também relataram redução dos valores de excesso de base em bezerros com diarreia.

Segundo KANEKO et al. (2008), o excesso ou déficit de base, calculado a partir dos valores do pH e da pCO₂, indica a variação da concentração de bicarbonato em relação ao valor considerado como normal. Desta forma, como na maioria dos casos de diarreia em bezerros ocorre a perda de bicarbonato juntamente com as fezes, os valores de pH, bicarbonato e excesso de base encontram-se diminuídos. Contudo, apesar de vários trabalhos citarem o intervalo de -4,0 a 4,0 mEq/L como fisiológico para a espécie humana (HASKINS, 1977), não há consenso sobre os valores fisiológicos em bezerros neonatos. Enquanto SCHOTMAN (1971) sugere limite inferior de variação de até -3,5 mEq/L, LISBÔA et al. (2002) sugerem que valores abaixo de -1,5 mEq/L sejam interpretados como indicativos de uma situação não fisiológica.

Tabela 15. Médias e desvios padrão do excesso ou déficit de base (mEq/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	-0,67±1,16 ^{Aa}	-2,13±2,95 ^{Aa}	-1,65±3,11 ^{Aa}
24	-0,33±1,14 ^{Aa}	-1,77±1,82 ^{Aa}	-0,80±3,17 ^{Aa}
48	0,72±0,89 ^{Aa}	-0,65±1,91 ^{Aa}	-1,27±2,69 ^{Aa}
72	0,12±0,86 ^{Aa}	-0,50±1,89 ^{Aa}	-2,12±2,38 ^{Aa}
96	0,40±0,61 ^{Aa}	-0,18±0,78 ^{ABa}	-1,98±1,62 ^{Ba}
120	0,05±1,11 ^{Aa}	-1,67±1,94 ^{ABa}	-2,68±1,43 ^{Ba}
144	-0,45±1,22 ^{Aa}	-1,37±3,09 ^{Aa}	-3,27±1,89 ^{Aa}
168	-0,27±1,50 ^{Aa}	-1,43±2,11 ^{Aa}	-1,98±2,71 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

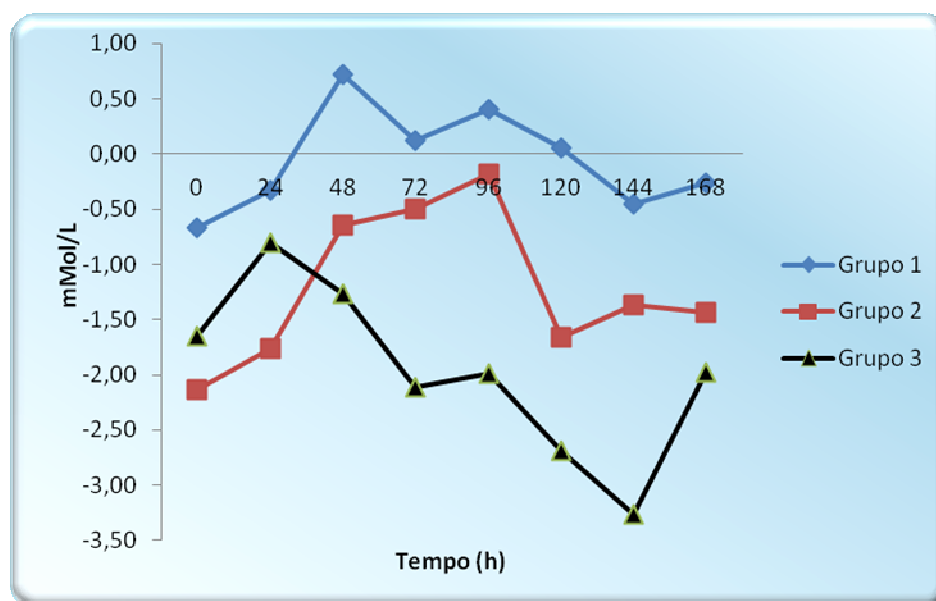


Figura 20. Variação do excesso ou déficit de base (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.1.4 Intervalo aniônico (Anion Gap - AG)

Em relação aos valores de AG, observaram-se pequenas oscilações, nos três grupos experimentais, no decorrer do experimento (Tabela 16 e Figura 21).

Em quadros de diarreia, como por exemplo, a causada pela *Salmonella*, pode ocorrer uma acidose metabólica hiperclorêmica, sendo que os valores de AG estarão dentro da normalidade (DIBARTOLA, 2012). No entanto, nos animais infectados (G2 e G3) os valores de AG encontrados dentro da normalidade no decorrer do experimento não são atribuídos a uma acidose metabólica hiperclorêmica, já que no decorrer do experimento, verificaram-se poucas oscilações nas concentrações de bicarbonato e de cloretos (discutido no item 4.3.2.1, p.55)

Tabela 16. Médias e desvios padrão do valor de intervalo aniônico (AG) (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	17,4±1,76 ^{Aa}	17,4±2,36 ^{Aa}	17,1±5,10 ^{Aa}
24	16,9±0,94 ^{Aa}	16,6±2,16 ^{Aa}	16,7±2,16 ^{Aa}
48	15,9±1,80 ^{Aa}	13,9±4,32 ^{Aa}	16,0±4,33 ^{Aa}
72	15,4±1,58 ^{Aa}	16,1±1,83 ^{Aa}	17,5±2,21 ^{Aa}
96	15,4±0,99 ^{Aa}	15,6±1,59 ^{Aa}	17,6±2,09 ^{Aa}
120	15,3±1,59 ^{Aa}	16,3±2,50 ^{Aa}	18,1±1,20 ^{Aa}
144	15,3±1,54 ^{Aa}	16,2±2,36 ^{Aa}	16,8±3,08 ^{Aa}
168	14,9±1,98 ^{Aa}	15,7±2,12 ^{Aa}	16,7±2,84 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

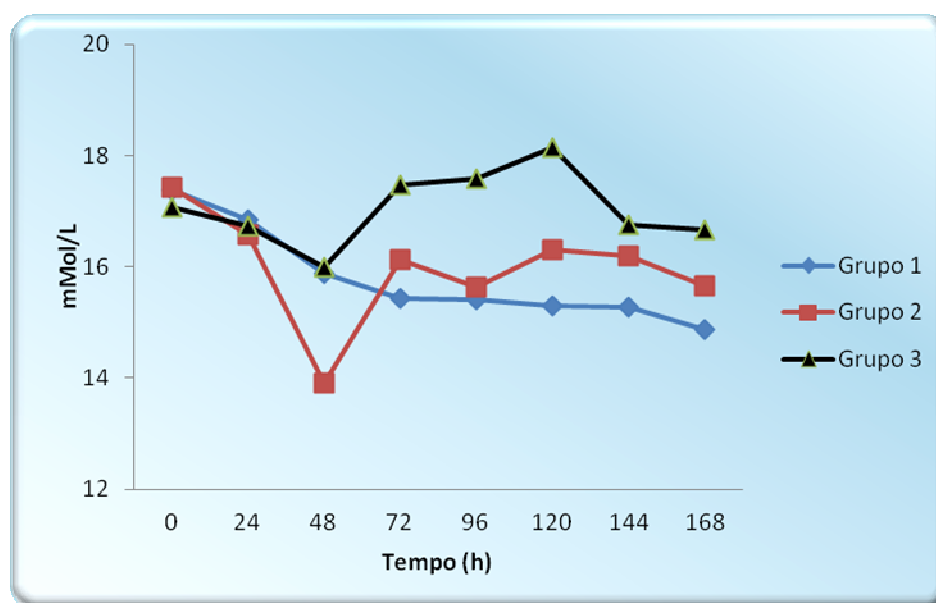


Figura 21. Variação do valor de intervalo aniônico (AG) (mMol/L) no sangue de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.2 Minerais

Os resultados de concentração sérica de cloretos, magnésio, fósforo, cálcio total e ferro dos bezerros bubalinos do grupo controle (G1) ou dos grupos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin são mostrados nas Tabelas enumeradas de 17 a 21 e nas Figuras enumeradas de 22 a 26.

4.3.2.1 Concentração sérica de cloretos

As concentrações séricas de cloretos pouco variaram no decorrer do experimento, nos três grupos experimentais (Tabela 17 e Figura 22), estando dentro dos valores de referência para bezerros bovinos sadios da raça Holandesa do nascimento aos 30 dias de vida BENESI et al. (2005). SANTOS et al. (2002a) e SILVA (2007) observaram uma tendência à redução das concentrações séricas de cloretos em bezerros infectados experimentalmente com *S. Typhimurium* e *S. Dublin*, respectivamente. GONÇALVES et al. (1991) também verificaram tendência de redução da concentração de cloretos em bezerros com diarreia, sendo que estes autores atribuíram essa queda às perdas fecais deste eletrólito.

A acidose metabólica pode ser causada por perda de fluido corporal rico em bicarbonato. Isto geralmente acontece no trato gastrointestinal, quando instalados quadros de diarreia oriunda do intestino delgado. Nestes casos, a concentração de bicarbonato perdida no fluido da diarreia excede proporcionalmente a de cloretos (DIBARTOLA, 2012). Este fato, aliado ao aumento da reabsorção de cloretos nos rins, em resposta à diminuição das concentrações de bicarbonato (SAXTON & SELDIN, 1986), pode resultar em acidose metabólica hiperclorêmica. Desta forma, a pequena variação das concentrações séricas de cloretos nos grupos infectados é mais um indicador de que as alterações nas concentrações de bicarbonato não foram suficientes para causar um desequilíbrio ácido-básico.

Tabela 17. Médias e desvios padrão da concentração sérica de cloretos (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	104±3,00 ^{Aa}	101±5,82 ^{Aab}	101±8,28 ^{Aa}
24	105±5,58 ^{Aa}	105±6,78 ^{Aab}	103±5,15 ^{Aa}
48	104±4,72 ^{Aa}	99,7±4,14 ^{Aa}	102±7,46 ^{Aa}
72	104±3,24 ^{Aa}	104±6,65 ^{Aab}	103±9,29 ^{Aa}
96	102±5,31 ^{Aa}	104±4,15 ^{Aab}	104±8,51 ^{Aa}
120	105±7,07 ^{Aa}	106±2,88 ^{Ab}	103±7,60 ^{Aa}
144	105±5,67 ^{Aa}	104±10,6 ^{Aab}	104±6,51 ^{Aa}
168	101±2,87 ^{Aa}	99,0±4,63 ^{Aa}	102±10,3 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

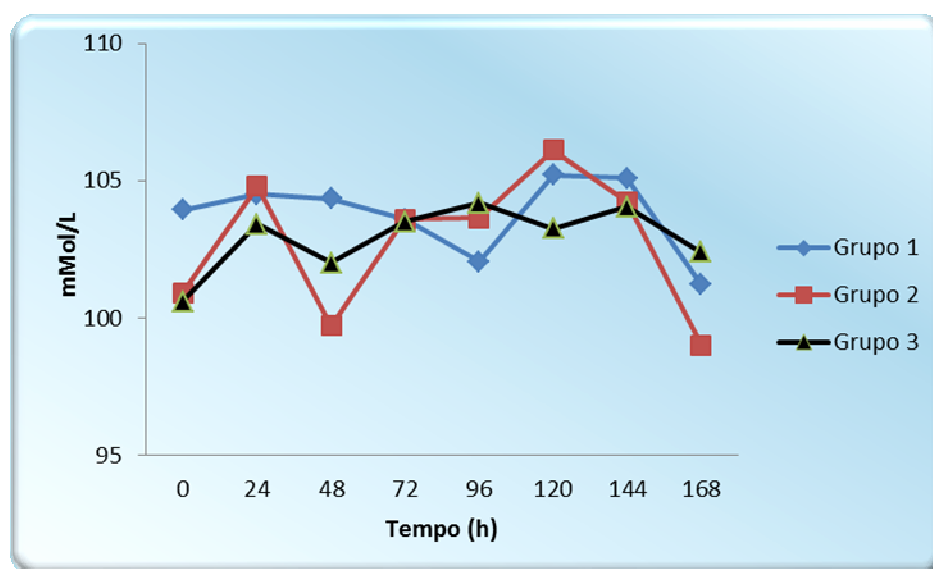


Figura 22. Variação da concentração sérica de cloretos (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.2.2 Concentração sérica de magnésio

Em relação à concentração sérica de magnésio, observou-se um aumento contínuo no G1 durante o experimento, resultando em diferenças significativas entre 0 hora e 120 horas PI e entre 0 hora e 168 horas PI. No G2, também se verificou aumento da concentração sérica de magnésio no decorrer da infecção, porém em menor magnitude que no grupo controle (G1). No G3, diferente do G1 e do G2, observaram-se pequenas oscilações no decorrer do experimento (Tabela 18 e Figura 23).

Em bezerros, os distúrbios decorrentes das diarreias devem-se, entre outros fatores, à inflamação e à atrofia das vilosidades intestinais causadas pelo agente etiológico (CAMBIER et al., 2001). Segundo KAISER et al. (2000) *Salmonella* alcança o intestino, onde atinge íleo distal e ceco, aderindo à mucosa intestinal por meio de mecanismos mediados pelas fímbrias. Desta forma, levando-se em consideração que o principal local de absorção do magnésio é o íleo, embora o jejuno e o ceco também possuam importante papel na absorção deste mineral (DIBARTOLA, 2012), distúrbios na absorção deste nutriente podem ocorrer no caso de infecções por *Salmonella*, como descrito por SILVA (2007) que constatou redução da concentração de magnésio em bezerros com diarreia infectados por *Salmonella* Dublin. No entanto, nos bezerros bubalinos foi observado aumento das concentrações séricas de magnésio no decorrer do experimento, evidenciando que os quadros de diarreia não causaram desequilíbrio deste mineral. Adicionalmente, FAGLIARI et al. (1998) relataram aumento das concentrações séricas de magnésio do nascimento aos 45 dias de vida em bezerros bubalinos sadios da raça Murrah, sugerindo que o aumento encontrado no decorrer do experimento nos grupos infectados (G2 e G3) e inclusive no grupo controle (G1) pode ter sido influenciado pela idade.

Tabela 18. Médias e desvios padrão da concentração sérica de magnésio (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	2,36±0,21 ^{Aa}	2,58±0,36 ^{Aa}	2,62±0,34 ^{Aa}
24	2,50±0,15 ^{Aab}	2,71±0,27 ^{Aa}	2,69±0,38 ^{Aa}
48	2,63±0,20 ^{Aab}	2,66±0,23 ^{Aa}	2,63±0,47 ^{Aa}
72	2,69±0,09 ^{Aab}	2,63±0,43 ^{Aa}	2,51±0,61 ^{Aa}
96	2,72±0,33 ^{Aab}	2,61±0,39 ^{Aa}	2,52±0,47 ^{Aa}
120	2,88±0,26 ^{Ab}	2,82±0,50 ^{Aa}	2,60±0,44 ^{Aa}
144	2,78±0,11 ^{Aab}	2,78±0,49 ^{Aa}	2,70±0,41 ^{Aa}
168	2,84±0,22 ^{Ab}	2,87±0,32 ^{Aa}	2,69±0,29 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

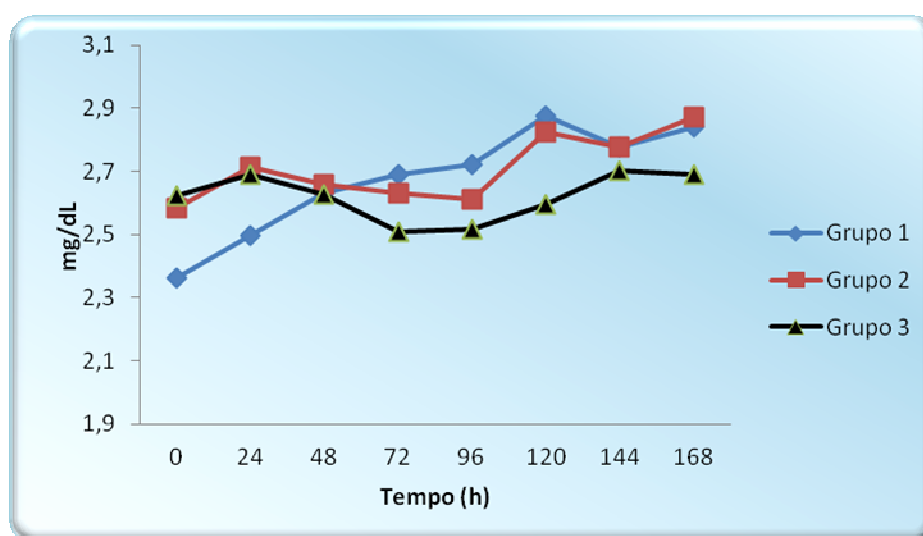


Figura 23. Variação da concentração sérica de magnésio (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.2.3 Concentração sérica de fósforo

No G1 e no G2, observou-se diminuição das concentrações séricas de fósforo no decorrer do experimento. No entanto, verificou-se que essa queda foi mais expressiva no G2. No G3, também se observou diminuição das concentrações séricas de fósforo no decorrer da infecção. No entanto, esta queda foi muito mais branda que no G1 e no G2 (Tabela 19 e Figura 24). Diferente do encontrado nos bezerros bubalinos, GUZELBEKTES et al. (2007) relataram aumento da concentração sérica de fósforo em bezerros com diarreia. Já SANTOS et al. (2002a) e ÁVILA (2009) não relataram diferenças significativas na concentração sérica de fósforo em bezerros experimentalmente inoculados com *Salmonella* Typhimurium.

Segundo KANEKO et al. (2008), as diferenças observadas nos estudos ocorrem provavelmente devido à gravidade do quadro de diarreia e ao grau de desidratação apresentados pelos animais. DIBARTOLA (2012) afirma que o equilíbrio ácido-básico interfere nas concentrações séricas de fósforo, sendo que a alcalose respiratória estimula a glicólise diminuindo as concentrações séricas de fósforo. Assim sendo, a queda das concentrações séricas de fósforo encontrado nos grupos infectados (G2 e G3), principalmente no G2, no decorrer do experimento, podem ser decorrentes do desequilíbrio deste mineral devido à ocorrência de diarreia associada à má absorção (atrofia das vilosidades intestinais). No entanto, considerando que no grupo controle (G1) também se observou queda das concentrações séricas de fósforo no decorrer do experimento e levando-se em conta que FAGLIARI et al. (1998) relatam decréscimo dos teores séricos de fósforo do nascimento aos 45 dias de vida em bezerros bubalinos sadios da raça Murrah, sugere-se também a influência da idade como fator de alteração deste mineral.

Tabela 19. Médias e desvios padrão da concentração sérica de fósforo (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	9,48±1,16 ^{Aa}	8,65±1,28 ^{ABa}	7,71±0,83 ^{Ba}
24	9,18±1,40 ^{Aa}	8,34±1,38 ^{ABab}	7,94±0,80 ^{Ba}
48	8,87±0,68 ^{Aa}	8,04±0,97 ^{Aab}	8,05±0,53 ^{Aa}
72	8,81±0,71 ^{Aa}	8,33±1,19 ^{Aab}	7,77±0,83 ^{Aa}
96	8,43±0,74 ^{Aa}	8,03±1,20 ^{Aab}	7,75±0,74 ^{Aa}
120	8,43±0,76 ^{Aa}	7,90±1,04 ^{ABab}	7,23±0,69 ^{Ba}
144	8,35±0,75 ^{Aa}	7,23±0,94 ^{ABb}	7,13±0,67 ^{Ba}
168	8,36±0,90 ^{Aa}	7,18±0,54 ^{Bb}	7,30±0,60 ^{ABa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

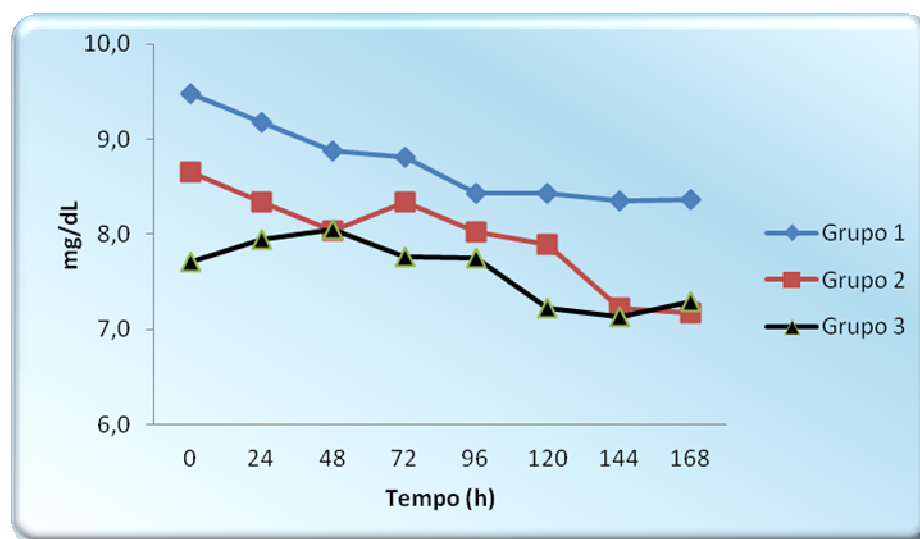


Figura 24. Variação da concentração sérica de fósforo (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.2.4 Concentração sérica de cálcio total

As concentrações séricas de cálcio total, nos três grupos experimentais, sofreram leves oscilações no decorrer do experimento (Tabela 20 e Figura 25), estando dentro dos valores de referência encontradas por FAGLIARI et al. (1998) em bezerros bubalinos sadios da raça Murrah do nascimento aos 45 dias de vida. De forma diferente, SANTOS et al. (2002a) e SILVA (2007) verificaram diminuição das concentrações séricas de cálcio total em bezerros inoculados com *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Dublin, respectivamente. No entanto, ROCHA et al. (2009) constataram decréscimo gradual dos teores séricos de cálcio total desde o nascimento ($11,2 \pm 2,1$ mg/dL) até os 30 dias de vida ($8,75 \pm 0,9$ mg/dL) em bezerros bovinos da raça holandesa, sendo que MOHRI et al. (2007) também relataram influência significativa da idade nos teores séricos deste mineral nos primeiros meses de vida em bezerros da raça Holandesa, com teores significativamente superiores às 24 e 48 horas de vida, em comparação com os demais momentos.

Tabela 20. Médias e desvios padrão da concentração sérica de cálcio total (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	$11,1 \pm 0,84^{Aa}$	$10,1 \pm 0,84^{Aa}$	$10,1 \pm 1,11^{Aa}$
24	$11,6 \pm 0,90^{Aa}$	$10,8 \pm 0,91^{ABa}$	$10,2 \pm 1,23^{Ba}$
48	$11,6 \pm 0,96^{Aa}$	$11,0 \pm 0,90^{ABa}$	$10,3 \pm 1,08^{Ba}$
72	$11,7 \pm 1,22^{Aa}$	$10,4 \pm 0,45^{Ba}$	$9,85 \pm 1,02^{Ba}$
96	$11,4 \pm 1,32^{Aa}$	$10,4 \pm 0,79^{ABa}$	$9,72 \pm 1,43^{Ba}$
120	$11,5 \pm 1,21^{Aa}$	$10,7 \pm 0,90^{ABa}$	$10,0 \pm 1,31^{Ba}$
144	$11,4 \pm 1,08^{Aa}$	$10,4 \pm 1,05^{Aa}$	$10,4 \pm 1,52^{Aa}$
168	$11,3 \pm 0,97^{Aa}$	$11,0 \pm 0,84^{Aa}$	$10,5 \pm 1,45^{Aa}$

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

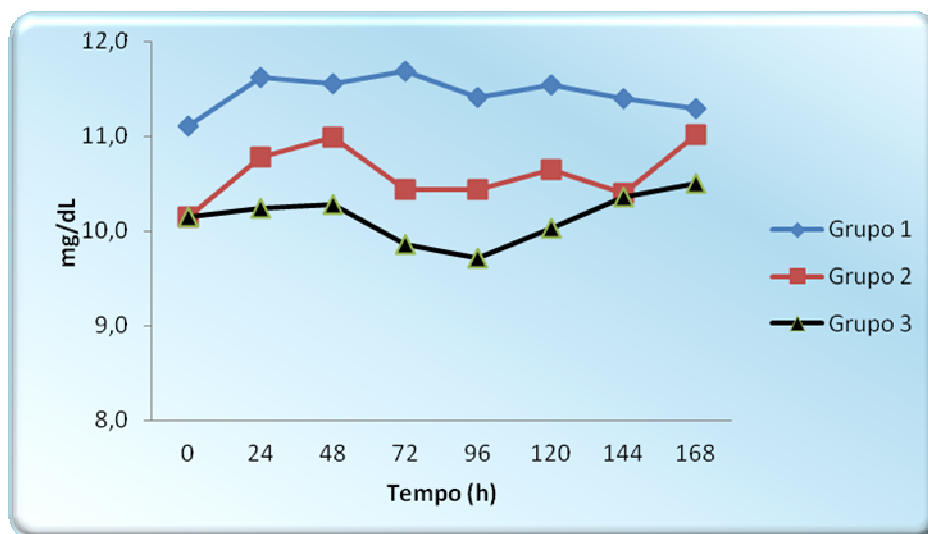


Figura 25. Variação da concentração sérica de cálcio total (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.2.5 Concentração sérica de ferro

Em relação à concentração sérica de ferro, ocorreram oscilações no G1, no decorrer do experimento, com diminuição das concentrações às 24 horas PI, seguido de aumento entre 48 e 96 horas PI e posterior queda às 120 horas PI, estabilizando em valores próximos aos encontrados em 0 hora, até o final do experimento (Tabela 21 e Figura 26).

No G2, destaca-se diminuição das concentrações séricas de ferro às 24 horas PI, sendo que estes valores se mantiveram, ao longo do experimento, abaixo dos valores encontrados no momento antes da inoculação. SILVA (2007), também observou queda das concentrações séricas de ferro após realizar infecção experimental de bezerros bovinos com *Salmonella* Dublin, que ocorreu entre 36 e 48 horas PI. Segundo KANEKO et al. (2008), a resposta imune do hospedeiro, mediada pela interleucina-1, promove redução da concentração sérica de ferro após invasão bacteriana, uma vez

que o crescimento e a multiplicação bacteriana dependem da disponibilidade deste componente bioquímico. Desta forma, embora os sinais clínicos característicos de salmonelose tenham começado de forma mais tardia (às 96 horas PI), assim como o aumento das concentrações séricas das proteínas de fase aguda (PFA) haptoglobina e ceruloplasmina (aumentaram a partir de 120 horas PI) (discutido no item 4.4.1, p.82), a diminuição das concentrações séricas de ferro a partir de 24 horas PI pode estar relacionada à infecção bacteriana, já que foi isolada *Salmonella*, neste grupo, por exame bacteriológico e PCR, a partir de 24 horas PI (discutido no item 4.5, p.92).

Já no G3, destaca-se diminuição das concentrações séricas de ferro às 72 horas PI, sendo que, após o início do tratamento, observou-se recuperação contínua das concentrações (às 120, 144 e 168 horas PI). No entanto, as concentrações não voltaram, até o final do experimento, a valores próximos aos encontrados em 0 hora. SILVA et al. (2007) relataram que em bezerros infectados e posteriormente tratados, também foi observada redução das concentrações séricas de ferro após a inoculação, porém, com elevação após o início do tratamento, notadamente às 108 horas PI. Desta forma, embora os sinais clínicos característicos de salmonelose tenham começado, neste grupo, às 24 horas PI, e a presença da *Salmonella* Dublin nas fezes também foi detectada 24 horas PI (discutido no item 4.5, p.92) observou-se queda das concentrações séricas de ferro mais tardia, às 72 horas PI, diferente do encontrado no G2. Adicionalmente, destaca-se que a queda nas concentrações séricas de ferro às 72 horas PI coincidiu com os momentos de início do aumento das concentrações das PFA fibrinogênio e haptoglobina (discutido no item 4.4.1 e 4.4.2, p.82). Além disso, a recuperação contínua das concentrações de ferro observadas nos momentos finais da infecção (às 120, 144 e 168 horas PI) também coincidiu com o início da queda das concentrações séricas de fibrinogênio e haptoglobina.

Tabela 21. Médias e desvios padrão da concentração sérica de ferro ($\mu\text{g/dL}$) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	123 $\pm$ 55,6 ^{Aa}	126 $\pm$ 61,1 ^{Aa}	143 $\pm$ 69,6 ^{Aa}
24	96,2 $\pm$ 58,6 ^{Aa}	84,1 $\pm$ 29,4 ^{Aa}	160 $\pm$ 76,3 ^{Aa}
48	117 $\pm$ 60,7 ^{Aa}	87,9 $\pm$ 31,7 ^{Aa}	173 $\pm$ 77,5 ^{Aa}
72	109 $\pm$ 66,0 ^{Aa}	79,5 $\pm$ 43,4 ^{Aa}	102 $\pm$ 54,9 ^{Aa}
96	149 $\pm$ 94,0 ^{Aa}	95,6 $\pm$ 53,8 ^{Aa}	107 $\pm$ 37,0 ^{Aa}
120	125 $\pm$ 102 ^{Aa}	107 $\pm$ 50,9 ^{Aa}	120 $\pm$ 49,0 ^{Aa}
144	128 $\pm$ 80,6 ^{Aa}	95,4 $\pm$ 27,4 ^{Aa}	126 $\pm$ 90,4 ^{Aa}
168	129 $\pm$ 84,5 ^{Aa}	112 $\pm$ 48,5 ^{Aa}	132 $\pm$ 94,0 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

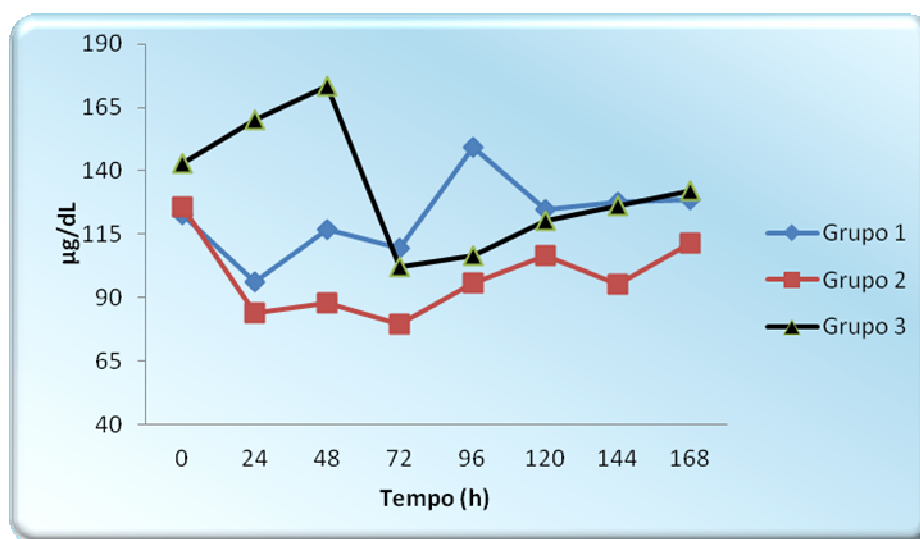


Figura 26. Variação da concentração sérica de ferro ($\mu\text{g/dL}$) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.3 Íons

Os resultados de concentração sérica de sódio, potássio e cálcio ionizado dos bezerros bubalinos do grupo controle (G1) ou dos grupos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin são mostrados nas Tabelas enumeradas de 22 a 24 e nas Figuras enumeradas de 27 a 29.

4.3.3.1 Concentração sérica de sódio

A concentração sérica de sódio foi constante durante o experimento, nos três grupos experimentais (Tabela 22 e Figura 27), estando dentro dos valores de referência para bezerros bovinos saudáveis da raça Holandesa do nascimento aos 30 dias de vida (BENESI et al., 2005). No entanto, a secreção de enterotoxinas pela *Salmonella* no trato intestinal pode induzir hipersecreção, aumentando a secreção de água, eletrólitos, bicarbonato e proteínas para o lúmen gastrointestinal. Desta forma, SILVA (2007) relatou diminuição da concentração de sódio em bezerros bovinos infectados experimentalmente com *S. Dublin*, atribuindo este fato à perda fecal deste eletrólito. Outros autores, como SANTOS et al. (2002b) e OCAL et al. (2006) também verificaram redução significativa da concentração sérica de sódio em bezerros após a inoculação oral com 10^{10} UFC de *Salmonella* Typhimurium e em bezerros com diarreia, respectivamente.

Tabela 22. Médias e desvios padrão da concentração sérica de sódio (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	138±2,07 ^{Aa}	140±5,06 ^{Aa}	138±1,82 ^{Aa}
24	140±4,36 ^{Aa}	139±4,23 ^{Aa}	139±5,27 ^{Aa}
48	137±1,51 ^{Aa}	137±2,71 ^{Aa}	138±2,07 ^{Aa}
72	139±2,59 ^{Aa}	136±3,88 ^{Aa}	135±2,07 ^{Aa}
96	138±2,38 ^{Aa}	134±3,03 ^{Ba}	136±3,01 ^{Ba}
120	136±1,63 ^{Aa}	137±4,96 ^{Aa}	136±5,47 ^{Aa}
144	140±3,27 ^{Aa}	139±5,82 ^{Aa}	136±3,35 ^{Aa}
168	138±1,26 ^{Aa}	137±2,26 ^{Aa}	136±3,01 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

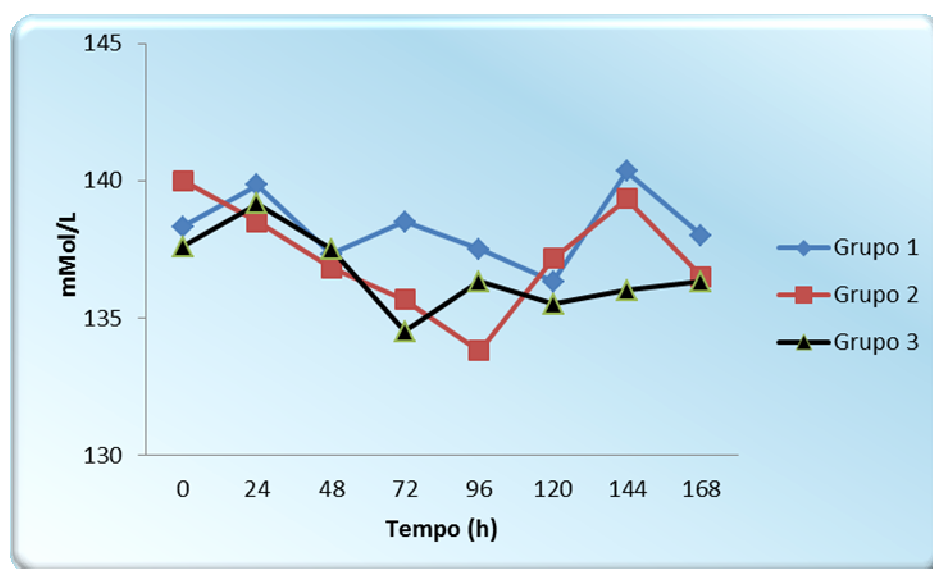


Figura 27. Variação da concentração sérica de sódio (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.3.2 Concentração sérica de potássio

A concentração sérica de potássio sofreu poucas oscilações durante o experimento, nos três grupos experimentais (Tabela 23 e Figura 28), estando dentro dos valores de referência para bezerros bovinos sadios da raça Holandesa do nascimento aos 30 dias de vida (BENESI et al., 2005). De forma semelhante, OCAL et al. (2006) também não constataram diferenças significativas da concentração de potássio em bezerros sadios e com diarreia. Já LEAL (2005) observou aumento das concentrações séricas de potássio em bezerros com diarreia, relacionando este achado à baixa concentração de sódio no meio extracelular e a mecanismos compensatórios da acidose metabólica, já que o potássio se desloca do fluido intracelular para o fluido extracelular.

Tabela 23. Médias e desvios padrão da concentração sérica de potássio (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	4,60±0,40 ^{Aa}	5,02±0,40 ^{Aa}	4,50±0,44 ^{Aa}
24	4,78±0,52 ^{Aa}	4,95±0,23 ^{Aa}	4,68±0,67 ^{Aa}
48	4,53±0,15 ^{Aa}	4,87±0,50 ^{Aa}	4,63±0,29 ^{Aa}
72	4,67±0,12 ^{Aa}	5,18±0,35 ^{Aa}	4,58±0,44 ^{Aa}
96	4,77±0,48 ^{Aa}	4,54±0,11 ^{Aa}	4,50±0,50 ^{Aa}
120	4,52±0,16 ^{Aa}	4,82±0,29 ^{Aa}	4,40±0,35 ^{Aa}
144	4,85±0,12 ^{Aa}	4,88±0,55 ^{Aa}	4,47±0,36 ^{Aa}
168	4,63±0,27 ^{Aa}	4,60±0,35 ^{Aa}	4,58±0,33 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

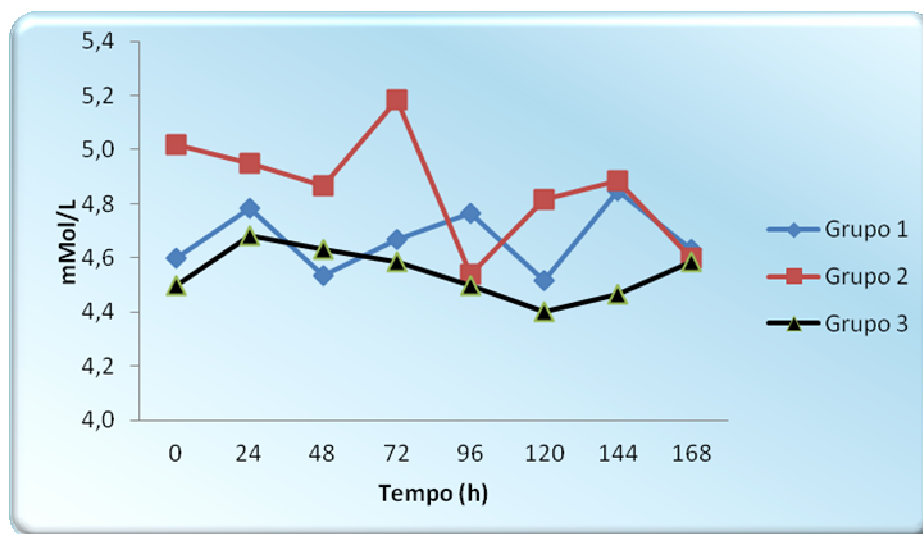


Figura 28. Variação da concentração sérica de potássio (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.3.3 Concentração sérica de cálcio ionizado

A concentração sérica de cálcio ionizado sofreu poucas oscilações durante o experimento, nos três grupos experimentais (Tabela 24 e Figura 29). De forma semelhante, OCAL et al. (2006) e SILVA (2007) também não verificaram diferenças expressivas das concentrações séricas de cálcio ionizado em bezerros bovinos com diarreia infectados com *Salmonella* Dublin.

Tabela 24. Médias e desvios padrão da concentração sérica de cálcio ionizado (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	0,42±0,06 ^{Aa}	0,44±0,10 ^{Aa}	0,61±0,11 ^{Ba}
24	0,38±0,05 ^{Aa}	0,47±0,11 ^{Aa}	0,61±0,12 ^{Ba}
48	0,44±0,04 ^{ABa}	0,43±0,10 ^{Aa}	0,56±0,08 ^{Ba}
72	0,45±0,07 ^{Aa}	0,44±0,08 ^{Aa}	0,58±0,08 ^{Ba}
96	0,44±0,04 ^{Aa}	0,48±0,08 ^{Aa}	0,59±0,07 ^{Ba}
120	0,44±0,04 ^{Aa}	0,51±0,08 ^{Aa}	0,68±0,07 ^{Ba}
144	0,42±0,03 ^{Ca}	0,54±0,12 ^{Aa}	0,68±0,05 ^{Ba}
168	0,42±0,05 ^{Aa}	0,53±0,12 ^{Aa}	0,71±0,09 ^{Ba}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

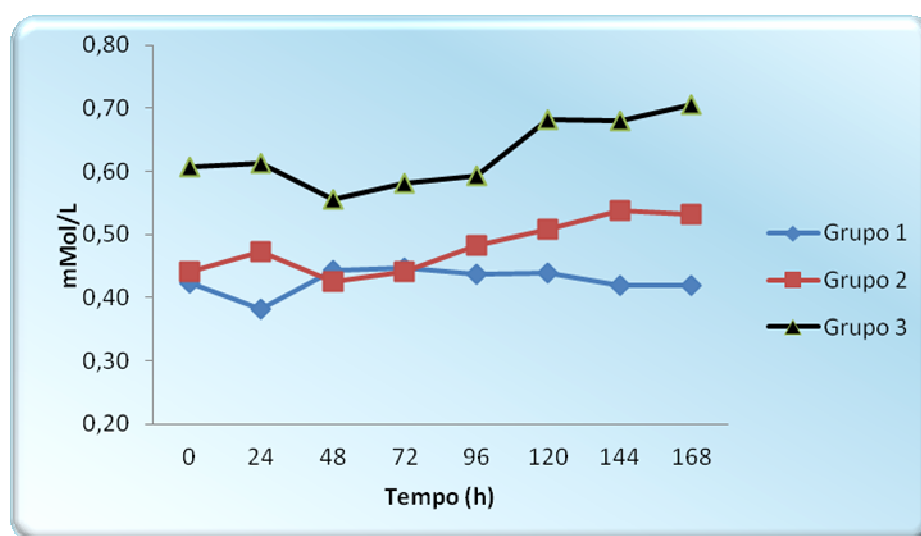


Figura 29. Variação da concentração sérica de cálcio ionizado (mMol/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.4 Catabólitos e enzimas

Os resultados das concentrações séricas de ureia, creatinina, bilirrubina total e direta, das atividades séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamiltransferase (GGT) e creatinacinase (CK) e das concentrações plasmáticas de glicose dos bezerros bubalinos do grupo controle (G1) ou dos grupos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin são mostrados nas Tabelas enumeradas de 25 a 32 e nas Figuras enumeradas de 30 a 37.

4.3.4.1 Concentração sérica de ureia e creatinina

Quanto às concentrações séricas de ureia, verificou-se aumento no decorrer do experimento, no G1 e no G2. Este aumento resultou, no G1, em diferenças significativas entre 0 hora e 168 horas PI. Já no G3, as concentrações foram constantes durante todo o período experimental (Tabela 25 e Figura 30). No entanto, observando-se as concentrações séricas de creatinina, nos três grupos experimentais, verificaram-se pequenas oscilações no decorrer do experimento (Tabela 26 e Figura 31), estando dentro dos valores de referência encontrados por FAGLIARI et al. (1998) em bezerros bubalinos sadios da raça Murrah do nascimento aos 45 dias de vida. Desta forma, embora quadros de desidratação possam levar a um aumento significativo das concentrações séricas de uréia e creatinina devido à inadequada perfusão renal (SANTOS et al., 2002b), os níveis de creatinina dentro da normalidade encontrados nos bezerros bubalinos, considerando-se que os bezerros não apresentaram desidratação no decorrer do experimento, sugerem que as alterações encontradas não estão relacionadas à *Salmonella* inoculada.

Tabela 25. Médias e desvios padrão da concentração sérica de ureia (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	18,2±6,35 ^{Aa}	28,9±15,5 ^{Aa}	26,0±7,51 ^{Aa}
24	21,5±7,20 ^{Aab}	30,3±14,2 ^{Aa}	26,4±8,98 ^{Aa}
48	26,6±5,25 ^{Aab}	31,2±12,3 ^{Aa}	22,8±8,21 ^{Aa}
72	30,9±7,19 ^{Aab}	34,0±10,0 ^{Aa}	27,1±7,75 ^{Aa}
96	31,1±10,5 ^{Aab}	40,2±7,58 ^{Aa}	26,4±5,52 ^{Aa}
120	31,8±12,2 ^{ABab}	41,5±11,6 ^{Aa}	25,6±8,02 ^{Ba}
144	33,5±11,6 ^{ABab}	40,8±11,6 ^{Aa}	23,8±7,62 ^{Ba}
168	36,5±13,6 ^{Ab}	36,3±13,8 ^{Aa}	23,2±8,87 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

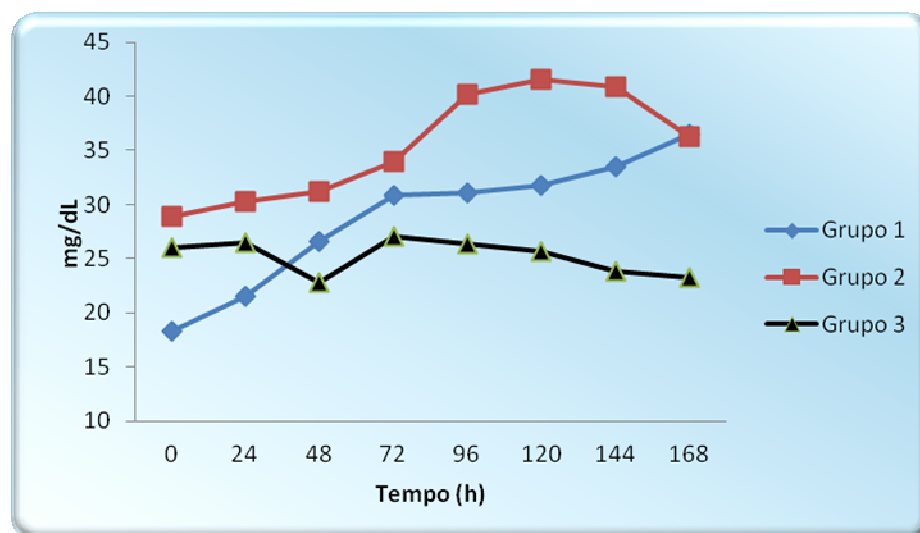


Figura 30. Variação da concentração sérica de ureia (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tabela 26. Médias e desvios padrão da concentração sérica de creatinina (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	1,45±0,22 ^{Aa}	1,45±0,13 ^{Aa}	1,44±0,22 ^{Aa}
24	1,43±0,20 ^{Aa}	1,47±0,11 ^{Aa}	1,46±0,22 ^{Aa}
48	1,47±0,21 ^{Aa}	1,43±0,12 ^{Aa}	1,49±0,24 ^{Aa}
72	1,42±0,17 ^{Aa}	1,61±0,15 ^{Aa}	1,63±0,24 ^{Aa}
96	1,44±0,18 ^{Aa}	1,48±0,10 ^{Aa}	1,62±0,38 ^{Aa}
120	1,51±0,27 ^{Aa}	1,50±0,17 ^{Aa}	1,52±0,35 ^{Aa}
144	1,58±0,35 ^{Aa}	1,41±0,17 ^{Aa}	1,44±0,34 ^{Aa}
168	1,60±0,35 ^{Aa}	1,38±0,19 ^{Aa}	1,48±0,28 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

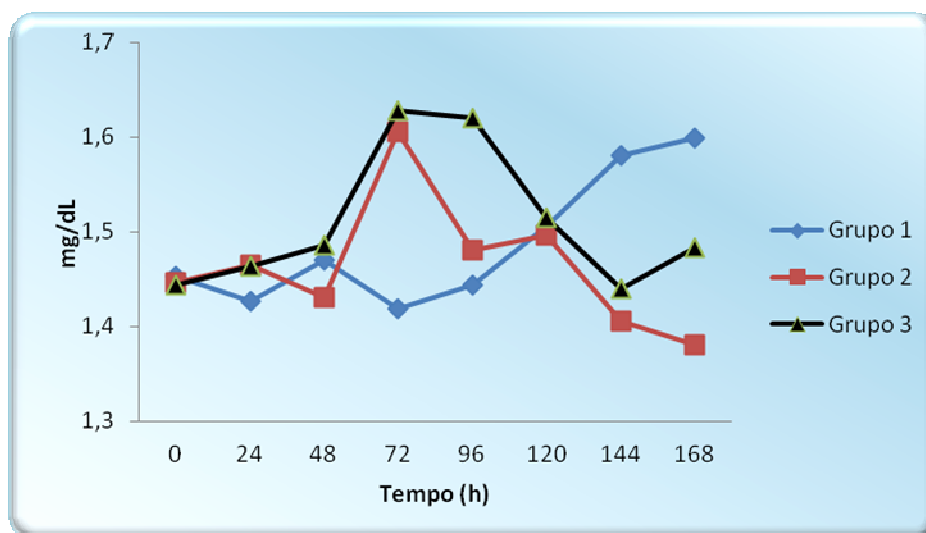


Figura 31. Variação da concentração sérica de creatinina (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.4.2 Concentração sérica de bilirrubina total e direta

De forma geral, o G1 e o G2 apresentaram diminuição dos teores séricos de bilirrubina total e direta no decorrer do experimento. Esta queda resultou, no G1, em diferenças significativas entre 0 hora e 120, 144 e 168 horas PI e entre 24 horas PI e 72, 96, 120, 144 e 168 horas PI para as concentrações séricas de bilirrubina total (Tabelas 27 e 28 e Figuras 32 e 33).

Já os animais do G3 apresentaram valores constantes de bilirrubina total no decorrer de todo o experimento. Em relação à bilirrubina direta neste grupo, também se observaram valores constantes no decorrer da infecção, sendo que às 120 e 168 horas PI, verificou-se leve queda e às 144 horas PI leve aumento das concentrações séricas da variável em questão, sem que houvesse diferenças.

FAGLIARI et al. (1998) observaram maiores concentrações de bilirrubina total ao nascimento e decréscimo gradativo em função da idade, em bezerros sadios do nascimento aos 45 dias de vida. BENESI et al. (2003) também verificaram redução fisiológica dos valores da concentração de bilirrubina total, conjugada e livre em bezerras sadias do nascimento até os 30 dias de idade. Desta forma, a tendência à queda da bilirrubina total e direta nos bezerros bubalinos, provavelmente ocorre devido a mudanças na idade.

Tabela 27. Médias e desvios padrão da concentração sérica de bilirrubina total (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	1,27±0,39 ^{Aab}	1,17±0,42 ^{Aa}	0,55±0,31 ^{Ba}
24	1,44±0,56 ^{Aa}	1,24±0,43 ^{Aa}	0,51±0,24 ^{Ba}
48	1,20±0,46 ^{Aab}	0,98±0,35 ^{Aa}	0,54±0,21 ^{Ba}
72	0,94±0,40 ^{ABbc}	1,25±0,61 ^{Aa}	0,56±0,28 ^{Ba}
96	0,89±0,26 ^{Abc}	1,12±0,42 ^{Aa}	0,47±0,15 ^{Ba}
120	0,75±0,20 ^{ABc}	1,02±0,43 ^{Aa}	0,48±0,19 ^{Ba}
144	0,77±0,24 ^{ABc}	0,95±0,44 ^{Aa}	0,53±0,28 ^{Ba}
168	0,74±0,27 ^{Ac}	0,89±0,45 ^{Aa}	0,49±0,20 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

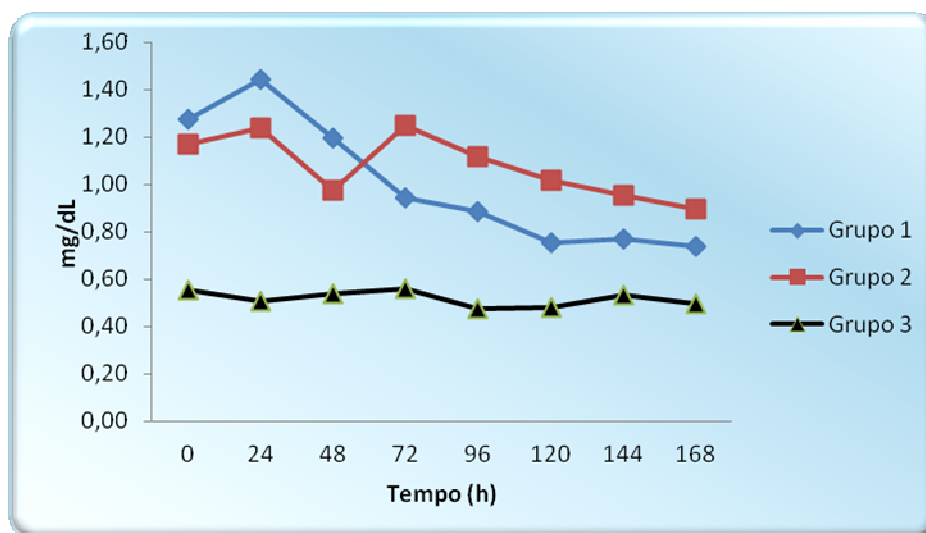


Figura 32. Variação da concentração sérica de bilirrubina total (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental.

Tabela 28. Médias e desvios padrão da concentração sérica de bilirrubina direta (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	0,40±0,10 ^{Aa}	0,37±0,12 ^{ABa}	0,23±0,07 ^{Ba}
24	0,37±0,08 ^{Aa}	0,40±0,13 ^{Aa}	0,21±0,08 ^{Ba}
48	0,36±0,14 ^{Aa}	0,32±0,14 ^{ABa}	0,21±0,06 ^{Ba}
72	0,34±0,13 ^{Aa}	0,33±0,10 ^{Aa}	0,24±0,10 ^{Aa}
96	0,37±0,13 ^{Aa}	0,34±0,08 ^{Aa}	0,23±0,06 ^{Aa}
120	0,31±0,11 ^{Aa}	0,29±0,10 ^{Aa}	0,18±0,06 ^{Aa}
144	0,30±0,10 ^{Aa}	0,26±0,09 ^{Aa}	0,26±0,14 ^{Aa}
168	0,31±0,10 ^{Aa}	0,26±0,07 ^{Aa}	0,19±0,03 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

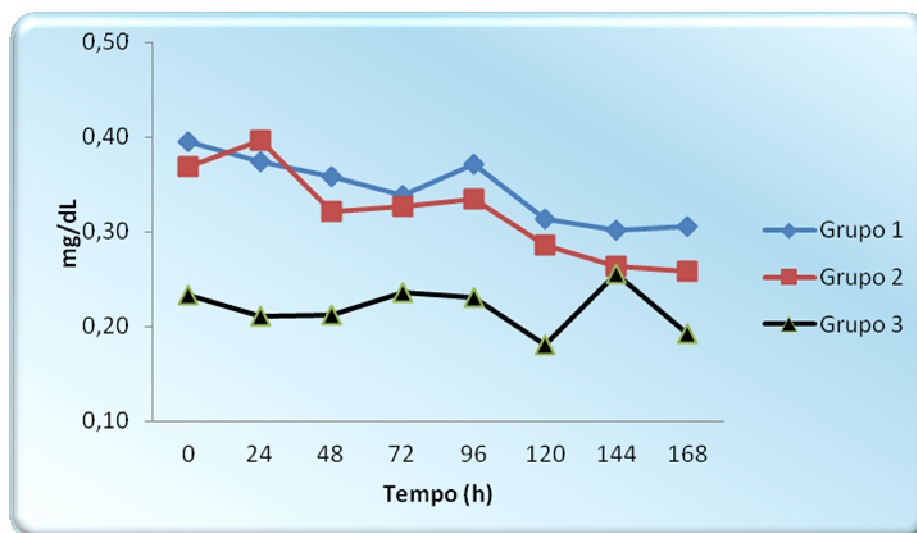


Figura 33. Variação da concentração sérica de bilirrubina direta (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.4.3 Atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST)

No grupo controle (G1) verificou-se diminuição da atividade sérica de AST no decorrer do experimento. Já no G2 e no G3, observaram-se oscilações da atividade sérica de AST no decorrer dos momentos (Tabela 29 e Figura 34). No entanto, essas variações não resultaram em diferenças significativas, sendo que não foram observados aumentos expressivos que pudessem caracterizar lesão hepática. Da mesma forma, SILVA et al. (2007) e SANTOS et al. (2002b) não observaram alterações significativas da atividade da enzima AST nos bezerros infectados experimentalmente com *S. Dublin* e *S. Typhimurium*, respectivamente.

Tabela 29. Médias e desvios padrão da atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	123±25,1 ^{Aa}	110±41,5 ^{Aa}	99,1±31,5 ^{Aa}
24	127±27,3 ^{Aa}	133±38,2 ^{Aa}	92,5±24,3 ^{Aa}
48	127±28,2 ^{Aa}	119±52,3 ^{Aa}	93,4±21,6 ^{Aa}
72	118±22,6 ^{Aa}	95,6±16,7 ^{Aa}	115±43,1 ^{Aa}
96	107±18,1 ^{Aa}	105±30,9 ^{Aa}	92,5±23,4 ^{Aa}
120	99,2±16,1 ^{Aa}	107±32,9 ^{Aa}	100±31,7 ^{Aa}
144	94,6±14,7 ^{Aa}	112±34,9 ^{Aa}	100±29,7 ^{Aa}
168	94,1±10,4 ^{Aa}	123±61,5 ^{Aa}	120±47,9 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

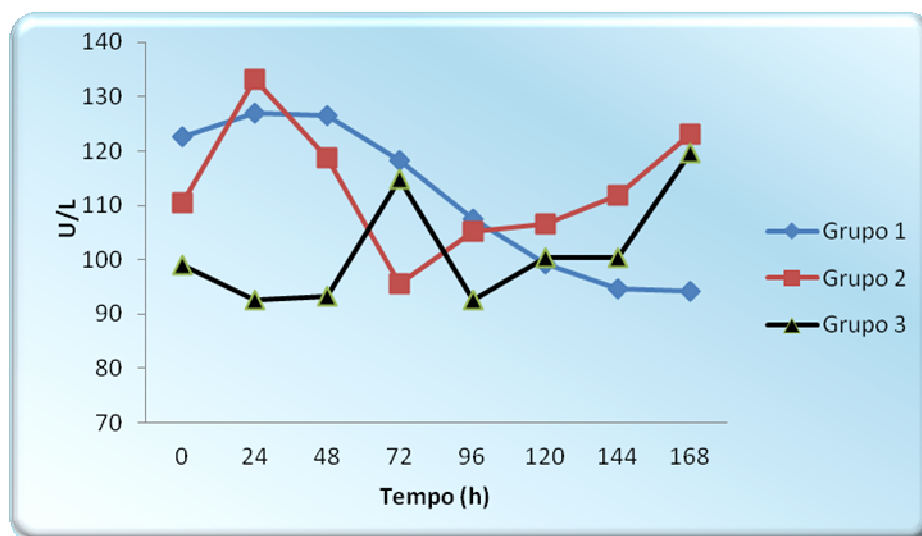


Figura 34. Variação da atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.4.4 Atividade sérica de gamaglutamiltransferase (GGT)

No G1 e G2, verificou-se declínio da atividade sérica de GGT no decorrer da infecção, levando a diferenças significativas, em ambos os grupos, dos momentos iniciais (às 0 e 24 horas PI) em relação aos momentos finais da infecção (às 120, 144 e 168 horas PI). No G3, a atividade sérica de GGT foi estável durante todo o experimento, não apresentando diferenças significativas entre os momentos (Tabela 30 e Figura 35).

Semelhante ao encontrado nos bezerros bubalinos do G1 e do G2, FAGLIARI et al. (1998) também observaram maiores concentrações de GGT ao nascimento, verificando acentuado decréscimo em função da idade, em bezerros bubalinos sadios entre 0 e 45 dias de vida. SILVA (2007), também observou queda da atividade sérica de GGT, tanto no grupo infectado com *S. Dublin* quanto no grupo controle, o que sugere que a diminuição da atividade sérica da GGT ao longo do período experimental

pode ser explicada pela degradação da GGT de origem colostrar (THOMPSON & PAULI, 1981).

Tabela 30. Médias e desvios padrão da atividade sérica de gamaglutamiltransferase (GGT) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	101±122 ^{Aa}	61,2±37,5 ^{Aa}	19,8±7,01 ^{Ba}
24	91,8±102 ^{Aa}	54,8±30,8 ^{Aab}	19,8±7,01 ^{Ba}
48	82,9±87,8 ^{Aab}	45,9±25,6 ^{Aabc}	19,1±6,40 ^{Ba}
72	73,9±80,7 ^{Aab}	38,3±19,9 ^{Aabc}	19,1±8,02 ^{Ba}
96	63,8±63,4 ^{Aab}	35,7±12,5 ^{Aabc}	17,9±3,95 ^{Ba}
120	59,9±61,5 ^{Aab}	31,9±10,2 ^{Abc}	16,6±3,12 ^{Ba}
144	54,8±60,3 ^{Ab}	29,3±7,52 ^{Ac}	16,6±5,76 ^{Ba}
168	51,0±51,1 ^{Ab}	27,4±7,02 ^{ABc}	29,3±31,1 ^{Ba}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

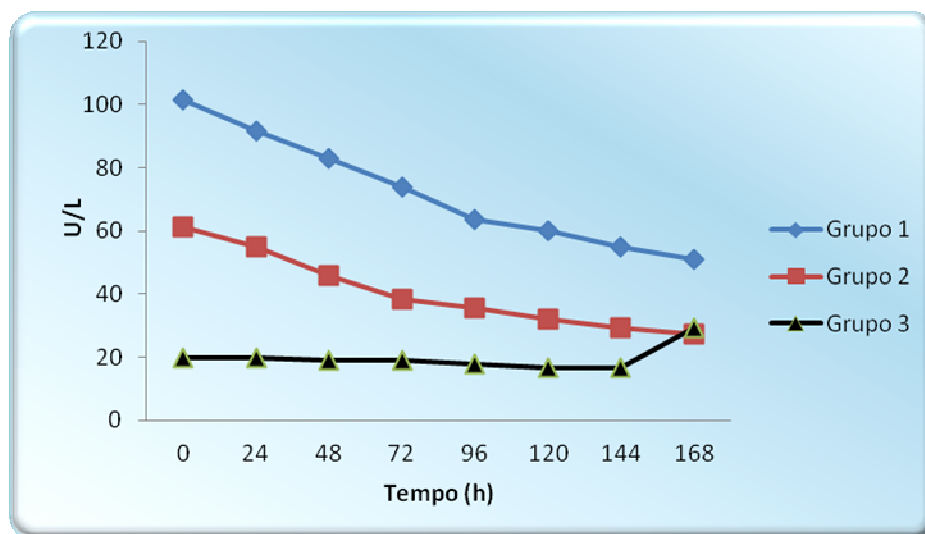


Figura 35. Variação da atividade sérica de gamaglutamiltransferase (GGT) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.4.5 Atividade sérica de creatinacina (CK)

Em relação à CK, observou-se atividade sérica elevada no G1 no momento antes da infecção. No entanto, às 24 horas PI, a atividade sérica dessa enzima se estabilizou até o final do experimento. No G2, a atividade sérica da CK foi estável durante todo o experimento. No G3, observou-se elevação da atividade sérica dessa enzima entre 96 e 168 horas PI (Tabela 31 e Figura 36). Assim sendo, verificou-se que os picos de atividade sérica de CK ocorreram no início do experimento (G1) e nos momentos após o início do tratamento com florfenicol (G3), o que sugere que esteja relacionado ao estresse devido ao início do experimento (G1) e ao estresse devido à contenção no momento da aplicação do medicamento (G3) e também à lesão causada devido à aplicação intramuscular das duas doses do medicamento (G3).

Tabela 31. Médias e desvios padrão da atividade sérica de creatinacina (CK) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	403±328 ^{Aa}	177±57,7 ^{Aa}	267±71,0 ^{Aa}
24	194±71,3 ^{Aa}	159±66,4 ^{Aa}	278±60,4 ^{Aa}
48	176±65,6 ^{Aa}	151±42,2 ^{Aa}	230±49,7 ^{Aa}
72	180±67,6 ^{Aa}	140±50,3 ^{Aa}	223±60,7 ^{Aa}
96	162±45,2 ^{Aa}	141±73,2 ^{Aa}	435±310 ^{Ba}
120	180±40,7 ^{Aa}	177±80,4 ^{Aa}	567±441 ^{Ba}
144	176±22,6 ^{Aa}	177±57,1 ^{Aa}	445±174 ^{Ba}
168	185±26,5 ^{Aa}	182±57,3 ^{Aa}	500±297 ^{Ba}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

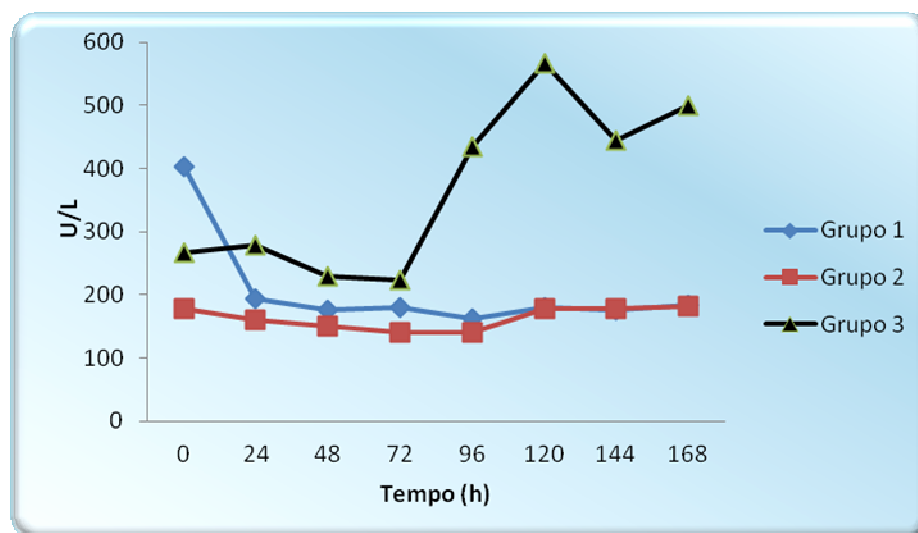


Figura 36. Variação da atividade sérica de creatinacina (CK) (U/L) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.3.4.6 Concentração plasmática de glicose

Foram observadas pequenas oscilações nas concentrações plasmáticas de glicose no decorrer do experimento, nos três grupos experimentais. (Tabela 32 e Figura 37). De forma diferente, outros autores, como SANTOS (2002b) e SILVA (2007) observaram redução na concentração de glicose nos bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Dublin, respectivamente.

Tabela 32. Médias e desvios padrão da concentração plasmática de glicose (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	92,2±24,6 ^{Aa}	73,1±14,0 ^{Aa}	74,7±13,3 ^{Aa}
24	84,5±17,2 ^{Aa}	73,0±8,04 ^{Aa}	77,3±13,5 ^{Aa}
48	85,7±17,1 ^{Aa}	73,8±13,6 ^{Aa}	76,5±13,3 ^{Aa}
72	86,7±14,8 ^{Aa}	63,8±13,3 ^{Aa}	71,0±11,6 ^{Aa}
96	94,1±13,2 ^{Aa}	69,3±14,5 ^{Aa}	69,2±16,3 ^{Aa}
120	96,2±19,3 ^{Aa}	77,1±18,9 ^{Aa}	88,0±28,0 ^{Aa}
144	86,9±23,8 ^{Aa}	72,2±16,1 ^{Aa}	84,6±33,9 ^{Aa}
168	86,3±22,2 ^{Aa}	84,3±19,0 ^{Aa}	88,8±23,8 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

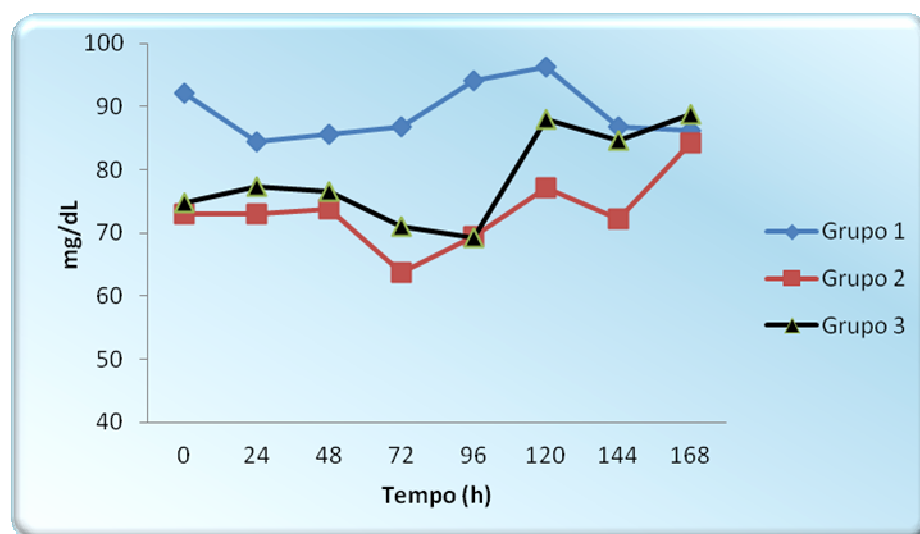


Figura 37. Variação da concentração plasmática de glicose (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental.

4.4 Proteinograma sérico e concentração plasmática de fibrinogênio

4.4.1 Proteinograma sérico

O proteinograma sérico obtido em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) possibilitou a detecção de até 28 proteínas, cujos pesos moleculares variaram de aproximadamente 15.000 Da a 281.000 Da. Destas, oito proteínas foram submetidas às análises estatísticas em razão da sua importância diagnóstica, sendo que os resultados obtidos mostraram alterações significativas dos níveis séricos de ceruloplasmina e haptoglobina e variações menores dos níveis séricos de IgG (Tabela 33 e Figuras 38 e 39).

As concentrações séricas de proteína total apresentaram ínfimas variações ao longo do período experimental em todos os grupos, estando próximas aos valores de referência encontrados por FAGLIARI et al. (1998) em bezerros bubalinos sadios da raça Murrah do nascimento aos 45 dias de vida (Tabela 33).

Em relação à ceruloplasmina, os níveis séricos permaneceram estáveis nos bezerros do grupo controle durante todo o experimento. De forma diferente, observou-se, no G2, aumento de até 2,3 vezes a partir de 120 horas PI, quando comparados aos níveis encontrados no momento antes da inoculação (0 hora), sendo que os momentos de maiores concentrações de ceruloplasmina no G2 (às 120, 144 e 168 horas PI) coincidiram com os momentos de maiores escores de consistência das fezes (maior ocorrência de diarreias graves).

A ceruloplasmina, assim como a haptoglobina, a transferrina, a glicoproteína ácida e o fibrinogênio são considerados proteínas de fase aguda (PFA) positivas, isto é, suas concentrações tendem a aumentar frente ao estímulo inflamatório (THOMAS, 2000), sendo indicadores confiáveis de doença inflamatória aguda ou ativa, podendo ser indicadores mais sensíveis do que o leucograma (TAYLOR, 2000). Assim sendo, observou-se, nos bezerros bubalinos do G2, que os níveis séricos de ceruloplasmina aumentaram às 60 horas após o início dos sinais clínicos. Outros autores como SILVA et al. (2011), estudando bezerros bovinos inoculados com *S. Dublin* e FAGLIARI et al. (2007), estudando casos de fotossensibilização em bovinos, observaram aumento de 110% e 309 % nos níveis séricos de ceruloplasmina às 24 e 36 horas após o início dos sinais clínicos, respectivamente.

Em relação ao G3, embora observados quadros de diarreia a partir de 24 horas PI, que se agravaram no decorrer do experimento e principalmente após o tratamento, não foram observadas alterações das concentrações séricas de ceruloplasmina no decorrer do experimento.

Em relação à haptoglobina, observou-se aumento das concentrações séricas no grupo controle no decorrer do experimento. No entanto, os valores estavam dentro dos encontrados por FAGLIARI et al. (2006) em seus estudos com proteinograma sérico de bezerros bovinos recém-nascidos sadios da raça Holandesa.

No G2, observou-se aumento dos níveis séricos de haptoglobina no decorrer do experimento, sendo este aumento mais expressivo a partir de 120 horas PI (mesmo momento do início de aumento da ceruloplasmina), ou seja, às 60 horas após o início dos sinais clínicos. Neste momento, os níveis séricos de haptoglobina foram 4,3 vezes

maiores que os encontrados no momento antes da inoculação (0 hora). Os momentos de maiores concentrações de haptoglobina no G2 (às 120, 144 e 168 horas PI) também coincidiram com os momentos de maiores escores de consistência das fezes (maior ocorrência de diarreias graves). SILVA et al. (2011), também observaram aumento significativo dos níveis séricos da haptoglobina em bezerros bovinos inoculados com *S. Dublin*, também a partir de 60 horas após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos. Já DEIGNAN et al. (2000), utilizando ensaio imunoenzimático, verificaram aumento dos níveis séricos de haptoglobina três dias após a infecção oral de bezerros com *Salmonella* e observaram correlação da gravidade da infecção com os níveis séricos de haptoglobina. Adicionalmente, FAGLIARI et al. (2007), estudando bovinos acometidos por fotossensibilização, também observaram aumento significativo dos níveis séricos de haptoglobina, destacando que esta proteína foi a PFA com aumento mais relevante em relação a outras PFA avaliadas, entre elas a ceruloplasmina e a α_1 -glicoproteína ácida.

Em relação ao G3, também se verificou aumento dos teores séricos de haptoglobina, às 72 horas PI (às 48 horas após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos), sendo que, nos momentos posteriores ao tratamento, os valores voltaram a cair, chegando próximos aos valores encontrados em 0 hora. Desta forma, embora observados quadros de diarreia que se agravaram no decorrer do experimento e principalmente após o tratamento, os níveis de haptoglobina não continuaram aumentados até o final do experimento.

A glicoproteína ácida, transferrina, albumina e proteína de 23.000 Da, sofreram pequenas oscilações no decorrer da infecção. No entanto, autores como FAGLIARI et al. (2003) e ÁVILA et al. (2009) relataram aumento da glicoproteína ácida em seus experimentos. SILVA et al. (2011), também relataram aumento da glicoproteína ácida, além da diminuição da albumina sérica.

Quanto à concentração das imunoglobulinas, verificou-se, mesmo de forma não significativa, diminuição dos níveis séricos de IgG em todos os grupos avaliados, enquanto que os níveis séricos de IgA pouco oscilaram. Estes resultados provavelmente estão relacionados à idade dos animais, pois segundo PERINO & WITTUN (1995), os níveis de IgG colostrar presentes no soro de bezerros bovinos

declinam lentamente e alcançam valores mínimos por volta dos 60 dias após o nascimento.

Tabela 33. Médias e desvios padrão das concentrações sérica de proteína total (g/dL) e das frações protéicas (mg/dL), obtidas em gel de poliácrilamida (SDS-PAGE), de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10⁸ UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Proteína e grupo	Tempo (h) após a inoculação com <i>Salmonella</i> Dublin							
	0	24	48	72	96	120	144	168
Proteína Total								
G1	7,92±0,90 ^{Aa}	8,02±0,88 ^{Aa}	7,96±0,92 ^{Aa}	7,90±1,09 ^{Aa}	7,63±0,79 ^{Aa}	7,61±0,92 ^{ABa}	7,67±0,94 ^{ABa}	7,51±0,84 ^{Aa}
G2	7,76±1,71 ^{Aa}	7,90±1,38 ^{ABa}	7,99±1,75 ^{Aa}	7,69±1,74 ^{Aa}	7,74±1,76 ^{Aa}	7,99±1,73 ^{Aa}	7,87±2,04 ^{Aa}	7,62±1,51 ^{Aa}
G3	7,26±0,65 ^{Aa}	7,21±0,69 ^{Ba}	7,06±0,50 ^{Ba}	7,18±0,77 ^{Aa}	7,03±0,60 ^{Aa}	7,12±0,75 ^{Ba}	7,12±0,92 ^{Ba}	6,96±0,87 ^{Aa}
Imunoglobulina A								
G1	392±135 ^{Aa}	454±173 ^{Aa}	433±144 ^{Aa}	461±241 ^{Aa}	465±157 ^{Aa}	432±143 ^{Aa}	404±143 ^{Aa}	437±123 ^{Aa}
G2	478±144 ^{Aa}	494±95,1 ^{Aa}	502±107 ^{Aa}	525±197 ^{Aa}	515±196 ^{Aa}	517±131 ^{Aa}	462±117 ^{Aa}	493±139 ^{Aa}
G3	471±176 ^{Aa}	455±166 ^{Aa}	449±176 ^{Aa}	432±144 ^{Aa}	439±155 ^{Aa}	451±141 ^{Aa}	450±147 ^{Aa}	426±141 ^{Aa}
Ceruloplasmina								
G1	29,5±17,8 ^{Aa}	38,1±26,6 ^{Aa}	31,0±13,6 ^{Aa}	32,8±14,3 ^{Aa}	29,7±18,5 ^{Aa}	35,4±18,5 ^{Aa}	37,5±16,8 ^{Aa}	41,1±20,2 ^{Aa}
G2	57,2±33,0 ^{ACa}	59,3±21,3 ^{ABa}	81,2±24,3 ^{BCac}	74,3±26,2 ^{ABa}	69,6±29,0 ^{ABa}	133±48,3 ^{BCbd}	127±53,9 ^{BCbd}	118±32,9 ^{BCcd}
G3	103±38,2 ^{Ba}	92,0±26,1 ^{Ba}	86,3±16,2 ^{Ba}	99,8±28,7 ^{Ba}	111±17,0 ^{Ba}	104±19,1 ^{Ba}	107±23,1 ^{Ba}	107±36,3 ^{Ba}
Transferrina								
G1	462±63,3 ^{Aa}	463±92,4 ^{Aa}	451±113 ^{Aa}	412±54,2 ^{Aa}	415±56,6 ^{Aa}	409±59,6 ^{Aa}	414±77,8 ^{Aa}	375±67,9 ^{Aa}
G2	378±161 ^{Aa}	420±160 ^{Aa}	352±149 ^{Ba}	338±150 ^{Ba}	321±120 ^{Ba}	342±137 ^{Aa}	351±137 ^{Aa}	334±79,9 ^{Aa}
G3	426±81,1 ^{Aa}	414±94,6 ^{Aa}	391±73,1 ^{ABa}	365±67,3 ^{ABa}	373±79,6 ^{ABa}	382±81,3 ^{Aa}	389±78,6 ^{Aa}	423±88,7 ^{Aa}
Albumina								
G1	4.840±404 ^{Aa}	4.869±337 ^{Aa}	4.921±521 ^{Aa}	4.928±547 ^{Aa}	4.705±372 ^{Aa}	4.815±439 ^{Aa}	4.844±505 ^{Aa}	4.763±506 ^{Aa}
G2	4.377±981 ^{ABa}	4.435±641 ^{ABa}	4.504±816 ^{ABa}	4.112±852 ^{Ba}	4.352±871 ^{ABa}	4.352±790 ^{ABa}	4.496±1.071 ^{ABa}	4.090±884 ^{Ba}
G3	4.127±302 ^{Ba}	4.186±257 ^{Ba}	4.105±246 ^{Ba}	4.182±330 ^{Ba}	4.010±254 ^{Ba}	4.083±436 ^{Ba}	4.121±541 ^{Ba}	4.078±499 ^{Ba}
Imunoglobulina G								
G1	1.895±733 ^{Aa}	1.910±804 ^{Aa}	1.827±719 ^{Aa}	1.760±653 ^{ABa}	1.707±635 ^{Aa}	1.576±651 ^{Aa}	1.577±690 ^{Aa}	1.534±639 ^{ABa}
G2	1.961±999 ^{Aa}	1.965±974 ^{Aa}	1.963±1.045 ^{Aa}	2.012±932 ^{Aa}	1.890±934 ^{Aa}	1.858±856 ^{Aa}	1.728±914 ^{Aa}	1.772±571 ^{Aa}
G3	1.512±468 ^{Aa}	1.491±459 ^{Aa}	1.420±329 ^{Aa}	1.378±287 ^{Ba}	1.397±387 ^{Aa}	1.367±293 ^{Aa}	1.342±327 ^{Aa}	1.263±234 ^{Ba}

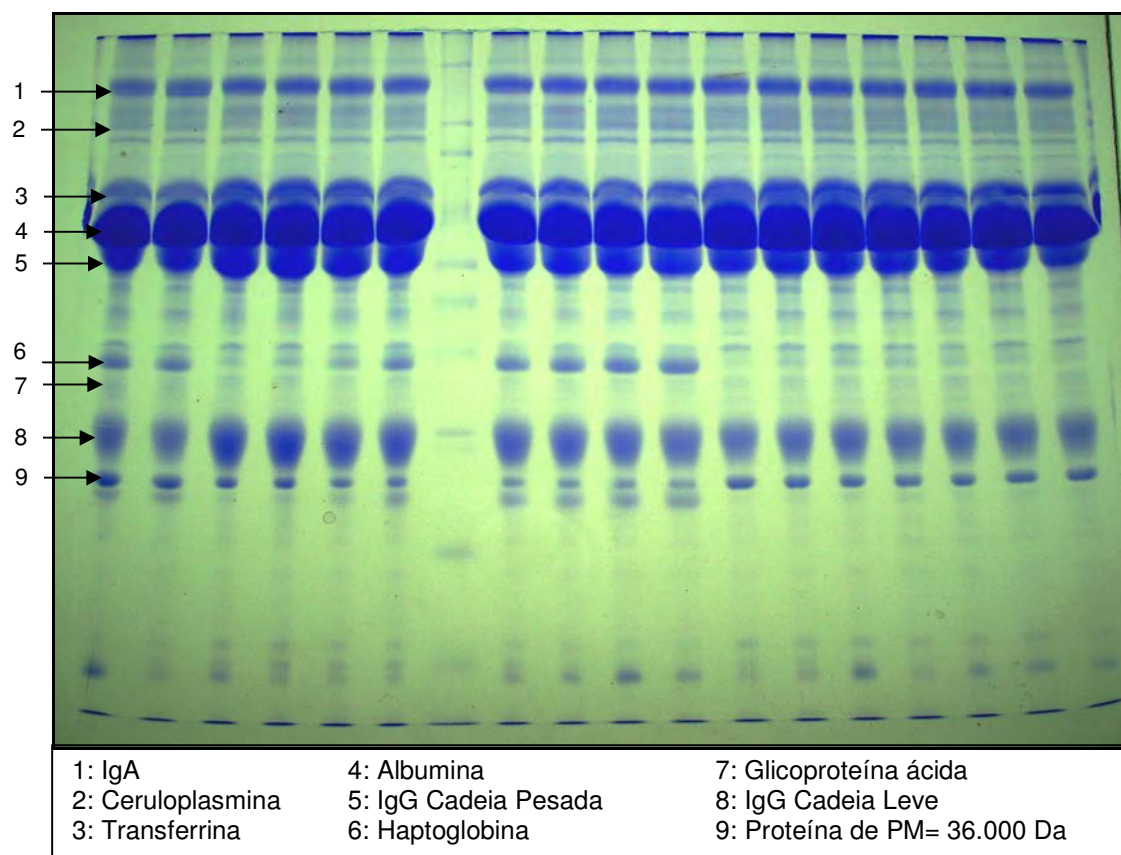


Figura 38. Exemplo de corrida eletroforética de amostras de soro de bezerros bubalinos infectado experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin em gel de poliacrilamida corado com azul de comassie.

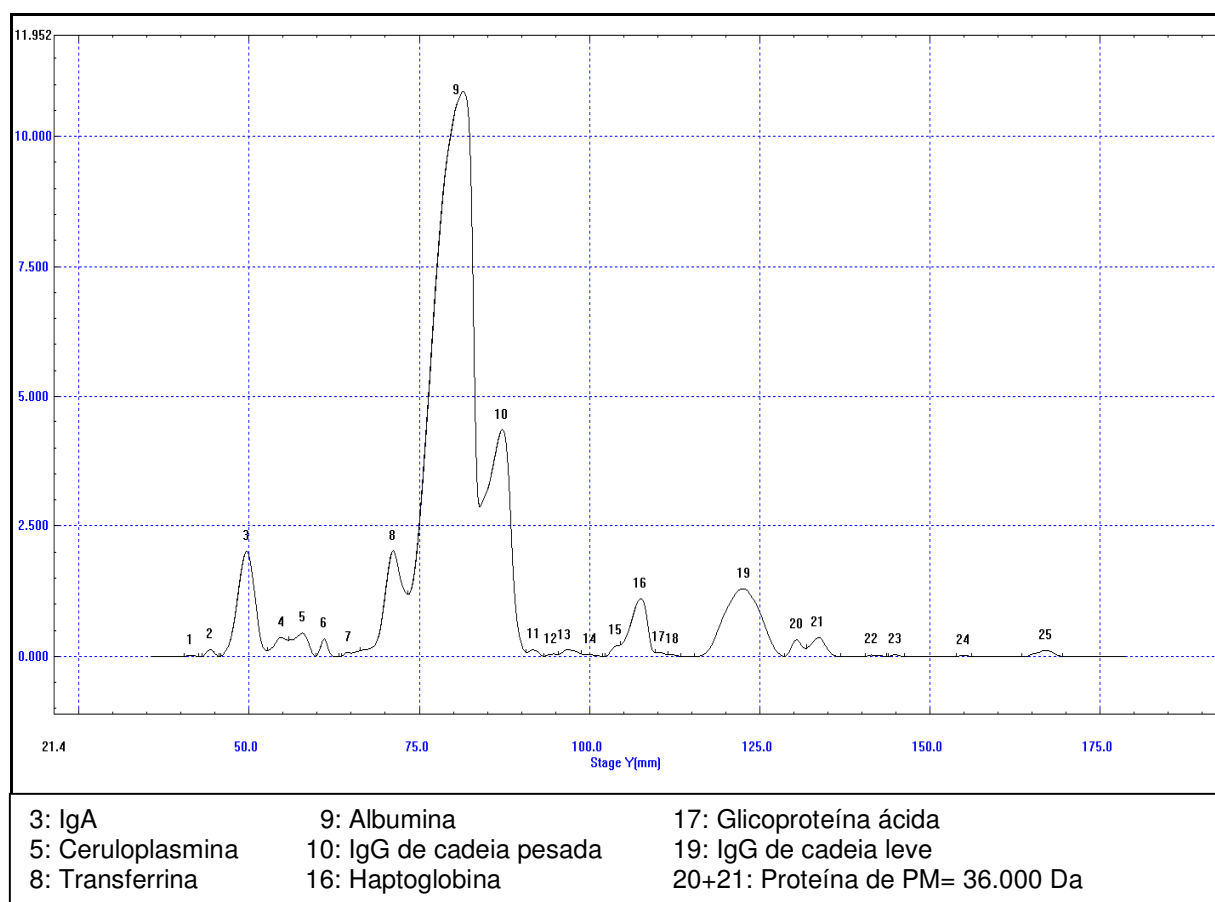


Figura 39. Traçado eletroforético do proteinograma sérico de bezerro infectado experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin.

4.4.2 Concentração plasmática de fibrinogênio

As concentrações plasmáticas de fibrinogênio sofreram oscilações no grupo controle (G1), tendendo a um aumento no decorrer do experimento. No entanto, este aumento ocorreu de forma pouco expressiva, sempre se mantendo em valores abaixo de 800 mg/dl (Tabela 34 e Figura 40), assim como observado por ÁVILA (2009) e SILVA et al. (2010a) com bezerros bovinos do grupos controle.

No G2, verificou-se um aumento expressivo da concentração plasmática de fibrinogênio de 96 a 168 horas PI, atingindo o pico às 120 horas PI. Este aumento resultou em algumas diferenças significativas entre os momentos iniciais (às 0 hora e 24 horas PI) e mais avançados da infecção (96 a 168 horas PI). Desta

forma, nota-se que o fibrinogênio, neste grupo, foi um indicador mais sensível de resposta aguda que a ceruloplasmina e a haptoglobina, pois sua elevação iniciou-se 24 horas antes da ceruloplasmina (às 120 horas PI) e da haptoglobina (às 120 horas PI). No entanto, o momento de aumento mais expressivo, às 120 horas PI, coincidiu com o aumento inicial das outras duas proteínas.

O fibrinogênio é a proteína mais empregada para avaliação da reação de fase aguda em ruminantes, devido à facilidade de mensuração e rapidez na obtenção dos resultados. Ademais, o fibrinogênio é considerado um importante indicador da resposta de fase aguda nos bovinos (GODSON et al., 1995). Outros autores, como ÁVILA (2009) e SILVA et al. (2010a), trabalhando com bezerros bovinos inoculados com *S. Typhimurium* e *S. Dublin* também verificaram aumento expressivo das concentrações séricas de fibrinogênio às 120 e às 48 horas PI, respectivamente.

No G3, houve aumento da concentração plasmática de fibrinogênio, às 72 e às 96 horas PI, sendo que, nos momentos após o tratamento, os valores voltaram a sofrer uma redução, assim como os achados para a haptoglobina. O pico de fibrinogênio ocorreu às 72 horas PI, mesmo momento do início do aumento das concentrações séricas de haptoglobina e queda das concentrações séricas de ferro neste grupo.

Tabela 34. Médias e desvios padrão da concentração plasmática de fibrinogênio (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

Tempo (h)	Grupos		
	G1	G2	G3
0	633±197 ^{Aa}	467±163 ^{Aac}	733±163 ^{Aa}
24	500±210 ^{ABa}	400±179 ^{Ba}	783±117 ^{Aa}
48	567±151 ^{Aa}	567±151 ^{Aacd}	800±167 ^{Aa}
72	667±273 ^{Aa}	767±266 ^{ABce}	1.000±219 ^{Ba}
96	633±81,6 ^{Aa}	833±151 ^{ABbde}	983±147 ^{Ba}
120	500±167 ^{Aa}	1.000±179 ^{Bbe}	850±122 ^{Ba}
144	733±103 ^{Aa}	767±151 ^{Ace}	833±81,6 ^{Aa}
168	733±103 ^{Aa}	950±217 ^{Abe}	800±110 ^{Aa}

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

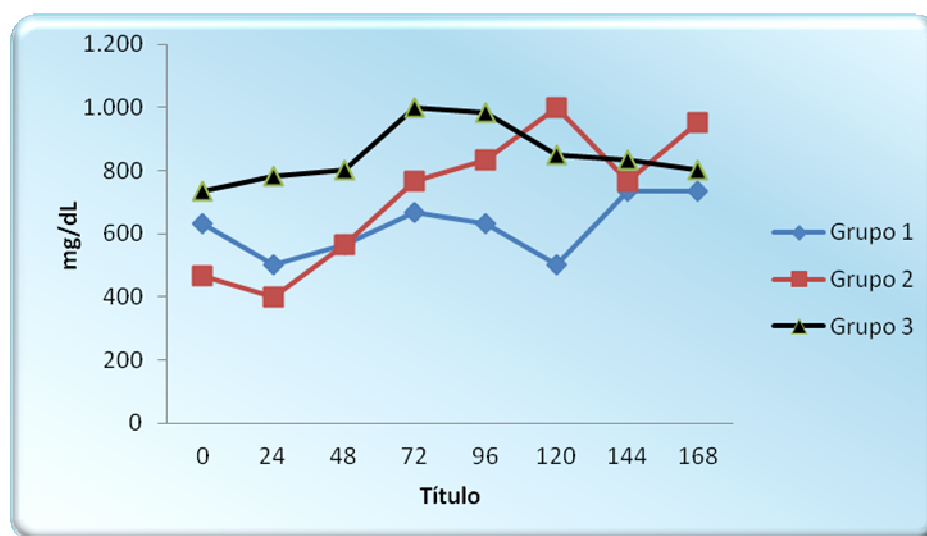


Figura 40. Variação da concentração plasmática de fibrinogênio (mg/dL) de bezerros bubalinos do grupo controle (G1), bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2) e bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *S. Dublin* e submetidos a tratamento com florfenicol (G3) antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção.

4.5 Exames para identificação de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais

4.5.1 Isolamento de *Salmonella* Dublin

Não foi isolada *Salmonella* em nenhum dos momentos, no grupo dos animais controle (G1). Nos grupos infectados, foi possível realizar, em pelo menos um dos três caldos de enriquecimento utilizados, o isolamento de *Salmonella* em todos os bezerros inoculados, sendo a excreção de forma contínua ou intermitente (Tabelas 35 e 36).

No G2, foi possível realizar o isolamento bacteriológico a partir de 24 horas PI, sendo que às 72 horas PI, todos os animais já haviam eliminado o agente. Neste grupo, a excreção da *Salmonella* continuou até o final do experimento, às 168 horas PI, onde quatro animais do grupo eliminaram *Salmonella* nas fezes (Tabela 35).

No G3, foi possível realizar o isolamento bacteriológico a partir de 24 horas PI, sendo que às 48 horas PI, todos os animais já haviam eliminado o agente. A partir de 120 horas PI foi observada a interrupção da excreção de *Salmonella* em todos os bezerros do grupo, até o final do experimento (Tabela 36).

Tanto as amostras de *Salmonella* Dublin utilizadas no preparo do inóculo quanto as amostras de *Salmonella* isoladas a partir dos suabes retais dos bezerros infectados, apresentaram padrões idênticos de susceptibilidade aos antimicrobianos testados, sendo sensíveis ao florfenicol, cloranfenicol, gentamicina, ampicilina, ceftiofur e trimetoprim/sulfametoxazol e resistentes ao ácido nalidíxico, tetraciclina, eritromicina e doxiciclina, indicando origem comum entre as bactérias.

Tabela 35. Detecção de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais obtidos de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com aproximadamente 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2), antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental, pelo isolamento bacteriológico.

Animal		Tempo (h)							
		0	24	48	72	96	120	144	168
7	SC	-	-	-	+	+	+	+	+
	TMK	-	-	-	+	+	+	+	+
	RV	-	-	-	+	+	+	+	+
8	SC	-	-	-	+	-	-	+	-
	TMK	-	-	-	-	+	-	-	-
	RV	-	-	-	-	+	+	-	-
9	SC	-	+	+	+	-	+	-	+
	TMK	-	+	+	+	-	+	+	+
	RV	-	+	+	+	-	+	-	+
10	SC	-	+	-	-	+	+	+	+
	TMK	-	+	+	-	+	+	+	+
	RV	-	+	+	+	+	+	+	+
11	SC	-	-	+	-	-	+	+	+
	TMK	-	-	+	+	-	+	+	-
	RV	-	-	+	-	-	-	+	-
12	SC	-	-	+	-	-	-	-	-
	TMK	-	-	+	-	-	-	-	-
	RV	-	-	+	-	-	-	-	-

(+) = positivo; (-) = negativo; SC = selenito cistina; TMK = tetracionato Muller-Kauffmann; RV = Rappaport-Vassiliadis

Tabela 36. Detecção de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais obtidos de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin e submetidos a tratamento com florfenicol (G3), antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental, pelo isolamento bacteriológico.

Animal		Tempo (h)							
		0	24	48	72	96	120	144	168
13	SC	-	+	-	+	+	-	-	-
	TMK	-	+	-	+	+	-	-	-
	RV	-	+	-	-	+	-	-	-
14	SC	-	-	-	+	-	-	-	-
	TMK	-	-	+	+	+	-	-	-
	RV	-	-	+	+	-	-	-	-
15	SC	-	+	+	+	+	-	-	-
	TMK	-	+	+	+	+	-	-	-
	RV	-	+	+	-	+	-	-	-
16	SC	-	+	+	+	+	-	-	-
	TMK	-	+	+	+	-	-	-	-
	RV	-	+	+	+	-	-	-	-
17	SC	-	+	+	-	-	-	-	-
	TMK	-	+	+	+	-	-	-	-
	RV	-	+	+	-	-	-	-	-
18	SC	-	-	+	+	-	-	-	-
	TMK	-	-	+	+	-	-	-	-
	RV	-	-	+	-	-	-	-	-

(+) = positivo; (-) = negativo; SC = selenito cistina; TMK = tetrionato Muller-Kauffmann; RV = Rappaport-Vassiliadis

4.5.2 Detecção de *Salmonella* Dublin pela PCR

Assim como no isolamento bacteriológico, não foi identificada *Salmonella* em nenhum dos momentos, no grupo dos animais controle (G1), utilizando a técnica de PCR. Nos grupos infectados, foi possível realizar, em pelo menos um dos três caldos de enriquecimento utilizados, a identificação de *Salmonella* em todos os bezerros inoculados (Tabelas 37 e 38).

No G2, foi possível realizar a detecção de *S. Dublin* a partir de 24 horas PI, sendo que às 48 horas PI, todos os animais já haviam eliminado o agente. Neste grupo, a excreção da *Salmonella* continuou até o final do experimento, às 168

horas PI, onde quatro animais do grupo eliminaram *Salmonella* nas fezes (Tabela 37).

No G3, foi possível realizar a detecção de *S. Dublin* a partir de 24 horas PI, sendo que às 48 horas PI, todos os animais já haviam eliminado o agente. Neste grupo, a excreção da *Salmonella* também continuou até o final do experimento, às 168 horas PI, onde dois animais do grupo eliminaram *Salmonella* nas fezes (Tabela 38).

Tabela 37. Detecção de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais obtidos de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com aproximadamente 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin (G2), antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental, pela PCR.

Animal		Tempo (h)							
		0	24	48	72	96	120	144	168
7	SC	-	+	-	+	+	+	+	+
	TMK	-	-	-	+	+	+	+	+
	RV	-	-	-	+	+	+	+	-
8	SC	-	-	+	+	-	-	+	-
	TMK	-	+	-	-	-	-	-	-
	RV	-	-	-	-	-	+	-	-
9	SC	-	+	-	+	-	+	-	+
	TMK	-	+	+	+	-	+	+	-
	RV	-	+	+	+	-	+	-	-
10	SC	-	+	+	+	+	+	+	+
	TMK	-	+	+	+	+	+	+	+
	RV	-	+	+	+	+	+	-	+
11	SC	-	-	+	-	+	-	+	+
	TMK	-	-	+	+	-	+	+	+
	RV	-	-	-	-	-	-	-	+
12	SC	-	-	+	-	+	-	-	-
	TMK	-	-	+	+	-	-	-	-
	RV	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) = positivo; (-) = negativo; SC = selenito cistina; TMK = tetrionato Muller-Kauffmann; RV = Rappaport-Vassiliadis

Tabela 38. Detecção de *Salmonella* Dublin a partir de suabes retais obtidos de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin e submetidos a tratamento com florfenicol (G3), antes da inoculação (0 hora) e 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a infecção experimental, pela PCR.

Animal		Tempo (h)							
		0	24	48	72	96	120	144	168
13	SC	-	+	-	+	+	-	-	-
	TMK	-	+	-	-	+	-	-	-
	RV	-	+	+	+	-	-	-	-
14	SC	-	-	-	+	+	+	+	+
	TMK	-	-	+	+	+	+	+	+
	RV	-	-	+	+	+	+	+	+
15	SC	-	-	+	+	+	+	+	-
	TMK	-	+	+	-	+	-	-	-
	RV	-	+	-	+	+	+	+	-
16	SC	-	-	-	-	-	-	-	-
	TMK	-	+	-	-	-	-	-	-
	RV	-	-	-	-	-	-	-	-
17	SC	-	+	-	+	+	-	-	-
	TMK	-	+	+	+	+	-	-	-
	RV	-	+	-	-	+	-	-	-
18	SC	-	-	+	+	+	+	+	+
	TMK	-	-	+	+	+	+	+	+
	RV	-	-	+	-	+	-	+	-

(+) = positivo; (-) = negativo; SC = selenito cistina; TMK = tetracionato Muller-Kauffmann; RV = Rappaport-Vassiliadis

4.5.3 Comparação entre os resultados do isolamento bacteriológico e da detecção pela PCR e comparação dos caldos de enriquecimento seletivo (SC, TMK e RV) na identificação de *Salmonella* Dublin a partir de amostras de suabes retais

4.5.3.1 Comparação entre o isolamento bacteriológico e a detecção pela PCR na identificação de *Salmonella* Dublin a partir de amostras de suabes retais

A partir dos resultados obtidos durante o período experimental (0 a 168 horas PI), observou-se que a utilização do isolamento bacteriológico e da técnica da PCR foi capaz de detectar *Salmonella* Dublin nas amostras de fezes de todos

os bezerros analisados, em pelo menos um dos três caldos de enriquecimento utilizados (Tabelas 35 a 38).

No G2, a técnica da PCR permitiu encontrar resultados semelhantes ao do isolamento bacteriológico, sendo que em ambas as técnicas foi possível detectar a bactéria a partir de 24 horas PI, sendo que a excreção da *Salmonella* continuou até o final do experimento, às 168 horas PI, onde quatro animais do grupo eliminaram o agente nas fezes.

Já no G3, a PCR permitiu encontrar resultados diferentes daqueles encontrados no isolamento bacteriológico. Em ambas as técnicas, foi possível detectar a bactéria a partir de 24 horas PI. No entanto, através da PCR, observou-se a excreção da *Salmonella* até o final do experimento, às 168 horas PI, onde dois animais do grupo eliminaram o agente nas fezes. Já no isolamento bacteriológico, foi observada a interrupção da excreção de *Salmonella* em todos os bezerros do grupo a partir de 120 horas PI. Desta forma, a partir de 120 horas PI, no G3, não foi possível detectar o agente através do isolamento bacteriológico, sendo que utilizando a PCR o agente foi encontrado em três bezerros às 120 horas PI, três bezerros às 144 horas PI e dois bezerros às 168 horas PI. Este achado sugere que o tratamento utilizando o antibiótico florfenicol não foi capaz de eliminar *Salmonella* na mucosa intestinal, já que até o final do experimento (às 168 horas PI), ou seja, entre 72 e 96 horas após a aplicação da primeira dose do florfenicol, dois bezerros ainda eliminavam a bactéria nas fezes. De forma diferente, SILVA (2010c), estudando bezerros de 10 a 15 dias infectados por *S. Dublin*, verificaram que o tratamento com florfenicol reduziu a eliminação fecal do agente.

A utilização dos caldos SC, TMK e RV permitiram, no isolamento bacteriológico, a detecção de 38, 42 e 45 amostras positivas para *S. Dublin*, respectivamente. Pela PCR foi possível detectar 49, 48 e 37 amostras positivas para os caldos SC, TMK e RV, respectivamente. Assim sendo, pelo teste do qui-quadrado de McNemar a técnica da PCR foi superior ($P < 0,05$) ao isolamento bacteriológico na detecção de amostras positivas para *Salmonella* Dublin em suabes retais, quando utilizado o caldo SC. No entanto, embora sem diferenças

significativas entre as duas técnicas quando utilizados os caldos TMK e RV verificou-se, para ambos os caldos, que um maior número de amostras positivas foi encontrada utilizando-se a PCR (Tabela 39).

Muitas pesquisas têm relatado que a PCR é superior ao isolamento bacteriológico convencional na detecção de *Salmonella* em diversos tipos de amostras (SCHRANK, 2001; OLIVEIRA et al., 2002; FRESCHI et al., 2005). Contudo, alguns estudos relataram superioridade do isolamento bacteriológico convencional ou não registraram diferenças significativas entre as duas técnicas (FLÔRES et al., 2003; DICKEL et al., 2005; BANSAL et al., 2006; SILVA et al., 2010b). Segundo FRESCHI (2003) e OLIVEIRA (2005), as diferenças entre os métodos de extração de DNA, a quantidade e o tipo de amostra utilizada na reação de PCR, as variações entre composições comerciais dos caldos de enriquecimento e a sequência dos *primers* escolhidos para a reação podem interferir significativamente sobre o sucesso da PCR, explicando as divergências entre os resultados descritos na literatura.

Tabela 39. Detecção de *Salmonella* Dublin em amostras de suabes retais de bezerros bubalinos infectados experimentalmente com 10^8 UFC pelo isolamento bacteriológico e PCR associados aos caldos de enriquecimento seletivo selenito cistina (SC), tetrationato Muller-Kauffmann (TT) e Rappaport-Vassiliadis (RV).

Método	Nº de amostras positivas para <i>S. Dublin</i>			Total de amostras examinadas por caldo
	SC	TMK	RV	
Isolamento bacteriológico	38 ^{ABa}	42 ^{Ba}	35 ^{Aa}	96
Detecção pela PCR	49 ^{Ab}	48 ^{Aa}	37 ^{Ba}	96

Valores seguidos de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste do qui-quadrado ($P>0,05$)

4.5.3.2 Comparação dos caldos de enriquecimento seletivo (SC, TMK e RV) na detecção de *Salmonella* Dublin a partir de amostras de suabes retais

4.5.3.2.1 Isolamento de *Salmonella* Dublin

Das 96 amostras analisadas, 47 (49,0%) foram positivas para *Salmonella* Dublin. Das amostras positivas, 38 (80,9%) foram isoladas utilizando o caldo SC, 42 (89,2%) utilizando o caldo TMK e 35 (74,5%) utilizando o caldo RV. Desta forma, pelo teste do qui-quadrado de McNemar, observou-se que a eficiência do caldo TMK no isolamento da *Salmonella* foi estatisticamente superior ao caldo RV. No entanto, embora não fossem observadas diferenças significativas entre os caldos TMK e SC, observou-se maior número de amostras positivas quando utilizado o caldo TMK (Tabela 39). SILVA et al. (2008b), comparando a eficiência dos caldos de enriquecimento SC, TMK e RV no isolamento de *Salmonella* Dublin em bezerros bovinos concluiu que o SC foi a melhor opção para a recuperação do agente, seguido do caldo TMK e do caldo RV.

Das 47 amostras positivas para o isolamento da *Salmonella* Dublin, 45 (95,7%) foram isoladas utilizando a simultaneamente os caldos SC + TMK, 43 (91,5%) utilizando RV + TMK e 43 amostras (91,5%) utilizando SC + RV. Desta forma, a porcentagem de detecção de amostras positivas utilizando um ou simultaneamente dois caldos de enriquecimento seletivo foi de 81,5% e 92,9%. Assim sendo, a utilização simultânea de dois caldos de enriquecimento é recomendada, sendo que o melhor resultado encontrado foi a utilização simultânea dos caldos SC + TMK.

4.5.3.2.2 Detecção de *Salmonella* Dublin pela PCR

Das 96 amostras analisadas, 60 (62,5%) foram positivas para *Salmonella* Dublin na PCR. Das amostras positivas, 49 (81,7%) foram identificadas utilizando o caldo SC, 48 (80,0%) utilizando o caldo TMK e 37 (61,7%) utilizando o caldo RV (Tabela 51). Assim sendo, pelo teste do qui-quadrado de McNemar, observou-se

que a eficiência dos caldos SC e TMK na identificação da *Salmonella* foram estatisticamente superiores ao caldo RV (Tabela 39).

Ademais, das 60 amostras positivas para a detecção da *Salmonella* Dublin, 58 (95,7%) foram identificadas utilizando a associação entre os caldos SC + TMK, 53 (88,3%) utilizando RV + TMK e 53 amostras (88,3%) utilizando SC + RV. Desta forma, a porcentagem de detecção de amostras positivas utilizando um ou simultaneamente dois caldos de enriquecimento seletivo foi de 74,5% e 90,8%. Assim sendo, a utilização simultânea de dois caldos de enriquecimento é recomendada, sendo que o melhor resultado encontrado, assim como para o isolamento bacteriológico, foi a associação entre os caldos SC + TMK.

4.6 Acompanhamento dos bezerros bubalinos após a fase aguda da infecção

Inicialmente, foi proposto o acompanhamento da infecção experimental entre 0 e 168 horas PI. No entanto, devido à continuidade dos episódios de diarreia e da eliminação da bactéria nas fezes após este período, optou-se por monitorar os animais por maior período.

4.6.1 Exame Físico

Os bezerros foram submetidos ao exame físico a cada 12 horas para avaliação da consistência das fezes e temperatura retal, no período entre 180 horas (8 dias) e 504 horas (21 dias) PI.

Como descrito anteriormente, no G2 e no G3, os primeiros sinais de hipertermia foram observados às 60 horas PI, sendo que às 144 horas PI (G2) e às 120 horas PI (G3), a temperatura retal de todos os bezerros já havia voltado a valores fisiológicos, permanecendo assim até o final do período experimental proposto (0 a 168 horas PI). Dando continuidade, entre 180 e 504 horas PI, a temperatura retal de todos os bezerros (G2 e G3) continuaram em valores fisiológicos, não sendo observado nenhum sinal de hipertermia.

Também como descrito anteriormente, no G2, os quadros de diarreia característica da doença iniciaram-se às 96 horas PI, sendo que a partir deste momento os episódios de diarreia se intensificaram, bem como a gravidade, sendo que o pico ocorreu às 168 horas PI, onde cinco animais apresentavam diarreia (quatro bezerros com diarreia grave), levando a um aumento significativo do escore neste momento. Dando continuidade, de 180 a 204 horas PI, os bezerros ainda apresentavam diarreia. No entanto, entre 216 horas (9 dias) e 264 horas (11 dias) PI, todos os bezerros infectados se recuperaram e não apresentaram mais sinais clínicos de salmonelose.

No G3, os quadros de diarreia começaram às 24 horas PI sendo que a partir deste momento, os episódios de diarreia, bem como a gravidade, aumentaram, atingindo o pico de 144 a 168 horas PI. Neste intervalo, foram observados seis episódios de diarreia leve e onze de diarreia grave. Dando continuidade, neste grupo, os bezerros ainda apresentavam diarreia entre 180 e 264 horas PI. Desta forma, devido à piora do quadro clínico dos bezerros bubalinos neste grupo, os animais só se recuperaram da diarreia entre 288 horas (12 dias) e 504 horas (21 dias) PI, não apresentando mais sinais clínicos de salmonelose. Desta forma, a instituição do tratamento com florfenicol nos bezerros bubalinos, ao invés de diminuir o tempo de ocorrência de diarreia, levou a um aumento da sua gravidade, com ocorrência inclusive de despreendimento de mucosa e aumentando do período de diarreia em até dez dias em relação ao G2.

4.6.2 Isolamento de *Salmonella* Dublin

Devido à continuidade da eliminação do agente pelas fezes até o final do experimento proposto (0 a 168 horas PI), foram realizadas, a partir de 192 horas PI colheitas rotineiras por meio de suabes retais para isolamento da *Salmonella* Dublin através de cultura bacteriológica.

Como descrito anteriormente, no G2, foi possível realizar a detecção da bactéria a partir de 24 horas PI, sendo que, neste grupo, a excreção da *Salmonella* continuou até o final do experimento proposto, às 168 horas PI, onde

quatro animais do grupo eliminaram o agente nas fezes. Após este período, a colheita diária de amostras mostrou que os bezerros deste grupo eliminaram a bactéria até 16 dias PI. Levando-se em consideração que até 11 dias PI, os bezerros infectados ainda apresentavam sinais clínicos de salmonelose, verificou-se que os animais continuaram a eliminar a bactéria nas fezes até cinco dias após o desaparecimento dos sinais clínicos, podendo ser considerados portadores convalescentes.

Também como descrito anteriormente, no G3 foi possível realizar a detecção da bactéria a partir de 24 horas PI, sendo que, neste grupo, a excreção da *Salmonella* também continuou até o final do experimento proposto, às 168 horas PI, onde dois animais do grupo eliminaram *Salmonella* nas fezes. Dando continuidade, a colheita diária de amostras após este período mostrou que os bezerros deste grupo eliminaram a bactéria até 16 dias PI (assim como observado no G2). . Desta forma, a instituição do tratamento com florfenicol nos bezerros bubalinos, além de aumentar o período de diarreia em até dez dias em relação ao G2, também não foi capaz de combater de forma eficiente a infecção pela *S. Dublin*, já que os bezerros excretaram o agente até 13 dias após o início do tratamento e durante o mesmo período que os animais do G2, até 16 dias PI.

4.6.3 Exame anatomopatológico e isolamento de *Salmonella* Dublin a partir de órgãos

Após a constatação de dois resultados negativos no isolamento bacteriológico para *Salmonella* Dublin nas fezes, com intervalo de 15 dias, conforme sugerido por ANDREWS et al. (2008), sete animais, sendo um do G1, dois do G2 e quatro do G3, foram necropsiados e submetidos a exame macroscópico, onde foram colhidos fragmentos de tonsilas, linfonodos submandibulares, pulmões, fígado, baço, intestino delgado e grosso, linfonodos mesentéricos e rins para a realização de exames histopatológicos. Adicionalmente, foi realizada a colheita de amostras de todos os órgãos citados para realização de isolamento bacteriológico para detecção da *S. Dublin*.

4.6.3.1 Exame anatomopatológico (macroscópico e microscópico)

O bezerro 6, do grupo controle (G1), não apresentou alterações características de salmonelose no exame necroscópico.

O exame macroscópico do bezerro 11 do G2 revelou enterite necrótica discreta, intensa congestão da mucosa do intestino delgado e aumento de linfonodos mesentéricos. No exame histopatológico observaram-se alterações no intestino delgado, caracterizado por necrose focal das vilosidades, hiperplasia das glândulas caliciformes e discreto edema da camada serosa com infiltrado inflamatório mononuclear discreto e difuso.

O exame macroscópico do bezerro 12 do G2 revelou enterite crônica discreta, intensa congestão da serosa e mucosa do intestino delgado e aumento de linfonodos mesentéricos. No exame histopatológico, observou-se congestão intensa e difusa no intestino delgado, bem como discreta destruição das vilosidades e discreto infiltrado linfocítico na submucosa, com distribuição multifocal e coalescente.

O exame macroscópico do bezerro 13 do G3 revelou enterite crônica discreta, discreta hiperemia na mucosa do intestino grosso e intensa congestão da serosa e mucosa do intestino delgado. Observou-se, também, aumento de linfonodos mesentéricos. No exame histopatológico, verificou-se discreta destruição das vilosidades do intestino delgado, com submucosa apresentando edema e infiltrado plasmocítico discretos.

O bezerro 14 do G3 apresentou ao exame macroscópico, leve hiperemia na mucosa do intestino delgado. Observou-se, também, moderada hiperemia na serosa do intestino grosso e intensa hiperemia na mucosa do intestino grosso e aumento de linfonodos mesentéricos. No exame histopatológico, verificou-se congestão intensa no intestino grosso.

O bezerro 15 do G3 apresentou, ao exame macroscópico, discreta hiperemia na serosa do intestino delgado, sendo que, em alguns segmentos do jejuno a mucosa estava intensamente hiperêmica. Apresentou, também, aumento

de linfonodos mesentéricos. No exame histopatológico, observaram-se linfonodos mesentéricos com congestão intensa e moderado infiltrado macrofágico na região medular. No intestino grosso e no intestino delgado observou-se congestão moderada.

O exame macroscópico do bezerro 16 do G3 revelou enterite crônica discreta e hiperemia discreta na mucosa do intestino delgado, sendo que em algumas regiões do jejuno a serosa encontrava-se moderadamente hiperêmica. Observou-se, também, aumento de linfonodos mesentéricos. No exame histopatológico, foram encontrados linfonodos mesentéricos com intenso infiltrado inflamatório eosinofílico difuso na cápsula e discreta reatividade linfóide. No intestino delgado, observou-se discreto infiltrado inflamatório composto por eosinófilos e linfócitos, difuso na submucosa.

Através dos resultados obtidos, verificou-se que as principais alterações encontradas nos bezerros do G2 e do G3 foram aumento de linfonodos mesentéricos (em todos os bezerros) e hiperemia e/ou congestão na camada mucosa e serosa do intestino delgado e grosso, com diferentes tipos celulares como infiltrado inflamatório (Figura 41). SANTOS & ALESSI (2010) relataram que a enterocolite é característica da salmonelose em animais domésticos, sendo que o quadro macroscópico se manifesta por hiperemia ou hemorragia da mucosa. Relatam também que a chegada do agente pela via linfática até os linfonodos mesentéricos provoca o aumento de volume destas estruturas devido a congestão, edema, hemorragia e necrose. Em estudo realizado por SILVA (2007) com bezerros experimentalmente infectados com *S. Dublin* o exame macroscópico revelou enterite fibrinosa e catarral e áreas hemorrágicas e pálidas na mucosa e serosa do intestino delgado e grosso. No exame histopatológico, verificou-se a presença de infiltrado mononuclear disperso e necrose de vilosidades no intestino delgado.



Figura 41. Linfonodos mesentéricos aumentados (A e B) e congestão de alças intestinais (C e D) em bezerros submetidos à infecção experimental com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin.

4.6.3.2 Isolamento de *Salmonella* Dublin a partir de órgãos

Não foi isolado *Salmonella* Dublin nos órgãos do bezerro 6, do grupo controle (G1). Também não foi isolado o agente nos quatro bezerros necropsiados (13, 14, 15 e 16) do G3.

No G2, não foi isolada *S. Dublin* nos órgãos do bezerro 12. No entanto, foi possível realizar, em pelo menos um dos três caldos de enriquecimento utilizados, o isolamento de *S. Dublin* nos órgãos do bezerro 11. Neste, o agente foi isolado em fragmentos de linfonodos submandibulares, pulmões, fígado, baço, linfonodos mesentéricos e rins, sendo que o agente não foi isolado em tonsilas, duodeno, jejuno, íleo e intestino grosso. Desta forma, como o bezerro 11, no momento da necropsia (28 dias PI) não eliminava *Salmonella* nas fezes há 16 dias e não apresentava sinais clínicos característicos de salmonelose há 19 dias, sugere-se a possibilidade deste animal ser caracterizado como portador latente da doença.

A *S. Dublin* é o sorotipo adaptado à espécie bovina (VELING et al., 2002), sendo comum em bezerros neonatos a ocorrência da forma septicêmica da salmonelose podendo levar os animais a óbito, como já relatado por SILVA et al. (2008a), que observaram taxa de mortalidade de 83,3% em bezerros inoculados experimentalmente com *S. Dublin*. No entanto, embora apresentando sinais clínicos característicos de salmonelose, nenhum bezerro bubalino do G2 veio a óbito, sendo que após a fase aguda da infecção, estes animais se recuperaram dos sinais clínicos induzidos pela *S. Dublin*. Desta forma, considerando que os animais do G2 continuaram eliminando o agente nas fezes após o período de sintomatologia (portador convalescente) e que em um destes animais (bezerro 11) foi encontrado *Salmonella* nos órgãos após um período de 16 dias em que o animal não eliminava mais o agente nas fezes, destaca-se o importante papel epidemiológico desta espécie animal como fonte de infecção desta doença para outras espécies, com especial atenção à espécie bovina.

Adicionalmente, as amostras positivas isoladas nos órgãos do bezerro 11 foram submetidas ao teste de antibiograma apresentando padrões idênticos de susceptibilidade aos antimicrobianos testados com *Salmonella* utilizada no preparo do inóculo e com *Salmonella* isoladas a partir dos suabes retais dos bezerros infectados, sendo sensíveis ao florfenicol, cloranfenicol, gentamicina, ampicilina, ceftiofur e trimetoprim/sulfametoxazol e resistentes ao ácido nalidíxico, tetraciclina, eritromicina e doxiciclina, indicando uma origem comum entre as bactérias.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo permitem as seguintes conclusões:

1. A infecção experimental dos bezerros bubalinos com 10^8 UFC de *Salmonella* Dublin foi capaz de induzir sinais clínicos de salmonelose. A inoculação provocou alterações hematológicas e bioquímicas, sendo as mais relevantes a leucopenia e neutropenia, a hipofosfatemia, o aumento da concentração das proteínas de fase aguda fibrinogênio, ceruloplasmina e haptoglobina e a diminuição das concentrações séricas de ferro.
2. O tratamento com o antibiótico florfenicol não foi efetivo no combate à *S. Dublin*.
3. A PCR mostrou-se superior ao isolamento bacteriológico na detecção de *S. Dublin*, com melhores resultados quando utilizado o caldo de pré-enriquecimento selenito cistina.
4. A eliminação da bactéria nas fezes dos animais infectados após o período de sintomatologia confirma o estado de portador desses animais.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. F.; GIUFFRIDA, R.; RIBEIRO, M. G. Quimioterápicos antimicrobianos e antibióticos. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. São Paulo: ROCA, 2002. p. 13-43.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008, 1080p.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2009.

ÁVILA, L. G. **Estudo clínico, laboratorial e terapêutico da diarreia experimental em bezerros induzida por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium**. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ÁVILA, L. G.; SATO, R. A.; JORGE, R. L. N.; FAGLIARI, J. J. Avaliação de minerais séricos em bezerros experimentalmente infectados com *S. Typhimurium*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Anais...** Gramado: 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0245-3.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

BACHA JUNIOR, W.; BACHA, L. M. **Color atlas of veterinary histology**. 2 ed. Baltimore: Lippincott Williams Wilkins, 2000. 318p.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BANSAL, N. S.; GRAY, V.; McDONELL, F. Validated PCR assay for the routine detection of *Salmonella* in food. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 282-287, 2006.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 1 ed. São Paulo: Edart, 1976. 251p.

BENESI, F. J.; LEAL, M. L. R.; LISBÔA, J. A. N.; COELHO, C. S.; MIRANDOLA, R. M. S. Parâmetros bioquímicos para avaliação da função hepática em bezerras sadias, da raça holandesa, no primeiro mês de vida. **Ciência Rural**, v. 33, p. 311-317, 2003.

BENESI, F. J. Principais enfermidades de bezerros neonatos. Como diagnosticá-las e tratá-las? 2004. Disponível em: <<http://www.spmv.org.br/conpavet2004/palestras%20-%20resumos/Neonatologia%20-%20Fernando%20Jose%20Benesi.doc>>. Acesso em 10 dez. 2011.

BENESI, F. J.; COELHO, C. S.; LEAL, M. L. R.; MIRANDOLA, R. M. S.; LISBÔA, J. A. N. Parâmetros bioquímicos para avaliação da função renal e do equilíbrio hidroeletrólítico em bezerras sadias, da raça Holandesa, no primeiro mês de vida. **Brazilian Journal of Veterinary Research and animal Science**, v. 42, p. 291-298, 2005.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 293-298, 2007.

CAMBIER, C.; CLERBAUX, T.; MOREAUX, R.; DETRY, B.; BEERENS, D.; FRANS, A.; GUSTIN, P. Blood oxygen binding in calves with naturally occurring diarrhea. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 799-803, 2001.

CAVIRANI, S.; CONSALVO, F.; D'ONOFRIO, G.; CAPUCCI, L.; CABASSI, C. S.; ALLEGRI, G.; BIGLIARDI, E.; CIVARDI, A.; FLAMMINI, C. F. A serological survey of different bovine herpesviruses (BHV-1, BHV-2, BHV-4) in dairy buffaloes of southern and northern Italy. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** Caserta: 1997. p. 626-630.

DEIGNAN, T.; ALWAN, A.; KELLY, J.; MCNAIR, J.; WARRENS, T.; O'FARRELLY, C.O. Serum haptoglobin: an objective indicator of experimentally-induced *Salmonella* infections in calves. **Research in Veterinary Science**, v. 69, p. 153-158, 2000.

DIBARTOLA, S. P. **Fluid, electrolyte and acid-base disorders in small animal practice**. 4.ed. St. Louis: Elsevier, 2012. 744p.

DICKEL, E. L.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; GIRARDELLO, R.; COLUSSI, F. M.; DUARTE, L. F. Microbiologia convencional, ELISA e PCR para detecção de *Salmonella* em abatedouro de frango totalmente automatizado, semi-automatizado de grande porte e semi-automatizado de pequeno porte. **Higiene Alimentar**, v. 19, p. 79-85, 2005.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Rosenberger: Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419p.

EKPERIGIN, H. E.; NAGARAJA, K. V. *Salmonella*. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 14, p. 14-29, 1998.

FAGIOLO, A.; RONCORONI, C.; LAI, O.; BORGHESE, A. Buffalo Pathologies. In: BORGHESE, A. **Buffalo Production and Research**. Roma: FAO, 2005. p. 249-296.

FAGLIARI, J. J.; FERREIRA NETO, J. M.; LUCAS, A.; ANTONIO NETO, J. Proteinograma total e fracionamento eletroforético do soro de bezerros Guzerá passivamente imunizados contra paratifo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 35, p. 317-332, 1983.

FAGLIARI, J. J.; OKUDA, H. T.; PASSIPIERI, M.; CURI, P. Serum protein levels of guzera cattle in different ages. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, p. 39-60, 1991.

FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; LUCAS, F. A.; CAMPOS FILHO, E.; CURI, P. R. Constituintes sangüíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos*

indicus), Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 3, p. 253-262, 1998.

FAGLIARI, J. J.; WEISS, D. J.; McCLENAHAN, D.; EVANSON, O. A. Serum protein concentrations in calves experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 383-387, 2003.

FAGLIARI, J. J.; RIZOLLI, F. W.; SILVA, S. L.; SILVA, D. G. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 450-453, 2006.

FAGLIARI, J. J.; PASSIPIERI, M.; OKUDA, H. T.; SILVA, S. L.; SILVA, P. C. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1355-1358, 2007.

FECTEAU, M. V.; HOUSE, J. K; KOTARSKI, S. F.; TANKERSLEY, N. S.; ONTIVEROS, M. M.; ALCANTAR, C. R.; SMITH, B. Efficacy of ceftiofur treatment of experimental salmonellosis in neonatal calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 918-925, 2003.

FEDER, I.; NIETFELD, J. C.; GALLAND, J.; YEARY, T.; SARGEANT, J. M.; OBERST, R.; TAMPLIN, M. L.; LUCHANSKY, J. B. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2477-2484, 2001.

FEITOSA, F.L.F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. 754p.

FLÔRES, M. L.; NASCIMENTO, V. P.; KADER, I. I. T. A.; CARDOSO, M.; SANTOS, L. R.; LOPES, R. L. F.; WALD, V. B. Análise da contaminação por

Salmonella em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da polimerase. **Ciência Rural**, v. 33, p. 553-557, 2003.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 25, p. 541-554, 2006.

FRESCHI, C. R. **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)**. 2003. 32f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FRESCHI, C. R.; CARVALHO, L. F. O.; OLIVEIRA, C. J. B. Comparison of DNA extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella* Typhimurium in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 363-367, 2005.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Varela, 1994. 169p.

GIGLIO, M.; GUARINO, A.; NOBILE, G.; FUSCO, G.; LANDOLFI, M. C. Coronavirus as a cause of enteropathy in buffalo calves. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: 1994. p. 113.

GODSON, D. L.; BACA-ESTRADA, M. E.; VAN KESSEL, A. G. Regulation of bovine acute phase responses by recombinant interleukin-1 β . **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 249-255, 1995.

GOKCE, G.; GOKCE, H. I.; ERDOGAN, H. M.; GUNES, V.; CITIL, M. Investigation of the coagulation profile in calves with neonatal diarrhea. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 30, p. 223-227, 2006.

GONÇALVES, R. C.; KUCHEMBUCK, M. R. G.; LOPES, R. S.; KOHAYAGAWA, A.; CURI, P. R.; LISBÔA, J. A. N. Diarréia em bezerros: estudo clínico e laboratorial. **Veterinária e Zootecia**, v. 3, p. 35-44, 1991.

GONZÁLEZ, F. H. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. **Anales de Veterinaria Murcia**, v. 23, p. 5-17, 2007.

GORDON, A. H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels**. New York: Elsevier, 1995. 213p.

GROVE-WHITE, D. H.; MICHELL, A. R. Iatrogenic hypocalcemia during parenteral fluid therapy of diarrhoeic calves. **The Veterinary Record**, v. 149, p. 203-207, 2001.

GUZELBEKTES, H.; COSKUN, A.; SEN, I. Relationship between the degree of dehydration and balance of acid-based changes in dehydrated calves with diarrhoea. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 51, p. 83-87, 2007.

HASKINS, S. C. An overview of acid-basic physiology. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 170, p. 423-428, 1977.

HEFFERNAN, E. J.; FIERER, J.; CHIKAMI, G.; GUINEY, D. Natural history of oral *S. Dublin* infection in BALB/c mice: effect of an 80-kilobase-pair plasmid on virulence. **The Journal of Infectious Disease**, v. 155, p. 1254-1259, 1987.

HOUSE, J. K.; ONTIVEROS, M. M.; BLACKMER, N. M.; DUEGER, E. L.; FITCHHORN, J. B.; McARTHUR, G. R.; SMITH, B. P. Evaluation of an autogenous *Salmonella* bacterin and a modified live *Salmonella* serotype Choleraesuis vaccine on a commercial dairy farm. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 1897-1902, 2001.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal, 2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1761&id_pagina=1>. Acesso em 10 dez. 2011.

IDF. Federação internacional de laticínios. 2010. Disponível em: <<http://www.svenskmjolk.se/Global/Dokument/Dokumentarkiv/Marknadsrapporter/World%20Dairy%20Situation/World%20Dairy%20Situation%202010.pdf>>. Acesso em 10 dez. 2011.

ITOH, Y.; HIROSE, K.; MYIAKE, M.; KHAN, A. Q.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T. Amplification of *rfbE* e *fliC* genes by polimerase chain reaction for identification and 143 detection of *Salmonella* serovar Enteritidis, Dublin and Gallinarum-Pullorum. **Microbiology and Immunology**, v. 41, p.791-794, 1997.

KAISER, P.; ROTHELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytoquine expression in avian cells in response to invasion by *S. Enteritides* and *S. Gallinarum*. **Microbiology**, v. 146, p. 3217-3226, 2000.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego: Academic, 2008. 916p.

KASARI, T. R.; NAYLOR, J. M. Clinical evaluation of sodium bicarbonate, sodium l-lactate, and sodium acetate for treatment of acidosis in diarrheic calves. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 187, p. 392-397, 1985.

KASARI, T. R. Metabolic acidosis in diarrheic calves: the importance of alkalinizing agents in therapy. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 6, p. 29-43, 1990.

KNUTSSON, R.; LOFSTROM, C.; GRAGE, H. et al. Modeling of 5' nuclease real-time responses of optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 52-60, 2002.

LAU, H. D. **Doenças em búfalos no Brasil: Diagnóstico epidemiologia e controle**. Brasília: Embrapa, 1999. 202 p.

LEAL, M. L. R. **Soluções salina hipertônica intravenosa (7,5%) e eletrolítica oral no tratamento de bezerros com diarreia osmótica induzida**. 2005. 166 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LISBÔA, J. A. N.; BENESI, F. J.; MARUTA, C. A.; MIRANDOLA, R. M. S.; TEIXEIRA, C. M. C. Tempo de viabilidade de amostras de sangue venoso bovino destinadas ao exame hemogasométrico, quando mantidas sob conservação em água gelada. **Ciência Rural**, v. 31, p. 271-276, 2001.

LISBÔA, J. A. N.; BENESI, F. J.; LEAL, LM. L. R.; TEIXEIRA, C. M. C. Efeito da idade sobre o equilíbrio ácido-básico de bezerras sadias no primeiro mês de vida. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 136-142, 2002.

MATTEWS, A. G. Serum protein electrophoresis in horses and ponies. **Equine Veterinary Journal**, v. 14, p. 322-324, 1982.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of bactericide power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, p. 732-749, 1938.

MILLAR, H. R.; SIMPSON, J. G., SRALKEN, A. L. An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 24, p. 827-830, 1971.

MOHRI, M.; SHARIFI, K.; EIDI, S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults. **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 30-39, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: Approved standard. Document M31-A2**. 2 ed. Wayne, PA: NCCLS, 2001, 53p.

NEUMANN, S. Serum iron level as an indicator for inflammation in dogs and cats. **Comparative Clinical Pathology**, v.12, p. 90-94, 2003.

OCAL, N.; DURU, S. Y.; YAGCI, B. B.; GAZYAC, S. Field condition diagnosis and treatment of acid-base balance disorders in calves with diarrhea. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 12, p. 175-2183, 2006.

OLIVEIRA, C. J. B. **Transmissão aerógena experimental, prevalência ao abate após surto, diagnóstico em amostras de fezes e métodos de genotipagem de *Salmonella enterica* em suínos**. 2005. 108 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

OLIVEIRA, S. D.; SANTOS, L. R.; SCHUCH, D. M. T.; SILVA, A. B.; SALLE, C. T. P.; CANAL, C. W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 25-35, 2002.

PERINO, L. J.; WITTUM, T. E. Effects of various risk factors on plasma protein and serum immunoglobulin concentrations of calves at postpartum hours 10 and 24. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 1144-1448, 1995.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. São Paulo: ARTMED, 2005. 512p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, G.C.; BLOOD, D.C. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

REBHUN, W. C. Doenças infecciosas do trato gastrointestinal. In: REBHUN, W. C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: ROCA, 2000. p. 205-210.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; JEREZ, J. A.; LEITE, D. S.; FERREIRA, F.; GENNARI, S. M. Identification of enteropathogens from buffalo calves with and without diarrhoea in the RibeiraValley, State of Sao Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, 2000. Disponível

em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000200013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 jan. 2012.

ROCHA, T. G; FRANCIOSI, C.; NOCITI, R. P.; JORGE, R. L. N.; FAGLIARI, J. J. Concentrações séricas de cálcio, fósforo, magnésio, ferro, sódio e potássio em bezerros mestiços canchim nelore e da raça holandesa do nascimento aos 30 dias de idade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 8., 2009, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7752/5539>>. Acesso em: 17 Jan. 2012.

SANTOS, R. L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J.; ADAMS, L. G. Morphologic and molecular characterization of *S. Typhimurium* infection in neonatal calves. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 200-215, 2002a.

SANTOS, R. L.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J.; ADAMS, L. G. Hematologic and serum biochemical changes in *Salmonella* serovar Typhimurium-infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 1145-1150, 2002b.

SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 2011. 904p.

SATIJA, K. C.; RAJPAL, S.; PANDEY, R.; SHARMA, V. K. Electrophoresis of buffalo (*Bubalus bubalis*) serum proteins including immunoglobulins. **Infection and Immunity**, v. 24, p. 567-570, 1979.

SAXTON, D. R. & SELDIN, D. W. Clinical interpretation of laboratory values. In: KOKKO, J. P. & TANNEN, R. L. **Fluids and electrolytes**. Philadelphia: Saunders, 1986. p. 3-62.

SCHOTMAN, A. J. H. The acid-base balance in clinically healthy and diseased cattle. **Netherlands Journal of Veterinary Science**, v. 4, p. 5-23, 1971.

SCHRANK I. S.; MORES, M. A. Z.; COSTA, J. C. A.; FRAZZON, A. P. G.; SONCINI, R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; SILVA, S. C. Influence of

enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 45-53, 2001.

SHARMAN, M. C.; KUMAR, M. Infectious diseases of buffaloes. In: ASIAN BUFFALO CONGRESS, 4., 2003, New Delhi. **Proceedings...** New Delhi: 2003. p.152-168.

SILVA, D. G. **Estudo clínico, laboratorial e terapêutico da diarreia experimental em bezerros induzida por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Dublin**. 2007. 153 f. Dissertação (Doutorado em Clínica Médica Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SILVA, D. G.; SILVA, P. R. L.; FAGLIARI, J. J.; ALESSI, A. C.; OLIVEIRA, R. G. Clinical evaluation of experimental *Salmonella* Dublin Infection in calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 251-255, 2008a.

SILVA, D. G.; FAGLIARI, J. J.; GARCIA, T. B. Comparison of the efficiency of selective enrichment broths for *S. Dublin* isolation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 766-768, 2008b.

SILVA, D. G.; SILVA, P. R. L.; FAGLIARI, J. J. Hemograma e perfil bioquímico sérico, inclusive hemogasométrico, de bezerros infectados experimentalmente com *Salmonella* Dublin. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 251-257, 2010a.

SILVA, D. G.; SILVA, D. R.; SILVA, P. R. L.; CICERO, E. A. S.; FERRAZ, A. L. J.; LEMOS, M. V. F.; FAGLIARI, J. J. Avaliação da reação em cadeia da polimerase e do isolamento bacteriológico convencional na detecção de *Salmonella* Dublin em amostras de fezes de bezerros infectados experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 752-756, 2010b.

SILVA, D. G.; SILVA, P. R. L.; FAGLIARI, J. J. Efficacy of florfenicol and intravenous fluid therapy for treatment of experimental salmonellosis in newborn calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 499-503, 2010c.

SILVA, D. G.; SILVA, P. R. L.; SILVA, P. C.; FAGLIARI, J. J. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves experimentally infected with Salmonella Dublin. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 551-554, 2011.

STEVENS, A. J.; GIBSON, E. A.; HUGHES, L. E. Salmonellosis: The present position in man and animals. **The Veterinary Record**, v. 80, p. 154-160, 1967.

SUNIL CHANDRA, N. P.; MAHALINGAM, S. Rotavirus associated diarrhoeas in buffalo calves in Sri Lanka. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** Sao Paulo: 1994. Vol II: p. 322-324.

TAYLOR, J. A. Leucocyte responses in ruminants. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 391-404.

THEURL, I.; MATTLE, V.; SEIFERT, M.; MARIANI, M.; MARTH, C.; WEISS, G. Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease . **Blood**, v. 107, p. 4142-4148, 2006.

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 891-898.

THOMPSON J. C.; PAULI J. V. Colostral transfer of gamma glutamyl transpeptidase in calves. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 29, p. 223-226, 1981.

TREMBLAY, R. Intravenous fluid therapy in calves. **Veterinary Clinics of North America: Food and Animal Practice**, v. 6, p. 77-101, 1990.

VARMA, K. J.; ADAMS, T. E.; POWERS, T. E.; LAMENDOLA, J. F. Farmacocinética do florfenicol em bezerros. **Hora Veterinária**, v. 2, p. 30-35, 1997.

VASCONCELOS, A.C. **Necrópsia e remessa de material para laboratório em medicina veterinária**. Brasília: MEC/ABEAS, 1988. 74p.

VELING, J.; BARKEMA, H. W.; VAN DER SCHANS, J.; VAN ZIJDERVELD, F.; VERHOEFF, J. Herd-level diagnosis for *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin infection in bovine dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 53, p. 31-42, 2002.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecil sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 4406-4412, 1969.

WOOD, D. & QUIROZ-ROCHA, G. F. Normal hematology of cattle. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6 ed. Iowa: Blackwell, 2010. p. 829-835.

WEISS, G.; GOODNOUGH, L. T. Anemia of chronic disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1011-1023, 2005.

WINTER, H. **Guia para la necropsia de los ruminantes domesticos**. Zaragoza: Acribia, 1969. 118p.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.

ZARGHAM, M.; MUHAMMAD, G.; UMAR, A.; ALI KHAN, S. A preliminary comparison of plasma fibrinogen concentrations, leukocyte number and erythrocyte sedimentation rate as non-specific indicators of inflammatory conditions in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Research Communications**, v. 21, p. 265-271, 1997.