

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE *Clostridium perfringens* E *Salmonella*
spp. EM SUÍNOS ADULTOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE
PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)**

Lívia Boarini

Bióloga

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE *Clostridium perfringens* E *Salmonella*
spp. EM SUÍNOS ADULTOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE
PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)**

Lívia Boarini

Orientador: Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Câmpus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2013

Boarini, Livia
B662i Identificação de *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. em
suínos adultos utilizando a técnica de PCR (Reação em Cadeia da
Polimerase) / Livia Boarini. -- Jaboticabal, 2013
xii, 51 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Rúben Pablo Schocken-Iturrino

Banca examinadora: Antonio Carlos Pizzolitto, José Moacir Marin

Bibliografia

1. Bacteriologia. 2. Clostrídios. 3. Suinocultura. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 579.8:636.4

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LIVIA BOARINI – Nascida em Jaboticabal, SP, aos 24 de Março de 1986, filha de Maria Aparecida Morello Boarini e Jayme Aparecido Boarini, graduada em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas, pelo Centro Universitário de Araraquara, SP, em 2008. Foi bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de agosto de 2005 a março de 2008. Em março de 2011 iniciou o Mestrado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária, sob orientação do Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) até fevereiro de 2013.

*"Crescer significa mudar e mudar envolve riscos,
uma passagem do conhecido para o desconhecido."*

Autor Desconhecido

Ofereço

*Aos meus Pais, Maria Ap. e Jayme, que investiram na minha
educação e proporcionaram a realização dos meus sonhos.*

“A vida é tão maravilhosa porque também é feita
de colos, de feridas que cicatrizam, de amigos que
celebram ou choram junto. Feita de pessoas apaixonadas
e apaixonantes, possíveis e impossíveis,
pessoas que machucam, pessoas que chegam pra curar.”
(Maria de Queiroz)

Dedico

Ao Felipe, meu marido, que esteve sempre ao meu lado,
com amor, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me agraciado com tantos dons, e principalmente por me proporcionar saúde, inteligência e discernimento para fazer escolhas responsáveis.

Aos meus pais, por acreditarem nos meus sonhos e investirem para que eles se realizassem. Obrigado pelo apoio e dedicação que sempre demonstraram por mim.

Ao meu marido, que sempre apoiou minhas decisões e participou por todas as etapas da minha formação, sabendo me incentivar nos momentos de desânimo, e me instruir nas dúvidas e incertezas.

Ao meu irmão, que me fez aprender a não ser egoísta, e me mostrou como é importante ter alguém para dividir momentos felizes e de cumplicidade.

À minha família Boarini e Morello, que me fazem sentir orgulho de ter nascido nesse seio. Todos os meus tios, tias, primos e primas que sempre me fazem perceber o quanto eu sou especial, e o quanto eles são especiais para mim.

Ao meu orientador Rubén Pablo Schocken-Iturrino, por todo conhecimento e amizade que me proporcionou durante esses anos.

Às minhas amigas de laboratório, Mariana, Marita, Mariana (Uréia), Lilian, Silvina e Andressa, obrigado por disporem o precioso tempo de vocês para me ajudarem nas coletas, obrigado por me ensinarem o poder do companheirismo, e principalmente, obrigado pelas "gordices" que inventávamos para nos confraternizarmos.

Aos meus amigos de Jabuka. Sabia que sempre podia contar com boas risadas nos fins de semana, "Ferlas" agradeço do fundo do coração a leveza que vocês dão à minha vida.

À UNESP – *Câmpus* Jaboticabal, por disponibilizar as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de um bom trabalho, e por disponibilizar um excelente quadro de docentes que contribuem com o aprimoramento de conhecimentos e experiências.

À Profa. Dra. Maria Cristina Thomaz por disponibilizar a suinocultura da FCAV/Jaboticabal para as coletas durante o experimento.

À Capes pela bolsa de Mestrado concedida.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e por estarem dispostos a contribuírem com sugestões que aprimorem o trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Aspectos Gerais da Suinocultura	4
2.2. <i>Clostridium</i> spp.	6
2.3. <i>Clostridium perfringens</i>	7
2.3.1. <i>Clostridium perfringens</i> tipo A.....	8
2.3.2. <i>Clostridium perfringens</i> tipo B.....	9
2.3.3. <i>Clostridium perfringens</i> tipo C.....	10
2.3.4. <i>Clostridium perfringens</i> tipo D e E	11
2.4. Clostridioses na Suinocultura.....	12
2.5. <i>Salmonella</i> spp.....	13
2.6. <i>Salmonella</i> spp. na Suinocultura	16
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Coleta e cultivo bacteriano	20
4.2. Identificação molecular de <i>Clostridium perfringens</i> e <i>Salmonella</i> spp.	21
5. RESULTADOS	24
5.1. Contagem de bactérias	24
5.2. Identificação molecular de <i>Clostridium perfringens</i> e <i>Salmonella</i> spp.	26
6. DISCUSSÃO.....	29

7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS	41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Sequências de nucleotídeos utilizadas para identificação dos genes presentes na espécie *Clostridium perfringens* nas amostras coletadas a partir de suabe da região anorretal de suínos23
- Tabela 2. Sequências de nucleotídeos utilizadas para amplificação e confirmação das espécies *Salmonella* spp. e *Salmonella* Typhimurium nas amostras coletas a partir de suabe da região anorretal de suínos.....23
- Tabela 3. Médias das contagens obtidas das amostras coletadas nas duas avaliações do confinamento e no frigorífico e resultado do Teste de Tukey.24
- Tabela 4. Médias de ganho de peso dos animais provenientes do confinamento entre as duas avaliações. Amostras de 1 a 12 representam os animais que apresentaram presença de *Clostridium* spp. e/ou *Salmonella* spp., demonstrando que a média de ganho de peso era inferior ao dos animais ausentes das mesmas (Amostras de 13 a 16).....25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produto da amplificação dos genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe* e *cpb-2* para identificação de *Clostridium perfringens*. PM: Padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); CN: Controle Negativo; A: Cepa padrão Tipo A (*cpa*: 900pb); B: Cepa padrão Tipo B (*cpa*: 900pb, *cpb*: 611pb e *etx*: 396pb); C: Cepa padrão Tipo C: (*cpa*: 900 pb e *cpb*: 611pb); D: cepa padrão Tipo D (*cpa*: 900pb e *etx*: 396pb); E: cepa padrão Tipo E (*cpa*:900pb e *iap*: 293pb); Linhas de 1-38: Amostras coletadas no confinamento; Linhas de 39-52: Amostras coletadas no frigorífico.....26

Figura 2. Produto da amplificação dos genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe* e *cpb-2* para identificação de *Clostridium perfringens*. PM: Padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); CN: Controle Negativo; A: Cepa padrão Tipo A (*cpa*: 900pb); B: Cepa padrão Tipo B (*cpa*: 900pb, *cpb*: 611pb e *etx*: 396pb); C: Cepa padrão Tipo C: (*cpa*: 900 pb e *cpb*: 611pb); D: cepa padrão Tipo D (*cpa*: 900pb e *etx*: 396pb); E: cepa padrão Tipo E (*cpa*:900pb e *iap*: 293pb); Linhas de 53-84: Amostras coletadas no frigorífico.27

Figura 3. Produto da amplificação do gene *invA* (284 pb) para identificação de *Salmonella* spp. PM: Padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Fermentas); CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; Linhas de 1-3: Amostras coletadas do confinamento; Linhas de 4-7: Amostras coletadas no frigorífico.....28

Figura 4. Produto da amplificação do gene *fliC* (620 pb) para identificação de *Salmonella* Typhimurium. PM: Padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Fermentas); CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; Linhas de 1-4: Amostras coletadas do frigorífico; Linhas de 5-7: Amostras coletadas no confinamento.....28

IDENTIFICAÇÃO DE *Clostridium perfringens* E *Salmonella* spp. EM SUÍNOS ADULTOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

RESUMO – A suinocultura vem ganhando espaço no mercado brasileiro, atualmente o interesse por alimentos saudáveis trouxe a carne suína como aliada e não mais como vilã. A partir disso, novas tecnologias como sistemas de confinamento, foram adotadas a fim de obter melhorias que visam principalmente à higiene do processo, alimentação balanceada dos animais e instalações adequadas. Nesse enquadramento, doenças infecciosas entéricas representam um problema importante na suinocultura, e estão envolvidas com grandes perdas econômicas e contaminação da carcaça comercializada. Considerando estes aspectos, o trabalho objetivou identificar *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp., a fim de alertar o setor suinícola sobre os riscos ainda disseminados que causam enfermidades nos suínos e contaminam os produtos que serão comercializados; e correlacionar a presença de *Clostridium perfringens* com interferências no ganho de peso dos animais. Foram realizadas contagens bacterianas para *Clostridium* spp. que apresentaram médias de $1,2 \times 10^5$ UFC/mL na primeira coleta e $7,88 \times 10^2$ UFC/mL na segunda coleta do confinamento, e nas amostras do frigorífico contou-se $1,8 \times 10^4$ UFC/mL. Os resultados obtidos por PCR foram positivos apenas para a toxina *alfa* (*cpa*), caracterizando uniformidade dos positivos (25%) para *Clostridium perfringens* tipo A do confinamento e 46,4% do frigorífico. Para *Salmonella* spp. com o gene *invA* foram detectados 9,5% de positivos nos animais do confinamento e 21,4% das amostras do frigorífico. E *Salmonella* Typhimurium com o gene *fliC*, foram positivas 3,57% no confinamento e 8,33% no frigorífico. Foi possível concluir que *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. foram encontrados em várias fases do setor suinícola, desde o confinamento e área de granja até o processo industrial de abate. As análises de correlação da presença de *C. perfringens* com o ganho de peso dos animais mostrou que a instalação dessa bactéria compromete o desempenho nutricional dos animais interferindo na fase de engorda. A utilização de métodos de biologia molecular se mostraram bastante eficientes, o que incentiva maiores investimentos nessas técnicas que identificam com melhor desempenho problemas na suinocultura, promovendo menores prejuízos para os criadores.

Palavras-chaves: bacteriologia, Clostrídios, gastroenterites, Salmonelas, suinocultura, toxinas

IDENTIFICATION *Clostridium perfringens* AND *Salmonella* spp. IN PIGS ADULTS USING THE TECHNIQUE OF PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

ABSTRACT – Swine production is becoming more popular in the Brazilian market, currently interest in healthy foods brought swine as an ally and not as a villain. From this, new technologies such as confinement systems were adopted in order to achieve improvements aimed primarily to process hygiene, a balanced diet of animals and adequate facilities. In this framework, enteric infectious diseases represent a important problem in the swine production, and are involved with large economic losses and contamination of carcass marketed. Considering these aspects, the study aimed to identify *Clostridium perfringens* and *Salmonella* spp. in order to alert the swine sector still scattered about the risks that cause diseases in swine and contaminate the products to be marketed; and correlating the presence of *Clostridium perfringens* with interference on weight gains of animals. Bacterial counts were performed for *Clostridium* spp presenting averages of 1.2×10^5 CFU/ mL in the first test and 7.88×10^2 CFU / mL in the second collection of confinement, and the samples of slaughterhouse told by 1.8×10^4 CFU/ mL. The results obtained by PCR were positive only for the *alpha*-toxin (*cpa*), featuring uniformity of positive samples (25%) for *Clostridium perfringens* type A of confinement and 46.4% of the slaughterhouse. For *Salmonella* spp. with the *invA* gene were detected 9.5% of positive animals in confinement and 21.4% of samples from the slaughterhouse. And *Salmonella* Typhimurium with the gene *fliC*, were positive 3.57% in the confinement and 8.33% in the slaughterhouse. It was concluded that *Clostridium perfringens* and *Salmonella* spp. were found in various stages of the swine industry, from the confinement and farm area until the process of industrial slaughter. The correlation analysis of the presence of *C. perfringens* with the weight gain of the animals showed that the installation of this bacterium affects the nutritional performance of animals interfering in the fattening stage. The use of molecular biology methods have proved very efficient, which encourages greater investment in these techniques that identify problems with better performance in swine, promoting smaller losses for breeders.

Keywords: bacteriology, Clostridia, gastroenteritis, *Salmonella* spp., swine, toxins

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura vem ganhando espaço no mercado brasileiro, onde anteriormente o consumo de derivados suínos era tido como vilão da boa saúde, atualmente o interesse por alimentos saudáveis trouxe a carne suína como aliada e não mais como vilã. Já que ela possui índices elevados de proteínas (20% na carne magra), aminoácidos essenciais, é fonte de vitaminas do complexo B, além de se destacar nos teores de cálcio, fósforo e principalmente potássio (SEBRAE, 2012a).

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de carne suína, isso se deve ao fato do consumo interno não ser expressivo, já que ainda encontra barreiras sobre conceitos estabelecidos pela população brasileira. No mundo é a carne mais consumida (64%), deixando a carne bovina com 27% e o frango com 8% da preferência, enquanto para os brasileiros a carne suína está em terceiro lugar na preferência. (SILVEIRA, 2012)

Esse fato ocorre devido à trajetória desenhada na utilização desses animais para o consumo humano, sendo que eram criados principalmente para a extração de banha, e para atingir essa expectativa, os animais eram criados e abatidos com peso em torno de 300 kg, tornando o consumo da carne altamente prejudicial, já que atingia níveis altíssimos de gorduras (SILVEIRA, 2012). Nos dias atuais o peso esperado de abate é em torno de 120kg, a fim de que os níveis de gordura presente nos animais sejam menores, priorizando a qualidade de carne tornando-a magra e saudável para o consumo.

A partir disso, um novo olhar para o consumo de carne suína iniciou a mudança de conceitos estabelecidos. Novas tecnologias desenvolvidas visam melhorias nesse setor, principalmente quanto à higiene de todo o processo, alimentação balanceada dos animais, instalações adequadas e serviços de inspeção dos órgãos responsáveis (SEBRAE, 2008a).

Dentre esses programas de melhorias, a erradicação de doenças responsáveis por perdas econômicas e prejuízos no rendimento dos animais está prioritariamente em exercício. Já que animais enfermos prejudicam a dinâmica do

processo, o rendimento e conversão alimentar e caracteriza-se por colocar em risco a qualidade da carne e derivados que serão produzidos e comercializados.

Para estabelecer um controle sobre a produção, foram desenvolvidos sistemas de confinamento para facilitar o manejo, o cuidado e higiene dos animais, evitando a permanência em áreas possivelmente contaminadas, como é o caso do contato direto com a terra e as plantas forrageiras que retêm a maior parte dos microrganismos. Além de ser necessário o controle sobre alguns fatores que predis põem riscos de contaminações cruzadas, de animais enfermos para animais saudios, através do contato direto dos animais, como também pelo manejo inadequado dos tratadores (BRASIL, 2006)

Quando existem falhas durante o processo de confinamento, a incidência de instalação de doenças nos animais se torna um problema, já que os principais agentes contaminantes de suínos possuem quadros subclínicos de doença, dificultando o diagnóstico precoce e o tratamento da enfermidade. Com o atraso no reconhecimento da doença, há a facilidade de disseminação do patógeno para animais saudios, e em pouco tempo o rebanho pode estar acometido por patologias.

Os principais agentes contaminantes encontrados na suinocultura e causadores de doenças conhecidas como clínicas e subclínicas são o *Clostridium perfringens* e a *Salmonella* spp., as quais infectam os animais confinados causando sintomas de gastroenterites, seguidas por diarreias, que dificultam o ganho de peso e o desenvolvimento dos animais. Quando a contaminação acontece nos primeiros dias de vida dos leitões, os prejuízos para o produtor se agravam, já que nessa fase o quadro diarreico é agressivo e a incidência de óbitos é elevada.

Ambos contaminantes também são preocupantes do ponto de vista sanitário, visto que animais portadores assintomáticos desses agentes poderão entrar infectados na linha de abate e disseminar o agente na produção. Com isso poderão contaminar as carcaças que serão comercializadas e trazer riscos à saúde do consumidor, uma vez que os mesmos são descritos como principais agentes causadores de toxinfecções alimentares em humanos (CASTAGNA *et al.*, 2004).

Na área veterinária há diversas formas de prevenções contra *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp.. As vacinas desenvolvidas a partir de toxóides de *Clostridium perfringens* são aplicadas nas fêmeas durante a prenhez, e os

anticorpos são transmitidos aos leitões na amamentação. Já para *Salmonella* spp., os métodos preventivos disponíveis são vacinas para algumas cepas, mas ao que tem maior viabilidade são probióticos, que adicionados à ração dos animais tem como finalidade inibir o crescimento bacteriano de patógenos.

Embora existam várias alternativas que possibilitem o controle desses agentes, a utilização em rebanhos brasileiros não apresenta essa rotina de prevenção, sendo que poucos são os produtores que disponibilizam investimentos para esse fim.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Gerais da Suinocultura

A participação da suinocultura no mercado brasileiro e mundial tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, já que essa produção passou por profundas alterações tecnológicas visando principalmente o aumento da produtividade e a diminuição dos custos no processo de criação e abate. Dados comprovam que se trata de uma atividade importante e lucrativa na economia brasileira, pois conta com um faturamento de R\$ 12 bilhões por ano neste setor. (SEBRAE, 2008b).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) indicou que em 2011 o Brasil se manteve em quarto lugar no ranking de produção e exportação mundial de carne suína, embora a ocorrência de déficits durante o sistema de produção com a sanidade animal, a nutrição e o manejo dos animais nas granjas podem acarretar complicações em negociações dos produtos e perdas de futuros investidores e compradores deste setor.

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de carne suína (ABIPECS), o consumo da carne *in natura* no Brasil vem crescendo discretamente nos últimos anos, durante o ano de 2011, o consumo médio foi de 15,1kg por pessoa, sendo 1,5kg a mais em relação ao ano de 2010 (ABIPECS, 2011).

Esse crescimento, apesar de discreto, demonstra que a suinocultura brasileira é um mercado promissor na economia, e que com melhorias nos sistemas de criação que transmitam segurança e confiabilidade para os consumidores dos produtos suínos, o mercado interno tende a prosperar.

Segundo o MAPA, apenas 32,29% dos municípios brasileiros possuem fiscalização e serviços de inspeção dos produtos de origem animal, o que coloca em risco a confiança na comercialização e principalmente o aquecimento do setor exportador dos cortes.

A falta de fiscalização dos órgãos públicos, aliada a ansiedade do crescimento acelerado desse setor contribui com a incidência de doenças de aspectos clínicos e subclínicos em suínos.

A utilização de técnicas aprimoradas de manejo e cuidados com o bem-estar dos animais devem ser analisados a fim de contribuir minimizando os fatores que influenciam negativamente na suinocultura. Adicionado aos fatores destacados acima, o ambiente onde os animais estão instalados, a qualidade da água e da ração são elementos que precisam de atenção, já que podem ser meios de veiculação de patógenos e contaminação do plantel. (SEBRAE, 2012b)

Analisando as exigências do mercado consumidor e a qualidade do produto comercializado, acredita-se que o crescimento acelerado tem contribuído com aumentos no aparecimento de doenças e principalmente as diagnosticadas como subclínicas, as quais provocam diminuição da conversão alimentar e conseqüentemente perda de peso, acarretando em prejuízos econômicos para o produtor ao final do processo.

A introdução de sistemas de confinamento nas propriedades é caracterizada pelas modificações zootécnicas de criação que são adotadas com a finalidade de melhorar a produção e facilitar a higienização dos animais e das baias durante o manejo do plantel, a fim de minimizar os custos e também diminuir a ocorrência de possíveis patógenos.

Para se obter um confinamento com um número menor de patógenos é importante salientar, aos produtores, que os métodos higiênicos e sanitários precisam de maiores atenções e cuidados, ao passo que inadequações ou falhas durante o processo de higiene propiciam a disseminação de agentes patogênicos, aumentando os gastos com medicamentos, acarretando prejuízos a criação. (DEWEY *et al.*, 1995; CALDERARO *et al.*, 2001).

Nesse enquadramento, as doenças infecciosas entéricas representam um problema importante na suinocultura, são de natureza multifatorial e estão envolvidas com grandes perdas econômicas e contaminação da carcaça comercializada.

2.2. *Clostridium* spp.

Pertencentes à família Bacillaceae, as bactérias do gênero *Clostridium* são caracterizadas como Gram-positivos, possuem forma de bastonetes móveis, anaeróbios estritos e facultativos, formadoras de esporos quando expostas a ambientes extremos de temperatura e acidez. A variação de temperatura ideal para seu crescimento é entre 37°C a 45°C, e pH ótimo é em torno da neutralidade (pH=7) (BLASCHEK & SOLBERG, 1981).

O gênero *Clostridium* é apresentado por cerca de 200 espécies, mas apenas algumas espécies tem poder patogênico devido à produção de toxinas durante seu crescimento. (TORTORA *et al.*, 2005). Estas bactérias possuem a capacidade de compartilhar antígenos através de plasmídios, além de possuírem antígenos solúveis que são capazes de se agruparem utilizando testes de precipitina, além de serem microrganismos fermentadores de vários açúcares, como glicose, lactose, sacarose e podem também digerir algumas proteínas.

A maioria das espécies patogênicas causadoras de gastroenterites se instala no organismo do hospedeiro e causam enfermidade quando o microambiente digestivo dos animais sofrem alterações que favorecem a proliferação dessas bactérias (LOBATO & ASSIS, 2005). Algumas espécies de animais de interesse comercial, como as aves, suínos e bovinos, estão diretamente suscetíveis às enfermidades causadas por essas bactérias. Além dos animais, os humanos também estão diretamente expostos a quadros de infecções alimentares e toxinfecções.

Os clostrídios são responsáveis por diversas doenças invasivas causadas pelas diferentes formas de ação e produção de suas toxinas, esses efeitos podem ocorrer nas 30 espécies de clostrídios patogênicos, porém cerca de 90% dos casos de doenças invasivas são atribuídas a espécie *Clostridium perfringens*, cuja ação das suas toxinas tem como causa comum intoxicações alimentares, gangrenas gasosas (AWAD *et al.*, 2001), carbúnculo sintomático (GOMES *et al.*, 2008) e enterites necróticas (ESTEVES, 2005).

O *C. perfringens* é uma das espécies com maior variedade patogênica do gênero, tendo como ação de suas toxinas inúmeras doenças invasivas, e provavelmente é a mais difundida no mundo e, sem dúvida, a principal envolvida em casos de enterites em animais domésticos (BERCHIERI JUNIOR & MACARI, 2000).

2.3. *Clostridium perfringens*

A espécie *C. perfringens* está entre os microrganismos com maior abrangência de toxinas e grande importância na quantidade e grau de toxicidade e letalidade (SONGER, 1997). Essas substâncias são altamente tóxicas e fatais, e podem ser classificadas como exotoxinas (toxinas extracelulares) de polipeptídeos relativamente instáveis. Podem ter sua toxicidade destruída em temperaturas acima de 60°C, ou através de ação antigênica que estimula a formação de antitoxinas neutralizadoras, que tem a função de converter a toxinas em toxóides, que não tem poder tóxico, e que são utilizados para a imunização contra esse patógeno.

O *C. perfringens* é caracterizado por ser uma bactéria em forma de bastonete, formadora de esporos semiterminais e microaerófilos, sobrevivendo assim em ambientes com pouca quantidade de oxigênio (BROOKS *et al.*, 2010a). As cepas de *C. perfringens* são semelhantes em aspectos bioquímicos e físicos de suas colônias e se diferenciam pelas estruturas antigênicas das toxinas presentes, as quais são divididas em cinco tipos (A, B, C, D e E) devido à presença dos quatro principais fatores de virulência responsáveis por causar enfermidades, que são *alfa* (α), *beta* (β), *epsilon* (ϵ) e *iota* (i) (SMITH, 1979; NILO, 1980; BEER, 1988; PENHA *et al.*, 2005).

Outras duas toxinas, as enterotoxinas e a *beta2*, também são apontadas como fatores de virulência de *C. perfringens*, apesar de não serem utilizadas na tipagem dessa bactéria (SONGER & UZAL, 2005).

Nas intoxicações alimentares, em humanos, causadas por *C. perfringens*, os sintomas ocorrem após ingestão de grande quantidade de células vegetativas presentes, geralmente, em carnes aquecidas. As toxinas formam-se a partir do

momento que o microrganismo inicia a esporulação no intestino, culminando em diarreia após 6 horas da ingestão.

A espécie *C. perfringens* tem ampla ocorrência também no trato intestinal dos suínos e está diretamente relacionada como causa de enterotoxemias, principalmente pela detecção das toxinas α (tipo A) e α e β (tipo C) (SONGER e UZAL, 2005; VIEIRA *et al.*, 2008).

Os genes codificadores das quatro principais toxinas podem ter localização cromossomal ou plasmidial, sendo que os da toxina *alfa* estão localizados no cromossomo, os da enterotoxina podem estar localizados tanto no cromossomo como no plasmídio, e os demais genes codificadores (*beta*, *beta2*, *épsilon* e *iota*) são plasmidiais (PETIT *et al.*, 1999)

A toxina alfa é uma exotoxina hemolítica necrosante (lecitinase) que é produzida pelos cinco tipos de *C. perfringens*, mas em quantidades variáveis, sua principal forma de ação é lesionar as membranas celulares por clivagem da lecitina em fosforilcolina e diglicerídios, danificando as invaginações intestinais.

2.3.1. *Clostridium perfringens* tipo A

O *Clostridium perfringens* tipo A tem grande abrangência no ambiente e é encontrado facilmente em diversos locais, sendo possivelmente encontrado de forma natural na microbiota intestinal de animais de sangue quente, além de ser facilmente encontrado no solo, onde estão adaptados a sobreviverem. As cepas do tipo A são identificadas pela produção da toxina *alfa*, a qual é considerada uma das mais agressivas e responsável por causar enfermidades nos animais expostos a ela (YOO *et al.*, 1997).

Os sintomas ocorrem quando um grande número de microrganismos está instalado no intestino e se acumulam no jejuno e íleo dos animais produzindo a toxina *alfa* que podem causar necrose dos enterócitos, fazendo o animal perder eletrólitos e líquidos.

Esta toxina é a mais comum entre o *C. perfringens* e a ação toxigênica das cepas são variáveis, fazendo seu poder patogênico apresentar maior ou menor agressividade entre os principais tipos de *C. perfringens*, tornando o entendimento sobre o seu papel na patogênese de doenças confuso (BROOKS *et al.*, 2010a).

Devido à amplitude de disseminação do *C. perfringens* tipo A no ambiente, e principalmente a presença do mesmo na microbiota natural dos animais, apenas o isolamento desse agente a partir de animais enfermos podem ser provas inconclusivas das causas da patologia, e após morte, o isolamento do mesmo é frequente e facilmente visto no trato intestinal e tecidos.

Algumas estirpes do tipo A também podem produzir enterotoxinas em menores quantidades, as quais causam sintomas gastrentéricos nos humanos e em alguns animais domésticos (MACCLANE, 1996; SONGER, 1996; SARKER *et al.*, 1999).

As enterotoxinas produzidas por *C. perfringens* são potencialmente patogênicas, principalmente quando crescem em pratos preparados à base de carne. Quando as células vegetativas são ingeridas, elas esporulam no intestino, produzindo uma proteína que parece ser um componente não essencial da parede do esporo (a enterotoxina), a qual é diferente de todas as outras toxinas produzidas por clostrídios e que causam sintomas diarreicos.

2.3.2. *Clostridium perfringens* tipo B

As cepas do *C. perfringens* tipo B são caracterizadas por produzirem, principalmente a toxina *beta* e poucas quantidades de toxinas *alfa* e *épsilon* (NILO, 1980). Embora sejam toxinas poderosas, o poder patogênico e as interferências causadas no organismo dos infectados não motivam grandes pesquisas e descobrimentos, possuindo discretos relatos sobre ocorrências de enfermidades se comparados aos outros tipos, o que se sabe é que as cepas do tipo B são responsáveis principalmente por causar surtos de diarreias em cordeiros neonatos (TIMONEY *et al.*, 1988) e manifestar dores abdominais crônicas nesses animais com

idade de abate. Outros grupos de animais, como cabras, bezerros e potros, também podem desenvolver enterites hemorrágicas devido à ação do *C. perfringens* tipo B.

A escassez de relatos atribuídos ao tipo B pode ser consequência da ação ocorrida a partir do ano de 1961 quando se iniciou o desenvolvimento de vacina para a proteção e o controle de diarreias nos rebanhos de cordeiros.

2.3.3. *Clostridium perfringens* tipo C

O *Clostridium perfringens* tipo C produz a toxina *beta*, e pequena quantidade de toxina *alfa*, ambas atuam atacando os enterócitos resultando na perda inicial das microvilosidades dos enterócitos, causando lesões necróticas. A *beta* toxina é tida como a mais sensível dentre as toxinas produzidas pelo *C. perfringens*, pois é facilmente degradada por altas temperaturas, ações enzimáticas ou outros fatores ambientais que não causariam danos à ação das outras toxinas (NIILLO, 1980). As cepas desse tipo de *Clostridium* são comumente causadoras de enterites necróticas e outras doenças gastrintestinas em humanos, aves, bovinos, suínos, equinos e ovinos (WALKER, 1990), possuindo grande abrangência de espécies suscetíveis.

Em animais neonatos a frequência de infecções do tipo C é muito comum, resultando em sintomas agressivos como diarreias hemorrágicas, necroses de mucosa, e levando os animais a óbito em poucas horas. A multiplicação e a agressividade dos sintomas causados por esse tipo de *Clostridium perfringens* podem ser atribuídos ao estabelecimento desse agente etiológico antes da microbiota residente, o que dificulta o combate do organismo ao agente. Outro fator que favorece a multiplicação do agente ocorre quando há alterações bruscas na dieta alimentar dos animais, no período de desmama, o que desestabiliza a flora intestinal residente e estimula o crescimento e a permanência do *Clostridium perfringens* tipo C (NIILLO, 1980; TIMONEY et al., 1988).

Dentre os animais domésticos, os leitões aparecem como os principais afetados por esse microorganismo desde as primeiras semanas de vida (JOHNSON et al., 1992; BUOGO et al., 1995), desenvolvendo graves doenças com sintomas

agressivos de enterites necrosantes hemorrágicas, que culminam em óbitos geralmente associadas a colonização do *C. perfringens* tipo C principalmente após a desmama.

Enterites necrosantes causadas por *C. perfringens* tipo C tem ampla ocorrência com casos de óbitos em crianças na Nova Guiné, contudo a utilização de vacinas com toxóides tipo C para a imunização contra esse agente tem estimulado a resistência do hospedeiro ao agente, favorecendo em valor preventivo a ocorrência de casos clínicos (BROOKS *et al.*, 2010a).

2.3.4. *Clostridium perfringens* tipo D e E

O *Clostridium perfringens* tipo D é caracterizado pela produção das toxinas *alfa* e *epsilon*, sendo a segunda a mais prevalente (NIILLO, 1980). É comumente causadora de enterotoxemia fatais em ovinos. Diferentemente dos outros tipos de *Clostridium perfringens*, o tipo D raramente afeta animais neonatos, pois seu principal modo de ação é em animais a partir de três semanas de vida e que ainda ingerem grande quantidade de leite.

Contudo, ao atingirem dez semanas de vida, os animais sofrem alterações na dieta alimentar, onde anteriormente os mantinham com amamentação, passam a ingerir dieta rica em grão e minerais. Esse manejo, aliado ao confinamento, favorece a ocorrência de casos de enterotoxemias fatais, já que a colonização desse agente também ocorre quando há mudanças bruscas na alimentação dos animais, desestabilizando a microbiota residente (PENHA, 2004). Esta doença também pode acometer bezerros e cabras, mas raramente ocorrem em bovinos adultos, equinos ou outros animais. (GRINER *et al.*, 1956)

O *Clostridium perfringens* tipo E produz a toxina *iota* em grande quantidade e a toxina *alfa* em menor (NIILLO, 1980); a toxina *iota* se faz presente apenas neste tipo de *Clostridium perfringens*, o que causa algumas controvérsias sobre seu papel na ocorrência de sintomas de enfermidade, já que fontes concluem que cepas do tipo E não desempenham importância na patogenicidade.

No entanto, Patton *et al.* (1978) evidenciam que a ocorrência de cepas do tipo E podem ser responsáveis por enterotoxemias em coelhos que sofreram estresse relacionado com a dieta alimentar. Songer (1997) relatou que raramente o tipo E pode ser a causa de enterotoxemia em cordeiros, bezerras e coelhos. A toxina *iota* foi relatada pela primeira vez a mais de 76 anos na Grã-Bretanha, mas os casos atribuídos a esta toxina são incertos já que as publicações podem não representar casos genuínos de ι -enterotoxemia.

Segundo Niilo (1980), a toxina é produzida por células ativadas por enzimas proteolíticas, esse efeitos biológicos incluem ação necrosante e aumento acentuado na permeabilidade capilar.

Patton *et al.* (1978) também descreveram hemorragia e edema cecal, semelhantes as causados por enterotoxinas, embora o isolamento do microrganismo do tipo E em animais afetados não correspondeu ao esperado, e a toxina *iota* não foi detectadas com o crescimento artificial. Com isso observa-se que resultados tidos de modelos experimentais não podem ser conclusivos para confirmação da patogenicidade da toxina *iota* tanto em animais quanto em humanos.

2.4. Clostridioses na Suinocultura

Dentre os tipos de *C. perfringens* envolvidos com enfermidades em suínos, destacam-se os do tipo A e C. Aqueles do tipo A, que produzem a toxina α , são os mais comuns encontrados no intestino de suínos, embora apresentem baixa mortalidade nos animais, está diretamente relacionada com casos de enterites necróticas em leitões. Diferentemente do *C. perfringens* Tipo C, que produzem as toxinas α e β , também é frequente causador de enterites necróticas em leitões, mas sua incidência em suínos tem grande relação com enterotoxemias fatais.

A transmissão para os suínos acontece por diferentes vias, podendo ocorrer durante a alimentação, quando esporos de *C. perfringens* estão presentes na ração fornecida aos animais, ou mesmo quando esses esporos são trazidos por correntes de ar para o ambiente onde os animais se encontram. Além da possibilidade de

transmissão dos animais infectados para os sadios veiculados pelo manejo do confinamento.

A amplitude de dispersão desse agente bacteriano é muito elevada, podendo encontrá-los em diversos ambientes, inclusive no solo e colonizando os intestinos de homens e animais. (NILO, 1980).

Devido a esta amplitude de dispersão e a resistência atribuída aos esporos do *C. perfringens*, o controle sanitário desse microrganismo é dificilmente realizado com sucesso, o que prejudica a eliminação dessa bactéria do ambiente e dos animais. E quando acometem os suínos, a detecção do *C. perfringens* e a identificação da doença é confusa, já que muitas vezes não causam sintomas. Com isso os métodos de averiguação sanitária dos animais são através da utilização de técnicas convencionais de microbiologia, as quais são lentas e laboriosas, pois necessitam de semeadura e isolamento em meios de cultura específicos com incubação em anaerobiose e identificação da espécie com provas bioquímicas.

O desenvolvimento de vacinas que controlam a disseminação de doenças responsáveis por perdas econômicas é uma escolha de sucesso nas criações de suínos. No Brasil, os programas disponíveis de vacinação em rebanhos são rotineiros, embora haja resistência dos criadores para essa prática, às vezes por motivos econômicos ou até pela falta de informação sobre os benefícios conquistados após a aplicação de vacinas. Para a suinocultura, há vacinas disponíveis para 17 antígenos diferentes no mercado brasileiro, inclusive para *Clostridium perfringens*, contudo a disponibilidade para as diferentes ações toxigênicas da bactéria ainda são restrita, sendo conhecidas vacinas para o tipo A, B, C e D, e esse fato dificulta o controle de outras patologias ligadas ao *Clostridium perfringens*.

2.5. *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* spp. pertence à Enterobacteriaceae que constituem um grande grupo de bastonetes Gram negativos, que tem como habitat natural o trato

intestinal de seres humanos e animais. As bactérias pertencentes a esse gênero são móveis com flagelos peritríquios, e transmitidas ao homem a partir de produtos de origem animal, os quais provocam enterites, infecções sistêmicas e febre entérica, sendo que grande parte dos sorotipos são patogênicos. A temperatura ideal de crescimento é de 36°C a 43°C, associado a um pH em torno de 7, embora suportem a faixa de pH de 4,5 a 9,5 (BROOKS *et al.*, 2010b). Em relação às características bioquímicas, as salmonelas são oxidase e indol negativas, possuem produção de gás a partir da glicose, apresentam catalase positiva, e possuem capacidade de reduzir nitrato a nitrito (ANDERSON & ZIPRIN, 2002) além de serem capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono para sua multiplicação.

Essas bactérias possuem três tipos de antígenos diferentes: o antígeno somático (O), composto por lipopolissacarídeos; o antígeno flagelar (H), o qual é composto por proteínas termolábeis e se dividem em monofásico e difásico; e o antígeno capsular único (Vi), presente apenas nas *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin*. Os antígenos O e H podem estar presentes, alternativamente, na bactéria, já que os sorovares elaboram os dois antígenos (D'AOUST, 1994; GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000).

O gênero *Salmonella* spp. sempre motivou inúmeras discussões na sociedade científica devido à forma taxonômica do grupo, já que era motivo de controvérsias sob a forma de nomenclatura das espécies. Contudo, estudo sobre hibridização de DNA com DNA resultaram no conhecimento da existência de sete grupos evolutivos. A partir de análises moleculares, concluiu-se que o gênero *Salmonella* está dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, e estas estão divididas em subespécies e sorotipos. A espécie mais conhecida e que possui maior incidência de relatos atribuídos a infecções e frequentes contaminações em humanos e animais é a *Salmonella enterica* que é composta por cinco subespécies: I – *enterica*, II – *salamae*, IIIa – *arizonae* e IIIb – *diazinonae*, IV – *houtenae*, e V – *indica*. Dentre as subespécies identificadas, a *S. enterica* é a que possui a maior quantidade de sorovares que são responsáveis por casos de infecções em humanos e animais (BROOKS *et al.*, 2010b).

Os sorovares são diferenciados a partir dos antígenos O e H, já que não é possível sua diferenciação utilizando provas bioquímicas. Estima-se que existem

2543 sorovares diferentes que compõem o gênero *Salmonella* (POPOFF *et al.*, 2001), sendo todos identificados de acordo com seus antígenos somáticos e flagelares, através de sorotipagem dos isolados.

Os quadros de infecção por *Salmonella* spp. podem ter diversas maneiras de origem, mas a principal via de transmissão desses agentes ocorrem através dos alimentos e da água contaminados, podendo causar graves enfermidades (KICH *et al.*, 2005).

A sua atividade toxigênica tem grande abrangência, podendo desencadear hipertermia, leucopenia, hipotensão e profundos transtornos no metabolismo, interferindo drasticamente nas condições físicas do hospedeiro (ESTEVES, 2005). Em animais, os principais casos diagnosticados são os envolvidos com enterites e septicemias (LONGO *et al.*, 2010), e os sintomas mais frequentes em humanos são as conhecidas como gastroenterites, sendo que alguns casos foram levados a óbitos devido a complicações no quadro infeccioso.

A *Salmonella* Enteritidis e a *Salmonella* Typhimurium são os sorovares mais isolados em casos de surtos de salmoneloses em humanos, se tornando um grave problema no controle da doença e na saúde pública (WALES, 2010).

Outras síndromes clínicas também já foram relatadas por sua ocorrência em humanos devido a infecções por Salmonela. Duas dessas síndromes possuem sintomas de alta agressividade e que podem levar a óbito, como é o caso da patologia conhecida como Febre Tifóide, que é uma infecção sistêmica grave causada por *S. Typhi* e da Febre Paratifóide que é causada pela *S. Paratyphi* em que os sintomas clínicos aparecem de 8 a 28 dias após a infecção por estas cepas altamente virulentas e invasivas (D'AOUST, 1994).

Problemas decorrentes de contaminações por *Salmonella* spp. tem abrangência mundial devido a sua fácil disseminação e a descuidos de ordem sanitária dos órgãos responsáveis. Os países considerados em desenvolvimento e mesmo os já desenvolvidos sofrem com a grande incidência de salmoneloses de origem alimentar, as quais contaminam os alimentos que posteriormente serão consumidos pela população.

As patologias de origem alimentar em humanos são geralmente atribuídas à Salmonela, as quais possuem incidência geográfica de âmbito mundial. Mesmo em

países classificados como desenvolvidos, a ocorrência dessa enfermidade é frequente; como exemplo, tem-se a União Européia, que a ocorrência desta patologia é confirmada em cerca de 100 mil casos registrados em humanos a cada ano (GESLAIN-LANÉELLE, 2011).

2.6. *Salmonella* spp. na Suinocultura

A incidência em contaminação de alimentos e casos de salmoneloses em humanos já apresentou proporções epidêmicas em vários países durante a década de 1990, contudo a preocupação com surtos de contaminação e reincidências de epidemias foi o incentivo para os órgãos responsáveis voltarem atenções às fiscalizações rotineiras e propor projetos de lei regulatórios para as indústrias de alimentos (MADRI SALUD, 2008).

Hill *et al* (2008) relataram que 1% a 10% dos casos de salmoneloses em humanos motivaram-se por consumo de carne suína, e que 17% dos suínos com idade de abate estão infectados com *Salmonella* spp., além de estimar que 4% dos animais eliminam o microrganismo nas fezes por longo período.

Um número crescente de países europeus focam suas atenções na fase primária de produção de suínos, afim de minimizar os problemas ocasionados por contaminação de salmonela, mas um dos maiores desafios desta abordagem reside na identificação e intervenção eficaz nas medidas de controle que podem ser tomadas em nível de rebanho (LO FO WONG *et al.*, 2004).

A transmissão de *Salmonella* spp. em animais domésticos, como os suínos, ocorre principalmente pela via fecal-oral, sendo que as salmonelas podem ser carregadas por macrófagos e neutrófilos, e se alojarem nos linfonodos, sendo eliminadas quando os animais passarem por fatores de estresse.

Dentre os principais sorovares de salmonelas que são responsáveis por enfermidades nos animais, destaca-se a *S. Typhimurium*, a qual é um dos mais envolvidos em casos de enterocolite em suínos (MÜLLER, 2005), podendo ser

disseminada rapidamente entre os animais confinados através das fezes, acarretando grandes prejuízos econômicos.

Essa presença de salmonelas em suínos é preocupante de dois pontos de vista distintos, o primeiro é a manifestação da doença, interferindo na saúde dos animais. E a segunda preocupação é com a contaminação da carcaça e dos produtos que serão consumidos e que poderão manifestar toxinfecções em humanos (EKPERINGIN & NAGAJARA, 1998).

Quando levam a manifestações clínicas nos suínos, as salmonelas podem causar sintomas entéricos como diarréias, que é a forma localizada da doença, ou se manifestam de forma sistêmica, afetando vários sistemas e causando septicemia e óbito. Mas os casos clínicos ocorrem com rara frequência nos rebanhos de suínos, tornando a principal preocupação com a introdução do agente nos rebanhos e posteriormente no frigorífico, facilitando a contaminação das carcaças abatidas.

Na década de 1990, a comercialização da carne de porco tinha pouca aceitação dos consumidores, já que o consumo de suínos era associado como uma potencial fonte de salmonelose humana (LO FO WONG *et al.*, 2002), onde sabia-se que *Salmonella* era identificada em todas as fases de produção de suínos.

Como suínos infectados ainda são uma das principais fontes de introdução da bactéria na cadeia alimentar humana. Algumas pesquisas científicas tem se concentrado nos últimos anos na identificação dos fatores de risco para a infecção, bem como desenvolver estratégias que minimizem os efeitos a nível de produção (GOTTER *et al.*, 2012).

Conforme abordado anteriormente, o agravamento na disseminação de *Salmonella* spp. ocorre quando os suínos portadores desse microrganismo, e aparentemente saudáveis, eliminam essas bactérias nas fezes continuamente, podendo contaminar o ambiente a que estão confinados e atingir outros animais que futuramente ocuparão o mesmo espaço (CASTAGNA *et al.*, 2004).

Os focos de contaminação por esses agentes estão principalmente ligados ao ambiente em que os animais estão confinados. As baias, por exemplo, quando não são devidamente higienizadas de um lote de animais para o outro, a contaminação do ambiente permanecerá e poderá infectar animais sadios através dos bebedouros de água ou da ração oferecida para estes animais.

A partir de pequenos descuidos de manejo no processo industrial, os animais portadores desses microrganismos podem transmiti-los para os animais sadios tanto durante o transporte, como na área de abate, além da possibilidade de contaminação da carcaça durante a evisceração.

Com relação à contaminação da carcaça por *Salmonella* spp., outros instrumentos presentes no frigorífico também podem ser responsáveis pela disseminação do agente na linha de produção, como as máquinas de polir, se estiverem inadequadamente limpas, ou procedimentos errados durante a evisceração, como falta de higiene, são os fatores de risco mais vistos dentro da indústria. Estima-se que 5 a 15% das contaminações de carcaça com *Salmonella* spp. ocorrem após a queima da pelagem, sendo que a maior porcentagem ocorre na prática de evisceração (55-90%) e em menor escala, na divisão dos cortes (5-35%) (BERENDS *et al.*, 1997).

Os principais elementos de contaminação que interferem na linha de abate tem forte correlação entre o número de animais vivos que carregam *Salmonella* spp. e as eliminam nas fezes, e o número de carcaças contaminadas no final da linha de abate, como descrito por Berends *et al.*, (1998). Os mesmos autores relataram que animais portadores de *Salmonella* spp., possuem 3 a 4 vezes mais chances de ter a carcaça positiva para esse microrganismo no final do processo.

Berends *et al.* (1997), afirmaram em seus estudos que 30% dos animais analisados apresentaram positividade para salmonela que possivelmente foi transmitido através do contato com animais portadores desse patógeno, caracterizando uma contaminação direta. Estimaram também que de 5 a 30% das carcaças dos animais positivos, poderiam ser contaminadas por *Salmonella* spp.

Enquanto houver animais positivos para salmonela entrando nos frigoríficos, haverá sempre transmissão do agente para a carcaça e conseqüentemente para o consumidor, mesmo que o processo na industria seja realizado de acordo com normas e códigos de boas práticas de fabricação. Em regulamentos da União Européia é autorizado a descontaminação da carcaça por substâncias que são consideradas seguras, como ácido láctico, sendo com as condições de que os frigoríficos cumpram as normas estabelecidas de uso (BERENDS *et al.*, 1997) pela GMP – “Good Manufacturing Practices”.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considera-se de suma importância o controle microbiológico dos patógenos *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. a fim de minimizar interferências na economia do setor suinícola, e zelar pela segurança alimentar e comercialização dos produtos derivados de carne suína, onde estes microrganismos podem afetar a qualidade microbiológica da carne comercializada desencadeando riscos à saúde do consumidor.

Baseado nessas informações idealizou-se o presente trabalho, a fim de alertar os suinocultores e a comunidade científica sobre a importância de manter os rebanhos e o setor suinícola livres de agentes patogênicos, principalmente *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp., para maiores rendimentos com a atividade e a conservação da sanidade do rebanho e conseqüentemente a manutenção da qualidade dos produtos comercializados.

O trabalho objetivou identificar as bactérias *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., que frequentemente estão envolvidas em casos de doenças subclínica e/ou casos de diarreia e doenças intestinais nos suínos, utilizando metodologias básicas de microbiologia e a técnica de PCR para identificação.

Também se objetivou correlacionar a presença de *Clostridium perfringens* nos suínos com interferências no ganho de peso destes animais criados para o abate.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e cultivo bacteriano

As amostras foram coletadas de um confinamento experimental de suínos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP *Câmpus* Jaboticabal contando com 84 amostras provenientes de duas avaliações em períodos distintos. Outro grupo amostral, também constituído por 84 animais, foi obtido de um frigorífico de suínos no interior do Estado de São Paulo.

Na primeira coleta, os animais do confinamento apresentavam idade em torno de 120 dias e média de peso de 98 kg, enquanto que na segunda coleta os animais estavam com 140 dias e pesando 121 kg em média. A higienização das baias foi realizada apenas com jatos de água em dias alternados. Os animais estavam aparentemente saudáveis e sem sintomas de enterites, não receberam vacinação no confinamento de origem e, os que apresentaram dificuldades respiratórias no confinamento experimental foram tratados com terramicina e um anti-inflamatório.

As amostras foram obtidas através da introdução de dois suabes na região anorretal de cada animal. Os suabes foram imersos individualmente em tubos contendo água peptonada 0,1% estéril e encaminhados ao laboratório de Bactérias Anaeróbicas da FCAV/UNESP para as análises bacterianas.

O procedimento para contagem de bactérias do gênero *Clostridium* spp. foi iniciado realizando-se diluições seriadas a partir dos tubos coletados. As amostras diluídas foram submetidas ao choque térmico a temperatura de 80°C por 10 minutos para a germinação dos esporos, eliminação de células vegetativas e de possíveis contaminantes.

Após o choque térmico, 1 mL de cada diluição foi transferido para placas de Petri estéreis em duplicata e às placas foram acrescentados 20 mL de meio de cultura Reinforced Clostridial Agar (RCA) ainda no estado líquido. Os líquidos foram homogeneizados, sendo este método conhecido como *pour-plate*. As placas foram dispostas em jarras de anaerobiose com sistema GasPack[®] e levadas à estufa a 37°C por 48 horas.

A contagem das colônias de *Clostridium* spp. de cada diluição foi realizada, possibilitando a leitura de crescimento de 30 a 300 UFC. Após a contagem, 3-5 colônias de cada amostra foram selecionadas e então repicadas para tubos de ensaio fechados com rosca contendo cinco mililitros de caldo BHI (Brain Heart Infusion) a fim de simular um ambiente anaeróbico. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24h.

A partir dos dados da contagem bacteriana foi realizado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, sendo o coeficiente de variação estabilizado pela transformação dos valores para $\log(x+5)$.

Para o cultivo de bactérias do gênero *Salmonella* spp. os tubos contendo os suabes foram incubados a 42°C por 24 horas. Posteriormente, transferiu-se um mililitro do líquido da cultura de bactéria para tubos de ensaio contendo dez mililitros de caldos de enriquecimento Selenito-Novobiocina[®] e Rappaport Vassiladis, os quais foram incubados a 37°C e 42°C, respectivamente, durante 24 horas.

Após o enriquecimento, realizou-se o isolamento das amostras em Agar MacConkey e Agar XLD, e as placas semeadas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Colônias sugestivas de *Salmonella* spp. foram repicadas em meio Agar Radhanjs, e novamente levadas à estufa bacteriológica nas mesmas condições anteriores. As amostras que apresentaram crescimento e coloração duvidosos para *Salmonella* spp. no meio Ágar Radhanjs foram repicadas em meio de cultura Ágar Rambach (Merck[®]) e TSI (Triple Sugar Iron) e incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente.

4.2. Identificação molecular de *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp.

As amostras foram submetidas à extração de DNA às utilizando a técnica descrita por Marmur (MARMUR, 1961). A partir do DNA das amostras foram realizadas reações de PCR para a detecção dos genes que codificam as toxinas *alfa*, *beta*, *epsilon*, *iota*, *entero* e *beta 2* presentes em *C. perfringens* (Tabela 1) e para a detecção dos genes *invA* e *fliC* presentes em *Salmonella* spp. e *S.*

Typhimurium, respectivamente. As cepas de *Clostridium perfringens* utilizadas como padrão foram cedidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) – sediado em Pedro Leopoldo- MG. Já a cepa de *Salmonella* Typhimurium foi cedida pelo Laboratório de Bacterioses/Ornitopatologia do Departamento de Patologia da FCAV/UNESP – Câmpus Jaboticabal.

A amplificação dos fragmentos foi realizada utilizando tampão 1X [100 mM Tris-HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8% (v/v) Nonidet P40]; MgCl₂ 2 mM; dNTP's 0,2 mM, 1,5 U de *Taq DNA polimerase*, 5 pmol de cada *primer*, 60 ng de DNA genômico e água pura estéril para 20 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador Veriti Thermal Cyclor (Applied Biosystems) programado com 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 1 minuto a 55°C para a reação multiplex de *C. perfringens*, 60°C e 52°C para amplificação dos genes *invA* e *fliC*, respectivamente, e 72°C por 1,5 minuto seguido de um ciclo final a 72°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo SYBR[®] Green 1X (Invitrogen) e padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen e Fermentas, respectivamente) e visualizadas em equipamento de fotodocumentação Gel Doc XR (BioRad).

Tabela 1. Sequências de nucleotídeos utilizadas para identificação dos genes presentes na espécie *Clostridium perfringens* nas amostras coletadas a partir de suabe da região anorretal de suínos.

Gene	Sequência (5'-3')*	Produto Amplificado (pb)
<i>cpa</i>	AGTCTACGCTTGGGATGGAA TTTCCTGGGTTGTCCATTTTC	900
<i>cpb</i>	TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA	611
<i>etx</i>	TGGGAACCTTCGATACAAGCA TTAACTCATCTCCCATAACTGCAC	396
<i>iap</i>	AAACGCATTAAAGCTCACACC CTGCATAACCTGGAATGGCT	293
<i>cpe</i>	GGGGAACCCTCAGTAGTTTCA ACCAGCTGGATTTGAGTTTAATG	506
<i>cpb-2</i>	CAAGCAATTGGGGGAGTTTA GCAGAATCAGGATTTTGACCA	200

* Baums et al. (2004)

Tabela 2. Sequências de nucleotídeos utilizadas para amplificação e confirmação das espécies *Salmonella* spp. e *Salmonella* Typhimurium nas amostras coletadas a partir de suabe da região anorretal de suínos.

Gene	Sequência (5'-3')	Produto amplificado (pb)	Referência
<i>invA</i>	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284 pb	Galán <i>et al.</i> (1992)
<i>fliC</i>	CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT ACTGGTAAAGATGGCT	620 pb	Soumet <i>et al.</i> (1999)

5. RESULTADOS

5.1. Contagem de bactérias

Na primeira avaliação, na qual o peso médio dos animais era de 98,39 kg, houve contagem bacteriana em 17 animais dos 42 coletados, sendo a média das contagens de $1,2 \times 10^5$ UFC/mL. Já na segunda avaliação, na qual o peso médio dos animais era de 121 Kg, obteve-se contagem bacteriana em 24 animais dos 42 coletados, cuja média foi de $7,88 \times 10^2$ UFC/mL. Nas amostras coletadas no frigorífico a média de contagem foi de $1,8 \times 10^4$ UFC/mL.

Os testes estatísticos mostraram que não houve diferenças significativas entre as duas avaliações do confinamento (DMS (5%) = 0,7024). Já a variação da contagem bacteriana entre as amostras coletadas no confinamento e no frigorífico foi significativa (99% de probabilidade) (Tabela 3).

Tabela 3. Médias das contagens obtidas das amostras coletadas nas duas avaliações do confinamento e no frigorífico e resultado do Teste de Tukey.

	Media Contagem	
Primeira Avaliação	$1,2 \times 10^5$	b
Segunda Avaliação	$7,88 \times 10^2$	b
Frigorifico	$1,85 \times 10^4$	a
CV	49,7	
F	28,89**	
P	< 0,01	
DMS(5%)	0,7024	

* dados transformados para $\log(x+5)$

Ao avaliar o ganho de peso entre os animais do confinamento, os mesmos apresentaram variações de peso entre os que tiveram contagens bacterianas de *Clostridium* spp. e/ou presença ou ausência de salmonelas. Os que apresentaram presença das bactérias e maior contagem bacteriana mostraram valores menores de ganho de peso e foram para o abate abaixo do peso esperado (Tabela 4).

Tabela 4. Médias de ganho de peso dos animais provenientes do confinamento entre as duas avaliações. Amostras de 1 a 12 representam os animais que apresentaram presença de *Clostridium spp.* e/ou *Salmonella spp.*, demonstrando que a média de ganho de peso era inferior ao dos animais ausentes das mesmas (Amostras de 13 a 16).

ANIMAIS CONFINAMENTO					
ANIMAL	PESO AVALIAÇÃO 1 (kg)	PESO AVALIAÇÃO 2 (kg)	GANHO DE PESO (kg)	PRESENÇA <i>Clostridium</i> <i>spp.</i>	PRESENÇA <i>Salmonella</i> <i>spp.</i>
1	90,45	112,2	21,75	+	+
2	93,55	115,8	22,25	+	+
3	89,75	113,1	23,35	-	+
4	96,95	122,2	25,25	-	+
5	99,5	125,45	25,95	-	+
6	99,7	126,15	26,45	+	-
7	98,9	126,8	27,9	+	+
8	100,75	129,1	28,35	+	-
9	105,4	133,95	28,55	+	-
10	85,45	115,45	30	+	+
11	95,6	127	31,4	+	-
12	92	123,6	31,6	+	-
13	99	133,95	34,95	-	-
14	104,2	143,85	39,65	-	-
15	110,75	150,8	40,05	-	-
16	95,95	136,85	40,9	-	-

Houve correlação negativa entre a contagem de *Clostridium spp.* e o ganho de peso dos animais, pois a significância do coeficiente de correlação entre esses dois fatores apresentou o valor de - 0,25. Esse resultado reafirma que os animais dos quais foram obtidas médias de contagem bacterianas mais elevadas foram os que apresentaram menores valores de ganho de peso.

5.2. Identificação molecular de *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp.

Por meio da técnica de PCR foi possível a identificação de *Clostridium perfringens* pela amplificação do gene *cpa* que codifica a toxina *alfa*, presente em todas as bactérias dessa espécie. As amostras positivas não apresentaram amplificação para as demais toxinas testadas. Assim, 25% (21 amostras) dos animais do confinamento e 46,4% (39 amostras) dos animais do frigorífico apresentavam *C. perfringens* do tipo A (Figuras 1 e 2).

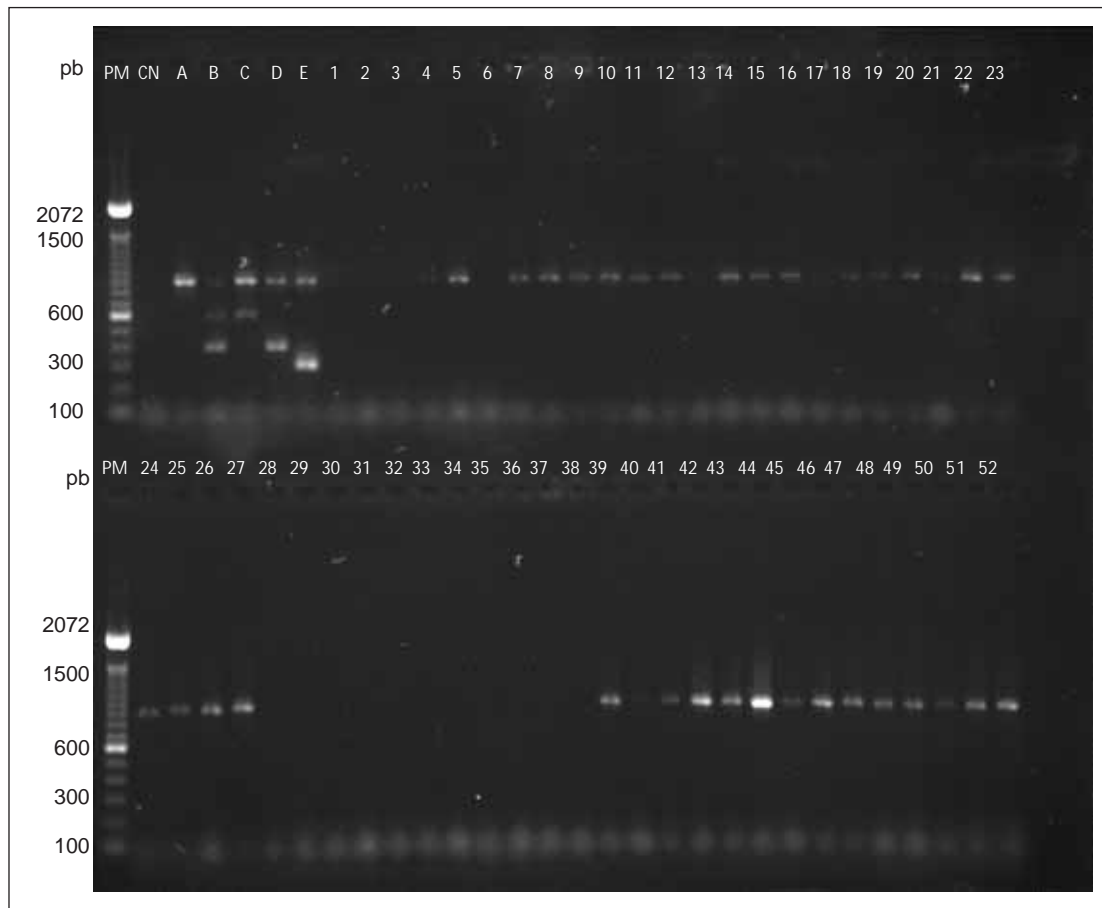


Figura 1. Produto da amplificação dos genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe* e *cpb-2* para identificação de *Clostridium perfringens*. PM: Padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); CN: Controle Negativo; A: Cepa padrão Tipo A (*cpa*: 900pb); B: Cepa padrão Tipo B (*cpa*: 900pb, *cpb*: 611pb e *etx*: 396pb); C: Cepa padrão Tipo C: (*cpa*: 900 pb e *cpb*: 611pb); D: cepa padrão Tipo D (*cpa*: 900pb e *etx*: 396pb); E: cepa padrão Tipo E (*cpa*:900pb e *iap*: 293pb); Linhas de 1-38: Amostras coletadas no confinamento; Linhas de 39-52: Amostras coletadas no frigorífico.

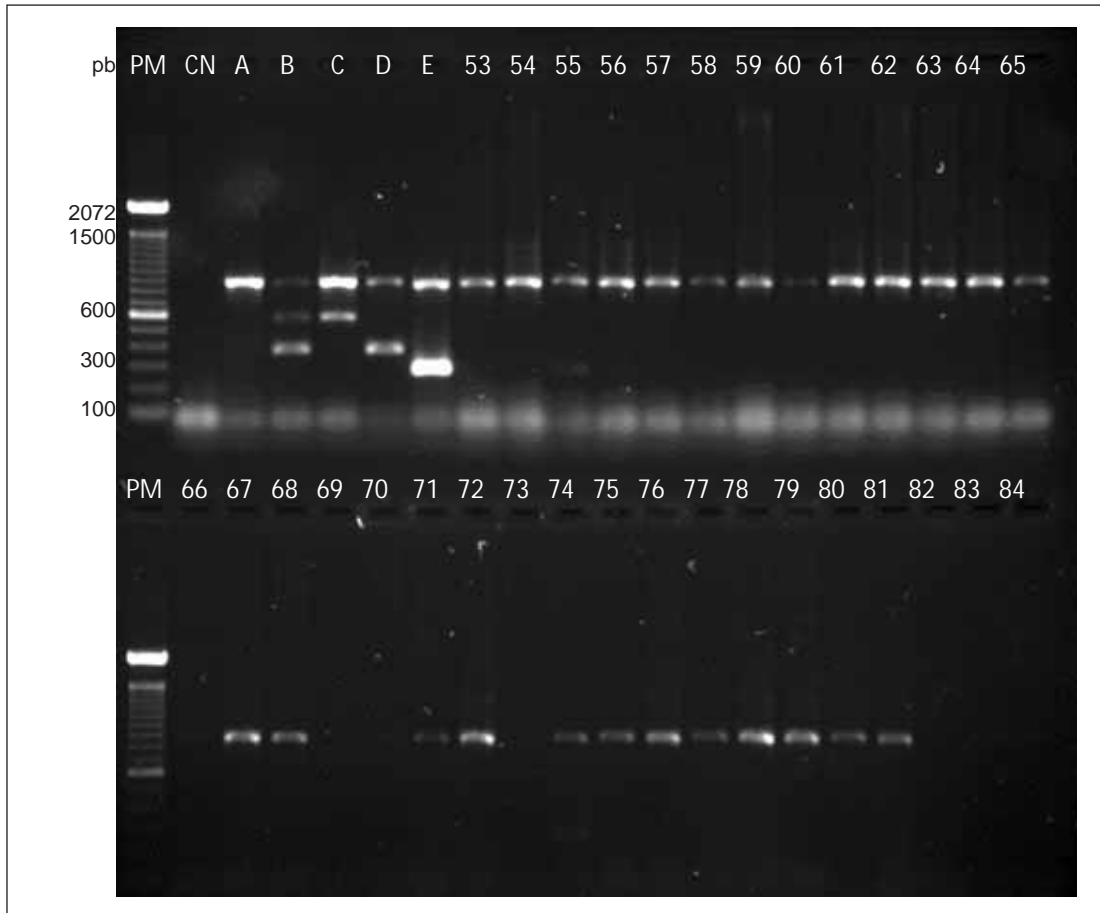


Figura 2. Produto da amplificação dos genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe* e *cpb-2* para identificação de *Clostridium perfringens*. PM: Padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); CN: Controle Negativo; A: Cepa padrão Tipo A (*cpa*: 900pb); B: Cepa padrão Tipo B (*cpa*: 900pb, *cpb*: 611pb e *etx*: 396pb); C: Cepa padrão Tipo C: (*cpa*: 900 pb e *cpb*: 611pb); D: cepa padrão Tipo D (*cpa*: 900pb e *etx*: 396pb); E: cepa padrão Tipo E (*cpa*:900pb e *iap*: 293pb); Linhas de 53-84: Amostras coletadas no frigorífico.

Bactérias do gênero *Salmonella* spp. foram identificadas em 9,5% dos animais em confinamento (oito amostras) e 21,4% (18 amostras) dos animais coletados na linha de abate (Figura 3). Já para *Salmonella* Typhimurium, o número de amostras positivas no frigorífico (8,33%) foi maior que no confinamento (3,57%) (Figura 4).

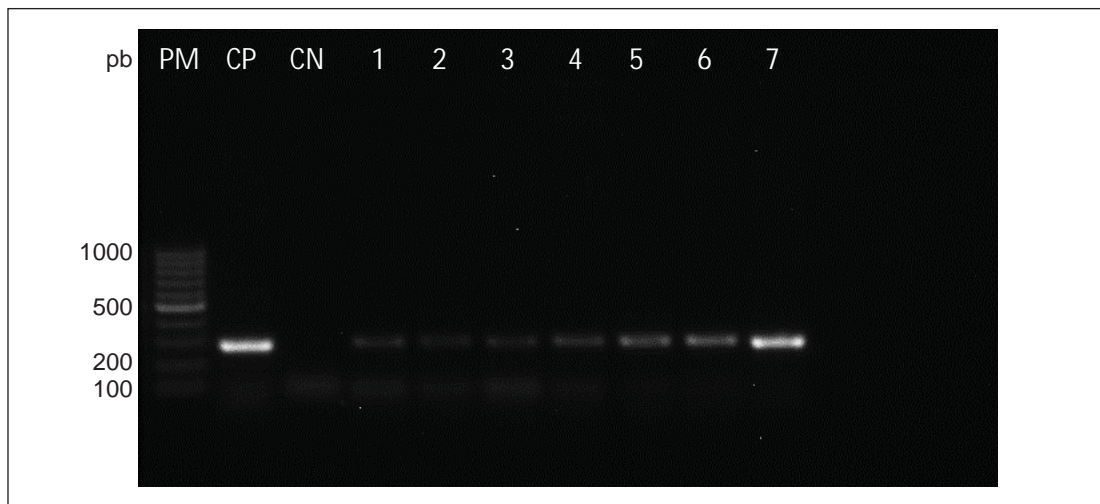


Figura 3. Produto da amplificação do gene *invA* (284 pb) para identificação de *Salmonella* spp. PM: Padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Fermentas); CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; Linhas de 1-3: Amostras coletadas do confinamento; Linhas de 4-7: Amostras coletadas no frigorífico.

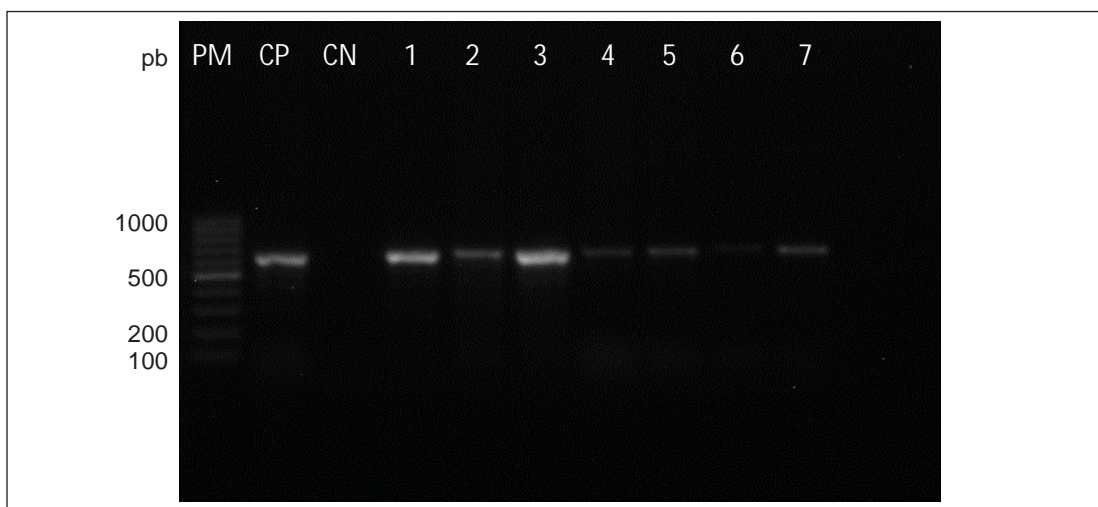


Figura 4. Produto da amplificação do gene *fliC* (620 pb) para identificação de *Salmonella* Typhimurium. PM: Padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Fermentas); CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; Linhas de 1-4: Amostras coletadas do frigorífico; Linhas de 5-7: Amostras coletadas no confinamento.

6. DISCUSSÃO

As análises bacterianas realizadas durante o trabalho ocorreram sem que os animais apresentassem sintomas característicos de contaminação por *C. perfringens* ou *Salmonella* spp.. Contudo as investigações se mantiveram motivadas pela provável presença dessas bactérias em animais aparentemente saudáveis, já que esses podem ser portadores assintomáticos desses patógenos.

No caso das cepas de *Clostridium perfringens*, esse fato acontece devido à formação de esporos resistentes que podem estar presentes na região intestinal nesta forma latente. Já as *Salmonella* spp., em organismos imunologicamente resistentes, podem colonizar a região intestinal e permanecer inativas sem causar danos ao hospedeiro, caracterizando-o como um portador assintomático.

Quando comparadas as duas avaliações realizadas em períodos distintos no confinamento experimental observou-se que o número de suínos positivos na segunda contagem apresentou um leve aumento. Esse fato pode ser explicado de duas maneiras distintas, sendo a primeira, uma possível contaminação direta, possibilitando a transferência do patógeno para animais sadios. E a segunda é que possíveis quadros de estresse durante o manejo comprometem o sistema imunológico dos animais, deixando-os mais suscetíveis a instalação de microrganismos veiculados pela rotina do confinamento, como o tratador, os equipamentos de proteção individual (EPIs), ou outros fatores responsáveis por disseminar os microrganismos no ambiente.

As contagens de *Clostridium* spp., mostraram valores de contagem com diferenças significantes ($P < 0,01$) entre o confinamento e o frigorífico, sendo que os animais do confinamento apresentaram contagens estatisticamente inferiores aos do frigorífico, indicando uma elevada frequência de patógenos na linha de abate.

Os procedimentos sanitários utilizados no confinamento experimental podem ter sido os responsáveis pelos resultados de menor ocorrência de contagem bacteriana nos animais confinados quando comparado aos do frigorífico, identificando assim que procedimentos simples de higiene tem real importância na diminuição de patógenos presentes no ambiente. Ao passo que as amostras

coletadas no frigorífico por serem procedentes de diversas propriedades comerciais, onde o controle sanitário geralmente é deficiente. Talvez pelo desconhecimento dos produtores sobre a utilização de métodos preventivos de infecções que auxiliam na qualidade do produto comercializado.

Além de diminuição de bactérias do gênero *Clostridium*, os métodos empregados no confinamento também podem ser os responsáveis pela baixa incidência de *Salmonella* spp. no rebanho, ficando bem abaixo da frequência identificada no plantel do frigorífico.

A frequência desses patógenos no rebanho é de grande relevância para a economia da suinocultura, sendo que interferências na conversão alimentar e no ganho de peso dos animais são os pontos mais preocupantes para os criadores de rebanhos de corte, pois animais que estão acometidos por doenças ou contaminações que interferem no sistema nutricional têm maiores gastos com tecnologias e suplementos para minimizar os efeitos dessas contaminações, tornando-se um problema financeiro para o produtor e fazendo com que os investimentos dispostos para reverter à falha nutricional atinjam valores acentuados que encarecem o sistema de criação.

A estatística de correlação com o valor de -0,25 demonstra a relação entre a presença de patógenos e a dificuldade que o produtor tem em fazer os animais ganharem peso, pois o grupo amostral que apresentou positividade para o patógeno foi o que teve maior dificuldade em atingir o peso de abate e muitos, conseqüentemente, foram abatidos abaixo do peso médio do rebanho.

A ocorrência de infecções por *C. perfringens* em suínos costuma-se iniciar durante a fase de lactantes, e nesse período os danos ocasionados pela instalação do microrganismo são graves e facilmente levam os animais a óbito. Em suínos adultos, e principalmente aqueles com idade de terminação, as pesquisas de patologias ligadas a esse agente são pouco difundidas, possivelmente pela manifestação da doença ser subclínica além de não haver uma mobilização dos produtores no conhecimento e interesse nesse microrganismo, sendo que os mesmo acreditam que os riscos causados por essas enfermidades não são prejudiciais ao negócio. Esse fato contribui com a escassez de pesquisas com suínos de granja de

terminação, principalmente no Brasil, dificultando o entendimento da patologia e facilitando a veiculação do agente na indústria alimentícia.

O aparecimento de quadros clínicos nos animais com sintomas característicos da doença ocorrem e são visualizados apenas quando há crescimento bacteriano e liberação de toxinas, causando então diarreia, sinais de dores abdominais e às vezes presença de sangue nas fezes. Enquanto esse quadro infeccioso não se torna aparente, os animais eliminam o patógeno nas fezes e contaminam o ambiente por tempo indeterminado.

Schocken-Iturrino *et al.* (2009) afirmam que especialmente o *Clostridium perfringens* tipo A e C também são responsáveis por casos de enterites necróticas em aves, provocando diminuição na conversão alimentar, ganho de peso e na absorção de nutrientes. O *C. perfringens* do tipo A é a cepa mais relatada e associada à frequência de doenças entéricas em suínos jovens e em fase de amamentação (VIEIRA, 2006).

A toxina *alfa* é considerada a toxina mais letal desse microrganismo, sendo produzida pelos cinco tipos de *Clostridium perfringens*, embora sua patogenicidade também possa estar associada à coligação dessa toxina altamente agressiva com outras também produzidas pelo *C. perfringens*, caracterizando assim a diversidade encontrada na espécie (COLINNS *et al.*, 1989; COSTA *et al.*, 2004).

Diagnósticos de infecções atribuídas a *C. perfringens* tipo A tem demonstrado conceitos controversos, pelo motivo do seu quadro clínico apresentar variações nos sintomas e não serem bem definidos, além do motivo de que a principal toxina encontrada nessas estirpes (toxina *alfa*) poder estar presente no conteúdo intestinal de suínos e outros animais saudáveis, e não apenas em animais enfermos (SONGER & UZAL, 2005).

Vieira *et al.* (2008) relataram que apenas a produção de toxina *alfa* não demonstra ser a principal responsável por quadros relacionados a enterites, acreditando que a associação dessa toxina com outras, também de *C. perfringens*, podem apresentar maior toxicidade do que ela estar ativamente sozinha.

Songer & Glock (1998); Sipos *et al.* (2003); Moreno *et al.* (2003); Shinya *et al.* (2006); Vieira *et al.* (2008) identificaram maior frequência de *Clostridium perfringens* tipo A em seus estudos, enquanto que cepas de *C. perfringens* tipo C e D

apresentaram índices considerados irrelevantes para o trabalho, o qual também demonstrou a ausência total dos tipos B e E nas amostras verificadas. Estas pesquisas foram comparativas para a avaliação da pesquisa discutida, sendo que todas as amostras submetidas à identificação molecular apresentaram o mesmo padrão de banda, as quais caracterizaram *C. perfringens* tipo A em todas as amostras positivas. A amplificação dos outros genes avaliados apresentaram resultados negativos, caracterizando ausência total dos tipos B, C, D e E nos suínos pesquisados.

Songer & Glock (1998) afirmaram que 95% das amostras coletadas de casos de enterites necróticas de leitões foram ocasionadas por *C. perfringens* tipo A, contudo associada a essa estirpe, foi possível identificar a presença do gene *cpb-2* em 83% das amostras isoladas de *C. perfringens* nos leitões diarreicos, levantando a hipótese de que há uma possível interferência desse gene na manifestação da doença.

Apesar de relatos atribuírem a toxina *alfa* como a principal causadora de enterites em leitões (COLINNS *et al.*, 1989; COSTA *et al.*, 2004), e que esta toxina é a mais frequentes em leitões lactantes (VIEIRA *et al.*, 2008) a toxina *beta-2* codificada pelo gene *cpb-2* pode estar diretamente relacionada com os casos de patogenia do tipo A nos casos de enterites necróticas em suínos.

Recentemente, a toxina *beta2* produzida pelo *C. perfringens* tipo A tem sido associada aos quadros de enfermidades em suínos e em outros animais, mas o papel específico desta toxina na manifestação de doenças entéricas continua totalmente indefinido (SONGER & UZAL, 2005).

Como a possível interferência da toxina *beta-2* quando associada à toxina *alfa* pode ter relação com os casos de enfermidades em suínos, poderia explicar a ausência de manifestações de sintomas de doenças nos animais neste trabalho, pois mesmo havendo positividade do gene *cpa* (codificador da toxina *alfa*) nas amostras coletadas do confinamento e no frigorífico, os animais não estavam visualmente enfermos, possibilitando a transferência de responsabilidade à toxina *beta2*, já que o gene *cpb-2* não foi encontrado nas análises.

Epidemiologias utilizando fezes de suínos diarreicos ou não, demonstraram maior incidência do gene *cpb-2* nos animais diarreicos, sugerindo influencia dessa

toxina no processo patogênicos do microrganismo (GIBERT *et al.*, 1997; KLAASEN *et al.*, 1999).

Dentre as clostridioses atribuídas a outras cepas, tem-se o *C. perfringens* tipo C que já foi um problema predominante em rebanhos suínos, mas atualmente a utilização de campanhas de vacinação parece estar controlando a disseminação e infecções por esta população bacteriana (SONGER & UZAL, 2005), e o efeito dessa ação de controle é de grande importância para os criadores, já que afasta a ocorrência desse agente do rebanho.

Springer & Selbitz (1999) avaliaram o processo de vacinação de rebanhos de leitões através do registro do número total de nascidos vivos e as perdas durante as análises, possibilitando a constatação de que o uso de sistema de vacinação juntamente com métodos sanitários é de grande relevância, pois resultou em uma redução de 30% do número de perdas do plantel.

Como a proteção por vacinas contra estas bactérias demonstra ser um método eficaz, para as células de imunidade desempenharem um papel importante são geralmente aceitas vacinas com bactérias atenuadas, já que são consideradas mais adequadas para a indução de imunidade, do que as vacinas que são compostas por células inativas (HAESEBROUCK, 2004).

A introdução de programas de vacinação em rebanhos de suínos no Brasil ainda anda a passos lentos, possivelmente pela falta de incentivo e de exposição dos problemas ocasionados por frequências de patógenos nas propriedades, sendo que muitos criadores não possuem informações zootécnicas que os orientem e apontem os problemas atribuídos a cobertura alimentar ineficiente e dificuldades no ganho de peso dos animais, que sistematicamente são ocasionados por microrganismos patogênicos como *C. perfringens*.

As características desse agente, e sua forma esporulada dificultam sua erradicação, tornando-a praticamente impossível após sua colonização no intestino (LOBATO & ASSIS, 2000). Além da dificuldade de controle e da erradicação de doenças por *Clostridium perfringens*, Johansson (2004); Martel *et al.* (2004); Almeida (2010) afirmam que o uso de antibióticos, a princípio, diminuiu os casos de enterites avaliados em seus trabalhos, porém sua utilização indiscriminada como promotores

de crescimento culminou em aumento de linhagens resistentes, caracterizando novamente o surto de enfermidade.

A utilização do antimicrobiano terramicina (cloridrato de oxitetraciclina) neste trabalho durante o período de coletas no confinamento parece não ter inibido o crescimento da população bacteriana pesquisada. Tanto *C. perfringens* quanto *Salmonella* spp. não apresentaram dificuldade de crescimento quando semeadas em laboratório. A terramicina é um antibiótico pertencente à classe das tetraciclina que apresenta ação bacteriostática inibindo a síntese de proteína da bactéria, sendo eficiente em organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Os fármacos pertencentes a esta família possuem aspectos antibacterianos semelhantes e são comuns em casos de resistência cruzada entre eles.

Resistência a antibióticos com a tetraciclina e clindamicina foram observadas por Rood *et al.* (1978) em 77,9% e 22,7%, respectivamente, de cepas de *Clostridium* spp.. Esses dados foram relacionados com outros trabalhos anteriores destes mesmos autores, demonstrando que houve um aumento significativo dos quadros de resistência a estes esses mesmos antimicrobianos, sendo que a porcentagem encontrada anteriormente foi de 25% e 0,8% respectivamente.

Quanto à resistência de antimicrobianos em *Salmonella* spp., estudos demonstraram alta frequência de cepas resistentes a oxitetraciclina (77%) e a tetraciclina (42,1%), e em menor processo resistente a amoxicilina (4,8%) e a gentamicina (3,5%) (MENIN *et al.*, 2008).

Em pesquisa de resistência de *S. Typhimurium*, os resultados demonstraram que entre os isolados, esse sorotipo foi multirresistentes a tetraciclina com 63,9% em comparação com 10,8% de isolados de *S. Derby* e 8,0% de outras *Salmonella* spp. (MCDOWELL *et al.*, 2007).

Indivíduos infectados em granjas de produção por *Salmonella* spp. são relativamente comuns, e o uso de antimicrobianos para o controle acontece de forma desordenada, acarretando em multirresistência nos suínos aos fármacos utilizados. Weiss *et al.* (2002) isolaram *Salmonella* spp. de granjas de criação e observaram que todas as amostras coletadas foram positivas para *Salmonella* spp., e após realizar antibiograma das linhagens isoladas, demonstrou que 97,8% tinha

resistência à sulfonamida, 82,6% à estreptomicina, 36,9% à tetraciclina e 15,2% à sulfazotrim.

A ocorrência de salmoneloses em suínos é frequentemente observada durante o tempo de permanência no confinamento, mas quando inicia-se o processo de abate, a eliminação das formas vegetativas da bactéria se intensificam com o estresse causado pelo transporte, a espera na pocilga, e no corredor de abate. Durante este trajeto, os animais estimulados pelo estresse, eliminam *Salmonella* spp. nas fezes com mais frequência, e contaminam animais saudáveis e o ambiente do frigorífico.

Por esse motivo os resultados de presença de *Salmonella* spp. podem ter apresentado maior incidência no frigorífico (21,4%) que nos animais do confinamento experimental (9,5%), sendo que o estresse sofrido durante o trajeto até o abate pode ter motivado os animais portadores assintomáticos a eliminar a bactéria nas fezes.

A detecção de salmonelas nos suínos que chegam ao frigorífico é considerada um fator de risco para a indústria, podendo causar contaminação nas etapas de abate, evisceração e corte das carcaças, já que o processo industrial é rápido e não há a possibilidade de controle efetivo desse agente durante a linha de produção. Swanenburg *et al.* (2001) e Bessa (2006) encontraram significativas correlações entre as carcaças positivas para salmonelas na linha de abate e a presença dessa bactéria no conteúdo intestinal dos animais.

Quanto aos resultados encontrados neste trabalho para *Salmonella* spp. e *S. Typhimurium* comparados com resultados encontrados na literatura, a pesquisa reconhece que a presença dessa bactéria acontece de forma intermitente nos animais, e em suínos sua frequência é sistematicamente observada, necessitando de maior controle e evitar a entrada do agente no processo industrial.

Melo *et al.* (2011) isolaram *Salmonella* spp. em 51,51% das amostras de fezes de suínos em uma coleta, e *S. Typhimurium* foi identificada em 76,47% dos isolados, esses valores foram preocupantes não apenas por apresentarem porcentagens altas de contaminação, mas sim pelas médias durante as coletas subsequentes manterem o mesmo padrão de frequência, caracterizando infecções residentes nos animais.

No Rio Grande do Sul, Bessa *et al.* (2004) isolaram 226/300 amostras de fezes de suínos em três frigoríficos distintos e identificaram 26 sorovares diferentes de *Salmonella* spp. a partir dos isolados, sendo prevalente o sorotipo Typhimurium (24,3%) seguido por Agona (19,9%) Derby (13,2%) e Bredeney (12%).

As fontes de entrada de salmonela nas propriedades são múltiplas e sua permanência no ambiente pode ter longa duração se o manejo e os métodos sanitários não forem corretamente executados. A presença de salmonela em granjas de terminação é um assunto bastante discutido no setor, sendo que a procura por um consenso direcionado à manutenção de baixos índices de infecção e a possível erradicação do agente estão sempre em discussão sobre as melhores formas de ação (TIELEN *et al.*, 1997; DAVIES & FUNK, 1999).

Essa realidade na suinocultura é frequentemente observada nas propriedades, como pequenas granjas ou fazendas que possuem criação de suínos, pois ainda possuem grande ocorrência de infectados por *Salmonella* spp.. Padungtod & Kaneene (2006) isolaram em uma propriedade 6% de *Salmonella* spp. nos suínos da fazenda, 28% do matadouro e 29% da carne suína proveniente dessa mesma propriedade. Foi avaliada também a prevalência de contaminação por *Salmonella* spp. dos trabalhadores, sendo que foram isolados 36% dos trabalhadores rurais daqueles que tinham contato com os animais e 33% daqueles que não tinham contato nenhum.

A partir disso pode-se analisar que trabalhadores que são portadores de salmonela podem ser agentes transmissores de enfermidade para os animais e também veículos de contaminação para as carcaças que forem manipuladas por eles. Essa pesquisa ressalta a importância de se ter nas propriedades métodos eficazes de controle bacteriano e equipamentos de segurança que possam proteger os funcionários da contaminação e evitar o processo inverso, onde eles podem ser os transmissores e disseminadores do patógeno.

Propriedades que possuem olhar atento para os mecanismos higiênicos dos rebanhos tem três vezes menos chance de apresentar animais soropositivos para *Salmonella* spp.. Métodos simples cuidados mostraram que propriedades onde o tratador lavava as mãos antes de iniciar o manejo dos animais, apresentaram 1,5 vezes menos chance de soropositividade nos suínos, enquanto os animais que

estabeleciam contato direto com os outros, com encostar os focinhos, as chances de transmissão aumentaram 1,7 vezes em comparação com os animais que foram impedidos de estabelecer esse contato (LO FO WONG *et al.*, 2004).

Como já abordado, os sistemas de confinamento precisam receber cuidados atenciosos no quesito sanidade animal, pois a disposição dos animais pode facilitar a transmissão do patógeno por cruzamento, e sua erradicação é dificilmente eficaz devido à sutileza de sinais e sintomas que os suínos exprimem por estarem colonizados por salmonela no intestino.

Além do diagnóstico inconsistente, o isolamento dessa bactéria é de difícil realização, Love & Rostagno (2008) conseguiram resultados bem sucedidos para recuperação de *Salmonella* spp. em suínos, em apenas um dos cinco métodos de culturas microbiológicas testadas, mostrando que estes métodos de cultura básica se diferem e interferem significativamente nos resultados em relação ao desempenho de isolamento de *Salmonella* spp. a partir de amostras de fezes de suínos.

Enquanto que as técnicas de biologia molecular possibilitam a identificação de microrganismos potencialmente patogênicos anteriormente ao aparecimento dos quadros clínicos, o que favorece o tratamento e eliminação de microrganismos antes dos mesmos causarem prejuízos para o setor.

Embora no decorrer do experimento não se observasse sintomas característicos de doença por *C. perfringens* e *Salmonella* spp. nos animais confinados, com a tipificação pela técnica de PCR foi possível identificar amostras positivas para esses microrganismos no trato intestinal dos suínos. Esse resultado permite corroborar com Niilo (1993) e Gomes (2007), que relaram que *C. perfringens* e *Salmonella* spp. são comumente encontrados no intestino de animais de sangue quente, e que o aparecimento de sintomas de enfermidade ocorre quando há circunstâncias que favoreçam a multiplicação dessas bactérias e a produção de toxinas clostridiais.

Segundo Costa *et al.* (2004) e Penha *et al.* (2005) a utilização de PCR para determinar os tipos de *Clostridium perfringens* se mostrou muito eficaz, o que possibilita reduzir a utilização de testes bioquímicos que além de serem laboriosos, apresentam resultados duvidosos. Uzal *et al.* (1997) e Bartholomew *et al.*(1985)

citado por Costa *et al.* (2004) dizem que uma outra vantagem na utilização de PCR é maior sensibilidade e acurácia desta técnica, e o fato de poupar o uso de animais em laboratório para a detecção de toxinas, resolvendo problemas com grupos de ética animal, e dispensando a utilização de soros anti-toxina padrão, os quais são de difícil obtenção.

Um grupo amostral de *Clostridium perfringens* que foi submetido a isolamento e tipificação por Penha *et al.* (2005) resultaram em 45,7% de positividade para *C. perfringens* tipo A, 51,4% do tipo C e 2,9% do tipo B, a presença dos outros tipos constituintes dessa espécie não foram observados.

A tipificação de *Clostridium perfringens* utilizando técnicas moleculares como as reações de PCR com genes codificadores de toxinas, tem provado que é um método de detecção confiável para diagnósticos de enterotoxemias em várias espécies de animais.

Para investigações moleculares de *Salmonella* spp., a PCR também está se mostrando um método eficaz de detecção quando utilizado principalmente o gene *invA* nas reações, sendo que em teste realizados por Singer *et al.* (2006), utilizaram culturas positivas de testes bacteriológicos básicos como controle positivo para a confirmação por PCR, o que resultou em positividade na maioria das amostras.

Como várias pesquisas envolvendo a suinocultura têm visado melhorias para o processo de criação, pesquisadores vêm utilizando métodos de tipificação molecular para determinar relações epidemiológicas de linhagens de *S. Typhimurium* (KARIURKI *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2002). E a utilização da PCR em identificações é um método mais sensível que os convencionais (OLIVEIRA *et al.*, 2002; MYINT *et al.*, 2006; VON RÜCKERT, 2006; GOUVÊA, 2009). Para este trabalho a utilização da técnica de PCR foi rápida e de resultado confiável, já que apresentou amplificação com genes específicos para a espécie de *C. perfringens*, *Salmonella* spp. e *S. Typhimurium*.

Gouvêa (2009) comparou a técnica de PCR com os métodos de identificação convencionais para *Salmonella* spp, e teve como resultado, que a utilização da técnica de PCR nas análises foi muito mais rápida e eficaz, sendo que em apenas três dias obteve-se os resultados finais, o qual com métodos tradicionais de identificação poderiam se estender por mais de sete dias. Esses resultados

definiram que a PCR é comprovadamente um método rápido e seguro de identificação, além impedir a ocorrência de resultados duvidosos perante a dificuldade de leitura das provas bioquímicas.

Esta técnica tem alta frequência na rotina de laboratórios de pesquisas, sendo bastante estudada e utilizada em trabalhos científicos, mas esse quadro tem abrangido gradativamente outros setores, sendo que a PCR está ganhando espaço em indústrias alimentícias, de produção e laboratórios de diagnóstico, a fim de ser empregada no aperfeiçoamento e controle sobre agentes contaminantes.

Contudo, estudos que buscam identificar a presença de contaminantes como *C. perfringens* e *Salmonella* spp. em suínos para abate podem levar a melhores entendimentos sobre os métodos sanitários dos sistemas de criação e das doenças que atingem estes animais, contribuindo para melhores investimentos na suinocultura e menores prejuízos para os criadores, além de otimizar o sistema higiênico e sanitário dos confinamentos habitados por suínos em todas as fases de crescimento.

7. CONCLUSÃO

Foi possível identificar *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. que estão diretamente envolvidos em casos de doenças intestinais nos suínos utilizando metodologia bacteriana para a multiplicação desses microrganismos, e a técnica de PCR para a identificação.

Conclui-se também que houve significância de correlação entre a presença de *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. nos suínos e a média de ganho de peso dos animais pesquisados, caracterizando em uma interferência negativa durante a fase de engorda do rebanho.

8. REFERÊNCIAS

ABNT- NBR 6023/2002 – Disponível em: <http://www.abntcolegao.com.br>

ABIPECS. **Relatório ABIPECS 2011.** Disponível em: http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2011_pt.pdf

ALMEIDA, M.O. **Clonagem e expressão do gene da toxina beta de *Clostridium perfringens* Tipo B e sua aplicação na imunização de animais.** 2010. 116f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2010.

ANDERSON, R. C.; ZIPRIN, R. L. **Bacteriology of *Salmonella*.** In: HUI, H. Y.; PIERSON, M. D. and GORHAM, J. R. (Eds.). *Foodborne Disease Handbook*, 2 ed. New York, NY: Marcel Dekker, 2002, v. 1, p. 247 – 263.

AWAD, M. M.; ELLEMOR, D. M.; BOYD, R. L.; EMMINS, J. J.; ROOD, J. I. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens* mediated gas gangrene. **Infection and Immunity**, v. 69, p.7904–7910, 2001.

BARTHOLOMEW, B.A.; STRINGER, M.F.; WATSON, G.N., GILBERT, R.J. Development and application of an enzyme linked immunosorbent assay for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. **Journal of Clinical Pathology**, v.38, n. 2, p. 222-228, 1985.

BAUMS, C.G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Veterinary Microbiology**, v.100, p. 11-16, 2004.

BEER, J. Infecções e intoxicações por *Clostridium perfringens*. In:_____ (Ed.). **Doenças infecciosas dos animais domésticos.** São Paulo: Ed. Roca, 1988. v.2, p.234-250.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**, Ed. FACTA, Campinas, SP, 2000, p.333-338.

BERENDS, B.R.; VAN KNAPEN, F.; SNIJDERS, J.M.; MOSSEL, D.A. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.199–206,1997.

BERENDS, B.R.; VAN KNIPEN, F.; MOSSEL, D.A.; BURT, S.A.; SNIJDERS, J.M.; Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, p.219–229, 1998.

BESSA, C.M.; COSTA, M.; CARDOSO M. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.2, p.80-84, 2004.

BESSA, C.M. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.** 2006. 145f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2006.

BLASCHEK, H.P., SOLBERG, M. Isolation of a plasmid responsible for caseinase activity in *Clostridium perfringens* ATCC 3626B. **Journal of Bacteriology**, v.147, p.262–666, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 320, de 20 de dezembro de 2006. Regulamento técnico do Programa Nacional de Sanidade Suídea – PNSS. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Página 11. Brasília, 21 de dezembro de 2006.

BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; MIETZNER, T.A. **Infecções Causadas por bactérias anaeróbicas.** In: _____ (Ed). Microbiologia Médica. 25.ed., Inc: The McGraw-Hill Companies, 2010a. Tradução: Porto Alegre: Artmed, 2012. Cap. 21, p. 171-172, 273-279.

BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; MIETZNER, T.A. **Bacilos entéricos Gram-negativos (Enterobacteriaceae).** In: _____ (Ed). Microbiologia Médica. 25.ed., Inc: The McGraw-Hill Companies, 2010b. Tradução: Porto Alegre: Artmed, 2012. Cap. 15, p. 213-224.

BUOGO, C.; CAPAUL, S.; HANI, H.; FREY, F.; NICOLET, J. Diagnosis of *Clostridium perfringens* Type C enteritis in pigs using a DNA amplification technique (PCR). **Journal of Veterinary Medicine**, serie B, v. 42, p.51–58, 1995.

CALDERARO, F.F.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M. FERREIRA, A.J.P.; JEREZ, A.J.; PENA, H.J.F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do estado de São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, v.68, n.1, p.29-34, 2001.

CASTAGNA, S.M.F.; SCHWARZ, C.W.; CARDOSO, M. Presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonódos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.3, p.300-306, 2004.

COLLINS, J.E.; BERGELAND, M.E.; BOULEY, D.; DUCOMMUN, A.L.; FRANCIS, D.H.; YESKE, P. Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.351-353, 1989.

COSTA, G.M.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F. Diarréia em leitões lactentes por *Clostridium perfringens* Tipo A em granjas tecnificadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.03, p.401-404, 2004.

D'AOUST, J.Y. *Salmonella* and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, p.11-31, 1994.

DAVIES, P.R.; FUNK, J.A. Epidemiology and control of *Salmonella* in pork-some of questions, In: Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 3., 1999. **Resumo Expandido...** Washington DC, USA, 1999, p.1-11.

DEWEY, C.E.; WITTUM, T.E.; HURD, H.S.; DARGATZ, D.A.; HILL, G.W. Herd and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 4-14 days of age. **Swine Health and Production**, v.3, p.21-28, 1995.

EKPERIGIN, H.E.; NAGAJARA, K.U. *Salmonella*. **Veterinary Clinic of North America Food Animal Practice**, v. 14, n.1, p.17-29, 1998.

ESTEVES, A.S.M.F. **Perigos microbiológicos em alheira Principais vias de contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp.** 2005. 258 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2005.

GALAN, J.E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 13, p.4338-4349, 1992.

GESLAIN-LANÉELLE, C. **Casos de salmonela na UE caem pela metade nos últimos 5 anos**. AESA (Autoridade de Segurança dos Alimentos Europeia). 2011. Disponível em: <http://noticias.r7.com/saude/noticias/casos-de-salmonela-na-ue-caem-pela-metade-nos-ultimos-5-anos-20111011.html>. Acesso em: 17 nov. 2012

GIBERT, M.; RENAUD, C.J.; POPOFF, M.R. Beta-2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. **Gene**, v.203, p.65-73, 1997.

GOMES, A.M. **Isolamento e tipificação genotípica de *Clostridium perfringens* em frangos de corte**. 2007. 39f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG. 2007

GOMES, A. M.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.R.S.; ASSIS, R.A. Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1943 – 1947, 2008.

GOTTER, V.; KLEIN, G.; KOESTERS, S.; KREIENBROCK, L.; BLAHA, T.; CAMPE, A. Main risk factors for *Salmonella*-infections in pigs in north-western Germany. **Preventive Veterinary Medicine**, v.106, p. 301– 307, 2012.

GOUVÊA, R. Comparação entre isolamento bacteriológico convencional e PCR na **detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas e de campo**. 2009. 54f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, RJ., 2009.

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: Wray, C.; WRAY, A. ***Salmonella in domestic animals***. New York. CABI, 2000. Cap. 1, p. 1-18.

GRINER, L.A.; AICHELMAN, W.W.; BROWN, G.D. *Clostridium perfringens* type D (Epsilon) enterotoxemia in Brown Swiss dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.129, p.375-376, 1956.

HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; CHIERS, K.; MAESB, D.; DUCATELLE, R.; DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.255–268, 2004.

HILL, A.A.; SNARY, E.L.; ARNOLD, M.E.; ALBAN, L.; COOK, A. J. Dynamics of *Salmonella* transmission on British pig grower-finisher farm: A stochastic model. **Epidemiology and Infection**, v.136, n.3, p.320-333, 2008.

JOHANSSON, A. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. **Veterinary Microbiology**, v.99, p.251-257, 2004.

JOHNSON, M.W.; FITZGERALD, G.R.; WELTER, M.W.; WELTER, C.J. The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. **Veterinary Medicine**, v.87, n.4, p.382-386, 1992.

KARIUKI, S; OUNDO, J.O.; MUYODI, J.; LOWE, B.; THRELFALL, E.J.; HARD, C.A. Genotypes of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from two regions of Kenia. **Immunology and Medical Microbioly**, v. 29, n.1, p.9-13, 2000.

KICH, J.D. **Desenvolvimento de um teste de ELISA-LPS para *Salmonella* e sua aplicação em rebanhos suíno na identificação de fatores de risco associados à infecção.** 2004. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS. 2004.

KLAASEN, H.L.B.M.; MOLKENBOER, M.J.C.H.; BAKKER, J.; MISEREZ, R.; HAENI, H.; FREY, J.; POPOFF, M.R.; VAN DEN BOSCH, J.F. Detection of the *beta2* toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.24, n.3, p.325–332,1999.

LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R. A. Controle e profilaxia das clostridioses. **A Hora Veterinária**, v.19, n.113, p.29-33, 2000.

LOBATO, F.C.F.; ASSIS, R. A. Clostridioses dos animais. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE BURIATRIA, 2., 2005. Belo Horizonte, MG. **Resumo Expandido...** Belo Horizonte: Associação de Buiatria de Minas Gerais (ABMG), 2005.

LO FO WONG, D.M.A.; DAHL, J.; STEGE, H.; VAN DER WOLF, P.J.; LEONTIDES, L.; VON ALTROCK, A.; THORBERG, B.M. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.62, p. 253–266, 2004.

LO FO WONG, D.M.A.; HALD, T.; VAN DER WOLF, P.J.; SWANENBURG, M. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Production Science**, v.76, p.215–222, 2002.

LONGO, F. A.; SILVA, I. F.; LANZARIN, M. A. A importância do controle microbiológico em rações para aves. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVUCULTURA, 11, 2010. Chapecó, SC. **Anais...** Chapecó: 2010, p.1-23.

LOVE, B.C., ROSTAGNO, M.H. Comparison of five culture methods for *Salmonella* isolation from swine fecal samples of known infection status. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.620–624, 2008.

MACCLANE, B.A. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Toxicon**, v.34, p.1335–1343, 1996.

MADRI SALUD. **Instituto de Salud Pública**. Incidencias de *Salmonella* spp en muestras de alimentos analizadas en el Laboratorio de Salud Pública durante los años 2004-2007. 2008. Disponível em: http://www.madridsalud.es/temas/incidencias_salmonelosis.php. Acesso em: 04 dez. 2012.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p.208-218, 1961.

MARTEL, A.; DEVRIESE, L.A.; CAUWERTS, K.; DEGUSSEM, K.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. **Avian Pathology**, v. 33, n.1, p. 3-7, 2004.

MCDOWELL, S.W.J.; PORTER, R.; MADDEN, R.; COOPER, B.; NEILLS, S.D. *Salmonella* in slaughter pigs in Northern Ireland: Prevalence and use of statistical modelling to investigate sample and abattoir effects. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, p.116–125, 2007.

MELO, R.T.; GUIMARÃES, A.R.; MENDONÇA, E.P.; COELHO, L.R.; MONTEIRO, G.P.; FONSECA, B.B.; ROSSI, D.A. Identificação sorológica e relação filogenética de *Salmonella* spp. de origem suína. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.12, p.1039-1044, 2011

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D. de; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p.1687-1693, 2008.

MORENO, A.M.; BACCARO, M.R.; FERREIRA, A.J.P.; HIROSE, F.; CAMPOS, D.S. Detection of the *beta-2* toxin gene from *Clostridium perfringens* isolated in diarrheic piglets. **Arquivo Instituto Biológico**, v.70, n.2, p.135-138, 2003.

MÜLLER, M. **Comparação da presença de suínos portadores de *Salmonella* sp. no início da fase de terminação e ao abate, em três granjas no Rio Grande do Sul.** 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MYINT, M.S.; JOHNSON, Y.J.; TABLANTE, N.L.; HECKERT, R.A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, EUA, v.23, p.599-604, 2006.

NILO, L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. **The Candian Veterinary Journal**, v.21, p.141-148, 1980.

NILO, L. Enterotoxemic *Clostridium perfringens*. In: GYLES, C. L.; THOEN, C. O. (Eds.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Iowa State Univ. Press, Ames., 1993. p.114-123.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T. SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; CANAL, C.W. **Deteccion and identificacion of *Salmonella* from poultry-related samples by PCR.** Vet. Microb. Porto Alegre, v.87, p.25-35, 2002.

PADUNGTOD, P.; KANEENE, J.B. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.346–354, 2006.

PATTON, N. M.; HOLMES, H. T.; RIGGS, R. J.; CHEEKE, P. R. Enterotoxemia in rabbits. **Laboratory Animal Science**, v.28, p.536-540, 1978.

PENHA, M.D.L. **Detecção dos genes das toxinas alfa, beta e épsilon de Clostridium perfringens isolados a partir de amostras clínicas de bovinos pela reação em cadeia da polimerase**. 2004. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2004.

PENHA, M.D.L.; BALDASSI, L.; CORTEZ, A.; PIATTI, R.M.; RICHTZENHAIN, L.J. Detecção dos genes das toxinas alfa (α), beta (β) e épsilon (ϵ) em amostras de *Clostridium perfringens* isoladas de bovinos pela reação em cadeia da polimerase (PCR). **Arquivo Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.277-281, 2005.

PETIT, L., GIBERT, M., POPOFF, M.R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology**, v.7, p.104–110, 1999.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W.; GHEESLING, L.L. Supplement 2000 (n.44) to the Kauffmann-White scheme. **Research Microbiology**, v.152, n.10, p.907-909, 2001.

ROOD, J.I.; MAHER, E.A.; SOMERS, E.B.; CAMPOS, E.; DUNCAN, C.L. Isolation and Characterization of Multiply Antibiotic-Resistant *Clostridium perfringens* Strains from Porcine Feces. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.13, n.5, p.871-880, 1978.

SARKER, M.R., CARMAN, R.J.; MCCLANE, B.A. Inactivation of the gene (*cpe*) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two *cpe*-positive *C. perfringens* Type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. **Molecular Microbiology**, v.33, p.946–958, 1999.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; VITTORIL, J.; BERALDO-MASSOLI, M.C.; DELPHINO, T.P.C.; DAMASCENO, P.R. *Clostridium perfringens* em rações e águas fornecidos a frangos de corte em granjas avícolas do interior paulista – Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.1, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010000100033>. Acesso em: 14 nov. 2012.

SEBRAE. **Relatório Completo Suinocultura – carne *in natura*, embutidos e defumados**. São Paulo, 2008a. Disponível em: [http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/E700C099069CC7A8832574DC004BECAE/\\$File/NT000390A6.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/E700C099069CC7A8832574DC004BECAE/$File/NT000390A6.pdf). Acesso em: 23 ago. 2012.

SEBRAE. São Paulo, 2008b. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/carne/o-setor/suinos2/mercado>>. Acessado em: 23 ago. 2012.

SEBRAE. **Porco light vira opção para produtor buscar novos mercados**, São Paulo, 2012a. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/carne/o-setor/suinos2/producao/120-000-916-porco-light-vira-opcao-para-produtor/BIA120000916>. Acesso em: 23 ago. 2012.

SEBRAE. **Análise de mercado da suinocultura**, São Paulo, 2012b. Disponível em: http://www.sebrae.com.br/setor/carne/o-setor/suinos2/mercado/analise-de-mercado-da-suinocultura/BIA_120001021. Acesso em: 23 ago. 2012.

SHINYA, L.T.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M. Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Clostridium perfringens* isolated from diarrheic piglets. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.385-389, 2006.

SILVEIRA, C.F. **Mitos e Verdades sobre a Carne Suína**. Curitiba: Associação Paranaense de Suinocultores, 2012. Disponível em: <http://www.aps.org.br/noticias/1-timas/3708-mitos-e-verdades-sobre-a-carne-suina.html>. Acesso em: 25 ago. 2012.

SINGER, R.S.; COOKE, C.L.; MADDOX, C.W.; ISAACSON, R.E.; WALLACE, R.L. Use of pooled samples for the detection of *Salmonella* in feces by polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.319–325, 2006.

SIPOS, W.; FISCHER, L.; SCHINDLER, M.; SCHMOLL, F. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from domestical end exotic ruminants end swine. **Journal of Veterinary Medicine**, v.50, p.360-362, 2003.

SMITH, L.D.S. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. **Reviews of Infectious Diseases**, v.1, n.2, p.254-260, 1979.

SONGER, J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p.216–234, 1996.

SONGER, J. G. Clostridial Diseases of Animals. In: _____ (Ed.). **The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis**. Cap. 10, p.153-169. 1997

SONGER, J.G.; GLOCK, R.D. Enteric infection of swine with *Clostridium perfringens* types A and C. **Swine Health and Production**, v.6, n.5, p.223-225, 1998.

SONGER, J.G.; UZAL, F.A. Clostridial enteric infection in pig. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.528-536, 2005.

SOUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, N.; ROSE, V.; DROUIN, P.; SALVAT, G.; COLIN, P. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 2, p.113-117, 2008.

SPRINGER, S.; SELBITZ, H.J. The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *Clostridium perfringens* toxoid vaccine. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.24, p. 333-336, 1999.

SWANENBURG, M.; VAN DER WOLF, P.J.; URLINGS, H.A.; SNIJDERS, J.M.; VAN KNAPEN, F. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.231-242, 2001.

TIELEN, M.J.M.; VAN SCHIE, F.W.; VAN DER WOLF, P.J.; ELBERS, A.R.J.; KOPPENS, J.M.C.C.; WOLBERS, W.B. Risk factors and control measures for subclinical *Salmonella* infection of pig herds, In: Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, 2, 1997. Copenhagen. **Resumo Expandido...** Dinamarca, 1997, p. 32-35.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. **Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals**, 8 ed. Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY, 1988.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8 ed. Tradução: Porto Alegre: Artmed, 2005, p.920.

UZAL, F.A.; PLUMB, J.J.; BLACKALL, L.L.; KELLY, W.R. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in feces of goats. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.339-344, 1997.

VAHL, H. A. Verbetering van de *Salmonella* status van pluimveebedrijven door voedingsmaatregelen, een literatuurstudie. **Feed and Health**. Consultancy for animal feed & healthy livestock, p. 16-57, 2008.

VIEIRA, A.A.S. **Padronização e Aplicação da PCR multiplex na tipificação de *Clostridium perfringens* isolados de suínos diarreicos**. 2006. 34f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2006.

VIEIRA, A.A.S.; GUEDES, R.M.C.; SALVARANI, F.M. SILVA, R.O.S.; ASSIS, R.A.; LOBATO, F.C.F. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarreicos. **Arquivo Instituto Biológico**, v.75, n.4, p.513-516, 2008.

VON RÜCKERT, D.A.S. **Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoanálise e reação em cadeia da polimerase (PCR) no monitoramento de *Salmonella* spp. em frango de corte durante o abate**. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2006.

WALES, A. D.; ALLEN, V. M.; DAVIES, R. H. Chemical treatment of animal feed and water for the control of *Salmonella*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 1, p. 03-15, 2010.

WALKER, P.D. *Clostridium*. In: CARTER, G.; COLE JÚNIOR, J. (Ed.). **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. San Diego, Calif: Academic Press Inc., 1990. p.220-251.

WEISS, L.H.N.; NONIG, R.B.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.104-108, 2002.

YOO, H.S.; LEE, S.U.; PARK, K.Y.; PARK, Y.H. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.228–232, 1997.

YANG, S.J., Park, K.Y., Kim, S.H., No, K.M., Besser, T.E., Yoo, H.S., Kim, S.H., Lee, B.K., Park, Y.H. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enteric Sorovar Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. **Veterinary Microbiology**. v. 86, p.295-301, 2002.