

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PREBIÓTICO NA DIETA
SOBRE A EXCREÇÃO DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM SUÍNOS EM FASE
DE CRESCIMENTO E TERMINAÇÃO INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Juliana Cafruni Calveyra

PORTO ALEGRE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E PREBIÓTICO NA DIETA
SOBRE A EXCREÇÃO DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM SUÍNOS EM FASE
DE CRESCIMENTO E TERMINAÇÃO INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Autora: Juliana Cafruni Calveyra *
Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias Especialidade na área de
Bacteriologia.
Orientadora: Profª. Dra. Marisa Ribeiro de
Itapema Cardoso.
Co-orientadora: Dra. Jalusa Deon Kich

PORTO ALEGRE

2010

C167E CALVEYRA, JULIANA CAFRUNI

Efeito da adição de ácidos orgânicos e prebiótico na dieta sobre a excreção de *Salmonella* Typhimurium em suínos em fase de crescimento e terminação infectados experimentalmente. / Juliana Cafruni Calveyra. – Porto Alegre: UFRGS, 2010.

94 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2010. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, Orient.

1. Bacteriologia veterinária 2. *Salmonella* Typhimurium: suínos
3. Prebióticos 4. Infecções por *Salmonella* 5. Suínos I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, Orient. II. Kich, Jalusa Deon, Co-orient. III. Título

CDD 616.07581

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Juliana Cafruni Calveyra

Efeito da adição de ácidos orgânicos e prebiótico na dieta sobre a excreção de *Salmonella*
Typhimurium em suínos em fase de crescimento e terminação infectados
experimentalmente

Aprovada em 26 de fevereiro de 2010.

APROVADA POR

Profª. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Orientadora e Presidente da Comissão

Dra. Jalusa Deon Kich

Co-orientadora

APROVADA POR

Profº. Drº. David Emílio dos Santos Barcellos

Membro da Comissão

APROVADA POR

Profª. Drª. Gerturdes Corção

Membro da Comissão

APROVADA POR

Profº. Drº. Luis Gustavo Corbellini

Membro da Comissão

*Dedico essa vitória com muito amor e carinho ao meus pais,
cujo apoio incondicional foi determinante para essa conquista...
Muito Obrigada!!!!*

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais pelo amor, carinho e exemplo.

À minha orientadora Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso pela confiança, ensinamentos, orientação e amizade.

De forma especial gostaria de agradecer à minha co-orientadora Dra. Jalusa Deon Kich pelo tempo e dedicação a mim dispensados, pela amizade e cumplicidade.

Aos funcionários do setor de sanidade da Embrapa Suínos e Aves pela constante ajuda e contribuição no projeto, pela amizade e solidariedade.

Aos pesquisadores da EMBRAPA Suínos e Aves, Dr. Gustavo Lima, Ms. Nelson Morés, Dr. Paulo Esteves e Dr. Arlei Coldebella pela dedicação e empenho atribuídos no projeto.

Aos colegas de pós graduação com quem convivi, pelas alegrias e momentos de descontração.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes em mais esta fase do meu crescimento profissional e pessoal, o meu reconhecimento por todo carinho e atenção.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos valores de Densidades Óticas obtidas no teste de ELISA indireto para detecção de IgA anti-*Salmonella* em amostras de lavado de mucosa de íleo em suínos inoculados pela via oral de *Salmonella* Typhimurium e alimentados com dieta basal (Controle) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados, ácidos orgânicos não-encapsulados ou mananoligossacarídeo.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequências (%) médias e erros-padrão de excretores fecais de <i>Salmonella</i> sp. por tratamento e dias pós-inoculação (DPI) entre os dias 3 e 28 após a inoculação oral de <i>Salmonella</i> Typhimurium em suínos alimentados com dieta basal (T1) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).	49
Tabela 2 - Média da quantificação de <i>Salmonella</i> (\log_{10} .UFC.g ⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por tratamento e dias pós-inoculação (DPI) entre os dias 3 e 28 após a inoculação oral de <i>Salmonella</i> Typhimurium em suínos alimentados com dieta basal (T1) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).	50
Tabela 3 - Média das Densidades Óticas obtidas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG anti- <i>Salmonella</i> sp. por tratamento e dias pós-inoculação (DPI) entre os dias 3 e 28 após a inoculação oral de <i>Salmonella</i> Typhimurium em suínos alimentados com dieta basal (T1) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).	51
Tabela 4 - Frequências (%) médias e erros-padrão de amostras positivas para <i>Salmonella</i> sp. colhidas na necropsia de suínos inoculados via oral com <i>Salmonella</i> Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).....	52
Tabela 5- Média da quantificação de <i>Salmonella</i> (\log_{10} .UFC.g ⁻¹) no conteúdo cecal, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco e tratamento em suínos inoculados pela via oral com <i>Salmonella</i> Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta basal acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).	52
Tabela 6 - Média da quantificação de coliformes totais (\log_{10} .UFC.g ⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco, tratamento em dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados pela via oral com <i>Salmonella</i> Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta basal acrescida de ácidos orgânicos	

encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).	53
Tabela 7 - Média da quantificação de <i>Enterococcus</i> sp. (\log_{10} .UFC.g ⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por tratamento e dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados pela via oral com <i>Salmonella</i> Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta basal acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).	54
Tabela 8 - Média da quantificação de <i>Lactobacillus</i> sp. (\log_{10} .UFC.g ⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por tratamento e dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados pela via oral com <i>Salmonella</i> Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta basal acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).	55
Tabela 9 - Média da medida (micrômetros) de vilosidades intestinais nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco e tratamento em suínos inoculados pela via oral com <i>Salmonella</i> Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta basal acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).	56

RESUMO

A presença de *Salmonella* sp. em suínos ao abate evidencia a necessidade da implantação de programas de controle nas granjas produtoras, tanto pela correção de fatores de risco como pela adoção de medidas auxiliares que contribuam para diminuir o número de animais portadores e excretadores da bactéria. O objetivo desse estudo foi testar o efeito da adição de ácidos orgânicos e prebiótico à dieta de suínos infectados experimentalmente por *Salmonella* Typhimurium. Foram utilizados 46 leitões com 43 dias de idade, distribuídos em blocos casualizados e em quatro tratamentos: T1 – Dieta Basal; T2 - Dieta Basal + Ácido Orgânico Encapsulado; T3 - Dieta Basal + Ácido Orgânico não Encapsulado; T4 - Dieta Basal + Prebiótico (mananoligossacarídeo). As dietas foram administradas aos animais por oito semanas, sendo que após duas semanas todos os animais foram inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium (dia 0PI). Foram realizadas colheitas de sangue (-14, 0, 7, 14, 21, 28 e 35 PI) para pesquisa de IgG anti-*Salmonella*, e de fezes (-14, -7, 0, 3, 7, 14, 21 e 28) para pesquisa e quantificação de *Salmonella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e coliformes totais. No dia 35PI os animais foram eutanaziados e fragmentos de órgãos foram submetidos à pesquisa de *Salmonella*. Foram coletados segmentos do intestino delgado, de cada animal, para análise de morfometria e pesquisa de IgA de mucosa. Os resultados indicam que a adição de ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo na dieta de suínos na fase de crescimento não foi capaz de impedir a infecção dos animais, e a soroconversão foi observada a partir do dia 7PI. Observou-se menor excreção de *Salmonella* no grupo tratado com mananoligossacarídeo, com diferença estatística no dia 28PI. No dia 35PI, os grupos tratados com ácidos orgânicos e com prebiótico apresentaram menor contagem de *Salmonella* no conteúdo cecal em um dos blocos do experimento. Apenas na população de *Lactobacillus* observou-se, em um dos blocos do experimento, aumento significativo nos grupos tratados (T2, T3 e T4) em relação ao grupo controle. Diferenças de morfometria de vilosidades e concentração de IgA na mucosa intestinal não foram observadas entre os grupos. A partir disso, conclui-se que a adição de mananoligossacarídeo na dieta pode contribuir para a menor excreção de *Salmonella* Typhimurium em suínos.

Palavras Chave: suínos, *Salmonella*, ácidos orgânicos, mananoligossacarídeo.

ABSTRACT

The presence of *Salmonella* sp. in pigs at slaughter highlights the need to implement control programs in producing farms, both for the correction of risk factors, and to adopt measures, which are effective for reducing the number of carrier animals and excretion of the bacteria. The aim of this study was to assess the effect of the addition of organic acids and prebiotic to the diet of pigs experimentally infected with *Salmonella* Typhimurium. We used 46 piglets, with 43 days old, distributed in a randomized block design with four treatments: T1 - Basal Diet, T2 - BD + Encapsulated Organic Acid, T3 - BD + not Encapsulated Organic acid, T4 - BD + prebiotic (mannanoligosaccharide). The diets were fed to animals for eight weeks, and after two weeks all animals were inoculated orally with *Salmonella* Typhimurium (day 0 PI). Blood was collected (-14, 0, 7, 14, 21, 28 and 35 PI) for the detection of IgG anti-*Salmonella*, and feces (-14, -7, 0, 3, 7, 14, 21, 28) for detection and quantification of *Salmonella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* and Coliforms. On 35PI, the animals were euthanized and organs samples were collected for *Salmonella*. Segments of the small intestine of each animal for morphometric analysis and mucosal IgA detection. The results indicate that the addition of mannanoligosaccharide and organic acids in the diet of pigs in the growing phase was not able to prevent infection of animals, and seroconversion occurred on the day 7PI. There was a lower excretion of *Salmonella* in the group treated with mannanoligosaccharides, with no statistical difference in the day 28PI. On day 35PI, the groups treated with both organic acids and prebiotics showed lower counts of *Salmonella* in cecal contents. A significant increase on the *Lactobacillus* population was observed in the treated groups (T2, T3 and T4), in are experimental block. No differences in morphology of villi and concentration of IgA in the intestinal mucosa were observed between the groups. We conclude that the addition of mannanoligosaccharides in the diet can contribute to decrease excretion of *Salmonella* Typhimurium in pigs.

Keywords: *Salmonella*, pigs, organic acids, mannanoligosaccharides

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	13
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 MICRORGANISMOS PRESENTES NO TRATO GASTROENTÉRICO.	16
2.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO <i>SALMONELLA</i>	19
2.3 SALMONELOSE EM HUMANOS.....	20
2.4 INFECÇÃO POR <i>SALMONELLA</i> SP. EM SUÍNOS.....	24
2.5 FONTES DE TRANSMISSÃO DE <i>SALMONELLA</i> PARA OS SUÍNOS	24
2.6 OCORRÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> EM REBANHOS SUÍNOS BRASILEIROS	25
2.7 CONTROLE E PREVENÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> SP. NA CADEIA PRODUTIVA DE SUÍNOS	28
2.8 ÁCIDOS ORGÂNICOS	31
2.9 PREBIÓTICOS	35
CAPÍTULO 3: ARTIGO.....	39
Efeito da adição de ácidos orgânicos e prebiótico na dieta sobre a excreção de <i>Salmonella</i> Typhimurium em suínos em fase de crescimento e terminação infectados experimentalmente	
RESUMO.....	40
ABSTRACT	41
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. <i>Delineamento experimental</i>	43
2.2. <i>Seleção dos animais</i>	43
2.3. <i>Instalações e manejo</i>	44
2.4. <i>Tratamentos e dietas experimentais</i>	44
2.5. <i>Inoculação dos animais</i>	45
2.6. <i>Colheita de amostras</i>	45
2.7. <i>Pesquisa e quantificação de Salmonella sp.</i>	46
2.8. <i>Quantificação de Lactobacillus, Enterococcus e coliformes totais</i>	46
2.9. <i>Pesquisa de anticorpos</i>	47

2.10. Avaliação histopatológica e morfometria do epitélio intestinal	47
2.11. Análise estatística	47
3. RESULTADOS	48
3.1. Excreção fecal de <i>Salmonella sp.</i>	48
3.2. Pesquisa de anticorpos séricos	50
3.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> em amostras colhidas na necropsia	51
3.4. Quantificação de Coliformes totais, <i>Lactobacillus sp.</i> e <i>Enterococcus sp.</i>	53
3.5. Pesquisa de Anticorpos – IgA	55
3.6. Análise morfométrica de vilosidades intestinais	56
4. DISCUSSÃO	56
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO 4. PERSPECTIVAS	72
CAPÍTULO 5. REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	85
ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DA DIETA BASAL PARA OS ANIMAIS NA FASE DE CRESCIMENTO.	86
ANEXO 2 - CRONOGRAMA DAS COLETAS	87
ANEXO 3 - PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE <i>SALMONELLA</i> SEGUNDO MICHAEL, CARDOSO E COSTA (2003).	88
ANEXO 4 - PROTOCOLO DO TESTE DE ELISA	92
ANEXO 5 - PERCENTUAL DE PRESENÇA E NÍVEIS DESCRITIVOS DE PROBABILIDADE DO TESTE EXATO DE FISHER PARA HISTOPATOLOGIA, POR TRATAMENTO NOS ÓRGÃOS COLETADOS NA NECROPSIA DE SUÍNOS INOCULADOS VIA ORAL COM <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM E ALIMENTADOS COM DIETA BASAL (T1) OU DIETA ACRESCIDA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ENCAPSULADOS (T2), ÁCIDOS ORGÂNICOS NÃO-ENCAPSULADOS (T3) OU MANANOLIGOSSACARÍDEO (T4).	93

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira tem se destacado no mercado mundial, como uma moderna cadeia produtiva com credibilidade e altos índices zootécnicos. A intensificação da produção tem sido uma característica deste setor, respondendo à demanda de mercado, porém a busca por volume de carne produzida vem acompanhada de exigências de qualidade e garantia de inocuidade para o consumidor. Este contexto leva as agroindústrias a despenderem maior atenção a programas de controle de qualidade, tanto na produção animal, quanto no processamento industrial. Uma preocupação das empresas brasileiras é o controle da infecção por *Salmonella* em seus rebanhos, já que as atuais relações com o mercado exigem medidas preventivas. O enfoque no controle e monitoramento deste agente vem crescendo na tentativa de diminuir sua prevalência desde o campo até o produto final no frigorífico.

Uma das medidas amplamente adotada na suinocultura para controle e prevenção de patógenos é o uso de antimicrobianos na ração. Esta medida também é apontada como responsável pela melhora dos índices zootécnicos da granja, baseado no efeito promotor de crescimento de alguns princípios ativos. Entretanto, seu uso vem sendo restringido em diversos países, em virtude da possibilidade da seleção de cepas bacterianas resistentes. Cepas de *Salmonella* multiresistentes têm sido constantemente observadas em amostras de origem suína (PEREIRA et al., 2007), o que serve de suporte para as normas estabelecidas nos países que baniram o uso de antimicrobianos. De acordo com van Pelt (2007), a proporção de casos na Holanda causados por *S. Typhimurium* DT104, considerado um fagotipo resistente a antimicrobianos, alcançou 15% do total de isolamentos de *Salmonella* em humanos. Outra preocupação da agroindústria é a garantia que os produtos estejam livres de resíduos de antimicrobianos, especialmente daqueles determinados pelo mercado internacional. Especificamente no controle da infecção por *Salmonella*, a utilização de antimicrobianos não é indicada, pois além dos aspectos de resistência considerados anteriormente, a antibioticoterapia não elimina o estado de portador (HURD et al., 2001).

Suínos portadores e excretadores de *Salmonella* no pré-abate são responsáveis por mais de 70% das contaminações de carcaça (SWANENBURG et al., 2001). Apesar da

indústria aplicar programas APPCC para o controle dessa contaminação, os resultados dos mesmos são influenciados pela pressão exercida pelo número de animais infectados ao abate. Dessa forma, as primeiras medidas de controle no sistema de produção devem ser adotadas para diminuir a prevalência de animais portadores.

Associados às medidas de intervenção direcionadas a pontos críticos e fatores de risco, métodos alternativos de controle para diminuir patógenos intestinais têm sido freqüentemente praticados na produção animal. Para o controle de *Salmonella*, têm sido propostos aditivos na ração, como ácidos orgânicos e prebióticos, para a redução do índice de animais portadores (FEDORKA-CRAY et al., 1997; LETELLIER et al., 1999).

Estudos com ácidos orgânicos têm observado efeito positivo sobre a microbiota intestinal (PIVA et al., 2007). Estes componentes podem exercer ação bactericida ou bacteriostática em decorrência da dissociação ácida no citoplasma bacteriano (BASSAN, et al., 2008). A redução no lúmen intestinal do índice de patógenos, que em sua maioria são bactérias Gram negativas, induz o aumento da proporção de bactérias Gram positivas produtoras de ácido lático, determinando a acidificação do meio e ampliando o efeito de inibição dos patógenos no intestino (IMMERSEEL et al., 2002).

Alguns autores constataram que certos produtos naturais exercem efeito de prebióticos, agindo como estabilizantes da microbiota intestinal (MATHEW et al., 1993; LETTELIER et al., 2001). O produto mais utilizado desse grupo é o mananoligossacarídeo (MOS). O MOS é um carboidrato derivado da parede celular externa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e sua ação se explica pela interferência com a aderência de bactérias Gram negativas em decorrência de sua ligação às fimbrias aderentes à manose. Dessa forma, as bactérias são impedidas de aderirem aos receptores presentes nas células do trato gastrintestinal, uma vez que seus receptores fimbriais estão ocupados pelo MOS (MILES, et al., 1993). Indiretamente, este aditivo pode conferir melhoria da resposta imune, com proliferação de células mononucleares, e indução na síntese de imunoglobulinas, em especial a IgA (BRANDTZAEG et al., 1998) e promover modificações benéficas nas características anatômicas do trato gastrintestinal, através do aumento na área de absorção da mucosa intestinal (HOWARD et al. 1993).

Estudos desenvolvidos no sul do Brasil têm observado que a infecção por *Salmonella* e sua permanência em animais portadores é freqüente sendo um desafio a ser enfrentado pelo sistema de produção (KICH et al., 2007; SCHWARZ et al., 2009). Com o objetivo de controlar a infecção por este agente, devem ser avaliadas medidas de controle de *Salmonella* em suínos de crescimento e terminação, como forma de propor protocolos que permitirão alcançar níveis de prevalência aceitáveis em prazos mais curtos do que é possível apenas com intervenções de manejo. O Setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS, em parceria com a Embrapa Suínos e Aves vem realizando pesquisas para o desenvolvimento de estratégias de controle da infecção por *Salmonella* em suínos adaptadas às condições da suinocultura brasileira. Compondo esta linha de pesquisa, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de ácidos orgânicos e prebióticos sobre o efeito da excreção de *Salmonella* em suínos em fase de crescimento infectados experimentalmente. Paralelamente, foram considerados outros fatores como a composição da microbiota intestinal, alterações morfológicas das vilosidades e secreção de IgA.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microrganismos presentes no trato gastroentérico

Dentro da fisiopatologia animal, o trato gastroentérico é uma importante porta de entrada de patógenos no organismo e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de doenças. Porém, há barreiras naturais protetoras para prevenir tal invasão. A mucosa do trato gastroentérico apresenta ambiente ideal para colonização e multiplicação de microrganismos, que irão compor a microbiota intestinal. Alguns exercem papel de grande importância na digestão e absorção dos nutrientes, bem como na síntese de vitaminas. Ao lado disto, a microbiota intestinal também prepara o intestino do neonato para futuramente, também agir como um órgão de defesa (KAMIMURA et al., 2006).

O estabelecimento da microbiota no neonato inicia-se no momento do nascimento, pelo contato com a mucosa vaginal materna. As superfícies e mucosas dos animais, que em condições fetais são estéreis, rapidamente sofrem colonização por diversos microrganismos. Estes microrganismos podem ser nocivos, ou não causarem qualquer lesão no hospedeiro e exercerem um efeito benéfico no animal. A microbiota benéfica auxilia na digestão e absorção de nutrientes, produz vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e diminui, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos (ROY & GIBSON, 1999). As bactérias nocivas podem causar inflamação na mucosa intestinal, gerar metabólitos tóxicos e propiciar o aparecimento de enfermidades. Em condições normais, estas populações encontram-se em equilíbrio. No entanto, em condições que levam ao estresse como mudança da dieta, alterações climáticas, densidade elevada, ventilação deficiente, ou qualquer outra situação desfavorável, as populações benéficas podem diminuir, enquanto as nocivas proliferam, o que se reflete negativamente sobre o desempenho animal (MATHEW et al., 1993).

A população de bactérias e a diversidade de espécies presentes em dado segmento do trato gastrintestinal são afetadas pelo pH e tempo de retenção do conteúdo. O baixo pH do ambiente estomacal e o fluxo rápido de conteúdo do intestino delgado tendem a inibir a multiplicação de muitas bactérias. Por outro lado, o pH relativamente neutro e a retenção prolongada de conteúdo no intestino grosso permitem o

desenvolvimento de populações microbianas compostas por centenas de espécies distintas de bactérias (PEDROSO et al., 2005).

A resistência à colonização do intestino por bactérias patogênicas mediada pela microbiota normal ocorre, principalmente, em duas regiões do intestino: no conteúdo luminal, devido à produção de metabólitos tóxicos, e na superfície da mucosa intestinal, em razão da ocupação dos sítios de ligação pelas bactérias da microbiota normal (HENTGES et al., 1992).

Em indivíduos saudáveis, o duodeno é ocupado por uma microbiota esparsa e provavelmente transitória, numa densidade de até 10^3 bactérias por grama de conteúdo. As bactérias mais frequentemente encontradas nesse segmento são as dos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Bacteroides*. O íleo apresenta uma microbiota em densidade moderada, de cerca de 10^6 a 10^8 bactérias por grama de conteúdo, com predomínio dos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. (RASTALL et al., 2004). O cólon é colonizado por uma densa e complexa comunidade bacteriana, com cerca de 10^9 a 10^{11} bactérias por grama de conteúdo. De acordo com Stevens (1998), cerca de 400 espécies bacterianas já foram identificadas nessa porção intestinal. Mais de 99% dessas bactérias são anaeróbias estritas, com predomínio dos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Clostridium*. (RASTALL et al., 2004). Os anaeróbios ocupam a maioria dos nichos disponíveis e produzem produtos metabólicos secundários como ácido acético, butírico e lático; esses produtos associados à condição anaeróbica estrita tornam-se fatores que inibem o crescimento de outras bactérias.

A composição da microbiota normal em uma dada região do trato intestinal não é facilmente definida, pela dificuldade de distinguir entre microrganismos residentes e transitórios. Muitos desses microrganismos não são cultiváveis em meios de laboratório, de tal forma que permanecem não detectados devido às limitações dos métodos convencionais de isolamento e identificação (STEVENS et al., 1998). Entre as bactérias que podem ser isoladas por métodos convencionais, encontram-se os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* e as bactérias da família Enterobacteriaceae.

O gênero *Lactobacillus* é composto por bastonetes Gram positivos, não-esporulados, catalase-negativos, desprovidos de citocromos, anaeróbios, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos. O ácido láctico é o principal produto final da fermentação de açúcares (HOLT et al., 1994). As espécies *L. casei/paracasei* e *L. rhamnosus* constituem uma fração substancial da microbiota de lactobacilos da mucosa intestinal (BURITI et al., 2007). Os efeitos de probiose atribuídos a essas espécies são alcançados, principalmente, em decorrência da modulação da composição da microbiota intestinal permanente e transitória, por meio da produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas.

O gênero *Bifidobacterium* é pertencente ao grupo dos anaeróbios estritos (HOLT et al., 1994). Estas bactérias são imóveis, Gram positivas, não esporuladas, catalase negativas, em forma de bastonete curvo caracterizados por uma bifurcação em forma de Y. Crescem em pH entre 4,5 e 8,5 e temperatura entre 37 e 41°C. As bifidobactérias no intestino grosso fermentam os carboidratos e as fibras alimentares que não foram digeridas no intestino delgado, formando gases (hidrogênio, dióxido de carbono, oxigênio, amônia, metano), e produzindo, assim como os *Lactobacillus*, ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta.

O gênero *Enterococcus* compreende cocos Gram positivos, em arranjo de pares ou cadeias curtas, anaeróbios facultativos, catalase negativos e imóveis (GUARNER & MALAGE, 2003). Este grupo de bactérias pode ser cultivado na presença de altas concentrações de sal, toleram a presença de sais biliares e hidrolisam a esculina. Estas propriedades podem ser utilizadas para distinguir enterococos de outros cocos Gram positivos, catalase negativos. (MURRAY et al., 1998; FACKLAM, et al. 1999). São bactérias produtoras de ácido láctico, desempenham atividades metabólicas úteis, como a lipólise e esterólise, utilizam citrato e algumas cepas sintetizam bacteriocinas. Estas bactérias são encontradas em mamíferos, pássaros, répteis e insetos, bem como estão presentes no solo, plantas e água, no qual, comumente, são consideradas contaminantes de origem fecal (FACKLAN et al., 1999).

Os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* pertencem à família Enterobacteriaceae, e são amplamente distribuídos, podendo ser encontrados no solo, água, frutas, vegetais, animais

e nos seres humanos. Estas bactérias apresentam forma de bacilos Gram negativos, são anaeróbias facultativas, oxidase negativa e catalase positiva, catabolizam D-glicose e outros carboidratos com produção de ácido, são capazes de multiplicar na presença de sais biliares, sendo a maioria móvel (HOLT et al., 1994). *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* formam o grupo dos coliformes totais, que se caracterizam por fermentar a lactose com produção de aldeído, ácido e gás a 35°C. Esse grupo de bactérias é habitante do intestino do homem e dos animais, porém também pode ser encontrado como microbiota ambiental. *Escherichia coli* é o principal componente dos chamados coliformes fecais ou coliformes termotolerantes, os quais estão associados mais estritamente com o trato gastrointestinal. Esse grupo caracteriza-se pela capacidade de fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de 44,5°C, característica utilizada para sua diferenciação dos demais coliformes.

Muitos microrganismos desta família são patógenos e têm importância em saúde pública. Dentre estes, destacam-se *Salmonella* e *Shigella* (HOLT et al., 1994), que podem causar diarreia, febre, cólica, levando ao desconforto, perda de produtividade no trabalho e, em indivíduos imunocomprometidos, à septicemia.

2.2 Características gerais do gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* caracteriza-se por fermentar a glicose, como todos os membros da família Enterobacteriaceae, mas geralmente não fermenta a lactose ou o fazem lentamente (CLARKE & GYLES; 1990). A maioria, exceto os sorovares Gallinarum e Pullorum, é portadora de flagelos peritríquios, que conferem motilidade. (HOLT et al., 1994). É indol negativa, produz ácido sulfídrico, e é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono (HOLT et al., 1994). Não apresenta enzima urease e é capaz de descarboxilar lisina e ornitina.

São resistentes à dessecação e ao congelamento, podendo sobreviver no ambiente por anos. A temperatura ótima para o seu crescimento é 35 a 37°C, porém são capazes de multiplicação em uma faixa de temperatura limite, variando de 7°C a 45°C. No entanto, são sensíveis à luz solar (GRIFFITH et al., 2006) e à maioria dos desinfetantes como fenóis, clorados e iodados (BOROWSKY et al., 2006). Apresenta um pH ótimo para crescimento entre 6,5 e 7,5, podendo tolerar condições de pH entre 4,5 e

9,0. Valores menores que 4,1 podem ser letais para *Salmonella* sp. (TORTORA et al., 2003).

Atualmente o gênero compreende três espécies: *S. enterica*, *S. bongori* e *S. subterranea* (SHELOBOLINA et al., 2004). *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies, *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (REEVES et al., 1989). A espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica* apresenta uma grande variedade de sorovares, conforme sua fórmula antigênica. A denominação dos sorovares é apresentada após a subespécie ou após o gênero, sendo derivada usualmente da origem geográfica da primeira cepa isolada (REEVES et al., 1989).

O número de sorovares identificados aumenta a cada ano, englobando mais de 2.500 já descritos. A maioria deles não é adaptada a um único hospedeiro, podendo causar doenças tanto no homem quanto em animais (WRAY & SOJKA, 1997). Ainda assim, existem sorovares de *Salmonella* adaptados a um hospedeiro específico, tais como: *S. Typhi*, para humanos, *S. Choleraesuis*, para suínos, *S. Dublin*, para bovinos (GRIFFITH, et al., 2006) e *S. Pullorum* e *Gallinarum* para aves (SNOEYENBOS & WILLIAMS, 1991). Outros sorovares, como *S. Typhimurium*, *S. Anatum* e *S. Newport*, afetam um grande número de hospedeiros, exercendo importante papel na disseminação da salmonelose entre diferentes espécies (HIRSH et al., 1990). Um dos sorovares mais frequentemente isolados em suínos no Rio Grande do Sul tem sido o Typhimurium (BESSA et al., 2004, CASTAGNA et al. 2004, SILVA et al. 2006), enquanto nos surtos registrados de infecções humanas de origem alimentar tem predominado *S. Enteritidis* (GEIMBA et al., 2004).

2.3 Salmonelose em humanos

Em humanos, *Salmonella* pode apresentar duas diferentes manifestações clínicas: a forma entérica – tifóide ou paratifóide – e a forma gastroentérica – não tifóide causada, principalmente, pela *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. A forma tifóide ocorre através da infecção por *S. Typhi*, causando mal-estar, cefaléia, febre, náusea, vômito e dor abdominal, podendo ser acompanhada de erupção cutânea. Anualmente, são estimados aproximadamente 20 milhões de casos de infecção por *S. Typhi* e 200.000 mortes em todo o mundo (CRUMP et al., 2004).

Salmonella é um dos mais importantes patógenos transmitidos por alimentos cárneos de origem suína nos Estados Unidos. Cerca de 1,4 milhões de pessoas sofrem com a infecção por este agente todos os anos. Em 21,9% dos casos é isolada *S. Typhimurium*, sendo este um dos sorotipos mais importante nas infecções de origem alimentar (CDC, 2009). De acordo com o *White Paper on Food Safety* (Commission of the European Communities), este patógeno é apontado como uma das mais importantes zoonoses em países desenvolvidos. Sendo assim, a disponibilização de produtos livres de microrganismos ou com baixos níveis de contaminação tornou-se essencial, para garantir vantagens na comercialização e exportação de alimentos.

São registrados anualmente entre 40.000 a 60.000 casos de salmonelose humana nos EUA, mas estimativas do número de casos reais chegam a alcançar 3 milhões, demandando, por sua frequência, elevado volume de recursos aos sistemas de saúde (CDC, 2009). Conforme Hald & Wegener (1999), entre as fontes de infecções humanas na Dinamarca, 40-45% são provenientes de ovos e 10-15% de produtos suínos. Da mesma forma, teve grande impacto neste país o relato de Maguire et al. (1993) sobre um surto de infecção humana por *S. Typhimurium*, afetando 206 indivíduos, em que a fonte de infecção foi relacionada à ingestão de carne suína contaminada.

Existe uma demanda, principalmente entre os consumidores dos países industrializados, quanto à segurança dos produtos de origem animal (FRANCO et al., 1996). A possibilidade de contaminação dos produtos por *Salmonella*, e os riscos associados a este fato, tende a ser muito conhecida por parte dos consumidores, gerando maior expectativa de controle. Associa-se a isto, o fato de países como a Dinamarca terem lançado programas de controle de *Salmonella* em rebanhos suínos, desencadeando uma pressão em outros países produtores para a implementação de medidas semelhantes. As carnes e seus derivados são alimentos bastante susceptíveis à contaminação por *Salmonella* (SEIXAS et al., 2009). Esse fato está relacionado à dificuldade de manter os lotes livres deste patógeno. Mesmo um pequeno número de bactérias viáveis pode oferecer risco para a ocorrência de infecção, uma vez que as condições de armazenagem, distribuição e preparação dos alimentos podem favorecer a multiplicação do agente, permitindo que o mesmo alcance a dose infectante para humanos. A manipulação do alimento e os hábitos alimentares, como a ingestão de produtos de origem animal mal

cozidos, aumentam as chances de transmissão. A dose infectante depende do *status* imunológico do hospedeiro, da virulência do agente e da composição química do alimento contaminado. De acordo com o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC), em 2008, a maioria dos registros de hospitalizações e letalidade foi referente à população de risco: crianças, idosos e imunodeprimidos. Essa população apresenta baixa resposta imunológica em função da imaturidade ou debilitação do sistema imunológico, somada, em algumas situações, à baixa produção de ácido clorídrico no estômago que favorece a colonização intestinal. De forma geral, a dose infectante mais comumente citada fica em torno de 10^5 células para indivíduos imunocompetentes (VARNAM et al., 1991).

O período de incubação em humanos, para amostras de *Salmonella* sp. não tifóides é de 12-72 horas e os sintomas mais comuns são cefaléia, náusea, vômito, cólica abdominal, diarréia e febre moderada. A diarréia pode durar até duas semanas, porém a fase aguda restringe-se de dois a sete dias.

2.4 Infecção por *Salmonella* sp. em suínos

A infecção por *Salmonella* sp. está relacionada a duas diferentes apresentações nessa espécie: a primeira cursando com manifestação clínica, nas formas de enterocolite e septicemia; e a segunda como contaminante de carcaças e produtos que podem levar à infecções em humanos (EKPERIGIN & NAGAJARA, 1998).

A septicemia, uma forma grave da doença nos suínos, é usualmente causada por *S. Cholerasuis* e acomete principalmente leitões com menos de cinco meses de idade que apresentam, normalmente, inapetência, letargia, dispnéia, hipertermia, com temperaturas superiores a 40,5°C. Os animais podem apresentar cianose nas extremidades e abdomen. Na necropsia podem ser observadas lesões no estômago, esplenomegalia, hepatomegalia, linfonodos gastrohepáticos e mesentéricos aumentados, pulmões firmes e resistentes, com edema interlobular. Podem, também, apresentar hemorragia, broncopneumonia e icterícia (GRIFFITH, et al., 2006). Suínos que sobrevivem à septicemia aguda podem desenvolver sinais clínicos devido às lesões localizadas, como pneumonia, hepatite, enterocolite e, ocasionalmente, meningoencefalite. Embora existam

registros de infecção por *S. Choleraesuis* (WRIGHT J. et al., 1997, CHEN. et al.,1999), o último relato deste sorovar no Brasil foi realizado por Barcellos et al. (1991).

A enterocolite está associada com *S. Typhimurium*, a qual se dissemina rapidamente entre os suínos, porém com mortalidade baixa. Os animais apresentam diarreia aquosa, amarelada, normalmente sem sangue ou muco. Os suínos acometidos apresentam hipertermia, alimentando-se pouco e apresentando desidratação em decorrência da severidade e duração da diarreia. Os animais afetados apresentam enterite necrótica, focal ou difusa, e colite. Podem ser encontrados ainda espessamento da superfície mucosa do cólon, ceco e íleo e aumento dos linfonodos mesentéricos, principalmente o ileocecal (GRIFFITH, et al., 2006). Animais com enterocolite podem desenvolver um definhamento crônico. Os suínos podem recuperar-se totalmente, mas alguns poderão permanecer como portadores e excretadores intermitentes por meses (WILCOCK; SCHWARTZ, 1992).

Os suínos portadores assintomáticos de *Salmonella* são as principais fontes de contaminação das carcaças nos abatedouros, o que determina sua importância epidemiológica na saúde pública. Suínos portadores excretam a bactéria no ambiente infectando o lote, transmitindo horizontalmente entre os animais em contato no caminhão e baias de espera, aumentando o número de animais infectados que adentram o abatedouro. O transporte dos animais, os caminhões contaminados, a espera pré-abate e o abatedouro podem contribuir para uma contaminação cruzada, a partir de animais excretadores, sendo um ponto importante de contaminação. (VAN DER GAAG et al., 2003). Neste caso, o ponto mais crítico é a contaminação entre lotes, uma vez que lotes com baixa prevalência de *Salmonella* são alojados nas baias contaminadas por lotes anteriores. No Brasil, a relação entre os genótipos de *Salmonella* encontrados na baia de espera e nas carcaças, em matadouro de Santa Catarina, foi relatada por Kich et al. (2007), demonstrando que o tempo de espera observado nos frigoríficos pode contribuir para a transmissão horizontal da bactéria que, posteriormente, poderá chegar até a superfície da carcaça.

2.5 Fontes de transmissão de *Salmonella* para os suínos

Salmonella sp., por ser amplamente distribuída na natureza e ter muitos hospedeiros e vetores, possui várias oportunidades de contaminar os sistemas de produção animal. Apesar da transmissão via aerossol ser observada (FEDORKA-CRAY et al., 1995), a principal forma de infecção é a fecal-oral, podendo a bactéria permanecer nos linfonodos mesentéricos, e ser excretada quando o animal for submetido a um fator estressante como o transporte e/ou reagrupamento (HURD et al., 2002). Sua eliminação ocorre pelas fezes, permanecendo protegida na matéria orgânica e contaminando o ambiente. Estas características determinam as fontes de infecção que podem ser agrupadas da seguinte forma: alimento contaminado; animais portadores e excretores; vetores e contaminação residual.

Apesar da contaminação da ração ser monitorada há bastante tempo, ainda se atribui risco significativo de introdução de *Salmonella* através da alimentação em granjas de suínos (STÄRK et al., 2002). A utilização de farinhas de origem animal tem sido apontada como a principal fonte de contaminação da ração (MACIOROWSKI et al., 2006). Os tratamentos e melhorias direcionadas aos ingredientes de maior risco diminuíram os índices de contaminação e aumentaram a ocorrência relativa dos demais componentes das dietas (MACIOROWSKI et al., 2006). De acordo com Griffith et al. (2006), produtos de origem vegetal também podem servir como fonte de introdução de *Salmonella* sp. nos alimentos. A contaminação em farelo de soja foi registrada no Brasil por Albuquerque et al. (1999), que encontraram 12,82% (5/39) de amostras positivas para *Salmonella*. Portanto, os esforços para manter a ração livre de *Salmonella* requerem, além da qualidade dos ingredientes (ROSTAGNO et al., 2003), boas práticas de produção, cuidados com a ração final até seu fornecimento aos animais, evitando o contato com pássaros e roedores, materiais ou resíduos contaminados nos caminhões (FEDORKA-CRAY et al., 1997).

A fase de crescimento e terminação tem sido considerada a mais crítica para a amplificação do número de animais infectados (VAN DER GAAG et al., 2003, SCHWARZ et al., 2009), sendo o alojamento de leitões excretores uma importante forma de introdução de *Salmonella* na granja. Em alguns sistemas de produção a transmissão ocorre durante a fase de creche, como demonstrado em uma agroindústria brasileira em

que a presença de leitões soropositivos (23,74%) e excretores de *Salmonella* (48,9%) no momento do alojamento na terminação evidenciaram a infecção ocorrida na fase de creche (KICH et al., 2005). A excreção de *Salmonella* neste período, em que os leitões são transportados, reagrupados e alojados, introduz e dissemina a bactéria na granja de crescimento e terminação. A dinâmica da infecção entre rebanhos pode variar, inclusive com registro de excreção de *Salmonella* na creche e declínio na terminação (KRANKER et al., 2003). Porém, na maioria dos relatos a infecção tende a aparecer nas primeiras semanas após a chegada dos animais na terminação (FUNK, et al., 2001; KICH et al., 2007; SCHWARZ et al., 2009). A excreção ativa da bactéria pode ser estimulada pelo estresse associado a fatores como transporte dos animais (CLARKE et al., 1993), mistura dos lotes na terminação (SOBESTIANSKY et al., 1999) superlotação das baias, idade, inanição, administração de corticóides, entre outros.

A contaminação residual da granja, resultante de lotes anteriores infectados é uma forma importante de manutenção do agente nos rebanhos. Kich et al. (2005) isolaram *Salmonella* do piso das baias de 5/12 granjas de terminação antes da entrada dos animais. Em outro trabalho, Silva et al. (2006), estudando 70 creches de diferentes empresas em Santa Catarina, encontraram contaminação residual em 15,71% das granjas. Estes resultados indicam que as práticas de limpeza, desinfecção e vazio sanitário não estão sendo eficientes na eliminação da bactéria das granjas. Falhas de biossegurança, como a presença de roedores e moscas nas instalações durante ou após o vazio sanitário foram identificadas como fatores de risco para a contaminação residual por *Salmonella* em creches dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2006). Estes roedores e vetores contribuem na disseminação da infecção, carregando o agente entre baias, galpões e demais instalações da granja. Em trabalho recente, BODE et al. (2008) encontraram *Salmonella* sp. em comedouros, bebedouros e veículos como botas, ferramentas e caminhões, sendo os mesmos considerados críticos para a manutenção da bactéria nas granjas.

2.6 Ocorrência de *Salmonella* em rebanhos suínos brasileiros

Diversos trabalhos vêm sendo conduzidos no Brasil com o intuito de monitorar os rebanhos e apontar as fases de maior importância para a transmissão de *Salmonella* sp. ao

longo da cadeia de produção. A prevalência ao abate em frigoríficos no Rio Grande do Sul foi investigada por Bessa et al. (2004), encontrando 56% de suínos portadores em amostras de fezes e linfonodos mesentéricos (LM). Alguns anos mais tarde, Schwarz et al. (2009) encontraram 77% de animais positivos em LM em frigoríficos da mesma região, evidenciando a persistência da prevalência elevada de portadores ao abate. Nesse mesmo estudo, evidenciou-se que os lotes amostrados ao abate apresentavam também elevada soroprevalência contra *Salmonella*, demonstrando que a infecção dos animais havia ocorrido no período de alojamento na granja. Em Santa Catarina, encontrou-se prevalência de 65,34% de animais portadores de *Salmonella* em LM, em 1618 animais provenientes de diversas granjas integradas a uma agroindústria da região (KICH et al., 2007). Prevalência menor foi encontrada no Mato Grosso, onde apenas 16% dos suínos amostrados ao abate em diferentes frigoríficos eram portadores de *Salmonella* sp. (SILVA et al., 2009). No Paraná, foi observada presença de *Salmonella* em 17,33% dos 150 LM analisados (SPOLAORE et al., 2007), prevalência próxima à relatada por Zucon et al. (2008), em estudo conduzido em quatro frigoríficos de São Paulo, e que resultou em isolamento de *Salmonella* sp. em 16,12% das amostras de fezes, LM e carcaça analisadas.

Estudos longitudinais também foram realizados no sul do Brasil, identificando a fase de terminação como a mais freqüentemente envolvida na infecção dos rebanhos suínos (SILVA et al., 2006; MÜLLER, 2009). Esta fase da criação também foi considerada a mais crítica por Letellier et al. (1999) em rebanhos canadenses e Bahnon et al. (2005) na suinocultura americana. Avaliando 14 coortes de suínos do nascimento ao abate, Schwarz et al. (2009) encontraram 80% de soropositivos para *Salmonella* em leitões de um a três dias de vida, relacionando esse achado com a aquisição de imunidade materna pelo colostro. Confirmando essa hipótese, observou-se que esse índice decresceu no desmame para 8,5% e, após 21 dias de alojamento na creche, todos os animais eram soronegativos. Após duas semanas de alojamento na terminação, 49% dos suínos estavam excretando *Salmonella*; até a idade de abate 88,42% soroconverteram e 77% eram portadores nos linfonodos mesentéricos, evidenciando a importância da fase de crescimento e terminação para a amplificação do problema. Situação diferente em 12 lotes amostrados por Kich et al. (2006), em que 49% dos animais estavam excretando a bactéria ao chegarem nas granjas de crescimento e terminação e 23,74% já eram

soropositivos, demonstrando que, em algumas situações, a transmissão ocorre já na fase de creche.

A relação entre a ocorrência de suínos portadores de *Salmonella* ao abate e a contaminação de carcaças no frigorífico também tem sido investigada. Kich et al. (2007) observaram que os genótipos de *Salmonella*, isolados de fezes e ambiente antes do alojamento dos animais nas granjas de crescimento e terminação, estavam relacionados com áqueles presentes nos linfonodos inseridos na musculatura, inguinais profundos e pré-escapulares dos mesmos suínos ao abate. Ou seja, os genótipos, que já infectavam os leitões no período de creche e início do crescimento, alcançaram os linfonodos profundos e foram detectados no abatedouro. A contaminação das carcaças oriundas desses animais, por sua vez, estava relacionada com amostras de *Salmonella* isoladas das baias de espera do frigorífico, indicando que esses grupos clonais estavam mais relacionados com a contaminação superficial. Em Minas Gerais, em 120 suabes de carcaças, colhidas após a fase de escaldagem/depilação, antes e após evisceração, e após 24 horas de refrigeração, encontrou-se *Salmonella* em uma frequência média de 11,7% (LIMA et al., 2004). Em estudo similar conduzido em Santa Catarina, foi relatada frequência de 38,8% de suabes de carcaça positivos, colhidos após escaldagem, flambagem, evisceração e lavagem (SEIXAS et al., 2009).

Estudando a relação entre a infecção de lotes de animais abatidos e a contaminação de produtos elaborados, Castagna et al. (2004) encontraram 93,94 % de amostras positivas para *Salmonella* em massa de embutidos elaborada a partir de carne proveniente de lotes de suínos que tinham prevalência de 83,33% de animais positivos em linfonodos. Paralelamente, 49,59% de amostras de cortes de pernil proveninetes dos mesmos lotes de animais estavam contaminadas com *Salmonella* (BANDEIRA et al., 2007). Em relação a produtos disponíveis ao consumidor, Mürmann et al. (2009) detectaram 24% de amostras de lingüiça frescal, adquiridas em estabelecimentos comerciais de Porto Alegre, positivas para *Salmonella*, enquanto Fai et al. (2007) encontraram 30% de amostras positivas em presunto suíno cozido colhidos em estabelecimentos de Fortaleza.

2.7 Controle e prevenção de *Salmonella* sp. na cadeia produtiva de suínos

Programas de controle de *Salmonella* em suínos têm sido sistematicamente elaborados e implementados nos países produtores (GOLDBACH et al., 2006; BODE et al., 2008). Estratégias de controle e prevenção, por meio de intervenções isoladas, privilegiando apenas um elo da cadeia de produção, têm pouca chance de sucesso no controle desse agente. Devido às múltiplas possibilidades de contaminação, medidas de biossegurança devem fazer parte do programa, eliminando a presença de insetos e roedores nas granjas; intensificando as práticas de limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos; eliminando animais doentes; restringindo a entrada de funcionários e visitantes, entre outras. A implementação de programas de boas práticas nas fábricas de ração e frigoríficos, com medidas específicas direcionadas à *Salmonella* também devem ser adotadas (GOLDBACH et al., 2006).

A ampla distribuição deste agente no ambiente e em animais determina uma cadeia de transmissão bastante complexa. A adoção de um protocolo de limpeza e desinfecção eficaz é crucial para controlar a infecção por *Salmonella* e outros patógenos no período de vazio sanitário da granja e antes do alojamento dos lotes de suínos (BERENDS et al., 1996; FUNK et al., 2001). O manejo “todos dentro-todos fora” é tradicionalmente adotado em granjas de suínos antes do alojamento de novos lotes. Entretanto apenas a permanência da instalação vazia não demonstrou ser eficiente no controle de contaminação residual por *Salmonella* (FUNK et al., 2001), sendo necessária limpeza e desinfecção efetivas.

A limpeza consiste em remover mecanicamente os dejetos acumulados nas instalações, reduzindo a carga de microrganismos e obtendo superfícies limpas, sem matéria orgânica, que inative a ação dos desinfetantes (KICH, et al., 2006). A desinfecção é um processo químico para eliminação de microrganismos indesejáveis, atuando em sua estrutura ou metabolismo. Busca-se, dessa forma, evitar sua transmissão através da redução da dose infectante (ASCENZI et al., 2006). A presença de sujeira nas superfícies dificulta ou até mesmo impossibilita a ação dos desinfetantes em toda a área onde possam estar alojados os microrganismos (SOBESTIANSKY et al., 1999). Recomenda-se iniciar com a limpeza seca logo após a saída dos animais seguida da limpeza úmida, adicionando um detergente na água de lavagem. Estas substâncias têm ação umedecedora e surfactante

que, quando adicionadas na água, reduzem a tensão superficial, aumentando a capacidade de penetração e o poder de remoção da sujeira aderida ao piso, equipamentos e paredes da instalação (ASCENZI et al., 2006).

Diversos compostos químicos desinfetantes estão disponíveis no mercado, sendo os mais utilizados, na produção animal, os compostos de amônia quaternária, glutaraldeído, iodóforo e hipoclorito (JAENISCH, 2007). Kich et al. (2004) avaliaram a atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. Foi observado que no tempo de contato de 5 e 15 minutos, na ausência de matéria orgânica todos os desinfetantes testados foram eficazes. Na presença de matéria orgânica, porém, somente hipoclorito de sódio (1%), fenol e ácido peracético foi capaz de eliminar a bactéria *in vitro*. Em outro estudo, trabalhando com 96 amostras de *Salmonella* Typhimurium, foi observada a sensibilidade de todas as amostras ao quaternário de amônia, independentemente do tempo de contato ou da concentração. Em relação ao iodoform, quatro amostras apresentaram resistência, mesmo com tempo de contato de 60 minutos, e 59 foram resistentes na sub-concentração de uso (BOROWSKY et al., 2006). Em relação à *Salmonella*, somente a associação adequada, da limpeza e desinfecção com o tempo necessário de vazão sanitário, poderá contribuir para a redução da contaminação residual (BODE et al., 2008).

A eliminação de moscas e roedores que possam disseminar a bactéria ao longo do sistema de produção de suínos e entre granjas é outra medida de controle importante. O controle dessas populações é efetivo quando combinada a diferentes técnicas, no chamado controle integrado, incluindo ações mecânicas, químicas e biológicas (PAIVA et al., 1994). Dentre elas, pode ser destacado o manejo adequado dos dejetos e destino dos animais mortos, construção das instalações que dificultem ou impessam o acesso de roedores à granja armazenamento correto da ração, utilização de inseticidas e raticidas, entre outros (OJHA & KOSTRZYNSKA, 2007). A prática do controle de moscas e roedores tem sido investigada através de análises de fatores de risco associados à contaminação residual por *Salmonella* sp. (KICH et al., 2004). Um estudo foi realizado em instalações de creche após a desinfecção e vazão sanitário em 70 granjas de suínos aplicando um questionário e incluindo variáveis candidatas a fatores de risco. Foram contempladas questões relativas à limpeza e desinfecção, manejo e estado geral das

instalações e biosseguridade. O resultado indicou que há maior chance de contaminação residual por *Salmonella* quando há presença de trilhas de ratos nas instalações, presença de moscas e quanto maior for o intervalo de tempo entre a saída dos suínos das instalações e o início das operações de limpeza e desinfecção (SILVA et al., 2006).

O fornecimento de ração contaminada já foi amplamente demonstrado como fonte de infecção por *Salmonella* sp. em suínos e seu monitoramento constitui ponto importante nos programas de controle (ALBAN et al., 2002; SILVA et al., 2006; MÜLLER, 2009). Entretanto, a obtenção de amostra representativa de ração, tanto na fábrica quanto na granja, é crítica, o que resulta na dificuldade em demonstrar a implicação da ração na introdução de *Salmonella* na granja e na infecção dos animais (FUNK et al., 2001; KICH et al., 2005). Em um estudo conduzido no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, foi avaliado o número de partidas positivas de ração que chegam na granja observando que em 10/12 granjas houve isolamento de *Salmonella* de pelo menos uma amostra ao longo do período de crescimento e terminação (KICH et al., 2005). Verificando a presença de *Salmonella* e enterobactérias em diferentes etapas de produção da ração, um recente estudo observou que as áreas de armazenagem e recepção foram críticas em relação ao isolamento de *Salmonella* nas quatro fábricas estudadas, enquanto a peletização e resfriamento, não apresentaram amostras positivas. A armazenagem foi o ponto com a maior percentagem de amostras com contagem superior a 100 Unidades Formadoras de Colônia de enterobactérias (PELLEGRINI et al., 2009).

A utilização de vacinas vivas atenuadas, de subunidades ou bacterinas tem sido proposta com o intuito de auxiliar na diminuição do índice de animais portadores (SOBESTIANSKY et al., 1999; LETELLIER et al., 2001). Kolb et al. (2002) demonstraram redução de infecções subclínicas por *Salmonella* através de imunidade cruzada decorrente da vacina viva atenuada contra *S. Choleraesuis* (SC54). A redução na presença da bactéria em linfonodos mesentéricos foi observada nos animais imunizados com a vacina SC54, em comparação com o grupo controle (LETELLIER et al., 1999). A mesma vacina aplicada no primeiro dia de vida de leitões foi capaz de reduzir 45% e 47% da prevalência sorológica e de isolamento, respectivamente, no grupo vacinado em relação ao grupo controle (SCHWARZ et al., 2007). Da mesma forma, Lumsden et al.

(1991) mostraram a eficácia da vacina viva atenuada contra *S. Typhimurium* na redução da eliminação fecal da bactéria em suínos.

Juntamente com medidas de intervenção direcionadas a pontos críticos e fatores de risco, diversos tratamentos para reduzir o índice de portadores de *Salmonella* sp. estão sendo estudados (FEDORKA-CRAY et al., 1997; LETELLIER et al., 1999). Aditivos fornecidos na ração e produtos que promovam exclusão competitiva têm sido propostos para garantir menores índices de microrganismos patogênicos em suínos ao longo da cadeia produtiva (MILTEMBURG et al., 2000; BEST et al., 2001). Entre esses, prebióticos e ácidos orgânicos são objetos de estudo com o intuito de contribuir com o controle de *Salmonella* em suínos (FERKET et al., 2002), proporcionando condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos benéficos no trato gastrintestinal (SANTOS et al. 2006).

2.8 Ácidos Orgânicos

Ácidos orgânicos são substâncias que contêm uma ou mais carboxilas em sua molécula, incluindo ácidos graxos e aminoácidos, e são constituintes de células vegetais e animais (MROZ et al., 2002). Alguns deles podem ser formados por meio de fermentação microbológica no intestino, e outros resultam do metabolismo intermediário. Podem estar disponíveis como sais de sódio, potássio e cálcio; a vantagem desses sais em relação aos ácidos livres deve-se ao fato de serem inodoros e de fácil utilização nos processos de elaboração de rações animais. Vários ácidos orgânicos são empregados na produção animal, sendo mais adotados em suinocultura os ácidos fracos, de cadeia curta (C1-C7) (ADAMS, 1999). Estes ácidos, tais como o acético, o propiônico e o butírico são os principais produtos finais da fermentação no intestino, sendo rapidamente absorvidos pela mucosa (TSUKAHARA et al., 2002).

Os ácidos orgânicos têm sido utilizados na produção animal por serem preservantes eficientes da ração, além de uma alternativa no controle de patógenos no trato digestório. A ação mais efetiva dos ácidos é, provavelmente, a atividade antimicrobiana, por meio da ação direta de sua forma não dissociada, ou pela alteração indireta da microbiota intestinal, em decorrência da produção de um meio favorável para multiplicação de bactérias lácticas que causam a acidificação no lúmen intestinal

(TSILOYIANNIS et al., 2001). Porém, o conceito que ácidos ingeridos com a dieta agem pela diminuição direta do pH do trato digestório é equivocada. Ao acrescentar ácidos na ração ou na água, efetivamente ocorre a diminuição do pH. Entretanto, ao chegar no estômago a acidez é compensada pela equalização do pH do alimento ou água ingeridos com o do conteúdo estomacal, não permitindo uma alteração do pH final. (PARTANEN; MROZ, 1999).

Os ácidos orgânicos são lipossolúveis na forma não dissociada, podendo difundir facilmente, através da membrana semipermeável dos microrganismos, até o citoplasma bacteriano. Uma vez no interior da célula, no qual o pH é próximo ao neutro, sofrem dissociação em moléculas catiônicas e aniônicas. A forma catiônica contribui para a acidificação do citoplasma bacteriano, o que resulta na dissipação da força próton-motiva. Essa por sua vez, é essencial para o transporte de nutrientes e para o metabolismo energético que ocorre na membrana citoplasmática. Além disso, muitas enzimas essenciais para o metabolismo microbiano são inativadas em pH ácido (GRILLI et al., 2007). A forma aniônica, acumulada no interior da célula bacteriana, torna-se tóxica mediante mecanismos complexos que implicam no desbalanceamento iônico e osmótico, interferindo na replicação do DNA e na síntese protéica. Esses efeitos exercem ação letal para a célula bacteriana (VENTANCO et al., 2005). Segundo Eklund et al. (1983), a ação inibidora dos ácidos orgânicos na forma não dissociada é de 100 a 600 vezes maior do que na forma dissociada.

A eficiência antimicrobiana de um ácido depende da sua constante de dissociação (pKa). O pKa é uma constante de dissociação proporcional à concentração dos íons formados. Quanto maior o valor de pKa mais ionizado é o ácido, conseqüentemente maior a sua força. As bactérias Gram negativas são mais susceptíveis aos ácidos com menos de oito carbonos, enquanto as bactérias Gram positivas apresentam sensibilidade aos ácidos com cadeias maiores e moléculas mais lipolíticas (ADAMS et al., 1999, BEST et al., 2000, CANIBE et al., 2001). A absorção, por sua vez, depende do pKa do ácido e do pH do lúmen. Quando o pH do lúmen for menor do que o pKa do ácido, a absorção será rápida. Entretanto, o pH intestinal é normalmente superior ao pKa dos ácidos, fazendo com que permaneçam na forma dissociada, pouco absorvida. Porém, as trocas de Na-H pelas células do epitélio intestinal provocam reduções locais do pH,

levando a uma alteração para a forma iônica desses ácidos, ocorrendo absorção pela bactéria devido ao gradiente de concentração entre o lúmen e as células (CANIBE et al., 2004).

O mecanismo de morte bacteriana, explicada pela dissociação do ácido no citoplasma, reduz a população de bactérias Gram negativas, grupo a que pertence a maioria dos patógenos do intestino delgado. Dessa forma, ocorre o aumento da população de Gram positivas, em sua maioria, bactérias produtoras de ácido láctico. Estes microrganismos reduzem o pH, mantendo e ampliando o efeito de inibição dos patógenos no intestino, sob a forma de exclusão competitiva (IMMERSEEL et al., 2002).

Alguns estudos demonstram a efetividade dos ácidos orgânicos, enquanto outros pesquisadores não obtiveram resultados promissores. Vogt et al. (1981) e Waldroup et al. (1995), estudaram o efeito do ácido cítrico adicionado à ração de suínos nas concentrações de 2% e 1%, respectivamente, não observando diferença na excreção fecal de *S. Typhimurium* do grupo tratado em relação ao grupo controle. Da mesma forma, Biage et al. (2007) estudaram o efeito do ácido propiônico sobre a população de *Lactobacillus* e *E. coli* na digesta do estômago, duodeno, ceco e cólon de suínos com oito semanas de idade, não encontrando diferença significativa entre os tratamentos. RISLEY et al. (1991, 1992, 1993) realizaram três estudos sequenciais adicionando ácido fumárico na ração de leitões desmamados, não observando efeito sobre a densidade da população de *Lactobacillus* e *Escherichia coli* ao longo do trato gastrointestinal. Ainda, em relação à ação individual de outros ácidos, como ácido láctico (THOMLINSON; LAWRENCE, 1991, MARIBO et al., 2000), ácido fórmico (BOLDWAN et al., 1988, CANIBE et al., 2001) e ácido benzóico (MARIBO et al., 2000), não foi observada diferença significativa na contagem de *Lactobacillus* e *E. coli* no intestino dos animais tratados.

Porém, outros autores relatam efeito positivo da ação dos ácidos orgânicos na produção animal. Avila et al. (2003) observaram que a adição de ácido láctico na água de beber em aves na fase de pré-abate reduziu a prevalência de *S. Enteritidis*. A adição de ácido láctico na ração de suínos foi estudada por Maribo et al. (2000) que observaram aumento na população de *Lactobacillus* no ceco e colon e redução no pH no trato gastrointestinal. Resultados semelhantes foram relatados por Mikkelsen & Jensen (2004), com diminuição na contagem de coliformes e aumento de *Lactobacillus*. Efeitos dos

ácidos fórmico, propiônico, butírico, láctico, benzóico e fumárico foram estudados por Naughton & Jensen (2001). Estes estudos demonstraram redução de coliformes no intestino, influenciada pelo aumento de bactérias ácido-láticas e pela diminuição do pH. Os autores observaram que o ácido com maior potencial em diminuir a presença de coliformes foi o propiônico, seguido do fórmico e do butírico.

Como referido anteriormente, a capacidade de dissociação dos ácidos está relacionada com o pH do intestino. Como existe variação do pH em diferentes porções intestinais, a adição de mistura de ácidos com melhor atividade em diferentes pHs pode otimizar o efeito dos ácidos orgânicos. Com a finalidade de alcançar o efeito de controle, mantendo a característica da ração, várias associações de ácidos orgânicos são propostas como aditivos de ração e água, contribuindo no controle de *Salmonella* em suínos (PIVA et al., 2007). Um estudo utilizando ácidos propiônico e fórmico, associados a um prebiótico, mostrou que, quando adicionados à ração, houve redução do pH, passando a haver ação antibacteriana, particularmente contra bactérias Gram negativas, controlando a infecção por *Salmonella* Enteritidis (BASSAN et al., 2008).

A tecnologia do microencapsulamento dos ácidos também tem sido empregada como forma de estabilizar os ingredientes ativos e permitir ganho produtivo importante (IMMERSEEL et al., 2002). O processo se constitui da proteção dos ácidos orgânicos por uma camada de gordura vegetal. Estes ácidos são liberados, principalmente no intestino, alcançando-se níveis mais altos e consistentes em relação aos proporcionados pelos ácidos não-encapsulados (GRILLI et al., 2007). A razão disso está relacionada ao fato dos ácidos orgânicos encapsulados chegarem ao intestino do animal sem sofrer dissociação, protegidos por uma matriz que possui a capacidade de ultrapassar a porção anterior do intestino sem sofrer desnaturação. Uma vez no intestino, a matriz é emulsionada e hidrolizada por ação das secreções hepáticas e pancreáticas, liberando, assim, os ácidos na forma dissociada (RISLEY et al. 1991; PIVA et al., 2007). A degradação da matriz lipídica ocorre lentamente, favorecendo a liberação do ácido protegido ao longo do trato intestinal (PIVA et al., 2007). Neste estudo foi avaliada a concentração do ácido sórbico encapsulado e não-encapsulado ao longo do intestino de suínos. O grupo de animais que recebeu dieta com ácido encapsulado apresentou diminuição progressiva na concentração do ácido no jejuno, íleo, ceco e colon, enquanto

nos animais que receberam o ácido não encapsulado (ASNE) houve uma diminuição acentuada na concentração do mesmo logo após o estômago. A população de coliformes foi significativamente reduzida no grupo de animais tratados pelo ácido encapsulado no jejuno e ceco quando comparados ao grupo de animais que receberam o ácido não encapsulado. Especificamente para o controle de *Salmonella*, Immerseel et al. (2002) conduziram um estudo utilizando ácido orgânico e demonstraram a redução a colonização de *Salmonella* Enteritidis no ceco de frangos que receberam dieta tratada com ácidos propiônico e butírico encapsulados.

2.9 Prebióticos

Os prebióticos são compostos não digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, mas seletivamente fermentados pelos microrganismos do trato gastrintestinal, podendo estar presentes nos ingredientes da dieta ou adicionados a ela através de fontes exógenas concentradas (GIBSON; ROBERFROID, 1995). A prebiose é a estimulação seletiva do crescimento e/ ou a atividade de um número limitado de espécies bacterianas já residentes no trato digestivo (RISLEY et al., 1991).

Alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, álcoois de açúcares e oligossacarídeos tem ação compatível com o conceito de prebiose. Destes, os oligossacarídeos - cadeias curtas de polissacarídeos, compostos de três a 10 açúcares simples ligados entre si, têm recebido maior atenção pelas suas inúmeras propriedades prebióticas. Entre os prebióticos destacam-se os frutoligossacarídeos (FOS), mananologossacarídeos (MOS) e os galactooligossacarídeos (GOS), sendo o MOS, o produto mais utilizado na suinocultura (GEBBINK et al., 2000).

O MOS é um carboidrato derivado da parede celular externa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Sua ação se explica pela interferência com a aderência de bactérias Gram negativas que, por meio de lectinas das fimbrias, ligam-se aos receptores de manose presentes nas células (FERNANDES et al., 2003). Essa ligação é observada entre bactérias portadoras de fimbrias do tipo 1 e o MOS, possivelmente devido à capacidade de ligação destas fimbrias à D-manose, constituinte do MOS, tornando-as indisponíveis para a colonização intestinal. Em decorrência da ausência de ligação, as bactérias são eliminadas do trato gastrintestinal junto com as fezes (MATHEW et al.,

1993). Já foram descritas várias cepas de *E. coli* e *Salmonella* sp. que possuem este tipo de fimbria e que, por sua vez, podem aglutinar ao MOS (FINUCANE et al., 1999). Em recente trabalho, foi observado que o MOS pode ser efetivo para aglutinar “in vitro” amostras de *Salmonella enterica* que expressam a fimbria tipo 1, tendo grande potencial para ser testado no controle da colonização de *Salmonella* (BOROWSKY et al., 2009).

Existem também evidências de que o MOS pode atuar no sistema imune e enzimático, por promover o aumento de populações de bactérias benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*), que possuem a capacidade de produzir substâncias com propriedades imunoestimulantes - lipopolissacarídeos, peptidoglicano e ácidos lipoteicóicos. DAWSON & PIRYULESCU (1999) sugerem que estes compostos se ligam a sítios receptores dos macrófagos através do reconhecimento de determinados açúcares, presentes nas glicoproteínas da superfície epitelial, desencadeando uma reação em cascata que resulta na ativação dessas células, liberação de citocinas, proliferação de células mononucleares, fagocitose e indução na síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas, em especial a IgA (BRANDTZAEG et al., 1998; MACFARLANE; CUMMINGS, 1999).

Os prebióticos também podem induzir modificações benéficas nas características anatômicas do TGI, promovendo o aumento na área de absorção da mucosa intestinal. Howard et al. (1993) observaram aumento na densidade celular (número de células/cripta), maior comprimento das criptas, maior zona de proliferação (células marcadas/densidade celular), maior número e comprimento de células marcadas das partes proximal e distal do cólon em animais que receberam MOS, comparado ao controle. Após serem adicionados na dieta, e considerando a especificidade de fermentação dos prebióticos, há estímulo do crescimento e a estabilidade das populações microbianas produtoras de ácidos orgânicos (em especial, ácido lático e acético), em detrimento às demais. Estes compostos reduzem o pH luminal e, juntamente com outras substâncias antibacterianas e enzimas produzidas por esta mesma microbiota, inibem a proliferação dos microrganismos patogênicos, tais como *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. e *Salmonella* sp. (RADECKI & YOKOYAMA, 1991).

Alguns estudos demonstram a efetividade do MOS em relação a outros aditivos na ração (DAVIS et al., 1999, PETTIGREW et al., 2000). Os resultados

experimentais obtidos por Mathew et al. (1993) que adicionaram 1% de GOS e por Gebbink et al. (2000) que adicionaram 5% de FOS em dietas para leitões recém-desmamados demonstraram a ação efetiva destes compostos no aumento da população de bactérias lácticas e diminuição na contagem de *E. coli*. Da mesma forma, Stanley et al. (1996) observaram significativa redução de coliformes totais ($2 \log_{10}$) em cecos de frangos de corte que receberam 0,2% de lactulose na dieta. Em experimento conduzido em cães, Strickling et al. (2000) também observaram redução na excreção fecal de *Clostridium perfringens* nos animais suplementados com MOS. No entanto, os resultados obtidos por Farnworth et al. (1992), Gabert et al. (1994), Orban et al. (1997) em experimento com leitões e os obtidos por Fairchild et al. (1999) com perus, demonstraram que nem sempre a ingestão de compostos com potencial ação prebiótica causa mudança na microbiota intestinal.

O efeito da inclusão de MOS na dieta de frangos tem sido avaliada em vários estudos (SPRING et al., 2000; BIGGS et al., 2006; BAURHOO et al., 2007). Na maioria dos casos, observou-se um aumento da população de lactobacilos e bifidobactérias, associada à diminuição no número de *E. coli*, *Salmonella* e *Clostridium perfringens*. A utilização conjunta de prebiótico (mananoligossacarídeo) e ácidos orgânicos (fórmico e propiônico) reduziu a excreção de *Salmonella* nas fezes de frangos de corte (BASSAN et al., 2008).

Em suínos, ainda existem poucos relatos a respeito do uso do MOS no controle de *Salmonella*, o qual tem sido estudado entre diferentes medidas como vacinas, probiótico e outros prebióticos. Observou-se maior redução da bactéria no íleo dos animais vacinados e pouca alteração nos tratados com prebiótico (LETTELIER et al., 2001). Burkey et al. (2004) desafiaram suínos com *Salmonella* e compararam três diferentes dietas: MOS, clorato de sódio e antibiótico. Dos três tratamentos apenas o clorato de sódio resultou na redução da excreção de *Salmonella*. Apesar dos benefícios fisiológicos já demonstrados, os resultados obtidos do efeito do MOS sobre a excreção de *Salmonella* e sua relação com imunidade, microbiota intestinal, morfologia intestinal ainda precisam ser mais estudados em suínos.

Por todas essas observações, medidas suplementares de controle de *Salmonella* em suínos, com potencial de serem associadas à programas de correção de fatores de risco nas granjas, ainda necessitam ser testadas e sua efetividade comprovada.

CAPÍTULO 3: ARTIGO

Efeito da adição de ácidos orgânicos e prebiótico na dieta sobre a excreção de *Salmonella* Typhimurium em suínos em fase de crescimento e terminação infectados experimentalmente

Effect of organic acids and prebiotics on *Salmonella* Typhimurium excretion in finishing pigs experimentally infected

Juliana Cafruni Calveyra^{a*}; Mariana Gomes Nogueira^a; Jalusa Deon Kich^b, Luiza Leticia Biesus^b; Remídio Vizzotto^b; Laís Berno^b; Arlei Coldebella^b; Nelson Morés^b; Marisa Cardoso^{a, *}

^a Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Av. Bento Gonçalves 9090, 90540-000 Porto Alegre, RS, Brasil

^b Embrapa-Suínos e Aves

Caixa Postal 21, CEP 89700-000, 89700-000 Concórdia, SC, *Brasil*

*jucalveyra@hotmail.com

Artigo a ser submetido no periódico Research in Veterinary Science.

RESUMO

A presença de *Salmonella* sp. em suínos ao abate evidencia a necessidade da implantação de programas de controle nas granjas produtoras, tanto pela correção de fatores de risco como pela adoção de medidas auxiliares que contribuam para diminuir o número de animais portadores e excretadores da bactéria. O objetivo desse estudo foi testar o efeito da adição de ácidos orgânicos e prebiótico à dieta de suínos infectados experimentalmente por *Salmonella* Typhimurium. Foram utilizados 46 leitões com 43 dias de idade, distribuídos em delineamento em blocos casualizados em quatro tratamentos: T1 – Dieta Basal; T2 - Dieta Basal + Ácido Orgânico Encapsulado; T3 - Dieta Basal + Ácido Orgânico não Encapsulado; T4 - Dieta Basal + Prebiótico (mananoligossacarídeo). As dietas foram administradas aos animais por oito semanas, sendo que após duas semanas todos os animais foram inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium (dia 0PI). Foram realizadas colheitas de sangue (-14, 0, 7, 14, 21, 28 e 35 PI) para pesquisa de IgG anti-*Salmonella*, e de fezes (-14, -7, 0, 3, 7, 14, 21 e 28) para pesquisa e quantificação de *Salmonella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e coliformes totais. No dia 35PI os animais foram eutanaziados e fragmentos de órgãos foram coletados para pesquisa de *Salmonella*. Foram coletados segmentos do intestino delgado, de cada animal, para análise de morfometria e pesquisa de IgA de mucosa. Os resultados indicam que a adição de ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo na dieta de suínos na fase de crescimento não foi capaz de impedir a infecção dos animais, e a soroconversão ocorreu a partir do dia 7PI. Observou-se menor excreção de *Salmonella* no grupo tratado com mananoligossacarídeo, com diferença estatística no dia 28PI. No dia 35PI, os grupos tratados com ácidos orgânicos e com prebiótico apresentaram menor contagem de *Salmonella* no conteúdo cecal em um dos blocos do experimento. Apenas na população de *Lactobacillus* observou-se, em um dos blocos do experimento, aumento significativo nos grupos tratados (T2, T3 e T4) em relação ao grupo controle. Diferenças de morfometria de vilosidades e concentração de IgA na mucosa intestinal não foram observadas entre os grupos. A partir disso, conclui-se que a adição de mananoligossacarídeo na dieta pode contribuir para a menor excreção de *Salmonella* Typhimurium em suínos.

Palavras Chave: suínos, *Salmonella*, ácidos orgânicos, mananoligossacarídeo.

ABSTRACT

The presence of *Salmonella* sp. in pigs at slaughter highlights the need to implement control programs in producing farms, both for the correction of risk factors, and to adopt measures, which are effective for reducing the number of carrier animals and excretion of the bacteria. The aim of this study was to assess the effect of the addition of organic acids and prebiotic to the diet of pigs experimentally infected with *Salmonella* Typhimurium. We used 46 piglets, with 43 days old, distributed in a randomized block design with four treatments: T1 - Basal Diet, T2 - BD + Encapsulated Organic Acid, T3 - BD + not Encapsulated Organic acid, T4 - BD + prebiotic (mannanoligosaccharide). The diets were fed to animals for eight weeks, and after two weeks all animals were inoculated orally with *Salmonella* Typhimurium (day 0 PI). Blood was collected (-14, 0, 7, 14, 21, 28 and 35 PI) for the detection of IgG anti-*Salmonella*, and feces (-14, -7, 0, 3, 7, 14, 21, 28) for detection and quantification of *Salmonella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* and Coliforms. On 35PI, the animals were euthanized and organs samples were collected for *Salmonella*. Segments of the small intestine of each animal for morphometric analysis and mucosal IgA detection. The results indicate that the addition of mannanoligosaccharide and organic acids in the diet of pigs in the growing phase was not able to prevent infection of animals, and seroconversion occurred on the day 7PI. There was a lower excretion of *Salmonella* in the group treated with mannanoligosaccharides, with no statistical difference in the day 28PI. On day 35PI, the groups treated with both organic acids and prebiotics showed lower counts of *Salmonella* in cecal contents. A significant increase on the *Lactobacillus* population was observed in the treated groups (T2, T3 and T4), in are experimental block. No differences in morphology of villi and concentration of IgA in the intestinal mucosa were observed between the groups. We conclude that the addition of mannanoligosaccharides in the diet can contribute to decrease excretion of *Salmonella* Typhimurium in pigs.

Keywords: *Salmonella*, pigs, organic acids, mannanoligosaccharides

1. INTRODUÇÃO

Salmonella Typhimurium é um dos sorovares causador de infecção sub-clínica em suínos, podendo ser transmitida ao longo da cadeia produtiva e originar surtos de salmonelose na população pelo consumo de alimentos contaminados (KRANKER et al., 2003; BAHNSON et al., 2005). No Brasil, a presença desta bactéria em suínos tem sido relatada em estudos conduzidos em diferentes regiões (LIMA et al., 2004; KICH et al., 2007; SPOLAORE et al., 2007; ZUCON et al., 2008; SEIXAS et al., 2009). Estudos epidemiológicos em rebanhos suínos brasileiros demonstram uma alta prevalência de *Salmonella* tanto em amostras de fezes e linfonodos colhidas ao abate (BESSA et al., 2004; KICH et al. 2006; SCHWARZ et al., 2009), quanto em produtos como massa de embutido, cortes de pernil e lingüiça frescal (CASTAGNA et al., 2004; BANDEIRA et al., 2007; MÜRMANN et al., 2009). Dessa forma, evidencia-se a necessidade de implementação de programas de controle em granjas, fábricas de ração e frigoríficos, uma vez que intervenções isoladas, privilegiando apenas um elo da cadeia de produção, têm pouca chance de sucesso no controle desse agente.

Apesar dos antimicrobianos serem efetivos no tratamento da salmonelose clínica, sua utilização no controle da infecção sub-clínica por *Salmonella* em suínos não é indicada, pois não consegue diminuir de forma eficaz o número de animais portadores no rebanho (HURD et al., 2001). Por essa razão, outras moléculas que possam ser adicionadas às dietas de suínos têm sido propostas como medidas auxiliares nos programas a serem implementados em granjas de suínos para controle de *Salmonella* (FEDORKA-CRAY et al., 1997; LETELLIER et al., 1999; BASSAN et al., 2008).

Os ácidos orgânicos têm sido utilizados na cadeia produtiva como preservantes eficientes da ração, além de uma alternativa no controle de patógenos no trato digestivo. A ação efetiva dos ácidos é resultado da atividade antimicrobiana de sua forma não dissociada, modificando a microbiota intestinal mediante a produção de um meio favorável para bactérias lácticas (TSILOYIANNIS et al., 2001), as quais podem levar à diminuição do pH no lúmen intestinal (PARTANEN & MROZ, 1999).

O mananoligossacarídeo (MOS), um dos prebióticos mais utilizados na produção animal, é um carboidrato derivado da parede celular externa de *Saccharomyces*

cerevisiae, e atua bloqueando os sítios de adesão de algumas bactérias patogênicas, imobilizando e reduzindo sua capacidade de fixação na mucosa intestinal (MACARI & MAIORKA, 2000). Já foi observado que o MOS pode aglutinar de forma eficaz *in vitro* isolados de *Salmonella enterica* que expressam fimbria tipo 1, demonstrando potencial para ser testado no controle da colonização de *Salmonella* no trato gastrointestinal de suínos (BOROWSKY et al., 2009). Outro mecanismo proposto para a ação dos prebióticos está relacionado ao fato de que a especificidade de sua fermentação estimula a multiplicação de populações microbianas produtoras de ácidos orgânicos, em detrimento às demais (ROY & GIBSON, 1998). Além da redução do pH luminal, outras substâncias antibacterianas e enzimas produzidas por esta microbiota, inibiriam a proliferação de microrganismos nocivos, sensíveis a ambientes ácidos (RADECKI & YOKOYAMA, 1991).

A fase de crescimento e terminação tem sido identificada como de grande importância na amplificação do número de suínos portadores de *Salmonella* ao abate (SILVA et al., 2006; SCHWARZ et al., 2009; MÜLLER, 2009), o que justifica a avaliação de protocolos de controle que sejam adaptados às condições dessa fase nos rebanhos suínos brasileiros. A partir disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de ácidos orgânicos e prebióticos na dieta sobre a infecção e excreção fecal de *Salmonella* sp. em suínos de crescimento e terminação inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram conduzidas no complexo de sanidade animal da Embrapa Suínos e Aves em Concórdia, Santa Catarina, utilizando as instalações do isolamento, sala de necropsia e laboratório de bacteriologia, no período de março a outubro de 2009. O projeto foi registrado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - UFRGS sob o número 2007962.

2.1 Delineamento experimental: o experimento foi dividido em dois blocos que foram separados pelo tempo. Foram utilizados 22 e 24 animais, respectivamente, no primeiro e segundo blocos, distribuídos ao acaso em quatro tratamentos. Os grupos foram compostos

de 10 animais no controle (4 e 6 animais respectivamente, no primeiro e segundo blocos) e 12 animais em cada tratamento (6 animais em cada bloco). Cada grupo foi alojado em uma baia. A unidade experimental foi composta por um leitão. Os animais foram alojados com aproximadamente 43 dias de idade, com peso médio de 11,62 kg, por um período de 58 dias, sendo eutanaziados e necropsiados com aproximadamente 100 dias de idade e peso médio de 52,11 kg.

2.2 Seleção dos animais: foram utilizados suínos provenientes do Sistema de Produção de Suínos (SPS) da Embrapa Suínos e Aves. A seleção dos animais foi baseada, primeiramente, no resultado da pesquisa de anticorpos IgG anti-*Salmonella* pelo teste de ELISA indireto contendo antígeno somático de *S. Typhimurium* (KICH et al., 2007). Numa segunda etapa, um grupo de 256 leitões negativos no ELISA foram submetidos à pesquisa de *Salmonella* nas fezes por isolamento convencional, conforme metodologia indicada pela ISO 6579 e adaptada por Michael et al. (2003), e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tendo como gene alvo *invA*, conforme Castagna et al. (2004). Foram incluídos no experimento apenas os animais negativos em todos os testes. Os leitões foram pesados, classificados em três grupos (leves, médios e pesados) e distribuídos nos grupos.

2.3 Instalações e manejo: as baias apresentavam piso misto parcialmente ripado e estavam equipadas com comedouros semi-automáticos e bebedouros tipo chupeta. Foram utilizados vassouras, rodos e pás exclusivos para cada baia. Durante todo o período experimental, ração e água foram fornecidos à vontade, sendo realizada pesquisa de *Salmonella* sp. em todas as partidas de ração fornecidas aos animais. Antes do alojamento dos animais, foram realizados suabes de piso para avaliar a contaminação residual das baias. Os suabes colhidos e as amostras de ração foram submetidos ao protocolo de isolamento (MICHAEL et al., 2003) e PCR (CASTAGNA et al., 2004).

2.4 Tratamentos e dietas experimentais: após o alojamento, os animais foram submetidos a um período de adaptação, recebendo a mesma ração fornecida na fase anterior durante uma semana, havendo a mistura gradativa com a ração basal acrescida

dos tratamentos por mais uma semana. Todos os grupos receberam dieta basal (Anexo 1) acrescida do aditivo específico para compor os tratamentos (T1, controle: dieta basal; T2, composição de ácidos orgânicos encapsulados: ácidos fumárico, cítrico, fosfórico e málico, TETRACID 500 TM[®]-JEFO Nutrition Inc.; T3, composição de ácidos orgânicos de cadeia curta: ácidos sórbico, fórmico, acético, láctico, propiônico, cítrico, polisorbato, propileno glicol, ácidos graxos vegetais, dióxido de silício e formiato amônico, SELACID GREEN GROWTH[®] - DRY SELKO LATIN AMERICA LTDA; T4, prebiótico: mananoligossacarídeo, BIOMOS[®] -ALLTECH BIOTECHNOLOGY. Os aditivos utilizados foram adquiridos nos distribuidores regionais e misturados à dieta basal, utilizando a dose de 2 kg/tonelada de ração, conforme orientação dos fabricantes.

2.5 Inoculação dos animais: a inoculação oral de todos os animais ocorreu duas semanas após o alojamento, sendo considerado o dia 0 do experimento (DPI – dia pós-inoculação). O inóculo foi produzido com uma cepa *Salmonella* Typhimurium fagotipo DT177, isolada de suíno por Bessa et al. (2007) e mantida congelada (-20°C) na coleção de culturas do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS. Após reativação da cepa em Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) e confirmação da identidade da mesma, foram preparados os inóculos administrados aos animais. Para tanto, colônias isoladas foram semeadas em caldo BHI, incubadas a 37°C por 18 horas, sendo a concentração das culturas ajustadas para conter 10⁶ Unidades Formadoras de Colônia /mL. Para a inoculação, os animais eram contidos e o inóculo (10 mL) administrado via oral com auxílio de uma seringa.

2.6 Colheita de amostras: Amostras de fezes foram colhidas diretamente do reto nos dias 14 e 7 antes da inoculação e nos dias 0, 3, 7, 14, 21, 28 PI em sacos plásticos estéreis individuais e levados imediatamente ao laboratório para a análise microbiológica. Amostras de sangue foram colhidas por punção da veia cava cranial nos dia 14 antes da inoculação e nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 PI. Após a coagulação, o soro foi separado por centrifugação e armazenado a -20°C em microtubos individuais.

No dia 35 PI os animais foram eutanaziados e necropsiados. Foram colhidas amostras de conteúdo cecal, jejuno, ceco, cólon ascendente, reto, pulmão, fígado, baço,

tonsilas e linfonodos mesentéricos. As amostras foram divididas em dois fragmentos, sendo um deles mantido sob refrigeração e outro fixado em formol 10%. Um fragmento (5 cm) de íleo, distante 45 cm da válvula íleo-cecal, foi ligado nas extremidades, fixado pela injeção de 5 mL de solução saturada de Bouin, e removido para avaliação morfométrica. Outro fragmento (10 cm) de íleo, localizado a 60 cm da válvula íleo-cecal, teve suas extremidades ligadas, sendo injetados 10 mL de tampão fosfato Sorensen. Após lavagem cuidadosa, o conteúdo foi retirado com seringa, centrifugado e o sobrenadante congelado para posterior pesquisa de IgA. O cronograma das coletas encontra-se no Anexo 2.

2.7 Pesquisa e quantificação de *Salmonella* sp.: amostras de fezes colhidas nos dias 14 e 7 antes da inoculação e nos dias 0, 3, 7, 14, 21 e 28 PI, bem como amostras de conteúdo cecal, pulmão, fígado, baço, tonsilas e linfonodos mesentéricos foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* sp. conforme metodologia indicada pela ISO 6579 e adaptada por Michael et al. (2003), (Anexo 3). Amostras de fezes e conteúdo cecal foram também submetidas à protocolo de quantificação de *Salmonella* sp. pela estimativa do Número Mais Provável (NMP) segundo BAM (2003) e Borowsky et al. (2007). A estimativa do NMP foi calculada pelo programa computacional SAS, utilizando a equação publicada por BAM (2003), testando-se o nível de confiança do ajuste do modelo. Para as amostras em que o ajuste foi menor do que 95% de intervalo de confiança, diluições menores, sem crescimento de *Salmonella*, foram consideradas positivas quando, na mesma amostra havia o isolamento da bactéria em diluições maiores.

2.8 Quantificação de *Lactobacillus*, *Enterococcus* e coliformes totais: amostras de fezes colhidas no dia 7 antes da infecção experimental e nos dias 14 e 35PI foram diluídas (10^{-1} até 10^{-8}) em água peptonada 0,1%. Aliquotas das diluições foram semeadas em duplicata pelo método de profundidade (SILVA et al., 1997) nos seguintes meios sólidos: Ágar Rogosa (Difco) para *Lactobacillus* sp., Ágar Bile Esculina (Himedia) para *Enterococcus* sp. e Ágar Bile Vermelho Violeta (VRB, Himedia) para contagem de coliformes totais. Placas de Agar Rogosa foram incubadas em microaerofilia, enquanto os demais meios foram incubados em aerobiose. Após incubação à 37°C por 48-72 horas, as

colônias típicas em cada meio foram contadas nas diluições que resultaram em placas com 20-200 colônias. O número de colônias típicas foi multiplicado pelo inverso da diluição para o cálculo de unidades formadoras de colônia por grama de fezes (UFC/g) e considerado como a enumeração presuntiva das respectivas bactérias.

2.9 Pesquisa de anticorpos: as amostras de soro foram utilizadas para a pesquisa de IgG anti-*Salmonella* pelo teste de ELISA indireto desenvolvido por KICH et al. (2007) (Anexo 4), sendo a densidade ótica (DO) 0,169 considerada como ponto de corte do teste. Para a pesquisa de IgA no lavado de íleo, o teste foi adaptado, utilizando-se conjugado anti-IgA de suíno (BETHYL LABORATORIES Inc.). As amostras não diluídas foram testadas em triplicata, sendo os resultados expressos em valores de densidade ótica, uma vez que não há ponto de corte estabelecido para esse teste.

2.10 Avaliação histopatológica e morfometria do epitélio intestinal: fragmentos de vísceras fixadas em formol 10% foram incluídos em parafina e coradas pela técnica de hematoxilina eosina (LUNA, 1992) e avaliados quanto à presença de lesões microscópicas. Para a análise da morfometria do epitélio intestinal, o fragmento de íleo fixado em solução saturada de Bouin por 18 horas foi aberto pela margem mesentérica, sendo recortados fragmentos dos mesmos. Após lavagem em etanol 70%, os fragmentos foram desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes foram corados segundo a técnica da hematoxilina-eosina e examinados em microscópio óptico, sendo feitas três lâminas para cada fragmento. A altura da mucosa (distância em micrômetros entre a túnica muscular da submucosa até o topo de vilosidades íntegras) foi medida em três pontos de duas lâminas e em quatro pontos da terceira lâmina, totalizando dez medidas por fragmento. As médias calculadas das dez medidas foram utilizadas para a análise morfométrica.

2.11 Análise estatística: os dados de quantificação de *Salmonella*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e coliformes totais, assim como de IgG sérica, foram analisados através do modelo de medidas repetidas, utilizando o procedimento MIXED do SAS™ (2003), conforme XAVIER (2000). As variáveis de quantificação de *Salmonella*, *Lactobacillus*,

Enterococcus, coliformes totais e IgA foram transformadas em log para atender a distribuição dos dados exigidos nos métodos estatísticos aplicados. As variáveis NMP para Conteúdo Cecal, IgA e morfometria foram analisadas através de análise de variância, utilizando o procedimento GLM do SAS™ (2003). A pesquisa de *Salmonella* nos órgãos, sendo uma variável dicotômica, foi analisada por regressão logística considerando o efeito de tratamento e utilizando o procedimento Logistic do SAS™ (2003). Foram estimadas as razões de chances para todas as combinações entre os tratamentos. A histopatologia foi analisada através do teste exato de Fisher, utilizando o procedimento FREQ do SAS™ (2003). Foram testados os efeitos de bloco, tratamento, DPI (para as medidas repetidas) e as interações entre eles. O desdobramento dos efeitos foi realizado através do teste *t*.

3. RESULTADOS

Todas as amostras de soro colhidas dos animais no dia da inoculação foram negativas no teste de ELISA, bem como *Salmonella* sp. não foi isolada nas amostras de fezes desses animais. Os suabes colhidos nas baias antes do alojamento e as amostras de ração fornecidas aos animais foram negativos para *Salmonella* sp. Os animais não apresentaram sinais clínicos de salmonelose durante todo o período do experimento.

3.1 Excreção fecal de *Salmonella* sp.: o grupo controle (T1) e os grupos que receberam tratamento com ácidos orgânicos (T2 e T3) apresentaram uma elevada frequência de excretoras de *Salmonella* sp. durante todo o período do experimento (Tabela 1), enquanto o grupo que recebeu prebiótico demonstrou uma tendência de menor número de animais com amostras fecais positivas no mesmo período.

Tabela 1. Frequências (%) de excretores fecais de *Salmonella* sp. por tratamento e dias pós-inoculação (DPI) entre os dias 3 e 28 após a inoculação oral de *Salmonella* Typhimurium em suínos alimentados com dieta basal (T1) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).

DPI	T1	T2	T3	T4	p
3	70 (7/10)	91,7 (11/12)	83,3 (10/12)	83,3 (10/12)	0,6599
O 7	100 (10/10)	83,3 (10/12)	66,7 (8/12)	58,3 (7/12)	0,1136
14	80 (8/10)	58,3 (7/12)	50 (6/12)	41,7 (5/12)	0,3482
21	70 (7/10)	58,3 (7/12)	83,3 (10/12)	41,7 (5/12)	0,1804
s 28	70 (7/10)	41,7 (5/12)	50 (6/12)	25 (3/12)	0,1976

Os resultados de quantificação de *Salmonella* apresentaram interação entre tratamento e DPI ($p=0,0056$). As médias das quantificações em cada tratamento estão expressas na Tabela 2. Observa-se que no dia 3PI todos os grupos apresentaram excreção de *Salmonella* com contagens variando de 0,61 a 5,75 \log_{10} .UFC.g⁻¹. A média obtida no grupo controle (T1) não diferiu do grupo tratado com prebiótico (T4), sendo ambos menores em relação aos demais tratamentos. Apenas o grupo controle apresentou aumento significativo das médias de *Salmonella* sp. nas fezes entre os dias 3PI e 7PI. Após, este grupo apresentou decréscimo gradual de excreção fecal até o dia 28PI. Nos grupos tratados o decréscimo na média de *Salmonella* excretada nas fezes ocorreu a partir do dia 3PI, com diferença significativa de T2 e T3 em relação ao controle. A partir do dia 14PI, as médias observadas ao longo do tempo em T1, T3 e T4 não diferiram, enquanto no T2 foi observado decréscimo significativo na média de *Salmonella* excretada entre os dias 14PI e 21PI. Na última coleta de fezes realizada no dia 28PI, o grupo tratado com mananoligossacarídeo foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos, apresentando a menor contagem média de *Salmonella* sp. nas fezes no período.

Tabela 2. Média da quantificação de *Salmonella* (\log_{10} .UFC.g⁻¹) nas fezes, erro-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por tratamento e dias pós-inoculação (DPI) entre os dias 3 e 28 após a inoculação oral de *Salmonella* Typhimurium em suínos alimentados com dieta basal (T1) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).

Dias pós inoculação (DPI)	T1	T2	T3	T4	p
3	0,61±0,31aA	5,75±1,37cA	4,39±1,20bcA	1,99±0,83ab	0,0019
7	4,66±1,07B	3,01±0,81B	1,93±0,78AB	2,05±0,94	0,1671
14	1,61±0,71B	2,06±0,77BC	0,60±0,28B	0,77±0,53	0,2148
21	0,57±0,20B	1,05±0,34CD	1,46±0,40B	0,64±0,33	0,1143
28	0,99±0,29aB	0,64±0,24aD	0,91±0,31aB	0,23±0,12b	0,0015
p	0,0029	<,0001	0,0033	0,064	

Médias seguidas de letras minúsculas (a, b, c) distintas nas linhas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas (A, B, C, D) distintas nas colunas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

3.2 Pesquisa de anticorpos séricos: antes da inoculação com *S. Typhimurium* todos os animais eram soronegativos no teste de ELISA, sendo a soroconversão evidenciada a partir do dia 7PI. Observa-se na Tabela 3 que a média de densidade óptica (DO) 14 dias antes da inoculação (-14PI) e no dia da inoculação (0PI) foi, respectivamente, de 0,074 e 0,078, abaixo do ponto de corte estabelecido para o teste (KICH et al., 2007). Na primeira coleta após a inoculação (dia 7PI) foi observado aumento das DOs médias, o qual se manteve gradativo em todos os grupos até o final do experimento. Diferença estatística entre os tratamentos foi observada apenas no dia 14PI, quando os animais submetidos ao T3 e T4 apresentaram DO média menor em relação ao grupo controle (T1).

Tabela 3. Média das Densidades Óticas obtidas no teste de ELISA indireto para detecção de IgG anti-*Salmonella* em amostras de soro, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por tratamento e dias pós-inoculação (DPI), entre os dias -14 e 35 após a inoculação oral de *Salmonella* Typhimurium em suínos alimentados com dieta basal (T1) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).

DPI	T1	T2	T3	T4	p
-14	0,074 ± 0,01 A	0,08 ± 0,01 A	0,07 ± 0,00 A	0,07 ± 0,00 A	0,52
0	0,09 ± 0,01 B	0,08 ± 0,01 A	0,07 ± 0,00 A	0,07 ± 0,00 A	0,2081
7	0,29 ± 0,08 C	0,15 ± 0,02 A	0,17 ± 0,03 B	0,20 ± 0,03 B	0,1709
14	0,39 ± 0,08 aD	0,30 ± 0,06 abB	0,18 ± 0,02 bB	0,23 ± 0,04 bB	0,0045
21	0,46 ± 0,11 D	0,39 ± 0,07 BC	0,35 ± 0,09 C	0,30 ± 0,05 B	0,2724
28	0,57 ± 0,14 D	0,44 ± 0,08 BC	0,37 ± 0,04 C	0,35 ± 0,07 B	0,4291
35	0,47 ± 0,08 D	0,53 ± 0,10 C	0,51 ± 0,13C	0,37 ± 0,07 B	0,6729
p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	

Médias seguidas de letras minúsculas (a,b) distintas nas linhas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

Médias seguidas de letras maiúsculas (A, B, C, D) distintas nas colunas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

3.3 Pesquisa de *Salmonella* em amostras colhidas na necropsia: houve isolamento de *Salmonella* sp. a partir de diferentes amostras colhidas na necropsia em todos os grupos, com frequência variando de 16,67% (fígado em T3 e T4) a 90 % (pulmão em T1). A tonsila apresentou a maior frequência de isolamento, com média geral de 84,58% (Tabela 4). Entre as amostras analisadas, foi observado efeito do tratamento apenas para a presença de *Salmonella* no fígado ($p < 0,05$). O grupo controle apresentou 11,67 ($p = 0,0179$) vezes mais chance de isolar *Salmonella* a partir desse órgão em relação aos grupos tratados com ácido orgânico não-encapsulado e mananoligossacarídeo (T3 e T4).

Tabela 4. Frequências de amostras positivas para *Salmonella* sp. colhidas na necropsia de suínos inoculados via oral com *Salmonella* Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).

Amostra	T1	T2	T3	T4
Baço	6 (10)	3 (12)	8 (12)	6 (12)
Conteúdo Cecal	7 (10)	5 (12)	75,00 ± 13,1	8 (12)
Fígado	7 (10)	4 (12)	16,67 ± 11,2	2 (12)
Linfonodo				
Mesentérico	8 (10)	6 (12)	5 (12)	8 (12)
Pulmão	9 (10)	7 (12)	9 (12)	7 (12)
Tonsila	8 (10)	9 (12)	11 (12)	11 (12)

A presença de *Salmonella* no conteúdo cecal foi observada em 67,3% dos animais, considerando todos os tratamentos em conjunto. A média de quantificação de *Salmonella* sp. no conteúdo cecal foi influenciada pelo bloco do experimento e houve interação entre bloco e tratamento ($p < 0,0001$). No bloco 1, houve menor isolamento de *Salmonella* a partir do conteúdo cecal do grupo controle (T1), enquanto nos grupos T2, T3 e T4 observou-se a presença de *Salmonella* sem diferença nas médias calculadas para os tratamentos (Tabela 5). No bloco 2, o grupo controle diferiu dos demais tratamentos apresentando a maior média de isolamento de *Salmonella* sp. Os grupos T2 e T4 apresentaram as menores médias (0,83 e 1,47 \log_{10} UFC.g⁻¹, respectivamente) e não diferiram entre si estatisticamente.

Tabela 5. Média da quantificação de *Salmonella* (\log_{10} .UFC.g⁻¹) no conteúdo cecal, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco e tratamento em suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta basal acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).

Bloco	T1	T2	T3	T4	p
1	0,11 ± 0,00 a	2,20 ± 0,49 b	1,82 ± 0,62 b	1,21 ± 0,46 ab	0,0146
2	3,95 ± 0,37 a	0,83 ± 0,11 b	2,23 ± 0,35 c	1,47 ± 0,52 bc	<0,0001

Médias seguidas de mesma letra (a, b, c) nas linhas não diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$)

Alterações histopatológicas inespecíficas foram observadas nos diferentes órgãos (Anexo 5). A principal lesão, compatível com a infecção por *Salmonella* sp. encontrada

neste estudo foi a pneumonia intersticial, observada em 79,1% dos animais. *Salmonella* sp. foi isolada de 89,4% (17/19) dos pulmões que apresentaram esta lesão.

3.4 Quantificação de Coliformes totais, *Lactobacillus* sp. e *Enterococcus* sp.: os resultados da enumeração dessas bactérias estão apresentados nas tabelas 6 a 8 e agrupados conforme a interação observada. Para coliformes totais foi observada interação entre bloco, tratamento e DPI ($p=0,0093$), para *Enterococcus* entre tratamento e DPI ($p=0,0013$) e para *Lactobacillus* entre bloco e tratamento ($p=0,0002$) e tratamento e DPI ($p<0,0001$). A primeira coleta (dia -7 PI) foi realizada antes dos animais receberem os tratamentos, portanto os resultados refletem a variação entre os grupos de animais, no início do experimento.

No bloco 1 foi observado decréscimo gradual na população de coliformes totais ao longo do experimento, com diferença significativa nos grupos T2, T3 e T4. O efeito do tratamento foi observado no dia 14PI no grupo tratado com ácido orgânico não encapsulado (T3) o qual apresentou maior média em relação aos demais grupos. No bloco 2, apenas no dia 35PI houve diferença entre os tratamentos, sendo que os tratamentos com ácido orgânico encapsulado e prebiótico apresentaram maiores contagens médias em relação aos demais tratamentos.

Tabela 6: Média da quantificação de coliformes totais ($\log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco, tratamento em dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta basal acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).

Bloco	Dias pós-inoculação (DPI)	T1	T2	T3	T4	p
1	-7	6,41 ± 0,80 a	4,69 ± 0,18 bA	6,35 ± 0,25 aA	5,88 ± 0,22 aA	0,0003
1	14	6,58 ± 0,26 a	6,72 ± 0,36 aB	7,81 ± 0,55 bB	6,79 ± 0,41 aB	0,0205
1	35	5,57 ± 0,18	5,53 ± 0,32 C	5,49 ± 0,29 C	5,71 ± 0,36 A	0,9579
p		0,1099	<0,0001	<0,0001	0,0232	
2	-7	4,72 ± 0,15 aA	5,88 ± 0,44 bA	4,66 ± 0,09 aA	4,69 ± 0,22 aA	0,0068
2	14	6,41 ± 0,24 B	7,04 ± 0,27 B	7,02 ± 0,16 B	7,10 ± 0,11 B	0,1275
2	35	6,21 ± 0,15 aB	6,50 ± 0,29 abAB	6,00 ± 0,23 aC	7,28 ± 0,07 bB	0,0122
p		<0,0001	0,0248	<0,0001	<0,0001	

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste t ($p<0,05$).

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste t ($p<0,05$).

As diferenças na quantificação de *Enterococcus* foram verificadas no dia 14PI (Tabela 7), quando os grupos controle (T1) e ácido orgânico encapsulado (T2), apresentaram contagem significativamente maior que os grupos tratados com ácido orgânico não encapsulado (T3) e prebiótico (T4). Também foi observado efeito de tratamento no dia 35PI, quando o grupo T3 apresentou maior média de *Enterococcus sp.* nas fezes.

Tabela 7: Média da quantificação de *Enterococcus sp.* (\log_{10} .UFC.g⁻¹) nas fezes, erro-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por tratamento e dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta basal acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).

Dias pós-inoculação (DPI)	T1	T2	T3	T4	p
-7	6,31 ± 0,13	6,34 ± 0,38	6,13 ± 0,15 A	6,79 ± 0,37 A	0,316
14	6,56 ± 0,28a	6,14 ± 0,20a	5,41 ± 0,22bB	5,29 ± 0,23 bB	0,0059
35	6,38 ± 0,10a	6,27 ± 0,19a	6,88 ± 0,19bC	6,34 ± 0,15 aA	0,0389
p	0,985	0,8439	<0,0001	<0,0001	

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

O efeito de tratamento para *Lactobacillus* foi observado no bloco 1 apenas no dia 35PI, quando os animais do tratamento com ácido orgânico encapsulado (T2) apresentaram média significativamente inferior em relação ao grupo controle. No bloco 2, todos os grupos tratados com dieta basal acrescida de algum aditivo (T2, T3, e T4) apresentaram média de contagem significativamente maior que o grupo controle (T1) no dia 35PI.

Tabela 8: Média da quantificação de *Lactobacillus* sp. (\log_{10} .UFC.g⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por tratamento e dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta basal acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).

Bloco	Dias pós-inoculação					p
	(DPI)	T1	T2	T3	T4	
1	-7	6,62±0,10A	6,45±0,15A	6,52±0,20A	6,52±0,13A	0,923
1	14	9,30±0,14B	9,06±0,09B	9,00±0,16B	8,72±0,21B	0,6197
1	35	8,98±0,10aB	7,96±0,36bC	8,34±0,19abB	8,37±0,18abB	0,0431
Pr > F		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
2	-7	8,83±0,13aA	9,42±0,10b	9,23±0,14b	9,04±0,13ab	0,0115
2	14	9,13±0,33A	9,62±0,25	9,51±0,10	9,76±0,23	0,2584
2	35	8,36±0,18aB	9,31±0,20b	9,26±0,18b	9,31±0,14b	0,0002
p		0,0073	0,6831	0,6727	0,0826	

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

3.5 Pesquisa de Anticorpos – IgA: Os resultados médios de densidade ótica de IgA nas amostras de lavado de mucosa de íleo por grupo de tratamento estão ilustrados na Figura 1. A distribuição dos dados, valor mínimo, máximo e média demonstram a variabilidade dos resultados, não sendo observado efeito de tratamento.

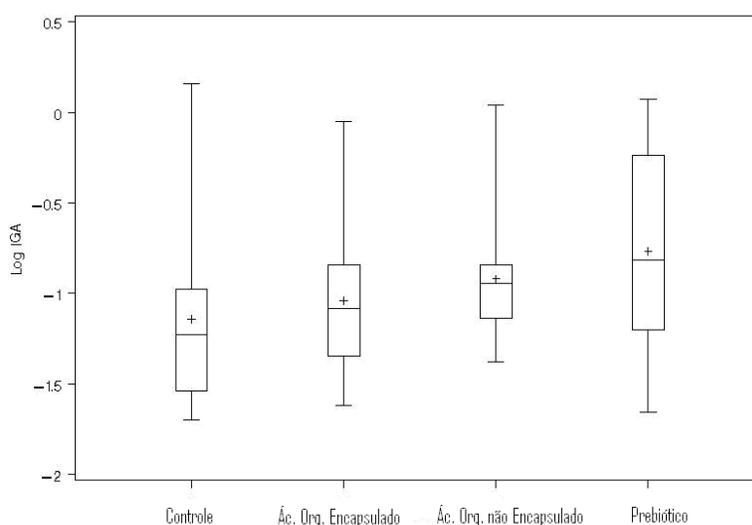


Figura 1: Distribuição dos valores de Densidades Óticas obtidas no teste de ELISA indireto para detecção de IgA anti-*Salmonella* em amostras de lavado de mucosa de íleo

em suínos inoculados pela via oral de *Salmonella* Typhimurium e alimentados com dieta basal (Controle) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados, ácidos orgânicos não-encapsulados ou mananoligossacarídeo.

3.6 Análise morfométrica de vilosidades intestinais: As médias dos tamanhos das vilosidades por blocos e tratamento estão apresentadas na Tabela 9. Não foi observado efeito de tratamento ($p < 0,05$) sobre esta variável, apenas no bloco 1 o grupo controle apresentou uma tendência de médias maiores de tamanho de vilosidades em comparação com os demais grupos.

Tabela 9: Média da medida (micrômetros) de vilosidades intestinais nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco e tratamento em suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta basal acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).

Bloco	T1	T2	T3	T4	p
1	472 ± 57	331 ± 21	375 ± 30	379 ± 40	0,0534
2	335 ± 11	366 ± 17	378 ± 47	363 ± 20	0,7898

4. DISCUSSÃO

Todos os grupos de tratamentos sofreram infecção por *Salmonella* sp., comprovado pelo isolamento da bactéria a partir de diferentes amostras colhidas dos animais e a detecção de soroconversão a partir do sétimo dia pós-infecção. A ausência de sinais clínicos de salmonelose nos animais inoculados era esperada, uma vez que a infecção por *Salmonella* Typhimurium em suínos resulta, predominantemente, em quadro subclínico e estado de portador (WILCOCK & SCHWARZ, 1992; NIELSEN et al., 1995; KICH et al., 2007). Em relação à presença de anticorpos séricos, observou-se o efeito do tempo (DPI) sobre o título de IgG com uma elevação contínua das DOs médias; todos os grupos alcançaram o status de soropositivos no dia 14PI, considerando o ponto de corte estabelecido para o teste de ELISA (KICH et al., 2007). Em geral, suínos expostos à *Salmonella* apresentam títulos de IgG a partir da segunda semana pós-infecção (NIELSEN et al., 1995; KICH et al., 2007), e a soropositividade é interpretada como um

indicativo da presença de portadores no lote de animais (VAN DER GAAG et al., 2003; ALBAN et al., 2007).

O estado de portador surge em decorrência tanto da infecção sistêmica, quanto da persistência da bactéria em tecidos linfóides associados ao trato gastrintestinal (BOYEN et al., 2008). No presente estudo, todos os tecidos analisados resultaram em isolamento de *Salmonella*, variando a frequência média de 16,6% no fígado a 91,6% nas tonsilas. O isolamento a partir de linfonodos mesentéricos foi observado em 52,9% dos animais, não havendo diferença entre os grupos. A via fecal-oral é considerada mais importante para a transmissão de *Salmonella* entre os suínos (BOYEN et al., 2008), propiciando que a bactéria alcance o trato gastrintestinal, invada o epitélio intestinal do íleo, e seja drenada para os linfonodos mesentéricos (GRIFFITH, et al., 2006). Por essa razão, os linfonodos mesentéricos constituem uma das mais importantes fontes de isolamento de *Salmonella* em suínos portadores, podendo a bactéria ser encontrada nesse tecido em poucas horas após a exposição (HURD et al., 2002; BESSA et al., 2004; SCHWARZ et al., 2009). A partir dos linfonodos, *S. Typhimurium* pode alcançar pela via linfática ou hematogêna outros órgãos, ocasionando uma infecção sistêmica (BOYEN et al., 2008). Para sorovares adaptados ao suíno, como *S. Choleraesuis*, a capacidade de invasão sistêmica está associada à sobrevivência e intensa multiplicação da bactéria no interior de macrófagos (HUEFFER & GALAN, 2004), enquanto no caso de *S. Typhimurium* a invasão de fígado e baço após infecções experimentais, parece não ser capaz de ser mantida por um longo período (BOYEN et al., 2008). No presente estudo, a tendência foi contrária a essa observação, pois ocorreu uma elevada frequência de isolamento a partir de baço e fígado no grupo controle após 35 dias pós-infecção. No caso de fígado, houve efeito de tratamento, tendo os grupos tratados com mananoligossacarídeo e com ácidos orgânicos não encapsulados frequência significativamente menor de positivos (16,67%) e o grupo tratado com ácido orgânico encapsulado uma tendência a menor isolamento (33,33%). Esse resultado deve ser interpretado com cautela, uma vez que os mecanismos que levam à infecção sistêmica por *S. Typhimurium* em suínos são ainda pouco conhecidos (BOYEN et al., 2008). Uma hipótese seria pela menor invasão a partir do intestino, resultante de uma menor colonização intestinal por *Salmonella* sp. Entretanto, outros

tecidos que sofreram colonização inicial, como tonsilas e pulmão, podem também ser a origem da invasão observada no fígado.

Ao lado da via fecal-oral, a invasão através de rotas alternativas, como tonsilas e pulmão, tem sido descrita (FREDORKA-CRAY et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007). Em nosso estudo, as tonsilas e pulmão contribuíram para a maior taxa de isolamento de *Salmonella* nos órgãos, o que pode explicar a ausência de efeito dos tratamentos nas taxas de infecção observadas. O alto índice de contaminação de tonsilas pode ser explicado pela inoculação via oral dos animais, pela exposição continuada à bactéria, e pela transmissão via aérea. A invasão de patógenos via tonsilas é amplamente conhecida, e estas são o sítio primário de colonização de suínos que se tornam portadores (WOOD et al., 1989; WOOD et al., 1992). Adicionalmente, a hipótese da participação do pulmão e dos tecidos linfóides associados às vias aéreas como porta de entrada para a infecção foi apontada como provável, em decorrência do hábito do suíno de utilizar o focinho para reconhecer o ambiente em que se encontra e buscar alimentos (FEDORKA- CRAY et al, 1995). Posteriormente, a participação de aerossóis, originados do ambiente onde estavam alojados suínos infectados por *Salmonella* sp., na transmissão a animais mantidos isolados foi comprovada (OLIVEIRA et al., 2006), bem como a transmissão pelo contato focinho-focinho (OLIVEIRA et al., 2007).

Fedorka-Cray et al. (1995) demonstraram que suínos esofagostomizados e inoculados através de sonda intranasal com *S. Typhimurium* apresentavam isolamento da bactéria no ceco, cólon, fígado e baço após três horas da exposição. No caso do trato intestinal, haveria uma translocação de *Salmonella* sp. em sentido inverso a partir de macrófagos da lâmina própria, permitindo que a bactéria estivesse presente no lúmen intestinal após seis horas da infecção. Em condições de transmissão por aerossóis e contato de focinho (OLIVEIRA et al., 2006; GARCIA, 2006; OLIVEIRA et al., 2007) também observou-se a presença de *Salmonella* sp. em linfonodos mesentéricos, conteúdo cecal, fígado e baço, demonstrando que a via aérea pode exercer papel importante na transmissão na granja e no pré-abate, ambientes onde a poeira originada da ração ou das fezes podem carrear a bactéria para animais não-infectados. No presente estudo, a participação do pulmão como sítio de isolamento de *Salmonella* sp. e a presença de lesões de pneumonia intersticial, presente em 79,1% dos animais, demonstram que essa via de

transmissão foi importante e evidencia que aditivos que atuam no trato gastrointestinal, como os prebióticos e os ácidos orgânicos, não serão capazes de prevenir completamente a infecção dos animais.

Os portadores, por meio da excreção fecal intermitente, tornam-se importantes para a transmissão de *Salmonella* sp. e amplificação do número de infectados na granja, transporte e pré-abate (HURD et al., 2001). No presente estudo, observou-se a presença de excretores fecais em todos os dias observados, havendo uma relação entre o número de animais excretores (Tabela 1) e a quantidade média de *Salmonella* sp. nos grupos de tratamentos (Tabela 2). No grupo controle (T1) observou-se um pico no número de excretores e na população de *Salmonella* sp. no dia 7PI, provavelmente em decorrência da multiplicação intestinal ocorrida na primeira semana. Mesmo a presença de anticorpos séricos não impediu que houvesse a excreção intermitente no grupo, em frequências que variaram de 50 a 70% dos animais, com a manutenção da população de *Salmonella* excretada pelo grupo. No conteúdo cecal, observou-se que 70% dos animais tinham presença de *Salmonella* sp., porém o resultado da quantificação foi influenciado pelo bloco do experimento.

Os tratamentos com ácidos orgânicos (T2 e T3) apresentaram perfil de excreção diferente em relação ao controle. Nesses grupos houve tendência a um elevado índice de excretores precoces (dia 3PI), acompanhado por uma quantidade significativamente maior de *Salmonella* sp. excretada pelos grupos que receberam ácidos orgânicos. Ao longo do tempo, porém, houve um decréscimo significativo na média de bactérias nas fezes, mesmo com a manutenção de uma frequência elevada de animais excretores (>50%) na maioria dos dias observados. Entretanto, comparando as médias de bactérias excretadas pelos grupos tratados com ácidos orgânicos com a do grupo controle, entre os dias 7PI e 28PI, não há diferença estatística. Nos grupos tratados com ácidos orgânicos parece ter havido uma tendência a um pico de excreção precoce (3DPI) de *Salmonella* sp., que pode ser ainda relacionada à eliminação passiva da bactéria inoculada, seguida da manutenção de um elevado número de animais excretando um baixo número de bactérias, de forma semelhante ao grupo controle. Entretanto na avaliação do conteúdo cecal, observou-se no segundo bloco do experimento uma média significativamente menor de

Salmonella sp. em ambos os tratamentos com ácidos orgânicos, com efeito mais pronunciado para os ácidos encapsulados (Tabela 5).

As misturas de ácidos orgânicos estão entre os aditivos que têm apresentado melhor consistência de resposta contra infecções bacterianas, principalmente àquelas causadas por *Escherichia coli* em leitões após o desmame (OSTERMAN et al., 2005; TAUBE et al., 2009). Estudos sobre a aplicação de ácidos orgânicos na produção animal associados ao controle de *Salmonella* sp. são encontrados na avicultura. Immerssel et al., (2002) relataram a redução na colonização de *Salmonella* Enteritidis no ceco de frangos que receberam dieta tratada com ácidos propiônico e butírico encapsulados. Ávila et al. (2003) também obtiveram a redução de *S. Enteritidis* em frangos, pela administração de ácido lático na água de bebida antes do abate. Em suínos, os resultados de melhor desempenho zootécnico com a utilização de ácidos já estão bem documentados (WALSH et al., 2003, CANIBE et al., 2004), porém, em relação à excreção de *Salmonella* são ainda contraditórios. Vogt et al. (1981) e Waldroup et al. (1995), estudaram o efeito do ácido cítrico adicionado à ração de suínos nas concentrações de 2% e 1%, respectivamente, não observando diferença na excreção fecal de *S. Typhimurium* no grupo tratado em relação ao grupo controle. Taube et al. (2009) encontraram uma frequência significativamente menor de suabes retais positivos em suínos com quatro semanas de idade, inoculados com *S. Derby* e tratados com ácidos propiônico e fórmico, porém não observaram efeito sobre a duração da excreção. Nesse estudo, observou-se que a ação mais intensa dos ácidos orgânicos ocorreu no quimo colhido no estômago e intestino delgado dos animais poucas horas após a infecção, enquanto nas porções mais distais do intestino esse efeito não foi observado, provavelmente pela absorção dos ácidos não-encapsulados no intestino delgado (TAUBE et al., 2009). Vários fatores podem contribuir para a diferença nos resultados obtidos em nosso estudo, entre elas possíveis variações na resistência do sorovar de *Salmonella* sp. utilizado no estudo, bem como a idade dos animais que compuseram o grupo. Além disso, o efeito antibacteriano dos ácidos orgânicos está relacionado com o tipo, concentração e a forma de administração do ácido e a espécie bacteriana (BOYEN et al., 2008). Os resultados obtidos no ceco apontam para um efeito favorável dos tratamentos com ácido no sentido da diminuição da população de *Salmonella* sp., principalmente no caso dos ácidos orgânicos encapsulados.

Esse efeito pode estar relacionado à apresentação encapsulada que permite a passagem do ácido pela porção superior do trato gastrointestinal sem sofrer absorção, permitindo que concentrações maiores sejam alcançadas no ambiente do ceco (VAN IMMERSEEL et al, 2006).

O grupo tratado com prebiótico (mananoligossacarídeo) apresentou uma tendência de menor frequência de excretores em relação ao grupo controle em todos os dias após a inoculação. Na análise quantitativa de *Salmonella* sp., as médias do dia 3PI foram semelhantes ao grupo controle e significativamente menores que os resultantes do tratamento com ácidos orgânicos, indicando um perfil de excreção semelhante ao grupo controle. Ao longo do tempo, houve tendência ($P=0,064$) de diminuição do número de bactérias excretadas, mas apenas no dia 28PI a diferença foi estatisticamente diferente dos demais grupos. No conteúdo cecal, também foi possível observar concentração significativamente menor de *Salmonella* sp. no segundo bloco do experimento (Tabela 5). O mecanismo proposto para a ação do mananoligossacarídeo está relacionado à capacidade de aderir à fimbria tipo 1 presente em diversas bactérias do trato intestinal, evitando a colonização intestinal e determinando que a bactéria seja eliminada com as fezes (MATHEW et al., 1993). No caso de *Salmonella enterica* que expressam a fimbria tipo 1, a aglutinação “in vitro” foi comprovada anteriormente (BOROWSKY et al., 2009). Uma vez que o efeito do mananoligossacarídeo atinge a colonização intestinal da bactéria, a menor média de excreção de *Salmonella* sp. ocorreria em decorrência da diminuição do número de bactérias capazes de permanecer no trato intestinal, resultando em menor excreção nos animais portadores. Essa hipótese é suportada também pela menor média de *Salmonella* sp. encontrada no conteúdo cecal.

Outros efeitos positivos propostos para os tratamentos testados incluem a alteração favorável da microbiota intestinal, pelo aumento de anaeróbios e *Lactobacillus* sp. (TSILOYIANNIS et al., 2001), bem como o incremento da resposta imune humoral de mucosa (BRANDTZAEG et al., 1998; MACFARLANE & CUMMINGS, 1999) e da integridade de vilosidades (GOMES et al., 2007). A resposta imune local tem sido apontada como envolvida na redução de *Salmonella* em suínos no íleo e o incremento nos títulos de IgA foram detectados no intestino delgado de suínos vacinados com uma cepa de *Salmonella Choleraesuis* atenuada (LETTELIER et al., 2001). No presente estudo, a

densidade ótica encontrada em todos os grupos apresentou variabilidade nos resultados, sem diferença significativa entre os grupos (Figura 1). Mesmo considerando que o teste de ELISA utilizado não tem ponto de corte estabelecido para IgA em lavado de mucosa, os resultados obtidos não apontam para uma influência dos tratamentos sobre as densidades óticas do teste. Da mesma forma, não foi observado efeito de tratamento sobre a integridade de vilosidades, medida pela morfometria (Tabela 9). Esses resultados estão de acordo com Soares et al. (2007), que também não encontraram diferenças na morfologia de vilosidades em suínos alimentados com rações contendo prebiótico, probiótico ou antibiótico. Por outro lado, Gomes et al. (2007) testaram diferentes ácidos (butírico, fórmico e fumárico) para avaliação da morfometria intestinal, encontrando diferença entre tratamentos para a altura do epitélio do duodeno, porém não em relação ao jejuno e íleo. No presente estudo, foi testado um fragmento de íleo, sítio de colonização por *Salmonella* sp. em suíno (BOYEN et al., 2008), o que pode explicar os resultados obtidos. O desenvolvimento da mucosa intestinal é decorrente do equilíbrio entre a renovação celular (proliferação e diferenciação), resultante da mitose sofrida por células totipotentes localizadas na cripta e ao longo das vilosidades (UNI et al., 2000), e a perda de células que ocorre normalmente no ápice das vilosidades levando a um *turnover* celular (síntese-migração-extrusão) constante. Entretanto, quando o intestino responde a algum agente, com desequilíbrio no *turnover* celular, ocorre modificação na altura das vilosidades (PLUSKE et al., 1997). Uma vez que *S. Typhimurium* não ocasiona lesões importantes no epitélio intestinal de animais infectados de forma sub-clínica, possíveis efeitos protetores dos tratamentos sobre as vilosidades podem ser difíceis de serem evidenciados.

Um dos mecanismos de ação sugeridos, tanto para o mananoligossacarídeo, quanto para os ácidos orgânicos é o incremento da população de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e diminuição de coliformes e *Enterococcus*, contribuindo para o estabelecimento de um ambiente intestinal desfavorável à colonização por bactérias patogênicas (SPRING et al., 2000; BAURHOO et al., 2007; MIKKELSEN & JENSEN, 2004; MARIBO et al., 2000). No presente estudo, as médias de coliformes totais não foram diminuídas por nenhum dos tratamentos testados, demonstrando que não houve o efeito relatado em outros estudos. As médias de *Enterococcus* apresentaram diminuição

significativa apenas no dia 14PI no grupo tratado com ácidos orgânicos não-encapsulados, voltando a elevar-se no dia 35PI, o que não permite afirmar que há um efeito evidente do tratamento sobre essa população bacteriana. Em relação à população de *Lactobacillus* sp. observou-se aumento significativo da média dos tratamentos comparado ao grupo controle no dia 35PI em um dos blocos experimentais, mas sem repetibilidade no outro bloco. Gebbink et al. (1999) relataram aumento da população de *Lactobacillus* no cólon distal de leitões tratados com frutoligossacarídeo na ração. Entretanto, Biage et al. (2007) não encontraram efeito do ácido propiônico sobre a população de *Lactobacillus* e *E. coli* na digesta do estômago, duodeno, ceco e cólon de suínos com oito semanas de idade. Em leitões em idade de desmame, a adição de ácido fumárico na ração também não influenciou a densidade da população de *Lactobacillus* e *E. coli* ao longo do trato gastrointestinal (RISLEY et al., 1991, 1992, 1993). Os mesmos resultados são relatados para outros ácidos, como ácido láctico (THOMLINSON & LAWRENCE, 1991, MARIBO et al., 2000), ácido fórmico (BOLDWAN et al., 1988, CANIBE et al., 2001) e ácido benzóico (MARIBO et al., 2000). A variabilidade de resposta da microbiota intestinal observada nos estudos realizados indica que as interações que ocorrem entre as bactérias, patogênicas ou comensais, bem como a influência das modificações do ambiente intestinal sobre essas interações, ainda é um tema que necessita ser investigado.

Os programas de controle de *Salmonella* em suínos objetivam a diminuição da prevalência de suínos portadores e excretadores nos lotes, animais que representam risco de introdução da bactéria na linha de abate (BAHNSON et al., 2005). Associados às boas práticas de manejo, aditivos na ração que diminuam a excreção de *Salmonella* e conseqüente amplificação da infecção na granja podem ser ferramentas utilizadas nestes programas de controle (OJHA & KOSTRYNSKA, 2007). Estes aditivos não são específicos para o controle de *Salmonella* e possuem efeito benéfico no desempenho zootécnico dos animais, como por exemplo, o decréscimo de problemas entéricos (IMMERSEEL et al., 2002) e a preservação da qualidade nutricional da ração (BEDFORD, 2000). Os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo não é capaz de influenciar no número de animais portadores após a infecção experimental. Porém, o tratamento com

mananoligossacarídeo foi capaz de determinar uma menor excreção fecal de *Salmonella* sp., bem como os ácidos orgânicos parecem diminuir a presença dessa bactéria no conteúdo cecal. A adoção desses tratamentos de forma estratégica, tem potencial para contribuir no controle da contaminação ambiental por *Salmonella* na granja e pré-abate, podendo determinar uma menor pressão de infecção para os animais negativos alojados nesses ambientes.

5. CONCLUSÃO

A adição de ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo na dieta de suínos na fase de crescimento não previne a infecção dos animais por *Salmonella* Typhimurium. O mananoligossacarídeo é capaz de reduzir a excreção de *Salmonella* sp., podendo ser uma alternativa para diminuir a contaminação ambiental na granja e no pré-abate.

6. REFERÊNCIAS

Alban, L., Stege, H., Dahl, J. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. Preventive Veterinary Medicine, n.3, p.133–146, 2002.

Avila, L.A.F., Nascimento, V.P., Canal, C.W., Salle, C.T.P.; Moraes, H.L.S. Effect of acidified drinking water on the recovery of *Salmonella enteritidis* from broiler crops. Rev. Bras. Cienc. Avic. v.5 n.3, p.183 – 188. 2003.

Bahnon, P.B., KIM, J.Y., WEIGEL, R.M., MILLER G.Y., TROUTT H.F. Association between on-farm and slaughter plant detection of *Salmonella* in market-weight seine. Journal of Food Protection, v.68, p.246-250, 2005.

Bam. Bacteriological Analytical Manual. Disponível em: ww.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html). Appendix 2: Most Probable Number Determination from Serial Dilutions. 9th edition., 2003.

Bandeira, R. Pellegrini, D.C.P., Cardoso, M.C. Ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes de pernil provenientes de lotes suínos portadores ao abate. Acta Scientiae Veterinariae. v.35, n.2, p.203-208, 2007.

Bassan, J. Flores, M.L., Antoniazzi, T., Bianchi, E., Kuttel, J., Trindade, M.M. Controle da infecção por *Salmonella Enteritidis* em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. Cienc. Rural v.38 n.7, 2008.

Baurhoo, B., Letellier, A., Zhao, X., Ruiz-Faria, C.A. Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and *Escherichia coli* populations after *in vivo* *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. Poultry Science, v. 86, p.2509-2516, 2007.

Bedford, M. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. World's Poultry Science Journal. n.56, p. 347-365, 2000.

Bessa, M.C., Costa, M., Cardoso, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do RS. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.24, n.2, p.80-84, 2004.

Bessa, M.C., Michael, G.B., Canu, N., Canal, C.W., Cardoso, M., Rabsch, W., Rubino, S. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul. Research in Veterinary Science, v.83, p.302-310, 2007.

Biage, G., Piva, A., Moschini, M., Vezzali, E., Roth, F. X. Performance, intestinal microflora, and wall morphology of weanling pigs fed sodium butyrate. Anim Science, n.85, p.1184-1191, 2007.

Boldwan, Von G., Jung, H., Schneider, R., Block, J., Klenke, B. Influence of propionic- and formic acid on piglets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, n.59, p.72-78, 1988.

Borowsky, L., Cardoso, M., Schmidt, V. Estimation of most probable number of *Salmonella* in minced pork samples. Brazilian Journal of Microbiology, v.38, p.544-546, 2007.

Borowsky, L., Corção, G., Cardoso, M. Mannanoligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. Brazilian Journal of Microbiology 40: ISSN 1517-8382. 2009.

Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes D., Van Immerseel F., Ducatelle R., Pasmans, F. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. Veterinary Microbiology n.130, p.1-19. 2008.

Brandtzaeg, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. Nutr Rev, v.56, n.1, supp. 2, p s5-s18, 1998.

Canibe, N., Steien, S.H., Verland, M., Jensen, B.B. Effect of K-diformate to starter piglet diets on digesta and faecal microbial profile, and on stomach alterations. Journal of Animal Science, n.79, p.2123-2133, 2001.

Canibe, N., et al. An overview if the effect of organic acids on gut flora na gut health, 2004. (Acessado em: 15 de novembro de 2009).

http://www-afac.slu.se/Workshop%20Norge/organic_acids_canibe_et_al.pdf

Castagna, S.M.F. Schwarz, P., Canal, C.W., Cardoso, M. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação em embutido tipo frescal. *Act. Scie. Vet.* v.32, p.141-147, 2004.

Fedorka-Cray, P. J., Kelley, L. C., Thomas J. G., Laufer J. A. Alternate Routes of Invasion May Affect Pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in Swine. *Infection and immunity.* v. 63, n.7, p.2658–2664, 1995.

Fedorka-Cray, P. et al. Feed and feed trucks as sources of *Salmonella* contamination in swine. *Swine Health Prod.* v.5, p.189 – 193, 1997.

Griffith, R.W.; Schwartz, K. J.; Meyerholz, D.K. Salmonellosis. *Diseases of Swine.* 9th ed., Ames: Iowa State University Press. cap.45, p.739-754. 2006.

Gebbink, G.A.R., Sutton, A.L., Richert, B.T., Patterson, J.A., Nielsen, J., Kelly, D.T., Versteegen, M.W.A., Williams, B., Bosch, A.M., Cobb, M., Kendall, D.C., DeCamp, S., Bowers, K. Effects of addition of fructooligosaccharide (FOS) and sugar beet pulp to weanling pig diets on performance, microflora and intestinal health. Disponível em <http://www.ansc.purdue.edu/swine/swineday/sday99/psd09-2000.html>. Acessado em 10 de outubro de 2009.

Gomes, F.E., Fontes, D.O., Saliba., E.O.S. Ferreira, W.M., Fialho, E.T., Silva, F.C.O., Silva, M.A., Corrêa, G.S.S., Salum, G.M. Ácido fumárico e sua combinação com os ácidos butírico ou fórmico em dietas de leitões recém desmamados integridade das vilosidades butírico, fórmico e fumárico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.5, p.1270-1277, 2007.

Hueffer, K., and Galan, J. E. *Salmonella*-induced macrophage death: multiple mechanisms, different outcomes. *Cell Microbiol.* n.6, p.1019–1025, 2004.

Hurd, H.S, Mckean, J.D., Wesley, I.V., Karriker, L.A. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *Jour. Food Protect.*, v.64, p.939-944, 2001.

Hurd, H.S., Mckean, J.D., Griffith, R.W., Wesley, I.V., Rostagno, M.H. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.5, p.2375 – 2381, 2002.

ISO 6579 Microbiology of food and animal stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. AMENDMENT 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. Fourth edition: 2002 – 07 -15:AMENDMENT 1: 2007-07-15.

Kich, J.D., Coldebella, A., Mores, N., Fratamico, P.M., Call, J.E., Luchansky, J.B., Cray, P.J. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* isolates recovered from finishing

swine herds and slaughter facilities in Southern Brazil. In:IAFP Annual Meeting, p.117, 2006.

Kich, J.D., Schwarz, P., Silva, L.E. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against prevalent *Salmonella* serovars in swine in southern Brazil. J. Vet. Diagn. Invest. n.19, p.510–517, 2007.

Kranker, S., Alban, L., Boes, J., Dahl, J. Longitudinal Study of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Infection in Three Danish Farrow-to-Finish Swine Herds Journal of Clinical Microbiology, v.41, n.6, p.2282-2288, 2003.

Letellier, A., Messier, S., Lessard, L., Quessy, S. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. Can J. Vet. Res. v.63, p.27-31, 1999.

Letellier, A., Messier, S., Lessard, L. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. Canadian Journal Veterinary Research, v.65, p.168-172, 2001.

Lima E.S.C., Pinto, P.S.A., Santos, J.L., Vanetti, M.C.D. Bevilacqua, P.D., Almeida, L.P., Pinto, M.S. Dias, F.S. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC Pesq. Vet. Bras. v.24, n.4, p.185-190, 2004.

Luna, L. G. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. Maryland: Jhonson Printers, p. 88-312, 1992

Macari M, Maiorka A. Função gastrintestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas. v.2, p. 161-174, 2000.

Mathew, A.G. Sutton, A.L., Scheidt, A.B., Patterson, J.A., Kelly, D.T., Meyerholtz, K. A. Effect of galactan on selected microbial populations and pH and volatile fatty acids in the ileum of the weanling pig. Journal Animal Science, Savoy, v.71, n.6, p.1503-1509, 1993.

Muller, M., Schwarz, P., Kich, J.D., Cardoso, M. Perfil sotológico e de isolamento de *Salmonella* sp. em suínos no início da terminação e ao abate. Ciência Animal Brasileira, v.10, n.3, p.931-937, 2009.

Murmann, L., Santos, M.C.M., Cardoso, M.R.I. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. Food Control, v.20, p.191-195, 2009.

Macfarlane, G.T., Cummings, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? BMJ, London, v.18, p.999-1003, 1999.

Maribo, H., Jensen, B. B., Hedemann, M. S. Different doses of organic acids to piglets. Danish Bacon and Meat Council, n.469, 2000.

Michael, G.B., Cardoso, M., Costa, M. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, p.138-142, 2003.

Mikkelsen, D., Jensen, B.B. Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, p.3485-3942, 2004.

Nielsen, B., Baggesen D., Bager F. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology*, n.47, p.205-218, 1995.

Oliveira, C.J.B., Carvalho, L.F.O.S., Garcia, T.B. Experimental airborne transmission of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Typhimurium in weaned pigs. *Epidemiol. Infect.* n.134, p.199-209. 2006.

Oliveira, C.J.B., Garcia, T.B., Carvalho, L.F.O.S., Givisiez, P.E.N., Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. *Vet. Microbiol.* n. 25, p.355-361. 2007.

Ojha, S., Kostrzynska, M. Approaches for Reducing *Salmonella* in Pork Production. *Journal of Food Protection*, v.70, n.11, p.2676-2694, 2007.

Ostermann, D., Vieira, S.L., Viola, E.S., Sanfelice, A.M. Metabolismo e bases conceituais para a ação benéfica de ácidos orgânicos para frangos de corte. *Animal World*, ano 3, n.15, p. 28-31, 2005.

Partanen, K.H.; Mroz, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews*, v.12, n.1, p.117-145, 1999.

Pluske, J.R., Hampson, D.J., Williams, L.H., Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest. Product. Sci.* v.51, p.215-236, 1997.

Radecki, S.V.; Yokoyama, M.T. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition. In: MILLER, E.R.; DUANE, E.U.; LEWIS, A.J. Swine nutrition. Boston Butterworth-Heinemann, p.439-447, 1991.

Risley, C.R., Kornegay, E.T., Lindermann, M.D. Effects of organic acids with and without a microbial culture on performance and gastrointestinal tract measurements of weaning pigs. *Animal feed science and technology*, v.35, n.3, p.259-270, 1991.

Risley, C.R., Kornegay, E.T., Lindermann, M.D., Wood, C.M., Eigel, W.N. Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs. *Journal of Animal Science* v.70, p.196-206, 1992.

Risley, C.R., Kornegay, E.T., Lindermann, M.D., Wood, C.M., Eigel, W.N. Effect of feeding organic acids on gastrointestinal digesta measurements at various times postweaning in pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. Canadian Journal of Animal Science, v.73, p.931-940, 1993.

Roy, M.; Gibson, G.R. Probiotics and prebiotics – microbial in menu. (1999). Disponível em <http://www.babelfish.altavista.com/cgi-bm>. Acessado em 3 de outubro de 2009.

Schwarz, P., Calveyra, J., Sella, A., Bessa, M., Barcellos, D.E.S.N., Cardoso, M. *Salmonella* enterica: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.61, n.5, p.1028-1034, 2009.

Seixas F.N., Tochetto, R., Ferraz, S.M. Presença de *Salmonella* sp. em carcaças suínas amostradas em diferentes pontos da linha de processamento. Ciência Animal Brasileira, v.10, n.2, p.634-640, 2009.

Silva, L.E., Gotardi, C.P., Vizzotto, R., Kich, J.D., Cardoso, M. Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, n.4, p.455-461, 2006.

Silva, N., Junqueira, V.C., Silveira, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Varela, São Paulo.

Soares, R.T.R.N., Chiquieri, J., Nery, V.L.H., Carvalho, Q.E.C., Costa, A.P.D. Bioquímica sanguínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v.8, n.2 (2007).

Spolaore, A.J.G. Prevalência de *Salmonella* sp. em linfonodos mesentéricos de suínos abatidos na região oeste do Paraná e potencial de disseminação em bandejas, facas e luvas de manipuladores durante a inspeção *post-mortem*. Dissertação apresentada ao Curso de Pósgraduação em Ciências Veterinárias do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Mestre. 2007.

Spring, P., Wenk C., Dawson, K.A. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentration of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. Poultry Science, v.79, p.205-211, 2000.

Taube, V.A., Neu, M.E., Hassan, Y, Verspohl, J., Beyerbach, M., Kamphues, J. Effects of dietary additives (potassium diformate/organic acids) as well as influences of grinding intensity (coarse/fine) of diets for weaned piglets experimentally infected with *Salmonella* Derby or *Escherichia coli*. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. n.93, p.350-358. 2009.

Thomlinson, J.R., Lawrence, T.L.J. Dietary manipulation of gastric pH in the prophylaxis of enteric disease in weaned pigs: some field observations. Veterinary Record, v.109, n.1, p.120-122, 1991.

Tsiloyiannis, V.K., Kyriakis, S.C., Vlemmas, J. The effect of organic acids on the control of post-weaning oedema disease of piglets. *Research in Veterinary Science*, v.70, p.281-285, 2001.

Uni, Z. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chickens small intestine. *Br. Poultr. Sci.*, v.41, p.410-415, 2000.

Van Der Gaag, M.A., Fred Vos, Saatkamp H.W., van Boven, M., van Beek, P., Huirne, R.B.M. A state-transition simulation model for the spread of *Salmonella* in the pork supply chain. *European Journal of Operational Research*, v.156, p.782-798, 2003.

Van Immersell, F., Cauwerts, K., Devriese, L.A., Devriese, F., Ducatelle, R. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. *World's Poultry Science Journal*. n.58, p.501-513, 2002.

Van Immerseel, F., Russell, J.B., Flythe, M.D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol.* n.35, p.182-188, 2006.

Vogt, H., Matthes, S., Harnisch, S. Der Einfluss organischer Säuren auf die Leistungen von Broilern und Legehennen. *Archiv für Geflügelkunde*, n.45, p.221-232, 1981.

Xavier, L.H. Modelos univariado e multivariado para análise de medidas repetidas e verificação da acurácia do modelo univariado por meio de simulação. Piracicaba, 2000. 91 p. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2000.

Waldroup, A., Kaniawato, S., Mauromoustakos, A. Performance characteristics and microbiological aspects of broiler fed diets supplemented with organic acids. *Journal of Food Protection*, n.58, p.482-489, 1995.

Walsh, M.C., Sholly, D.M., Hinson, R.B., Saddoris, K.L., Sutton, A. L., Radcliffe, J. S., Odgaard, R., Murphy, J., Richert, B.T. Effects of water and diet acidification with and without antibiotics on weanling pig growth and microbial shedding. *Journal Animal Science*, n.10, p.2006-2049, 2003.

Wilcock, B.P., Schwartz, K.J., Salmonellosis. In LEMAN, A. D. et al. *Diseases of Swine*, 7 ed. Ames: Iowa State University Press. p.570-583, 1992.

Wood, R.L., Pospischil, A., Rose, R. Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. *Am. J. Vet. Res.* n.50, p.1015-1021, 1989.

Wood, R.L., Rose, R., Coe, N.E., Ferris, K.E., Experimental establishment of persistent infection in swine with a zoonotic strain of *Salmonella* Newport. *Am. J. Vet. Res.* n.52, p.813-819, 1992.

Zucon, L.T.S. Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos. Tese apresentada ao Curso de Pós graduação em Epidemiologia experimental aplicada às zoonoses da faculdade de medicina veterinária e zootecnia da universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em medicina veterinária. 2008.

CAPÍTULO 4. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados do experimento realizado, algumas ações de pesquisa futura podem ser propostas.:

1) Estudos com infecção experimental de grupos com introdução de animais sentinela, como forma de observar possíveis efeitos bacteriostáticos dos tratamentos, bem como o impacto da menor excreção fecal de *Salmonella* sp. nos grupos em contato com lotes positivos. Esta ação poderia contribuir para a avaliação do uso dos aditivos de forma estratégica no campo, considerando etapas da produção com maior taxa de excreção da bactéria.

2) A associação de ácido orgânico encapsulado com mananoligossacarídeo como uma alternativa que possa oferecer efeito sinérgico deve ser melhor estudada. Como a ação destes aditivos indicaram um efeito positivo no presente estudo, sua adição na ração de suínos poderá amplificar o efeito do tratamento. Principalmente se considerarmos que atuem em porções distintas do trato gastrointestinal.

3) Numa etapa final, a validação a campo dos tratamentos é necessária, visando observar seus efeitos na realidade do sistema de produção brasileiro.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C.A. Nutricines. Food Components in health and nutrition. Nottingham University Press. Nottingham. p.128.1999.
- ALBAN, L.; STEGE, H.; DAHL, J. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. Preventive Veterinary Medicine, n.3, p.133–146, 2002.
- ALBUQUERQUE, R.; ITO N.; MIYAJI C. Study of occurrence of salmonelas in feedstuffs, feeds and dust swabs in feed mill. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. v.36 n.6, 1999.
- ASCENZI, J.M. In: Handbook of disinfectants and antiseptics. 137-143. M. Dekker, Nova York 2006.
- AVILA L.A.F.; NASCIMENTO V.P.; CANAL, C.W.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S. Effect of acidified drinking water on the recovery of *Salmonella enteritidis* from broiler crops. Rev. Bras. Cienc. Avic. v.5 n.3, p.183 – 188. 2003.
- BAHNSON, P.B. KIM, J.Y., WEIGEL, R.M., MILLER G.Y., TROUTT H.F. Association between on-farm and slaughter plant detection of *Salmonella* in market-weight seine. Journal of Food Protection, v.68, p.246-250, 2005.
- BANDEIRA, R.; PELLEGRINI, D.C.P.; CARDOSO, M.C. Ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes de pernil provenientes de lotes suínos portadores ao abate. Acta Scientiae Veterinariae. 35(2): 203-208, 2007.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; RODRIGUES N.C.; MIGLIAVACCA F.; OLIVEIRA S.J.; BOROWSKY S.M. Ocorrência da salmonelose septicêmica em suínos no período neonatal. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v.19, p.41-44, 1991.
- BASSAN, J.D.L.; FLORES, M.L.; ANTONIAZZI, T.; BIANCHI, E.; KUTTEL, J.; TRINDADE, M.M. Controle da infecção por *Salmonella Enteritidis* em frangos de corte com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeo. Cienc. Rural v.38 n.7, 2008.
- BAURHOO, B., LETELLIER, A., ZHAO, X., RUIZ-FERIA, C.A. Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and *Escherichia coli* populations after *in vivo* *Escherichia coli* challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. Poultry Science, v.86, p.2509-2516, 2007.
- BERENDS, B.R. URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A.; KNAPEN, F.V. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. International Journal of Food Microbiology, n.30, p.37-53, 1996.
- BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do RS. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.24, n.2, p.80-84, 2004.

BEST, P. Como actúan los ácidos como promotores de crecemento? Probable modo complexo de acción: atacando microbios patogénicos y ayudando la digestión de amino ácidos. Alimentos Balanceados para animales, p.18-19, 2000.

BIGGS, P., PARSONS C. M., FAHEY G.C. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. Poultry Science, v.86, p.2327-2336, 2007.

BODE, K.; BAIER S., BLAHA T. Successful *Salmonella* Control in 3 finishing herds supplied by one sow herd. IPVS, 20th Internacional Pig Veterinary Society Congress, South Africa, p.173, 2008.

BOLDWAN, VON G., JUNG, H., SCHNEIDER, R., BLOCK, J. & KLENKE, B. Influence of propionic- and formic acid on piglets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, n.59, p.72-78, 1988.

BOROWSKY, L.; BESSA M.C.; CARDOSO M.; AVANCINI C. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodofor. Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.5, p.1474-1479, 2006.

BOROWSKY L.; CORÇÃO, G.; CARDOSO, M. Mannanligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. Brazilian Journal of Microbiology 40: ISSN 1517-8382. 2009.

BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. Nutr Rev, New York, v.56, n.1, supp. 2, p s5-s18, 1998.

BURITI, F. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. Publicación Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, v.57, n.4, 2007.

BURKEY, T.E.; DRITZ, S.S.; NIETFELD, J.C.; JOHNSON, B.J.; MINTON J.E. Effect of dietary mannanligosaccharide and sodium chlorate on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of weaned pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Journal Animal Science, v.82, p.397-404, 2004.

CANIBE, N., STEIEN, S. H., ØVERLAND, M. & JENSEN, B.B. Effect of K-diformate to starter piglet diets on digesta and faecal microbial profile, and on stomach alterations. Journal of Animal Science, v.79, p.2123-2133, 2001.

CANIBE, N., ENGBERG, R.M., JENSEN, B.B. An overview if the effect of organic acids on gut flora na gut health, 2004. Disponível em http://www-afac.slu.se/Workshop%20Norge/organic_acids_canibe_et_al.pdf. (Acessado em: 15 de novembro de 2009).

CASTAGNA, S.M.F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação em embutido tipo frescal. *Act. Scie. Vet.* v.32, p.141-147, 2004.

(CDC) Centre for Diseases Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium/update.html> (Acessado em: 5 de novembro de 2009).

CHEN YH, CHEN TP, LU PL, SU YC, HWANG KP. *Salmonella choleraesuis* bacteremia in southern Taiwan. *Kaohsiung Journal of Medical Science.* p.202, 1999.

CLARKE, R.C.; GYLES, C.L. *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; CHARLES, O.T. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 2.ed. p.133-153. Ames: Iowa State University, 1993.

CRUMP, J.A.; LUBY, S.P.; MINTZ, E.D. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ.* v.82, p.346-353, 2004.

DAVIS, M. E., MAXWELL, C. V.; KEGLEY, E. B. Efficacy of mannan oligosaccharide (Bio-Mos) addition at two levels of supplemental copper on performance and immunocompetence of early-weaned pigs. *Journal Animal Science*, v.77, p.63 (Abstr), 1999.

DAWSON, K. A.; PIRYULESCU, M. Mananoligossacarídeos derivados de leveduras como moduladores da resposta imunológica e alternativas aos promotores de crescimento antimicrobianos. In: Ronda latino-americana da alltech, Anais... Curitiba: [s.n.], p.33-41, 1999.

EKLUND, T. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology.* v.54 p.383-389, 1983.

EKPERIGIN, H. E.; NAGARAJA, K.V. *Salmonella*. The Veterinary Clinic North Am. Philadelphia, v.28, n.2, p.17-29,1998.

FACKLAN, R. R.; SAHM, D. F.; TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus*. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed., p. 297-305. 1999.

FAI A.E.C.; FIGUEIREDO, E.A.T.; VERDIN, S.E.F.; PINHEIRO, N.M.S.; STAMFORD, T.L.M.; BRAGA, A.R.C. *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza/CE: fator de risco para a saúde pública. *Ciência e saúde coletiva*, p.644. 2007.

FAIRCHILD A. S. GRIMES, J.L.; JONES, F.T.; WINELAND, M.J.; EDENS, F.W.; SEFTON, A.E. Effect of hen age, Bio Mos and Flavomycin on susceptibility of turkey poults to oral *Escherichia coli* challenge. *Poultry Science*, v.80, n.5, p.562-571, 2001.

FARNWORTH, E.R.; MOLDER, H.W.; HONES, J.D.; JONES, J.D.; CAVE, N.; YAMAZAKI, H.; RAO, A.V. Feeding Jerusalem artichoke flour rich in fructooligosaccharides to weanling pigs. *Can J Anim Sci*, v.72, n.12, p.977-980, 1992.

FEDORKA-CRAY, P. J.; KELLEY, L. C.; THOMAS J. GRAY.; J. T. LAUFER1 J. A. Alternate Routes of Invasion May Affect Pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in Swine. *INFECTION AND IMMUNITY*, v.63, n.71, p.2658–2664, 1995.

FEDORKA-CRAY, P. HOGG, A.; GRAY, J.T.; LORENZEN, K.; VELASQUEZ.; BEHREN, P.V. Feed and feed trucks as sources of *Salmonella* contamination in swine. *Swine Health Prod*. v.5, p.189-193, 1997.

FERKET, P.R. Use of oligosaccharides and gut modifiers as replacements for dietary antibiotics. In: Minnesota nutrition conference, 63. Proceedings... Minnesota: Eagan, p.169-182, 2002.

FERNANDES, P.C.C.; MALAGUIDO, A.; SILVA, A.V. Manejo nutricional visando substituir a utilização de antimicrobianos em alimentos para aves. In: Simpósio sobre manejo e nutrição de aves e suínos cbna. Campinas, SP. Anais... Campinas: CBNA.p. 135-166, 2003.

FINUCANE, M.C., DAWSON, K.A.; SPRING, P.; NEWMAN, K.E. Incidence os mannose sensitive of adhesins in enteric bacteria. Abstracts 88 th. Annual Meeting Poultry Science Association, 139., 1999.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAFF, M. *Microbiologia Alimentar*. São Paulo: Atheneu., p.181, 1996.

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

GABERT, V.W.; SAUER W.C.; MOSENTHIN, R.; SCHMITZ, M.; AHRENS, F. The effect of oligosaccharides and lactitol on the ileal digestibilities of amino acids, monosaccharides and bacterial populations and metabolites in the small intestine of weanling pigs. *Can J Animal Science*, Ottawa, v.75, n.1, p.99-107, 1994.

GEBBINK, G.A.R. SUTTON, A.L., RICHERT, B.T., PATTERSON, J.A., NIESLSEN J., KELLY, D.T., VERSTEGEN, M.W.A., WILLIAMS, B., BOSCH, A.M., COBB, M., KENDALL, D.C., DECAMP, S., BOWERS, K. Effects of addition off rutooligosaccharide (FOS) and sugar beet pulp to weanling pig diets on performance, microflora and intestinal health. Acessado em 10 de outubro de 2009. Online. Disponível em <http://www.ansc.purdue.edu/swine/swineday/sday99/psd09-2000.html>.

GEIMBA M.P.; TONDO, E.C.; OLIVEIRA, F.A.; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from

foods involved in outbreaks in Brazil. *Journal of Food Protection*, Des Moines, Iowa, v.67, n.6, p.1229-1233, 2004.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, B.M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, Bethesda, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GOLDBACH, S.G.; ALBAN, L. A cost-benefit analysis of *Salmonella*-control strategies in Danish pork production. *Prev. Vet. Med.*, v. 77, 1-14, 2006.

GRIFFITH, R.W.; SCHWARTZ, K. J.; MEYERHOLZ D.K. Salmonellosis. *Diseases of Swine*. 9th ed., Ames: Iowa State University Press. cap.45, p. 739-754. 2006.

GRILLI E.; BODIN J-C.; GATTA P. P.; TEDESCHI M.; PIVA A. Microencapsulation allows release of organic acids in the GI tract of broilers. *Proceedings of the 16th European Symposium on Poultry Nutrition* p.118. August 26 - 30, Strasbourg , France. 2007.

GUARNER, F.; MALAGE, J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, London, v.360, p.512-518, 2003.

HALD, T.; WEGENER, H.C. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal*. v.24, p.255-69, 2004.

HENTGES, D. J. Gut flora and disease resistance. In: FULLER, R. *Probiotics: the scientific basis*. London: Chapman e Hall. cap. 5, p. 87-109. 1992.

HIRSH, D.C. *Salmonella*. In BIBERSTEIN, D.V.M.; ZEE, Y.C. *Review of veterinary Microbiology*. Boston: Blackwell Scientific Publicationscap, v.24, p.110-115. Lvan, 1990.

HOLT, J. G.; WILLIAMS, W.; BALTIMORE, M.D. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. v.175, n.566, p.573-574, 1994.

HOWARD, M.D.; KERLEY, M.S.; GORDON, D.T. Effect of dietary addition of fructooligosaccharide on colonic microflora populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. *Journal Animl Science*, Savoy, v.71, supp.1, p.177, 1993.

HURD, H.S.; MCKEAN, J.D.; WESLEY, I.V.; KARRIKER, L.A. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *Jour. Food Protect.*, v.64, p.939-944, 2001.

HURD, H.S. MCKEAN, J.D.; GRIFFITH, R. W.; WESLEY, I.V.; ROSTAGNO, M.H. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.5, p.2375-2381, 2002.

IMMERSEEL, F. Van; CAUWERTS, K.; DEVRIESE, L.A.; DEVRIFE, F.; DUCATELLE, R. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. *World's Poultry Science Journal*. v.58, p.501-513, 2002.

JAENISCH F.R. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. Resumos do V CBA - Manejo de Agroecossistemas Sustentáveis. *Rev. Bras. de Agroecologia/out.* v.2, n.2, 2007.

KAMIMURA, R.; ARANTES, V.M.; BELETTI, M.E.; RIBEIRO, D.P.; SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; CARVALHO, E. J. Efeito de mananligossacarídeo e colistina sobre a histomorfometria intestinal e níveis de IgA e IgG séricas em leitões. *Vet. Not., Uberlândia*, v.12, n.2, p.153-160, 2006.

KICH J.D., BOROWSKI, L.; SILVA, V.S.; RAMENZONI, M.; TRIQUES, N.; KOOLER, F.L.; CARDOSO, M.R.I. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p.33-39, 2004.

KICH, J.D.; SCHWARZ, P.; CARDOSO, M.R.I. TRIQUES, N.; VIZZOTTO R.; RAMENZONI, M.; Fatores de risco associados com a prevalência sorológica de *Salmonella* em granjas comerciais de suínos no sul do Brasil. *Ciência Rural*, v.35, p.398-405, 2005.

KICH, J.D.; COLDEBELLA, A.; MORES, N.; FRATAMICO, P.M.; CALL, J.E.; LUCHANSKY, J.B.; CRAY, P.J. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* isolates recovered from finishing swine herds and slaughter facilities in Southern Brazil. In:IAFP Annual Meeting, p.117, 2006.

KICH, J.D.; SCHWARZ, P.; SILVA, L. E. et al. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against prevalent *Salmonella* serovars in swine in southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* v.19, p.510–517, 2007.

KOLB, J.; ROOF, M.; BURKHART, K. Reduction of *Salmonella* in carcasses using Enterisol® SC-54 vaccination. In: International pig veterinary society congress, 17. Ames, Estados Unidos. Proceedings...14. 2002.

KRANKER, S.; ALBAN, L.; BOES, J.; DAHL J. Longitudinal Study of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Infection in Three Danish Farrow-to-Finish Swine Herds. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.6, p.2282-2288, 2003.

LETELLIER, A.; MESSIER, S.; LESSARD, L.; QUESSY, S. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. *Can J. Vet. Res.* v.63, p.27-31, 1999.

LETELLIER, A., MESSIER, S., LESSARD, L. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Canadian Journal Veterinary Research*, v.65, p.168-172, 2001.

LIMA E.S.C., PINTO, P.S.A.; SANTOS, J.L.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA P.D.; ALMEIDA, L.P.; PINTO M.S.; DIAS F.S. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC1Pesq. Vet. Bras. v.24, n.4, p.185-190, 2004.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? BMJ, London, v.18, p.999-1003, 1999.

MACIOROWSKY, G.K.; HERRERA, P.; JONES, F.T.; PHILLAI, S.D.; RICKE, S.C. Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. In animal feeds – a review. Veterinary research communication, v.30, p.127-137, 2006.

MAGUIRE, H.C.F.; CODD, A.A.; MACKAY, V.E.; ROWE, B.; MITCHELL, E. A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. Epidemiol. Infect. v.110, p.230-246, 1993.

MARIBO, H., JENSEN, B. B.; HEDEMANN, M. S. Different doses of organic acids to piglets. Danish Bacon and Meat Council, n.469, 2000.

MATHEW, A.G. SUTTON, A.L.; SCHEIDT, A.B.; PATTERSON, J.A.; KELLY, D.T.; MEYERHOLTZ, K. A. Effect of galactan on selected microbial populations and pH and volatile fatty acids in the ileum of the weanling pig. Journal Animal Science, Savoy, v.71, n.6, p.1503-1509, 1993.

MILES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: Natural ways to prevent colonization by pathogens. In: Biotechnology in the feed industry of annual symposium, 9. London. Proceeding... London: Nottingham University Press, p.133 – 150. 1993.

MILTEMBURG, G. Promotores e aditivos de crescimento em Avicultura. In: Conferência apinco de ciência e tecnologia avícolas, Campinas. Anais... Campinas: FACTA, p. 204-215, 2000.

MIKKELSEN & JENSEN. Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol., v.70, p.3485-3942, 2004.

MROZ, Z. Acidifiers fytases and their interections in feeding of pigs and poultry. Thecnical meeting on additives and new feed technologies. Effects of their interections and specifictions of use. Madrid, p.1-51. 2002.

MULLER, M. SCHWARZ P.; KICH, J.D.; CARDOSO, M. Perfil sotológico e de isolamento de *Salmonella* sp. em suínos no início da terminação e ao abate. Ciência Animal Brasileira, v.10, n.3, p.931-937, 2009.

MURMANN, L.; SANTOS, M.C.M.; CARDOSO, M.R.I. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. *Food Control*, v.20, p.191-195, 2009.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M.A. *Microbiologia Médica*. Trad. Patrícia J. Vouex. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 172 p. 1998.

NAUGHTON, P.J.; MIKKELSEN, L.L.; JENSEN, B.B. Effects of Nondigestible Oligosaccharides on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Nonpathogenic *Escherichia coli* in the Pig Small Intestine In Vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n.8, p. 3391-3395, 2001.

OJHA S.; KOSTRZYNSKA M. Approaches for Reducing *Salmonella* in Pork Production. *Journal of Food Protection*, v.70, n.11, p. 2676-2694, 2007.

ORBAN, J.I.; PATTERSON, J.A., ADEOLA, O.; SUTTON, A.L.; RICHARDS, G. N. Growth performance and intestinal microbial population of growing pigs fed diets containing thermal oligosaccharide caramel. *J. Animal Science*, Savoy, v.75, n.1, p.170-175, 1997.

PAIVA D. P. Controle integrado de moscas em criações de suínos.. *Suinocultura Dinâmica*, Concórdia/SC, v.12, p.1-5, 1994.

PARTANEN, K.H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews*, v.12, n.1, p.117-145, 1999.

PEDROSO, L.L.O.; UTIYAMA, C.E.; MENTEN, J.F. M.; LAMBAIS, M.R.; MIYADA, V.S. Variabilidade Espacial da Comunidade Bacteriana Intestinal de Suínos Suplementados com Antibióticos ou Extratos Herbais. *R. Bras. Zootec.*, v.34, n.4, p.1225-1233, 2005.

PELLEGRINI, D.C.P.; PAIM, D.S.; LIMS, G.J.M.M.; KICH, J.D.; COLDEBELLA, A.; CARDOSO, M. Frequência de isolamento de *Salmonella* sp. e de enterobactérias em diferentes áreas de fábricas de ração para suínos. In: Congresso nacional de veterinários especialistas em suínos, Uberlândia. p.42. 2009.

PEREIRA, C.S.; MEDEIROS, L.M.; COSTA R.G.; FESTIVO M.L.; REIS E.M.F.; SEKI L.M.; RODRIGUES D.P. Phage typing and Multidrug resistance profile in *S. Typhimurium* isolated from different sources in Brazil from 1999 to 2004. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38 n.2, 2007.

PETTIGREW, J. E. Bio-Mos effects on pig performance: a review. In *Biotechnology in the Feed Industry*, Proc. 16th Annu. Symp.T.P. Lyons and K. A. Jacques (Eds.). p 31. Nottingham University Press, UK, 2000.

PIVA, A., PIZZAMIGLIO, V., MORLACCHINI, M., TEDESCHI, M.; PIVA, G. Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine. *Journal of Animal Science*, v.85, p.486-493, 2007.

RADECKI, S.V.; YOKOYAMA, M.T. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition. In: MILLER, E.R.; DUANE, E.U.; LEWIS, A.J. Swine nutrition. Boston Butterworth-Heinemann, p.439-447, 1991.

RASTALL, R.A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *The Journal of Nutrition* v. 134, 2004.

REEVES, M.W., G.M.; EVINS, A.A.; HEIBA, B.D.; PLIKAYTIS, FARMER J.J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol*, v.27, p.313-320, 1989.

RISLEY, C.R.; KORNEGAY, E.T.; LINDERMANN, M.D. et al. Effects of organic acids with and without a microbial culture on performance and gastrointestinal tract measurements of weaning pigs. *Animal feed science and technology*, v.35, n.3-4, p.259-270, 1991.

RISLEY, C. R., KORNEGAY, E. T., LINDEMANN, M. D., WOOD C. M & EIGEL, W.N. Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs. *Journal of Animal Science*, v.70, p.196-206, 1992.

RISLEY, C. R., KORNEGAY, E. T., LINDEMANN, M. D., WOOD C. M. & EIGEL, W. N. Effect of feeding organic acids on gastrointestinal digesta measurements at various times postweaning in pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Animal Science*, v.73, p.931-940, 1993.

ROSTAGNO, M.H., HURD, H.S., McKEAN J.D. et al. Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Applied Environmental Microbiology*, v.69, p.4489-4494, 2003.

ROY, M. & GIBSON, G.R. (1999) Probiotics and prebiotics – microbial in menu. Disponível em <http://www.babelfish.altavista.com/cgi-bm>. Acessado em 3 de outubro de 2009.

SANTOS, E.C.; TEIXEIRA, A.S.; BERTECHINI, A.G.; FREITAS, R.T.F.; ROGRIGUES, P.B.; DIAS, E.S.; TORRES, D.M.; SANTOS, A.V.; GIACOMETI, R.A. Uso de aditivos eneficiadores de crescimento sobre o desempenho, rendimento de carcaça, bactérias totais, pH intestinal e pH de rações de frangos de corte. In: Promotores naturais de crescimento. Ave World, edição especial, p.8-9, 2006.

SCHWARZ, P.; J; CALVEYRA, J.; SELLA, A.; BESSA, M.; BARCELLOS, D. E. S. N.; CARDOSO, M. *Salmonella enterica*: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.5, p.1028-1034,

2009.

SCHWARZ, P.; CALVEYRA, J.C.; KICH, J.D.; BOROWSKY, L.M.; HIROSE, F.; KOLB, J.; BARCELLOS, D.E.S.N.; CARDOSO, M. Uso de vacina viva atenuada para o controle da infecção por *Salmonella enterica* em rebanho suíno no Sul do Brasil. In: Congresso da associação brasileira de veterinários especialistas em suínos (ABRAVES), 13, Anais... 1-2. Florianópolis, Brasil. 2007.

SEIXAS F.N.; TOCHETTO, R.; FERRAZ, S.M. Presença de *Salmonella* sp. em carcaças suínas amostradas em diferentes pontos da linha de processamento. Ciência Animal Brasileira, v.10, n.2, p.634-640, 2009.

SHELOBOLINA, E.S. SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization and U(VI)-reducing potencial of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate-and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella* subterranean sp. Applied and Environmental Microbiology, v.70, n.5, p.2959-2965, 2004.

SILVA, L.E. GOTARDI, C.P.; VIZZOTTO, R.; KICH, J.D.; CARDOSO, M. Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, n.4, p.455-461. ISSN 0102-0935, 2006.

SILVA, V. S. ; MORÉS, N. ; AMARAL, A. L. ; KRAMER, B. ; PRETTO, A. N. ; RAMENZONI, M. ; KICH, J. D. ; COLDEBELLA, A. . Fatores de risco associados à contaminação residual por *Salmonella* sp. em instalações de creche de suínos no período de vazio. In: III Congresso Latino-Americano de Suinocultura, Foz do Iguaçu/PR. Congresso Latino-Americano de Suinocultura. Editora Animal/Word, v.1. 2006.

SILVA, M.C.; FARIA, G.S.; MARTINS, R.P.; CARAMORI, J.G.; KICH, J.D.; COLODEL, E.M.; DUTRA, V.L.N.D. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. Ciência Rural, v.39, n.1, p.266-268, 2009.

SPRING, P.; WENK C.; DAWSON K. A.. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentration of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. Poultry Science, v.79, p.205-211, 2000.

SNOEYENBOS & G.H., WILLIAMS, J.E. Salmonellosis. In: B.W.CALNEK,ed., Diseases of Poultry. 9 ed. Iowa:Iowa State University Press, Ames, p. 72-73, 1991.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N.; MORÉS N.; OLIVEIRA, S.J.; CARVALHO, L.F.O.S.; MORENOM, A.M.; ROEHE, P.M.. Clínica e Patologia Suína. Goiânia. p.383-387, 1999.

SPOLAORE, A.J.G.; ALBERTON, G.C.; BERSOT, L.S. Prevalência de *Salmonella* sp. em linfonodos mesentéricos de suínos abatidos na região oeste do Paraná e potencial de disseminação em bandejas, facas e luvas de manipuladores durante a inspeção *post-mortem*. Dissertação de mestrado.2007.

STANLEY, V.G. Effects of lactose and Bio-MOS in dietary application on growth and total coliform bacteria reduction in broiler chicks. *Poultry Sci*, Champaign, v.75, supp.1, p.61, 1996.

STÄRK, K D.C.; WINGSTRAND, A.; DAHL, J.; MOGELMOSE, V.; WONG, D.M.A. Differences and similarities among experts' opinions on *Salmonella enteric* dynamics in swine pre-harvest. *Preventive Veterinary Medicine*, n.53, p.7–20, 2002.

STEVENS, C.E, HUME, I.D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiological Reviews*, v.78, p.393-427, 1998.

STRICKLING, J.A.; HARMON D. L.; DAWSON K. A.; GROSS K.L. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. *Anim Feed Sci Tech*, v.86, n.2, p.205-219, 2000.

BIAGE,G., PIVA, A., MOSCHINI, M., VEZZALI, E., ROTH, F. X. Performance, intestinal microflora, and wall morphology of weanling pigs fed sodium butyrate. *Anim Science*, n.85, p.1184-1191, 2007.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A.; KEUZENKAMP, D. A.; VAN KNAPEN, F. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*, v.70, n.3, p. 243-254, 2001.

THOMLINSON, J.R.; LAWRENCE, T.L.J. Dietary manipulation of gastric pH in the prophylaxis of enteric disease in weaned pigs: some field observations. *Veterinary Record*, v.109, n.1, p.120-122, 1991.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Introducion a la Microbiologia*. Zaragoza: Acribia, p.792, 2003.

TSILOYIANNIS, V.K.; KYRIAKIS, S.C.; VLEMMAS, J. et al. The effect of organic acids on the control of post-weaning oedema disease of piglets. *Research in Veterinary Science*, v.70, p.281-285, 2001.

TSUKAHARA, T.; KOYAMA, H.; OKADA, M.; USHIDA, K., Stimulation of butyrate production by gluconic acid in bath culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-production bacteria. *Journal Nutr*, v.132, p. 2229-2234, 2002.

VAN DER GAAG, M.A., FRED VOS, SAATKAMP H.W., VAN BOVEN M., VAN BEEK, P., HUIRNE, R.B.M. state-transition simulation model for the spreadof *Salmonella* in the pork supply chain. *European Journal of Operational Research*, v.156, p.782-798, 2003.

VAN PELT W.; MIN J., VELING J., de WIT M, WANNET WJB, VAN DE GIESSEN AW. Een explosive toename in Nederland van multiresistente *Salmonella* Typhimurium DT104 in 2007. Infectieziekten Bulletin. Disponível em (http://www.isis.rivm.nl/inf_bul/). Acessado em 23 de novembro de 2009.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. Foodborne pathogens: an illustrated text. St. Louis: Moby-Year Book, p.209-34, 1991

VETANCO, B. Salkil. Chapecó(SC),. 8p. Boletim Técnico, 8. 2005.

VOGT, H., MATTHES, S., HARNISCH, S. Der Einfluss organischer Säuren auf die Leistungen von Broilern und Legehennen. Archiv für Geflügelkunde, v.45 p.221-232, 1981.

WALDROUP, A., KANIAWATO, S. & MAUROMOUSTAKOS, A. Performance characteristics and microbiological aspects of broiler fed diets supplement with organic acids. Journal of Food Protection, v.58, p. 482-489, 1995.

WILCOCK, B. P.;SCHWARTZ, K.J.; Salmonellosis. In LEMAN, A. D. et al. Diseases of Swine, 7 ed . Ames: Iowa State University Press. p.570-583, 1992.

WRAY, C.W.; SOJKA, W.J. Reviews of the progress of dairy science: bovine salmonellosis. Journal Of Dairy Science, v.44, p.383-425, 1997.

WRIGHT J., THOMAS P., SERJEANT GR. Septicemia caused by Salmonella infection: an overlooked complication of sickle cell disease. Journal Pediatrics, p.130-394. 1997

ZUCON, L.T.S. Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos. Tese apresentada ao Curso de Pós graduação em Epidemiologia experimental aplicada às zoonoses da faculdade de medicina veterinária e zootecnia da universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em medicina veterinária. 2008.

ANEXOS

Anexo 1 – Composição da dieta basal para os animais na fase de crescimento

Suínos Pre Inicial	
Ingrediente	(Kg)
ACUCAR	10,0000
LACTOSE	30,3030
MILHO GRAO	308,6948
MILHO PRE-COZIDO	30,0000
OLEO SOJA	3,1806
PLASMA AP 920	12,5000
SOJA FARELO (45%)	91,3626
FOSFATO BICALCICO 18	1,3629
CALCARIO 37	3,9365
SAL COMUM	1,6194
DL-METIONINA	0,7563
HCL-LISINA	2,5321
L-TRIPTOFANO	0,1509
L-TREONINA	0,6260
COLINA 60% - CLORETO	0,0500
CAULIM	1,5000
FITASE QUANTUM 2500XT SUINO	0,1000
ANTIOXIDANTE	0,0750
PX MIN SEM NADA	0,5000
PX VIT SEM NADA	0,7500
Total Batch	500,0001

Anexo 2 - Cronograma das coletas

Idade Dias	DPI	Atividades	Amostras	Análises
43	-14	Alojamento	Fezes e Sangue	Avaliação qualitativa para <i>Salmonella</i> sp.
				Quantificação de <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp. e Coliformes totais
				Avaliação Sorológica IgG anti- <i>Salmonella</i> sp.
60	-7	Tratamento	Antes dos tratamentos: coleta de Fezes	Avaliação qualitativa para <i>Salmonella</i> sp.
67	0	Inoculação	Antes da inoculação: Fezes e Sangue	Quantificação de <i>Salmonella</i> sp.
				Avaliação Sorológica IgG anti- <i>Salmonella</i> sp.
70	3	Coleta	Fezes	Quantificação de <i>Salmonella</i> sp.
74	7	Coleta	Fezes e sangue	Quantificação de <i>Salmonella</i> sp.
				Avaliação Sorológica IgG anti- <i>Salmonella</i> sp.
81	14	Coleta	Fezes e Sangue	Quantificação de anaeróbios (<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp. e Coliformes totais)
				Quantificação de <i>Salmonella</i> sp.
				Avaliação Sorológica IgG anti- <i>Salmonella</i> sp.
88	21	Coleta	Fezes e Sangue	Quantificação de <i>Salmonella</i> sp.
				Avaliação Sorológica IgG anti- <i>Salmonella</i> sp.
95	28	Coleta	Fezes e Sangue	Quantificação de <i>Salmonella</i> sp.
				Avaliação Sorológica IgG anti- <i>Salmonella</i> sp.
102	35	Necropsia	Sangue	Avaliação Sorológica IgG anti- <i>Salmonella</i> sp.
			Pulmão, fígado, baço, tonsila, LM, conteúdo cecal	Avaliação qualitativa para <i>Salmonella</i> sp.
			Conteúdo Cecal	Quantificação de <i>Salmonella</i> sp. Quantificação de anaeróbios (<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp. e Coliformes)
			Pulmão, fígado, baço, tonsilas, LM*, ceco, colon, reto	Avaliação histopatológica
			Íleo	Morfometria do epitélio intestinal
			Lavado intestinal	Pesquisa de IgA anti- <i>Salmonella</i> sp.

Anexo 3 – Protocolo de Isolamento de *Salmonella* sp. segundo Michael, Cardoso e Costa (2003).

Pré-enriquecimento da amostra

Para fezes, conteúdo cecal e órgãos:

Pesar 25 g da amostra, adicionar 225 mL de água peptonada tamponada e triturar no STOMACKER 260 rpm por 1 minuto e incubar a 37°C por 18-24 horas.

Enriquecimento seletivo

Pipetar 100µL da cultura pré-enriquecida e transferir para tubos de ensaio contendo 9,9mL de Caldo Rappaport Vassiliadis. Pipetar 1mL da cultura pré-enriquecida e transferir para tubos de ensaio contendo 9mL de caldo tetrationsato. Incubar em banho-maria a 42°C por 24 horas.

Isolamento e identificação de colônias

Semear aproximadamente 20mL ou uma alçada, da cultura submetida ao isolamento seletivo, em placas de Ágar VB e de Ágar XLT4 e incubar à 37°C por 24-48 horas.

Fazer a leitura prévia para identificação de colônias com morfologia compatível com *Salmonella* e manter as culturas em temperatura ambiente por mais 24h para a leitura definitiva.

Nota:

As colônias de *Salmonella* ficam de cor rosa claro com halo de cor vermelha no Ágar VB e incolores com um ponto central de cor preta em Ágar XLT4.

As colônias com morfologia compatível com *Salmonella* devem ser isoladas por inoculação em uma placa de Ágar VB ou XLT4. Confirmando-se as características morfo-fisiológicas, deve-se preparar culturas em Ágar TSA para provas de identificação antigênica e bioquímica.

Identificação morfo-fisiológica

Sorologia:

Suspender 3 colônias, obtidas por cultivo em Ágar TSA por 48h a 37°C, em 100mL de PBS. Sobre uma lâmina de vidro, mesclar 25µL de soro polivalente e 25µL da suspensão de colônias e homogeneizar movimentando a lâmina por dois minutos.

Interpretação:

A formação de grumos indica resultado positivo.

Ágar tríplice açúcar ferro (TSI):

A partir de uma colônia isolada em Ágar TSA, inocular o tubo de TSI, com uma agulha de platina, estriando a rampa e picando o fundo. Incubar a 37°C por 18 a 24h com as tampas desrosqueadas, para garantir a presença de oxigênio na rampa.

Interpretação:

O escurecimento do ágar no fundo dos tubos, indica produção de H₂S.

Bolhas, trincas ou deslocamento do ágar indicam produção de gás.

Viragem do indicador na rampa para vermelho (alcalino) e no fundo para amarelo (ácido) indicam que a bactéria é anaeróbia facultativa, fermenta glicose, não fermenta lactose e sacarose.

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela coloração amarela na base e vermelha na rampa, formação de gás e de H₂S.

Teste SIM

A partir de uma colônia isolada, inocular o tubo de SIM, com uma agulha de platina, picando o fundo. Colocar no interior do tubo, uma fita para indicação de indol, de forma que não atinja o ágar. Incubar a 37°C por 18-24h.

Interpretação:

A turvação do meio além da linha de inoculação indica motilidade positiva.

O escurecimento do ágar no fundo dos tubos, indica produção de H₂S positiva.

A formação de coloração rosa nas fitas de indol indica resultado positivo.

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela presença de motilidade, exceto para os sorovares Pullorum e Gallinarum, produção de H₂S e indol negativo.

Teste de fenilalanina desaminase

Inocular a cultura com a alça de platina em tubos com fenilalanina desaminase, estriando a rampa. Incubar a 37°C por 18 a 24h. Após a incubação, adicionar sobre a cultura de 4 a 5 gotas da solução de cloreto férrico, movimentando o reagente por toda a rampa. Aguardar por aproximadamente 5 minutos.

Interpretação:

O aparecimento de cor verde indica resultado positivo.

A não alteração da cor indica resultado negativo.

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela não alteração da cor.

Ágar Ferro Lisina (LIA)

A partir de uma colônia isolada em Ágar TSA, inocular o tubo de LIA, com uma agulha de platina, estriando a rampa e picando o fundo. Incubar a 37°C por 18 a 24h.

Interpretação:

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela coloração púrpura na base e na rampa, com produção de H₂S (base escura).

Ágar Citrato de Simmons

A partir de uma colônia isolada em Ágar TSA, inocular o tubo de citrato, com uma agulha de platina, estriando uma linha central na rampa. Incubar a 37°C por 18 a 24h.

Interpretação:

Alteração da coloração do meio para azul indica resultado positivo.

Para *Salmonella* a reação é variável de acordo com o sorovar.

ONPG

A partir de uma colônia isolada em Ágar TSA, inocular o tubo de ONPG, com uma alça de platina. Incubar a 37°C por 18 a 24h.

Interpretação:

A alteração da cor do meio para amarelo, indica resultado positivo.

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela não alteração da cor.

Caldo Uréia

A partir de uma colônia isolada em Ágar TSA, inocular o tubo com caldo uréia, com uma alça de platina. Incubar a 37°C por 18 a 24h.

Interpretação:

A alteração da cor do meio para rosa escuro, indica resultado positivo.

A reação típica de *Salmonella* caracteriza-se pela não alteração da cor.

Anexo 4 - Protocolo do Teste de ELISA

Impregnar placas DYNEX IMMULON 2 HB com 100 μ L, por cavidade, do antígeno diluído 1:1000 em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 – 0,05M. Deixar em repouso por 24 horas over-night a 4° C, a seguir congelar por, no mínimo, uma hora a – 70°C. No momento do uso, após o descongelamento em temperatura ambiente, lavar a placa 3 vezes por 3 minutos com tampão fosfato, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), pH 7,4. Diluir os soros 1:400 e os sucos de carne 1:30 em PBS-T contendo 1% de albumina bovina (PBS-TA). Adicionar em triplicata a placa teste. Incubar a placa contendo os soros a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Após lavar a placa novamente como descrito acima. Bater a placa sobre uma superfície macia e absorvente afim de retirar o máximo possível da solução de lavagem. Distribuir em cada cavidade 100 μ L do soro conjugado com peroxidase (Anti-pig) na diluição 1:3000 em PBS -TA. Incubar em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, lavar a placa e colocar 100 μ L do revelador por cavidade. Preparar o revelador no momento do uso, adicionando 100 μ L do substrato e 3,5 μ L de H₂O₂ e 230 μ L de NaOH 10N para cada 10 mL de tampão revelador (solução reveladora). Deixar por 15 minutos em temperatura ambiente. Bloquear a intensificação da cor com acréscimo de 50 μ L por cavidade de ácido sulfúrico 2M (H₂SO₄). Agitar levemente e ler em espectrofotômetro com filtro 450nm e DO correspondente (ICN -TiterteK Multiskan). A leitura é realizada no programa ELISUAVE com padrões já definidos e instalados na máquina (computador) Magitronic, patrimônio número 1205057 da Bacteriologia no Laboratório de Sanidade.

Anexo 5 - Percentual de presença e níveis descritivos de probabilidade do teste exato de Fisher para histopatologia, por tratamento nos órgãos coletados na necropsia de suínos inoculados via oral com *Salmonella Typhimurium* e alimentados com dieta basal (T1) ou dieta acrescida de ácidos orgânicos encapsulados (T2), ácidos orgânicos não-encapsulados (T3) ou mananoligossacarídeo (T4).

	T1	T2	T3	T4	p
LM edema	0,0	25,0	16,7	33,3	0,2904
LM hiperplasia	10,0 ab	33,3 ab	0,0 b	50,0 a	0,0121
LM infiltração de eosinófilos	0,0	33,3	33,3	16,7	0,1935
LM normal	50,0	41,7	58,3	41,7	0,9142
Amígdala material necrótico	100,0	100,0	100,0	100,0	
Baço normal	90,0	91,7	91,7	83,3	1,0000
Ceco infiltração linf	10,0	8,3	0,0	0,0	0,5826
Ceco infiltração de células mononucleares	100,0	100,0	100,0	100,0	
Ceco infiltração de células mononucleares (++ ou mais)	60,0	83,3	66,7	58,3	0,6137
Ceco foliculo linfoide	10,0	16,7	8,3	0,0	0,7194
Ceco foliculo infoide (++ ou mais)	10,0	8,3	0,0	0,0	0,5826
Colon infiltração células mononucleares	100,0	100,0	100,0	100,0	
Colon infiltração células mononucleares (++ ou mais)	90,0	83,3	75,0	83,3	0,9504
Colon foliculo linfoide	30,0	33,3	41,7	33,3	0,9743
Colon linfoide (++ ou mais)	0,0	16,7	8,3	25,0	0,4785
Fígado fibrose	50,0	16,7	25,0	16,7	0,2774
Fígado infiltração células mononucleares	30,0 ab	58,3 a	8,3 b	16,7 ab	0,0438
Fígado normal	40,0	16,7	33,3	50,0	0,3896
Fígado proliferação células biliares	40,0 ab	75,0 a	50,0 ab	16,7 b	0,0368

Ileo infiltração células mononucleares	10,0	8,3	8,3	8,3	1,0000
Ileo infiltração eosinófilos	100,0	100,0	91,7	100,0	1,0000
Pulmao pneumonia intersticial	100,0	66,7	66,7	83,3	0,6951
Reto infiltração células mononucleares	100,0	100,0	100,0	100,0	
Reto infiltração células mononucleares (++) ou mais)	80,0	83,3	66,7	83,3	0,7835
Reto foliculo linfoide	30,0	25,0	33,3	66,7	0,1804
Reto foliculo linfoide (++ ou mais)	20,0 ab	16,7 ab	0,0 b	58,3 a	0,0068