

Luciane Martins Borowsky

ADIÇÃO DE MANANOLIGOSSACARÍDEO À DIETA COMO ALTERNATIVA
PARA O CONTROLE DA INFECÇÃO POR *SALMONELLA* SP. EM LEITÕES
EM FASE DE CRECHE

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora Profa Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Co-orientadora Profa Dra. Gertrudes Corção

PORTO ALEGRE
2009

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

B736a Borowsky, Luciane Martins

Adição de mananligossacarídeo à dieta como alternativa para o controle da infecção por *Salmonella* sp. em leitões em fase de creche / Luciane Martins Borowsky. – 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof^a. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Co-orientação: Prof^a. Gertrudes Corção

1. *Salmonella* - patogenicidade 2. *Salmonella enterica* 3. Infecções por *Salmonella* 4. Prebióticos 5. Dieta 6. Suínos I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, orient. II. Corção, Gertrudes, co-orient. III. Título.

CDU 579.84 (043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

ADIÇÃO DE MANANOLIGOSSACARÍDEO À DIETA COMO ALTERNATIVA
PARA O CONTROLE DA INFECÇÃO POR *SALMONELLA* SP. EM LEITÕES
EM FASE DE CRECHE

Luciane Martins Borowsky
Médica veterinária (UFRGS)
Mestre em Microbiologia Ciências Veterinária (UFRGS)

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente na área de Microbiologia do Ambiente

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
AGOSTO, 2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à minha família, meus pais, Waldo e Tatiana e a minha irmã Cláudia, porque sem a ajuda deles eu nada conseguiria. Obrigado por poder sempre contar com vocês!

À professora Dra Marisa Cardoso, minha orientadora, pela paciência e dedicação e pelo imprescindível apoio, pelos ensinamentos valorosos e por toda sua ética.

À Dra Gertrudes Corção, minha co-orientadora.

À EMBRAPA SUÍNOS E AVES, pelo apoio na execução desse trabalho.

Aos colegas do laboratório da Preventiva, sempre prestativos.

À CAPES e a ALLTECH pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

ADIÇÃO DE MANANOLIGOSSACARÍDEO À DIETA COMO ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DA INFECÇÃO POR *SALMONELLA* SP. EM LEITÕES EM FASE DE CRECHE

Autor: Luciane Martins Borowsky

Orientador: Profa. Dra. Marisa Cardoso

¹ RESUMO

No controle da infecção por *Salmonella*, a correção de fatores de risco tem sido associada a medidas alternativas como a adição de prebióticos às dietas. O mananoligossacarídeo (MOS) é um carboidrato capaz de adsorver bactérias Gram-negativas que possuem fímbria tipo 1, essencial para a colonização do intestino. O presente estudo teve como objetivo: *i.* avaliar isolados de *Salmonella enterica* quanto à presença e expressão de fímbria tipo 1 e adsorção ao MOS; *ii.* avaliar em suínos o efeito do MOS no índice de infecção e excreção de *Salmonella*; na microbiota entérica e no título de IgA. Um total de 108 isolados de *Salmonella*, foi avaliado quanto à amplificação dos genes *fimA* e *fimH*, hemaglutinação manose-sensível e adsorção ao MOS. Em todos os isolados ambos os genes foram amplificados, 31 expressaram fímbria tipo 1 e, desses, 74,2% adsorveram fortemente ao MOS. Após, 23 suínos desmamados, alocados em grupo tratamento (com MOS) e controle, foram inoculados, com um isolado de *S. Typhimurium* capaz de adsorver ao MOS, e acompanhados por 28 dias. A quantidade de *Salmonella* excretada pelos suínos foi baixa, apresentando tendência de menores medianas no grupo tratamento. Não houve diferença significativa no número de infectados nem nas densidades óticas do ELISA IgG e IgA. As amostras de tonsila apresentaram o maior número de isolamentos. Contagens similares de lactobacilos, enterococos e coliformes foram encontradas nos dois grupos. Concluiu-se que a adição de MOS não impediu a infecção dos suínos por *Salmonella*, porém houve uma tendência de menor excreção no grupo tratado.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Molecular de Procaríotos e Eucariotos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (98p.) Agosto, 2009.

ADDITION OF MANANOLIGOSACCHARIDE TO THE DIET AS AN ALTERNATIVE FOR THE CONTROL OF *SALMONELLA* SP. INFECTION IN WEANED PIGLETS

Author: Luciane Martins Borowsky

Advisor: Dr. Marisa Cardoso

² ABSTRACT

In the control of *Salmonella* infection, correction of risk factors has been associated with alternative measures such as the addition of prebiotics to diets. Mannanoligosaccharide (MOS) is a complex carbohydrate, able to adsorb Gram-negative bacteria that possess type-1 fimbriae, essential for colonization of the intestine. This study aimed to: i, evaluate isolates of *Salmonella enterica*, the presence and expression of type-1 fimbriae, and agglutination with MOS; and ii, evaluate in pigs the effect of MOS on the rate of infection and excretion of *Salmonella*, and enteric microbiota and *Salmonella* IgA titers. A total of 108 strains of *Salmonella* sp. isolated from carrier pigs were evaluated for the amplification of *fimA* and *fimH* genes, agglutination with MOS and hemagglutination. In all strains tested, amplicons of the expected size were detected, 31 expressing type-1 fimbriae; and of these, 74.2% showed a strong agglutination to MOS. A total of 23 weaned pigs were allotted to a treatment group (with MOS) and a control group, were inoculated with a strain of *S. Typhimurium* able to adsorb to the MOS, and were evaluated for 28 days. The amount of *Salmonella* excreted by the pigs was low, showing a trend toward a lower median in the treated group. The ELISA IgG and IgA optical density of both groups showed no significant difference. In our study, the tonsils contributed to the highest rate of *Salmonella* isolation. The medians of coliforms, enterococci and lactobacilli were similar throughout the experiment in both groups. It was concluded that the addition of MOS did not affect the infection of pigs by *Salmonella*, although the excretion rate was lower in the treated group.

² Doctoral thesis in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (98p.) August, 2009

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 O gênero <i>Salmonella</i>	17
2.2 Patogenicidade de <i>Salmonella</i> sp.	20
2.2.1 Ilhas de patogenicidade	21
2.2.2 Plasmídeos	24
2.2.3 Toxinas	24
2.2.4 Flagelo.....	26
2.2.5 Fímbrias	26
2.3 A infecção por <i>Salmonella</i> sp. em suínos.....	28
2.4 Resposta imune do suíno à <i>Salmonella</i>	31
2.5 Controle de <i>Salmonella</i> sp. na cadeia produtiva de suínos.....	34
2.6 Microbiota intestinal e desmame de leitões.....	36
2.7 Prebióticos como alternativa ao uso de antimicrobianos.....	39
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	44
3.1 Artigo 1: Aglutinação do mananoligossacarídeo em amostras de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de suínos.....	46
3.2 Artigo 2: O efeito da dieta de mananoligossacarídeo na infecção por <i>Salmonella</i> e concentração de bactéria entéricas em suínos desafiados com uma baixa dose de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	63
4. DISCUSSÃO GERAL	80
5. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS.....	105
VITA	108

RELAÇÃO DE TABELAS

- Tabela 1 Artigo 1: Agglutination with mannanoligosaccharide (MOS) and hemmagglutination mannose sensitive in *Salmonella enterica* strains isolated from pigs. 58
- Tabela 1 Artigo 2: *Salmonella* quantification (cfu-g⁻¹)_ in the feces and *Salmonella* isolation from organs of pigs fed antibiotic-free diets (control) and diets supplemented with mannanoligosaccharide (MOS, 4.0 ppm for 21-d until 35-d pigs, followed by 2.0 ppm until 49-days of age) and challenged with 10³ cfu *Salmonella* Typhimurium. 77
- Tabela 2 Artigo 2: Median of coliforms, enterococci and lactobacilli counts (log₁₀ cfu-g⁻¹) in the feces of pigs fed antibiotic-free diets (control) and diets supplemented with mannanoligosaccharide (MOS, 4.0 ppm for 21-d until 35-d pigs, followed by 2.0 ppm until 49-days of age) and challenged with 10³ cfu *Salmonella* Typhimurium. Values with different letters are different (Mann-Whitney non parametric test, P<0.05) 78

RELAÇÃO DE FIGURAS

- Figura 1 Artigo 1: PCR multiplex amplicons (311bp *fimH* e 84 bp *fimA*) in 1.2% agarose: 100 pb molecular weight (M); negative control (N); *Salmonella* Typhimurium (1); *Salmonella* Bredeney (2)..... 59
- Figura 1 Artigo 2: Box-plot of the Optical Density on the ELISA-IgG test of serum samples taken from pigs fed antibiotic-free diets (control) and diets supplemented with mannanoligosaccharide (MOS, 4.0 ppm for 21-d until 35-d pigs, followed by 2.0 ppm until 49-days of age), before and after challenging with 10^3 cfu *Salmonella* Typhimurium. 79

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
°	grau
°C	grau Celsius
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain heart Infusion</i>
bp	<i>base pair</i>
CFA	<i>Clumping Factor Agar</i>
CFU	<i>Colony Forming Unity</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
g	grama
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio
Kb	kilobase
L	litro
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
MOS	Mananoligossacarídeo
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
MPN	Most Probable Number
ng	nanograma
pb	pares de bases
OD	<i>optical density</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
p.i	pos inoculation
ppm	<i>part per million</i>
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Islands</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
V	volt
µg	micrograma
µl	microlitro

1. INTRODUÇÃO

Logo após o nascimento, as superfícies e mucosas dos animais, que, em condições fetais, são estéreis, rapidamente sofrem colonização por diversos microrganismos, tanto benéficos quanto nocivos. A microbiota desejável auxilia na digestão e absorção de nutrientes, produz vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e diminui, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos. A microbiota nociva pode causar inflamação da mucosa intestinal, gerar metabólitos tóxicos e determinar a ocorrência de enfermidades. Em condições normais, estas populações encontram-se em equilíbrio. No entanto, em condições de estresse (mudança da dieta, alterações climáticas, densidade elevada, ventilação deficiente ou qualquer outra situação desfavorável), as populações desejáveis diminuem e as nocivas proliferam, o que se reflete negativamente sobre a saúde e o desempenho animal.

Uma nutrição adequada pode ser responsável pela estabilidade da microbiota intestinal, o que promove a saúde e o crescimento do animal. Quando se tem um ecossistema estável, não há o favorecimento da multiplicação de microrganismos patogênicos. Entretanto, a intensificação dos sistemas de produção animal propicia o aumento do estresse e a elevada concentração de

animais oferecendo risco cada vez maior de disseminação de agentes patogênicos e instalação de processos mórbidos.

A manutenção da microbiota desejável tem sido há algum tempo obtida com o uso de promotores de crescimento, os quais reduzem os microrganismos considerados indesejáveis e proporcionam um meio favorável para aqueles considerados desejáveis. Fatores como o aparecimento de microrganismos resistentes pelo uso de promotores de crescimento antibióticos tem se tornado frequente, determinando medidas severas por parte das autoridades governamentais da Comunidade Européia e de outros países. Setores da saúde pública do Brasil também têm se manifestado contra os antibióticos e a sua proibição em rações é iminente, seguindo a tendência mundial e obedecendo às normas internacionais para a ausência completa dos promotores de crescimento, ocorrido em 2006.

Os transtornos entéricos dos animais associados à proibição do uso de promotores de crescimento levaram os pesquisadores a desenvolver alternativas, dentre elas o uso de cultura de microrganismos desejáveis, que colonizem o tubo digestivo, associada a fatores que favoreçam a multiplicação dos mesmos, proporcionando uma condição de equilíbrio. Os microrganismos capazes de se multiplicar e se adaptar rapidamente ao meio intestinal da maioria dos animais e, ainda, mudam a proliferação daqueles considerados indesejáveis, são pertencentes ao grupo dos probióticos e os agentes que favorecem à instalação desses microrganismos no meio intestinal são os prebióticos.

Os prebióticos são produtos naturais, estabilizantes da microbiota intestinal, agindo como melhoradores da saúde animal. Segundo as empresas que

comercializam esses produtos, há o aumento do aproveitamento das proteínas, aminoácidos e energia da dieta; melhoria da atividade da fitase bacteriana; redução da mortalidade embrionária e melhor conversão alimentar.

O produto mais utilizado desse grupo é o mananoligossacarídeo (MOS). O MOS é um carboidrato derivado da parede celular externa de uma levedura, a *Saccharomyces cerevisiae*. Sua ação se explica pela interferência com a aderência de bactérias Gram-negativas que utilizam lectinas, presente nas fímbrias aderentes à manose (fenômeno de adsorção). Em vez de aderir aos receptores presentes nas células do trato gastrointestinal, as bactérias aderem aos receptores do MOS. Este processo de adsorção é observado entre bactérias portadoras de fímbrias do tipo I e o MOS, devido à capacidade de ligação destas fímbrias à D-manose presente no MOS.

As fímbrias são estruturas filamentosas na superfície bacteriana que são compostos por um arranjo helicoidal de proteínas repetidas, possuem um papel importante na adesão e na invasão da bactéria nas células epiteliais intestinais e sua presença na superfície de uma bactéria facilita a aderência com a superfície mucosa do hospedeiro, sendo este um passo inicial crítico no processo infeccioso. Com base na sua atividade hemaglutinante (habilidade de promover aglutinação de hemácias) são classificadas em fímbrias não hemaglutinantes, fímbrias hemaglutinantes manose sensíveis (hemaglutinação inibida pela presença da manose) /e fímbrias hemaglutinantes manose resistentes (hemaglutinação não é inibida pela presença da manose). A fímbria tipo I, uma das mais presentes, é um importante determinante de virulência expresso em *E. coli* e na maioria das cepas de enterobactérias. Em relação à *Salmonella* sp., as

fimbrias tipo I são codificadas pelos genes cromossomais *fimA* e *fimH* e são igualmente apontadas como fundamentais para o processo de colonização.

A suinocultura brasileira, a exemplo de outras cadeias produtivas do agronegócio, cresceu significativamente, nos últimos quatorze anos. Esse crescimento é notado quando são analisados os vários indicadores econômicos e sociais, como volume de exportações, participação no mercado mundial, número de empregos diretos e indiretos, entre outros. O mercado interno da carne suína tem se mantido constante, porém a exportação aumentou 4,56% desde 2000, atingindo 551.032 mil toneladas entre junho de 2008 e maio de 2009, com faturamento de 1.398.716 bilhão de dólares, permitindo ao Brasil ser o quinto produtor mundial.

A tendência das empresas produtoras de suínos brasileiras é a crescente preocupação com o controle da infecção por *Salmonella* sp. em seus rebanhos, pois as atuais relações com o mercado passam a exigir esta medida. O controle e monitoramento deste agente em diferentes rebanhos passam por etapas de avaliação do problema nos matadouros frigoríficos e da fase crítica de infecção no campo, sendo necessárias medidas conjuntas.

A atual situação no sul do Brasil demonstra uma alta prevalência de *Salmonella* sp. em amostras de fezes e linfonodos, em animais abatidos; bem como produtos de origem suína, como massa de embutido, cortes de pernil e amostras de lingüiça frescal. Em relação ao momento de infecção dos animais, *Salmonella* sp. pode estar presente em todas as fases de produção. A fase de terminação tem sido identificada como a mais importante para a transmissão e

amplificação da infecção por *Salmonella* sp. nos rebanhos suínos, entretanto a fase de creche também tem sido demonstrada como de importância em algumas agroindústrias.

A desmama, que ocorre no período de 14 a 28 dias de idade, é um grande desafio aos leitões. Normalmente, há queda do desempenho nos dias posteriores a este evento, devido à perda do contato com a mãe, adaptação à dieta sólida, mudança do ambiente e maior desafio imunológico. Após a desmama há queda na população de bactérias lácticas e aumento da população de *E. coli* e de outros microrganismos patógenos oportunistas. Essa fase representa, também, o primeiro momento crítico para a transmissão de *Salmonella* sp. na cadeia de produção de suínos.

A partir dessas observações, estudos avaliando alternativas, que podem ser associadas a programas de controle a serem estabelecidos nas agroindústrias, vêm sendo propostos. O presente estudo é o primeiro de uma série de experimentos que estão sendo conduzidos dentro de projeto em parceria do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e a Embrapa Suínos e Aves e teve como objetivos:

1. Avaliar isolados de *Salmonella enterica*, quanto: *i.* expressão de fímbrias tipo I por meio do teste de hemaglutinação; *ii.* capacidade de adsorção ao mananoligossacarídeo; *iii.* presença do gene *fimA* e *fimH* que codificam a fímbria tipo I.

2. Avaliar em suínos, na fase de creche, tratados com MOS via ração e infectados artificialmente com *Salmonella* Typhimurium: *i.* a excreção fecal de

Salmonella; ii. a presença de *Salmonella* em linfonodos mesentéricos, tonsilas, conteúdo intestinal, baço e fígado; iii. a população de lactobacilos, enterococos e enterobactérias presente no intestino; iv. a resposta de IgG sérica e IgA de mucosa anti-*Salmonella*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, móveis por flagelos peritríquios, com exceção dos sorotipos Gallinarum e Pullorum (Wilcock & Schwartz, 1993). Fermentam a glicose, mas geralmente não utilizam a lactose nem a sacarose (Clarke & Gyles, 1993). São indol e oxidase negativos, catalase positivos, produzem gás sulfídrico, são urease negativos, descarboxilam a lisina e ornitina e são negativos para o teste de orto nitrofenil β -galactosidase (ONPG) (Holt et al., 1994).

Salmonella sp. apresenta crescimento ótimo a 35°-37°C e em pH 6,5-7,5, entretanto são conhecidas cepas adaptadas à variação maior de pH (4,5 a 9,5) e temperatura (2°C a 54°C). Sobrevive ao congelamento por longos períodos e não compete bem com microrganismos contaminantes presentes em alimentos (D'Aoust, 1997).

O gênero *Salmonella* está dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (Brenner et al., 2000). Mais recentemente, foi proposta a inclusão de uma terceira espécie *S. subterranea* (Shelobolina et al., 2004). *S. enterica* é dividida em

seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. Apesar de ser dividida em espécies como os demais gêneros bacterianos, é a classificação antigênica (antígenos: somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) que determina e denomina os diferentes sorovares (Brenner et al., 2000). Já foram identificados aproximadamente 2.557 sorovares de *S. enterica* e 22 de *S. bongori* (Grimont & Weill, 2007).

Entre os inúmeros sorovares, encontram-se alguns causadores de doenças septicêmicas em animais, como por exemplo, *S. Gallinarum* e *S. Choleraesuis*, respectivamente para aves e suínos; ou em humanos (*S. Typhi*) (Sobestiansky et al, 1999; Schwartz, 2000). Entretanto, a maioria dos sorovares está associada com infecções subclínicas ou com quadros de gastrinterite em animais e humanos. Estima-se que cerca de 150 sorovares estejam envolvidos em casos de gastrinterite em humanos, geralmente associados com infecções transmitidas por alimentos (Edwards et al., 2002). Em vários países, inclusive no Brasil, o sorovar Enteritidis tem sido o mais prevalente nos surtos de salmonelose transmitida por alimentos, sendo os alimentos que contém ovos os mais implicados nesses casos (Herikstadt et al., 2002; Geimba et al., 2004; Hughes et al., 2007).

Nos Estados Unidos, são estimados 76 milhões de casos e mais de 5.000 mortes por ano causadas por doenças transmitidas por alimentos, estando as infecções causadas por *Salmonella* sp. entre as mais prevalentes (Mead et al., 1999). Conforme Hald & Wegener (1999), entre os casos de infecção por *Salmonella* em humanos, 40-45% são provenientes do consumo de ovos e 10-

15% de produtos suínos. Modelos estatísticos americanos têm previsto cerca de 100.000 novos casos anuais de salmonelose associada ao consumo de produtos suínos nos Estados Unidos, representando um custo de aproximadamente US\$ 80 milhões para a sociedade (Miller et al., 2005). Alguns surtos, como o ocorrido na Dinamarca em 1993, envolvendo 550 pessoas, causado pelo consumo de carne suína contaminada por *S. Infantis*, desencadearam o interesse pela cadeia de transmissão dessa bactéria na suinocultura e culminaram com a implantação de programas de controle de *Salmonella* sp. mundialmente (Wegener & Baggesen, 1996). Na mesma época, Maguire et al. (1993) relataram um surto de infecção humana causada por *S. Typhimurium*, afetando 206 indivíduos na Dinamarca, em que a fonte de infecção foi novamente relacionada à ingestão de carne suína. Mais recentemente, a implicação de produtos de origem suína nos surtos de salmonelose na Alemanha foi analisada, sendo descrita, inclusive, a ocorrência de óbitos (Jansen et al., 2007).

A partir disso, a possibilidade de contaminação dos produtos suínos por *Salmonella* sp., e os riscos associados a este fato, tornaram-se melhor conhecidos por parte dos consumidores, gerando uma maior expectativa de controle. A tendência é o surgimento de demanda quanto à comprovação de controle de *Salmonella* sp. ou, pelo menos, do estabelecimento de programas de monitoramento e controle, como pré-requisito para produtores que desejem ser competitivos no mercado da suinocultura mundial.

2.2 Patogenicidade de *Salmonella* sp.

As fases de infecção por *Salmonella* sp. compreendem a colonização, a invasão e a multiplicação bacteriana. Após a ingestão, a primeira barreira a ser enfrentada é o baixo pH do estômago, entretanto foi demonstrado que *Salmonella* sp. pode adaptar-se e sobreviver em ambientes ácidos (Smith, 2003; Berk et al., 2005), possibilitando a essa bactéria a passagem pelo estômago. A seguir, alcançam o intestino delgado onde se encontram outras substâncias antibacterianas, incluindo elementos como sais biliares, lisozima e defensinas. Existe uma alta concentração de sais biliares na parte superior do intestino delgado, o que poderia explicar a razão de *Salmonella* sp. colonizar preferencialmente o íleo (Boyen et al., 2008).

A colonização da porção distal do intestino delgado (íleo) e do cólon é a etapa inicial na patogenia da salmonelose. Fatores que desequilibram a microbiota normal tais como terapia com antimicrobianos; dietas e privação de água aumentam a susceptibilidade do hospedeiro à salmonelose entérica e septicêmica (Santos et al., 2003; Cegeslky et al., 2008).

Após a etapa de colonização, a bactéria invade a célula epitelial da porção apical das vilosidades ou penetra através das células M, localizadas na Placa de Peyer. Para a invasão das células epiteliais, *Salmonella* sp. produz moléculas sinalizadoras que desencadeiam alterações no citoesqueleto da célula hospedeira, induzindo a formação de projeções que englobam a bactéria e a internalizam em fagossomos. Já no caso de células M, após a fagocitose, as bactérias são transportadas para os macrófagos presentes na Placa de Peyer, nos quais também permanecem dentro dos fagossomos. A partir daí, as bactérias

podem multiplicar e infectar as células adjacentes, chegar até a lâmina própria e serem transportadas até linfonodos regionais (Ohl & Miller, 2001; Schauzer et al., 2004; Boyen et al., 2008).

A proliferação na lâmina própria da mucosa intestinal resulta mais comumente em enterocolite, sem invasão da corrente sanguínea. Quando há infecção sistêmica, após a invasão dos linfonodos mesentéricos, as bactérias alcançam fígado e baço e, posteriormente, outros órgãos (Boyen et al., 2008).

A resposta inflamatória que ocorre na mucosa intestinal é um importante fator desencadeante do extravasamento de fluido para o lúmen intestinal. Prostaglandinas são liberadas como resultado dessa resposta, ativando a adenilato ciclase que ocasiona grande secreção de água, bicarbonatos e cloretos para o lúmen intestinal. A resposta inflamatória também induz a liberação de substâncias vasoativas que, por sua vez, aumentam a permeabilidade dos vasos da mucosa intestinal levando-os à excreção de fluidos (Darwin & Miller, 1999).

2.2.1 Ilhas de Patogenicidade

A maioria dos genes de virulência de *Salmonella* sp. está agrupada em regiões distribuídas no cromossomo, chamadas Ilhas de Patogenicidade (Salmonella Pathogenicity Islands-SPI). Atualmente, são conhecidas doze ilhas de patogenicidade (SPI-1/10), além da “*Salmonella* Genomic Island 1”(SGI-1) e da “High Pathogenicity Island” (HPI). Algumas das SPI são conservadas ao longo de todo o gênero *Salmonella*, enquanto outras são específicas para determinados sorovares.

A SPI-1 compreende genes necessários para a invasão das células epiteliais intestinais, indução da resposta secretória e inflamatória intestinal e para o sistema de secreção tipo III, que compreendem proteínas responsáveis pelo rearranjo do citoesqueleto da célula hospedeira, o chamado “ruffling”. Recentemente, foi demonstrado que genes codificados na SPI-1 são cruciais para a colonização do intestino e da região denominada de tecido linfóide associado (GALT – *gut associated lymphoid tissue*). SPI-1 está presente em *S. bongori* e em todas as subespécies e sorovares de *S. enterica* analisadas até o momento (Hensel, 2004; Altier, 2005).

A SPI -2 também inclui genes que codificam o sistema de secreção tipo III, porém está mais relacionada com a multiplicação intracelular da bactéria nas células epiteliais e sobrevivência nos macrófagos. A SPI-3 abriga o gene *mgtC*, que é requerido para sobrevivência dentro de macrófagos, virulência em ratos e crescimento em ambiente com baixo nível de Magnésio e pH (Hensel, 2004).

Os genes codificados por SPI-4 também são necessários para a sobrevivência no interior de macrófagos e podem codificar o sistema de secreção tipo I (TSS1), o qual media a secreção de toxinas induzindo apoptose de macrófagos infectados, além de uma adesina não fimbriada, a SiiE que auxilia a entrada da bactéria no epitélio intestinal. SPI-4 parece ser conservada entre os vários sorovares de *S. enterica*, no entanto, a comparação das seqüências do genoma revelou diferenças na organização da SPI-4 nos sorovares Typhi e Typhimurium. Além disso, estudos recentes demonstram a cooperação entre a SPI1 e SPI4, onde genes são expressos numa mesma fase de interação

patógeno-hospedeiro, ou seja, tanto SPI1 e SPI4 são necessárias para a entrada da *Salmonella* sp. nas células epiteliais (Gerlach et al., 2008).

A função dos genes da SPI-5 está principalmente associada com salmonelose entérica e não sistêmica. A SPI-5 abrange seis genes, incluindo o *sopB*, que é translocado para o citosol da célula hospedeira aonde é mediada a inflamação e secreção na mucosa intestinal. O *sopA* também influencia a resposta inflamatória da mucosa intestinal, porém através de um mecanismo distinto, induzindo a migração transepitelial de neutrófilos. A SPI-6 é uma região que foi descoberta ao ser feito o sequenciamento completo do genoma de *Salmonella* Typhi CT18, e que codifica os operons fimbriais *saf* e *tcf*. Os outros componentes das Ilhas de patogenicidade incluem: SPI-7 que codifica o operon *pil* envolvido na produção de fimbria; SPI-8 que codifica genes que conferem resistência a bacteriocinas; SPI-9 que inclui genes envolvidos no sistema de secreção tipo I (toxinas); e a SPI-10 que inclui o operon fimbrial *sef* (*Salmonella* Enteritidis fimbriae)(Marcus et al.; 2000; Ohl & Miller, 2001; Van Asten & Dijk, 2005).

O aparecimento de cepas multi-resistentes é atualmente uma preocupação relacionada com as infecções por *Salmonella*. A caracterização de fatores de resistência levou à identificação de uma ilha genômica em amostras multi-resistentes de *S. Typhimurium* DT 104, *S. Paratyphimurium* B e *S. Agona*. Essa ilha foi denominada *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI-1), e inclui genes que conferem o fenótipo de penta-resistência (tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e sulfonamidas) encontrada em *S. Typhimurium* DT104. Variantes do SGI-1 foram identificados em outros sorovares, indicando transferência horizontal e recombinação (Hensel, 2004).

A High Pathogenicity Island (HPI) é uma ilha de patogenicidade típica, que foi inicialmente identificada e caracterizada em detalhe em isolados de *Yersinia enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* de alta virulência (Schubert et al. 2004). A HPI codifica a biossíntese de sideróforo, o qual auxilia o sistema de absorção de ferro e sua presença parece estar correlacionada com a capacidade das amostras de causar infecções sistêmicas (Oelschlaeger et al., 2003).

2.2.2 Plasmídeos

A maioria das amostras de *Salmonella* sp., apresenta plasmídeos de virulência que carregam o *locus spv* (Salmonella plasmid virulence). Esse *locus* é composto por cinco genes designados *spv RABCD*. O produto do *spvR* é uma proteína regulatória essencial para a expressão dos outros genes *spv*. O principal gene de virulência nesse operon é o gene *spvB*, responsável pela capacidade da bactéria de desestabilizar o citoesqueleto da célula eucariótica através da liberação de actina ADP- ribosil. A expressão dos genes *spv* ocorre durante a infecção intracelular nos macrófagos e durante crescimento exponencial em meio que mimetize o ambiente intracelular.

Ainda em *S. Typhimurim* encontra-se o gene plasmidial, *pef* (plasmid encoded fimbriae), que está envolvido na ligação e multiplicação no epitélio intestinal (Olsen et al. 2004; Van Asten & Dijk, 2005).

2.2.3. Toxinas

Salmonella apresenta, como todos os membros da família Enterobacteriaceae, endotoxina, composta de lipídeo A, componente do lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é parte da membrana externa da parede bacteriana, é uma molécula complexa dividida em três regiões. O lipídeo A, que é

a porção tóxica, consiste da ligação de fosfato, glicosamida e ácidos graxos; a porção central (*core*); e a porção antigênica composta de cadeia de polissacarídeos que se estende da porção central para a parte externa do LPS. Sua composição de açúcares e o seu arranjo varia entre as sub-espécies da bactéria (Van Asten & Dijk, 2005). A ação das endotoxinas ocorre quando as bactérias gram-negativas são fagocitadas e lisadas, sendo o LPS da parede celular bacteriana liberado. Essa endotoxina induz a formação de interleucina-1 (IL-1) pelo macrófago que desencadeia uma série de efeitos sobre a resposta inflamatória e o sistema de coagulação do indivíduo infectado (Tortora, 1993).

Exotoxinas como mecanismo de patogenicidade em *Salmonella* sp. foram propostas em alguns estudos conduzidos no passado. Enterotoxinas codificadas pelo gene *stn* (Chary et al., 1993) foram identificadas por Prager et al. (1995) nos sorovares Typhimurium, Enteritidis, Dublin e Typhi. Ashkenazi et al. (1988) relataram ter identificado toxinas Shiga-like em isolados dos sorovares Cholerasuis, Enteritidis e Typhi. Ainda um terceiro tipo de toxina, a salmolisina, codificada pelo gene *slyA*, foi identificada em isolados clínicos de *Salmonella* (Libby et al., 1994). Entretanto, estudos recentes apontam apenas em *S. Typhi* a presença de exotoxinas que contribuiriam de forma expressiva para a ação patogênica. Essa exotoxina, denominada toxina tifóide, seria excretada pela bactéria em seu sítio de multiplicação, sendo transportada por via parácrina até as células alvo, onde exerceria seu efeito. Um dos efeitos propostos para essa toxina seria a imunomodulação, permitindo que o estado de portador fosse estabelecido (Spanó & Galan, 2008).

2.2.4 Flagelo

A motilidade pode ser considerada um fator de patogenicidade, por aumentar a oportunidade da bactéria em entrar em contato com a célula epitelial, interagindo com a superfície da célula bacteriana, além de poder ser utilizada para o escape do sistema de defesa do hospedeiro (Macnab, 1996). O flagelo bacteriano é composto de proteínas chamadas flagelinas. Em *Salmonella*, existe uma variação nas fases em que as proteínas flagelares são expressas. A chamada fase 1 é codificada pelo gene *fliC*, enquanto o gene *fljB* é responsável pela fase 2. As duas fases estão presentes na maioria dos sorovares flagelados de *Salmonella*. Segundo Dauga et al. (1998), o gene *fliC* está presente tanto no sorovar Pullorum quanto em *S. Gallinarum*, enquanto que o gene *fljB* não foi detectado nestes dois sorovares. A partir disso, os autores propuseram que é necessária a presença de ambos genes para que a bactéria apresente motilidade.

2.2.5 Fímbrias

A interação física entre o patógeno e o hospedeiro é essencial para a patogênese de praticamente todas as doenças bacterianas. Estruturas específicas chamadas fímbrias mediam a ligação entre o patógeno e a superfície da célula hospedeira, dando início à colonização. A presença de fímbrias permite que a bactéria se fixe à superfície dos enterócitos o que facilita sua penetração (Althouse, 2003). É sabido que este contato ocorre com um certo grau de especificidade para determinadas células, uma vez que são estruturas especializadas na superfície celular do patógeno que reconhecem receptores específicos na célula hospedeira e ligam-se a eles (Soto & Hultgren, 1999).

A fímbria tipo I foi a primeira fímbria a ser identificada pela sua habilidade de aglutinar eritrócitos. Essa aglutinação é inibida pela presença de manose, e, por isso, essas fímbrias foram denominadas manose-sensível (Podshun & Ullman, 1998). A fímbria tipo I foi identificada na maioria das bactérias Gram negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.* e *Vibrio cholerae* (Olesen et al., 1995).

Um segundo grupo é constituído pelas fímbrias manose-resistentes, as quais aglutinam eritrócitos mesmo na presença de manose. Dentre as fímbrias manose-resistentes, encontram-se as fímbrias P, importantes na colonização e persistência das bactérias no trato urinário, ligando-se especificamente ao carboidrato α -D galactose β -D galactose (Finlay & Caparon, 1999).

As fímbrias tipo II são similares às fímbrias tipo I, mas não são adesivas. As fímbrias tipo III são manose-resistentes, porém só aglutinam hemácias quando pré-tratadas com ácido tânico. Dois tipos de fímbrias tem sido classificadas como fímbria tipo IV, o primeiro tipo foi inicialmente identificado em *Proteus sp.*, ocasionando hemaglutinação manose-resistente, mas pertencendo a um grupo antígenicamente diferente da fímbria tipo I. Subseqüentemente, um diferente tipo de fímbria, também chamado fímbria IV foi identificada em *Pseudomas aeruginosa* (Edward & Puente, 1998).

Salmonella Typhimurim apresenta diversos genes que codificam diferentes tipos de fímbrias, entre eles o *lpf* (long polar fimbriae) que codificam fímbrias que se ligam às células M nas Placas de Peyer, o *pef* (plasmid encoded fimbriae) que está envolvido na ligação ao epitélio intestinal, o *fim* que codifica

para a fímbria tipo I, e o *agf* envolvido na síntese de um fino agregado de fimbrias, denominado “curli” (Van Asten & Dijk , 2005).

Embora várias fimbrias já tenham sido descritas em *S. Typhimurium* ,somente as fimbrias tipo 1 comprovadamente contribuem para a fixação em enterócitos e para a colonização do intestino (Althouse et al., 2003). A fímbria tipo 1 é composta primariamente de subunidades protéicas denominadas FimA, codificada pelo gene *fimA*. Entretanto, é outra subunidade, denominada FimH, que representa a lectina fimbrial, indispensável pela ligação ao epitélio (Knight et al., 2000).

2.3 A infecção por *Salmonella* sp. em suínos

Duas preocupações estão relacionadas com a infecção por *Salmonella* sp. em suínos: uma, com a manifestação clínica nesta espécie e outra, pela presença desse agente em carcaças e produtos que podem levar a toxinfecções em humanos (Ekperigin & Nagajara, 1998). Os animais portadores de sorovares de *Salmonella* que comumente não causam infecção clínica em suínos, são os mais importantes do ponto de vista da saúde pública, pois são as principais fontes de contaminação das carcaças nos abatedouros e passam despercebidos enquanto os animais estão na granja. A contaminação por *Salmonella* sp., por sua vez, possui um grande potencial de amplificação ao longo da cadeia produtiva, uma vez que animais portadores contaminam o lote, os companheiros de transporte ao abate e os novos grupos de animais no local de espera no abatedouro (Rostagno et al., 2003).

A salmonelose pode apresentar-se clinicamente nos animais na forma entérica (localizada) com diarreia ou na forma generalizada, afetando vários sistemas, resultado de septicemia. Os sorovares normalmente associados são o Typhimurium para as enterites e o Cholerasuis para as septicemias. No caso dos demais sorovares, o animal infectado pode ou não desenvolver sintomas clínicos da doença, entretanto o estado de portador e conseqüente disseminador da bactéria é a forma mais importante de manutenção do agente nos rebanhos e de sua entrada nos frigoríficos (Schwartz, 2000).

Existem animais que podem excretar *Salmonella* sp. por meses ou anos nas fezes após a recuperação da doença (portadores ativos). Outros ingerem o microrganismo que passa pelo intestino com pouca ou nenhuma invasão para os linfonodos mesentéricos (portadores passivos) e, finalmente existem os animais que apresentam *Salmonella* sp. em seus tecidos, mas geralmente não excretam o microrganismo nas fezes, ou o fazem de forma intermitente (portadores latentes) (Clarke & Gyles, 1993).

A infecção por *Salmonella* pode ocorrer em qualquer fase da produção de suínos, porém observa-se que as fases mais críticas tendem a ocorrer após o desmame, observando-se uma amplificação do problema ao longo da fase de crescimento e terminação (Lo Fo Wong et al., 2004). A mistura de lotes de diferentes origens ao longo das fases zootécnicas, a qualidade das instalações e do manejo e o tipo de ração oferecida aos animais são alguns dos fatores de risco que podem contribuir para o aumento de animais que chegam portadores ao abate. A presença de animais portadores no pré-abate amplifica o número de

animais positivos no trato gastrintestinal e incrementa o risco de contaminação da carcaça (Funk et al., 2001; Swanenburg et al., 2001; Lo Fo Wong et al., 2004; Vieira-Pinto et al., 2006).

Em relação à situação no Brasil, Bessa et al. (2004) verificaram cerca de 60% de suínos abatidos sob Inspeção Federal no Rio Grande do Sul com amostras de fezes ou linfonodos positivas para *Salmonella* sp. No mesmo estado, Castagna et al. (2004) encontraram uma prevalência média de 83,3% de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate, enquanto que 93,94% das amostras de massa de embutimento produzidas com a matéria-prima proveniente desses animais foram positivas. Lima et al. (2004) isolaram *Salmonella* da superfície de 11,4% de carcaças suínas amostradas em Minas Gerais. Kich et al. (2005) identificaram uma prevalência de anticorpos anti-*Salmonella* de 57,6% em suínos uma semana antes do abate em granjas do sul do Brasil.

Em produtos de origem suína disponíveis no comércio, 24% de amostras de lingüiça frescal de carne suína adquiridas em estabelecimentos comerciais de Porto Alegre tinham a presença de *Salmonella* sp. (Mürmann et al., 2009). Em Lages, observou-se presença da bactéria em 12,8% do mesmo tipo de produto exposto no comércio (Spricigo et al., 2008).

Em relação ao momento de infecção dos animais, estudos conduzidos no sul do Brasil identificaram a fase de terminação como a mais importante para a transmissão e amplificação da infecção por *Salmonella* sp. nos rebanhos suínos (Silva et al., 2006; Schwarz et al., 2006), entretanto a fase de creche também tem sido demonstrada como de importância em certas agroindústrias (Kich et al., 2006).

2.4 Resposta imune do suíno à *Salmonella*

De acordo com o nível de resistência do hospedeiro e da virulência da cepa bacteriana, uma infecção prolongada por *Salmonella* sp. pode ocorrer no suíno. Após a invasão da lâmina própria, a migração de macrófagos inflamatórios ocorre, levando à formação de granuloma e à produção de diferentes linfocinas. No interior das células fagocíticas, oxigênio e nitrogênio reativos são produzidos para destruição da bactéria. Num estágio posterior da infecção, células TCD4+ terão um papel fundamental na eliminação de *Salmonella* do sistema retículo-endotelial. Durante o curso da infecção, haverá a indução da produção de anticorpos contra o LPS e antígenos protéicos, paralelamente à resposta imune celular e ao desenvolvimento de memória imunológica (Mastroeni et al., 2000). Estudos demonstram que a interação da resposta humoral e celular é fundamental na formação de imunidade à salmonelose (Mittrucker et al., 2000).

A soroconversão é considerada uma medida da resposta imune ativa contra *Salmonella* e a produção de anticorpos pode ser medida em várias espécies, inclusive o suíno (Nielsen et al., 1995; Mastroeni et al., 2000). A resposta humoral pode ser observada após uma semana de inoculação e a reinfecção resulta num rápido aumento no título de anticorpos. A classe IgM aparece precocemente após a infecção, sendo seguida da elevação de títulos de IgG sérica (Lindberg et al., 1993). Os anticorpos contra *Salmonella* estão presentes no soro dos animais expostos ao ambiente contaminado ou, passivamente, pela transferência dos anticorpos maternos via colostro (Clarke & Gyles, 1993).

A produção de IgA sérica e de mucosa pode ser induzida tanto no intestino de animais que se recuperaram da doença, como pela imunização com vacinas vivas ou por bacterinas (Mastroeni et al., 2000). Estes anticorpos no intestino constituem a primeira linha de defesa específica, interferindo na aderência e invasão das células epiteliais pela bactéria (Clarke & Gyles, 2003).

A prevalência de *Salmonella* no rebanho pode ser medida por testes sorológicos (Van Der Gaag et al., 2003), e pode ser avaliada em grupos de animais de diferentes idades (Stege et al., 2000). As amostragens podem focar nos rebanhos que produzem animais para o abate ou nos rebanhos que distribuem fêmeas e leitões para outras granjas, e que podem contribuir para a disseminação de *Salmonella* (Sandberg et al., 2002).

A sorologia usando o teste de ELISA, conforme descrito por Nielsen, B. et al. (1995), tem sido adotada como ferramenta de implementação de programas de controle de *Salmonella* sp. Os ensaios imunoenzimáticos utilizam as propriedades de duas moléculas, o anticorpo e a enzima. O anticorpo reconhece e se liga a antígenos específicos, e a enzima é catalizadora de reações químicas, podendo ser detectada pela adição de substrato. A estratégia do ensaio é conjugar uma enzima apropriada a um anticorpo reagente e, através da adição de substrato, determinar o produto da reação. Se houver anticorpos no soro em teste, ocorrerá a ligação antígeno-anticorpo, que posteriormente é detectada pela adição de um segundo anticorpo dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde se busca detectar os anticorpos (IgG de suíno, no caso), a qual é ligada à peroxidase. Este anticorpo anti-IgG, ligado à enzima denomina-se conjugado. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima (por exemplo, H₂O₂ dissolvida

em uma substância química que proporciona uma reação colorida quando H₂O₂ é desdobrada), os orifícios onde ocorreu a reação antígeno-anticorpo apresentam aumento da densidade ótica, o que pode ser medido, refletindo a quantidade de enzima que foi incorporada ao complexo (Proux et al., 2000; Machado et al., 2001).

O teste de ELISA fornece informação sobre a ocorrência de infecção por *Salmonella* em um animal dos 30 aos 120 dias anteriores à coleta da amostra (Galland et al., 2000) e o período de soroconversão é de mais ou menos duas semanas (Van Der Gaag et al., 2003; Van Der Wolf et al., 2001). Esta característica impede que o teste possa ser utilizado para determinar a prevalência em um curto espaço de tempo (Hurd et al., 2002), pois nem sempre representaria o “status” atual do rebanho (Swanenburg et al., 2001).

Em estudos realizados no Brasil, Kich et al. (2007) concluíram que o ELISA indireto utilizando o sorovar Typhimurium, que possui os antígenos comuns aos sorovares prevalentes na Região Sul do Brasil (Bessa et al. 2004), apresenta-se como uma ferramenta adequada para a determinação da severidade da infecção e identificação dos fatores de risco associados. Reforçam a escolha de Kich et al. (2007) as observações de que a soropositividade tende a ser relacionada com a presença de *S. Typhimurium* (Stege et al., 2000; Van Winsen et al., 2001). Estudos também demonstram que este sorovar é o mais freqüentemente isolado (Funk et al., 2001; Van Der Gaag et al., 2003) e com melhor associação entre infecção e soropositividade (Nielsen et al., 1995).

2.5 Controle de *Salmonella* sp. na cadeia produtiva de suínos

Existe um consenso que o número de suínos positivos que chegam para o abate é o primeiro ponto crítico de controle da presença de *Salmonella* em carcaças (Berends et al., 1996). A ampla distribuição de *Salmonella* no ambiente e em animais determinam que sua cadeia de transmissão seja bastante complexa. Estudos epidemiológicos conduzidos em granjas ou frigoríficos têm utilizado ferramentas de biologia molecular na tentativa de identificar grupos clonais comuns no animal, ambiente e no produto final (Botterdoorn et al., 2004; Vieira-Pinto et al., 2006).

As principais fontes de infecção por *Salmonella* discutidas na literatura estão, comprovadamente, presentes em nosso sistema de produção. Foi observado em pesquisas anteriores (Kich et al., 2006) que *Salmonella* foi encontrada em 26% das amostras do ambiente das granjas, 29% das amostras de ração, 90% das amostras provenientes das baias de espera no frigorífico e que 49% dos animais estavam excretando a bactéria ao chegarem nas granjas de crescimento e terminação. Dentro do frigorífico, 67% dos animais eram portadores de *Salmonella* sp.

As condições para conseguir implementar programas de controle dependem de algumas atitudes como: atenção a todos os estágios da cadeia produtiva; uso de dados gerados pela pesquisa que possam ser aplicados como ferramentas para alcançar um controle de *Salmonella* sp. no produto final, os quais devem ser eficientes e de custo razoável. Exemplos dessas tecnologias incluem métodos de diagnóstico rápido, vacinas, probióticos, produtos de exclusão competitiva, prebióticos, estratégias de limpeza e desinfecção, correção dos

fatores de risco, produção em lotes e métodos avançados de monitoramento (Pascual et al., 1999, Nisbet, 2002).

O programa implantado na Dinamarca foi o primeiro e mais importante sistema integrado de controle de *Salmonella* sp. O mesmo foi introduzido em 1995 e o objetivo principal era identificar granjas com alta prevalência de *Salmonella* sp. Após cinco anos, os resultados foram analisados e algumas alterações realizadas, porém a avaliação do programa foi animadora, com redução nos resultados bacteriológicos em torno de 50% de 1993 para 1998, prevalência específica de 14,7% para 7,2% em granjas grandes e de 22,2% para 10,4% em granjas pequenas (Christensen et al., 2002). Até o final de 2003, 96,7% das granjas estava com menos de 40% de animais soropositivos (Anon, 2004). O programa da Dinamarca, entretanto, não foi apenas um levantamento sorológico, pois incluiu a intervenção e orientação em propriedades problema, bem como a modificação da dieta fornecida aos animais como forma de alterar o ambiente intestinal dificultando o estabelecimento de *Salmonella* sp. Por outro lado, após decorrido esse período inicial os efeitos da intervenção na granja tenderam a esgotar suas possibilidades de incremento de eficácia, sendo as medidas adotadas no abate mais importantes para a redução da bactéria na superfície das carcaças (Alban & Stark, 2005). Finalmente, estudos prospectivos demonstram que, mesmo em condições em que a quase totalidade das granjas encontra-se no nível de soroprevalência mais baixa, ainda assim haverá a possibilidade que algum suíno chegue ao abate infectado, representando um risco para a contaminação da carcaça. Nesse cenário, apenas o tratamento das carcaças após o processamento

poderá trazer algum benefício em termos de inocuidade dos alimentos de origem suína (Hurd et al., 2008).

2.6 Microbiota intestinal e desmame de leitões

Os leitões nascem livres de contaminação microbiológica, mas, em questão de horas, o trato gastrointestinal é colonizado, principalmente, por *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, correspondendo a 90% da microbiota normal de um suíno em aleitamento. Outros 5% da microbiota são representados por microrganismos anaeróbios facultativos (*E. coli* e *Enterococcus*) e menos de 1% por microrganismos como *Clostridium* e *Staphylococcus* (Huyghebaert, 2003). Após a desmama, há queda na população de bactérias lácticas e aumento da população de *E. coli* e outros microrganismos patogênicos oportunistas. Estas bactérias patogênicas, principalmente *E. coli*, podem aderir ao epitélio intestinal por meio de fímbrias, multiplicar e desequilibrar a microbiota, causando as diarreias pós-desmame (Mores et al., 1995; Mores et al., 1998)

Fatores fisiológicos e ambientais têm importante papel na estabilização da microbiota intestinal e no estabelecimento da população nativa. O pH relativamente alto do estômago de leitões logo após o nascimento deve-se à insuficiente secreção do ácido clorídrico, o que permite que as bactérias tolerantes ao pH elevado colonizem diferentes porções do trato intestinal. Em leitões lactentes, o pH decresce devido à produção de ácido láctico e apenas bactérias tolerantes ao ambiente ácido persistem e proliferam no intestino proximal, ocorrendo maior proteção contra a penetração de patógenos sensíveis ao meio ácido (Radecky & Yokoyama, 1991).

Parte da seleção da microbiota do intestino é química, devido a agentes inibitórios como ácidos graxos de cadeia curta, ácido sulfídrico, bile, lisozimas, lisolectinas e imunoglobulinas. Quando as bactérias sobrepõem estas barreiras, devem ainda combater o fluxo constante resultante dos movimentos peristálticos. As bactérias permanecem no intestino pela adesão às células epiteliais que revestem o intestino, multiplicando-se mais rapidamente do que são removidas pela renovação celular (Bertechini & Hossain, 1993).

A microbiota normal e em equilíbrio no trato gastrintestinal atua como barreira defensiva do animal, aderindo às paredes intestinais e impedindo a fixação de patógenos. Todavia, os microrganismos benéficos competem por nutrientes e locais de ligação no epitélio do trato intestinal, produzindo metabólitos como os ácidos láctico e acético, capazes de reduzir seletivamente o número de patógenos (Ruiz, 1992), sendo que alguns gêneros de bactérias intestinais, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, estão diretamente relacionados ao aumento da resposta imune.

Os lactobacilos são bactérias Gram-positivas, não-esporulados, catalase-negativos, desprovidos de citocromos, anaeróbios, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos (Minelli et al., 2004). O ácido láctico é o principal produto final da fermentação de açúcares. Dentre as bactérias lácticas, o grupo *Lactobacillus casei* compreende aquelas fenotipicamente e geneticamente heterogêneas, capazes de manter o equilíbrio de vários ambientes (Axelsson et al. 2004).

A desmama no período de 14 a 28 dias de idade é um grande desafio aos leitões. Normalmente, há queda do desempenho nos dias posteriores a este evento, devido à perda do contato com a mãe, adaptação à dieta sólida, mudança do ambiente (comedouros, bebedouros, temperatura e adaptação hierárquica do grupo) e maior desafio imunológico (Mores et al., 1998). Além do ambiente da creche apresentar estes desafios, soma-se o fato do leitão apresentar o sistema imune imaturo, levando-os a estar mais susceptíveis a enfermidades (Mellor, 2000).

Foi estimado que milhares de espécies de microrganismos habitam o trato digestório dos animais, incluindo bactérias, protozoários e fungos, sendo que no lúmen intestinal do mamífero, o número de microrganismos presentes estimado é de aproximadamente 10^{14} (Menten, 2001). Roy & Gibson (1999) ressaltaram que a microbiota benéfica auxilia na digestão e absorção de nutrientes, produz vitaminas que serão utilizadas pelo hospedeiro e inibe a proliferação de microrganismos patogênicos. Entretanto, condições de estresse desenvolvido no momento e após o desmame podem alterar a microbiota intestinal, provocando diminuição das bactérias benéficas e aumento das patogênicas, que geram metabólitos tóxicos ao hospedeiro, causando inflamações na mucosa intestinal, além de estabelecer uma condição mais propícia para o surgimento de enfermidades. Estas alterações provocam quedas imediatas nos parâmetros de desempenho animal (Silva & Nörnberg, 2003). Da mesma forma, essas modificações contribuem para a modificação da microbiota intestinal, permitindo o aumento de populações de coliformes e enterococos.

As bactérias do gênero *Enterococcus* são Gram positivas e anaeróbias facultativas e, podem ser encontradas no meio ambiente, alimentos e no trato gastrointestinal de animais e humanos (Domig et al., 2003). Atualmente, este gênero inclui 28 espécies (Moreno et al., 2006), sendo *E. faecium* e *E. faecalis* as duas espécies mais comumente encontradas. São bactérias produtoras de ácido láctico, desempenham várias atividades metabólicas úteis, como a lipólise e esterólise, utilizam citrato e algumas cepas sintetizam bacteriocinas, que são denominadas enterocinas. As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* podem ser responsáveis por infecções oportunistas, que ocorrem no trato urinário, no endocárdio e em queimaduras (Jett et al., 1994).

O grupo dos coliformes totais é formado por bacilos gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com a produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C (Jay, 2005). O grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias entéricas, como diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como por exemplo *Serratia* e *Aeromonas* (Silva et al., 1995). Os coliformes fecais são um grupo específico encontrado freqüentemente no trato intestinal do homem e dos animais, sendo a *Escherichia coli* a principal representante deste grupo (Banwart, 1989).

2.7 Prebióticos como alternativa ao uso de antimicrobiano

Apesar da comprovada capacidade de aumentar o desempenho de suínos e aves, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, vêm sendo sensivelmente restringido. A União Européia desde janeiro de 2006 não importa carne de animais tratados com antimicrobianos promotores de crescimento (Costa et al., 2007).

Baseando-se em novos conceitos de segurança alimentar, produtos alternativos aos antibióticos foram pesquisados e desenvolvidos (Miltenburg, 2000). O uso destes visa, igualmente, obter o máximo desempenho produtivo animal, com o diferencial de disponibilizar ao mercado um produto final saudável (ausência de resíduos de drogas), sem representar riscos à saúde do consumidor (Silva & Nörnberg, 2003). Ao retirar antibióticos da ração, variam as alternativas encontradas para a produção animal, como o uso probióticos, ácidos orgânicos, enzimas oligosacarídeos não digeríveis (prébióticos), entre outros.

Os prebióticos, são alimentos ou substâncias não- digeríveis, que afetam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ ou a atividade de um número limitado de espécies bacterianas já residentes no trato digestivo (Newman & Newman, 2001). O produto desse grupo mais usado é o mananoligossacarídeos (MOS) (Flemming & Freitas, 2005). O MOS é um carboidrato derivado da parede celular externa de uma levedura, a *Saccharomyces cerevisiae*. Sua ação se explica pela interferência com a aderência de bactérias Gram-negativas que utilizam lectinas, presentes nas fímbrias aderentes à manose (fenômeno de adsorção)(Fernandes et al. 2003). Em vez de aderir aos receptores presentes nas células do trato gastrointestinal, as bactérias aderem aos receptores do MOS presentes no conteúdo intestinal e são eliminadas pelo peristaltismo. Atualmente, sabe-se que alguns mananoligossacarídeos (MOS) possuem a capacidade de adsorver bactérias patogênicas ou oportunistas que residem no trato gastrointestinal, modificando sua constituição bacteriológica. Este processo de adsorção é observado entre

bactérias portadoras de fímbrias do tipo I e o MOS, possivelmente devido à capacidade de ligação destas fímbrias à D-manose, constituinte do MOS (Firon et al., 1982; Spring et al., 2000).

Já foram descritas várias cepas de *E. coli* e *Salmonella* que possuem este tipo de fímbria e que, por sua vez, podem adsorver ao MOS (Finucane et al., 1999). Dessa forma, a capacidade de prejudicar a aderência bacteriana pode representar uma estratégia para combater a infecção bacteriana devido à sua importância no início do processo infeccioso (Cegelski et al., 2008).

Indiretamente, os prebióticos também podem atuar no sistema imune e enzimático, por promover o aumento de populações de bactérias benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*). As bactérias têm a capacidade de produzir substâncias com propriedades imunoestimulantes (lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e ácidos lipoteicóicos). Provavelmente, um dos efeitos mais importantes da manose é sua capacidade de alterar a função do sistema imunológico dos animais. Segundo Dawson & Pirvulescu (1999), diversas evidências indicam que a adição de prebiótico de manose às dietas de animais pode estimular a função de defesa imunológica. Estes compostos ligam a sítios receptores dos macrófagos através do reconhecimento de determinados açúcares, presentes nas glicoproteínas da superfície epitelial, desencadeando uma reação em cascata que resultaria na ativação dos macrófagos e liberação de citocinas, a proliferação de células mononucleares, a fagocitose e a indução na síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas, em especial a IgA (Brandtzaeg, 1998; MacFarlane & Cummings, 1999).

Os prebióticos também podem causar modificações benéficas nas características anatômicas do trato gastrointestinal, 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, quando comparado ao controle.

Além disso, quando os prebióticos são adicionados à dieta, a especificidade de sua fermentação estimula o crescimento e a estabilidade das populações microbianas produtoras de ácidos orgânicos (em especial, ácido láctico 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 nocivos, tais como *E. coli*, *Clostridium* sp. e *Salmonella*, que são sensíveis a ambientes ácidos (Radecki & Yokoyama, 1991).

Alguns estudos demonstram a efetividade do MOS em relação aos antimicrobianos (Davis et al., 1999; Pettigrew, 2000), enquanto outros pesquisadores não encontraram resultados efetivos (Cromwell et al., 1991; Davis et al., 2000). O efeito da inclusão de MOS na dieta de frangos foi avaliada em vários estudos (Spring et al., 1999; 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*. Relatos em suínos são menos encontrados na literatura.

Lettelier et al. (2001) compararam a eficácia de uma vacina viva, do uso de probiótico e prebióticos no controle de *Salmonella* em suínos, concluindo que a vacina havia resultado em maior redução da bactéria no íleo, principalmente em decorrência da estimulação da resposta imune local. Burkey et al. (2004) desafiaram suínos com *Salmonella* e compararam três diferentes dietas (MOS, clorato de sódio e antibiótico), sendo que o MOS não apresentou diferença em relação ao antibiótico na contagem de *Salmonella* excretada.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Artigo 1: **Mannanligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs.**

Artigo aceito na “Brazilian Journal Microbiology”.

Carta de aceite para publicação do artigo na Brazilian Journal of Microbiology

Prezados autores

Temos o prazer de informar que a nova versão do seu manuscrito **Mannanligosaccharide agglutination of Salmonella enterica strains isolated from carrier pigs**, submetido ao Brazilian Journal of Microbiology, foi aceita para publicação. A redação em inglês também está aprovada.

Temos uma longa fila de trabalhos aprovados esperando serem publicados, havendo uma previsão de demora de 3 a 6 meses. Assim, pedimos aguardar pacientemente o envio da prova gráfica para sua revisão e aprovação.

Agradecemos novamente a escolha do BJM para publicação desse trabalho. Esperamos receber outras contribuições interessantes no futuro.

Atenciosamente

Prof. Bernadette D.G.M. Franco

Mannanligosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs.

Luciane Borowsky¹, Gertrudes Corção², Marisa Cardoso¹

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - UFRGS

² Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS

Corresponding Author: Marisa Cardoso, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 90540-000. Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55-513-316-6123, Fax: +55-513-316-7305.

E-mail address: mcardoso@ufrgs.br

ABSTRACT

Type-1 fimbriae are associated with most *Salmonella enterica* serovars and are an essential factor for host colonization. Mannanligosaccharides (MOS), a prebiotic that is agglutinated by type-1 fimbriae, are proposed for the control of enterobacteria colonization and may be an alternative to *Salmonella* control in pigs. The aim of this study was to evaluate the capability of porcine *Salmonella* strains to adhere to MOS *in vitro*. A total of 108 strains of *Salmonella* sp. isolated from carrier pigs were evaluated for the amplification of *fimA* and *fimH* genes, agglutination of MOS and hemagglutination. In all tested strains, amplicons of expected size were detected for both *fimA* and *fimH* gene. In the hemagglutination assays, 31 (28.7%) strains presented mannose-sensitive agglutination of erythrocytes, indicating that the strains were expressing type-1 fimbriae. Considering only strains expressing the type-1 fimbriae, 23 (74.2%) presented a strong agglutination of MOS, 3 (9.6%) a weak reaction and 5 (16.2%) none. The results indicate that *Salmonella enterica* strains expressing type 1 fimbriae can agglutinate effectively *in vitro* to MOS.

Key Words: *Salmonella*, type-1 fimbriae, mannanligosaccharides

INTRODUCTION

Salmonella sp. has been frequently isolated from pigs at slaughter in Southern Brazil (4, 6), demonstrating the need of control measures implementation to reduce the risk of public health problems arising from the consumption of contaminated pork. *Salmonella* control can be implemented at the pre-harvest level (on farm), at harvest level (during transport and slaughter) and at post-harvest level (processing and retailing). When a high *Salmonella* prevalence on farm is detected, the first measures must be initiated at pre-harvest level to achieve a lower number of carrier pigs at slaughter and decrease the hazard

of carcass contamination (10). Besides the measures related to animal management practices, the interest about alternative methods to inhibit the transmission of pathogens in farm animals has increased (5). Among these alternative methods, the use of prebiotics has been proposed to decrease the *Salmonella* infection in swine and poultry (12, 21).

Mannan oligosaccharides (MOS) are complex carbohydrates, derived from the cell wall of *Sacharomyces cerevisiae*, with mannose receptors that can bind to receptor sites of pathogenic bacteria, avoiding the attachment to the epithelium. Specifically, MOS is a prebiotic that has the ability to adhere to type 1 fimbriae and has been used as an alternative to antibiotic use for growth promotion and therapeutic treatment in the swine industry (18).

Fimbriae play a critical role in the colonization by facilitating the initial attachment to specific host cells and tissues (3, 9, 15). Type-1 fimbriae are associated to most *Salmonella enterica* serovars and are characterized by their ability to mediate the mannose-sensitive agglutination of red blood cells (1, 25). Interactions between type-1 fimbriae and D-mannose-containing receptors have been shown in a number of studies to play a key role in the infectious process (1, 2, 8, 9, 17).

Many gene clusters corresponding to fimbrial systems are present in the genomes of *S. enterica*, however, only the *fim* cluster that code for type-1 fimbriae is clearly associated to the colonization of the gut. In the genus *Salmonella*, type-1 fimbriae are composed primarily of FimA proteins subunits, encoded by the *fimA* gene. However, another protein subunit called FimH has been shown to represent the fimbrial lectin, indispensable for the attachment to the gut epithelium (7, 11, 16, 20).

A study (21) conducted with strains of four *Salmonella* serovars (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* and *S. Pullorum*) demonstrated that the ability to adhere to

MOS *in vitro* can vary between different serovars and among strains of a same serovar. In the same study, it was observed that the ability of MOS agglutination *in vitro* correlated well with the efficacy of MOS to decrease the *Salmonella* caecal counts in artificially inoculated chicks, demonstrating that feed supplemented with MOS may constitute an intervention measure in *Salmonella* control programs. Few studies have been conducted in pigs concerning *Salmonella* adhesion and colonization in the presence of prebiotics (12, 26). Moreover, the capability of MOS agglutination by *Salmonella* serovars commonly isolated from pigs has not been tested.

Thus, the aim of this study was to determine the capability of agglutination to mannanoligosaccharides in porcine *Salmonella enterica* strains expressing type -1 fimbriae.

MATERIAL AND METHODS

Strains: One hundred and eight *Salmonella enterica* strains comprising 26 serovars, isolated from carrier pigs were evaluated. The strains were isolated from feces, lymph nodes and tonsils of slaughtered pigs in southern Brazil. After identification and serotyping, strains were stored in Brain Heart Infusion with glycerol (20% v/v) at -20°C.

Isolation of DNA from bacteria. For preparation of the genomic DNA for multiplex PCR assays, overnight cultures in BHI at 37°C were prepared. One milliliter was subjected to DNA isolation using the NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Primers for the Multiplex PCR. For the detection of *fimA* gene the primers fimAF 5'- CCT TTC TCC ATC GTC CTG AA-3'; fimAR 5'- TGG TGT TAT CTG CCT GAC CA-

3', described by (7) were used, resulting in a 84 bp amplicon. For the detection of *fimH* gene, primers were designed based on the sequences available (Genbank access number L19338). The primer sequence was selected by using the program Primer3 (www.primer tool, University of Massachusetts Medical School, U.S.A). The forward primer fimHF: 5'-ATG AGC ATC ACC GAT AGT GT-3' and the reverse primer fimHR 5'-GAA ATC AAA CTC CAC GAC CT-3', amplified a region of 311 bp between nucleotides 322 and 633 of the *fimH* gene of *S. Typhimurium*.

PCR. The PCR was carried out in a 25 µl mixture consisting of 50mMTris/HCl (pH 8.3), 200 µM (each) dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 0.5 µM (each) primer, 0.65 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen), 50 mM MgCl₂ and 2.0µL genomic DNA. The amplification was achieved on a thermocycler (Applied Biosystems, GemAmp PCR System 9700) as follows: an initial denaturation cycle at 94 °C for 5 min, followed by 25 cycles of 1 min at 94 °C, 30 s at 56 °C and 1 min at 72 °C, and a final extension at 72 °C for 7 min. Amplification products were separated by electrophoresis on 1.2% agarose gel and fragments were revealed with Blue Green Loading Dye I followed by visualization under UV. *Salmonella Typhimurium* (LT2) was used as a positive control in each PCR run. A template control (sterile water) was included to monitor contamination of the PCR reagents in each PCR assay.

Specificity of the multiplex PCR: DNA from non-*Salmonella* strains (*E.coli*, *Proteus vulgaris* ATCC 10145, *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* ATCC13889) was isolated and submitted to PCR amplification as described above.

Hemagglutination: Strains were submitted to hemagglutination test, using guinea pig erythrocytes with and without 1% mannose addition. Bacteria were grown overnight on

Clumping Factor Agar (CFA, 25) at 37°C. The suspensions were adjusted to McFarland standard #4 in PBS or PBS/mannose 1% and serially diluted from 1:2 to 1:128 in the same buffer. Erythrocytes 1% (in PBS or PBS/mannose 1%) were added to each bacteria dilution. Suspensions of bacteria and erythrocyte were incubated overnight at 4°C. After the incubation, suspensions were evaluated for the presence or absence of agglutination. All assays were conducted in triplicate. As positive control for the assays, an *Escherichia coli* strain (Type-1 fimbriae positive) was used. A suspension of erythrocytes 1% in PBS or PBS/mannose was running in parallel as the negative control. *Salmonella* strains that presented mannose-sensitive hemagglutination were considered expressing type- 1 fimbriae as previously proposed (1, 13).

Slide agglutination assays of MOS: The MOS preparation used in this study was the commercial product BioMos® (Alltech, Kentucky, USA). For the agglutination assays of MOS, adjusted suspensions of *Salmonella*, as described above, were mixed with equal volumes of MOS 0.1% in PBS and kept at 4°C for 1 hour. Aliquots of these suspensions were disposed on a glass slide and the agglutination of MOS was observed with a light microscope. *Salmonella* agglutination of MOS was compared with the result obtained in assays with the *E. coli* control strain and the clumping level was scored as follow: *strong*, when the same level of clumping was observed for tested and control strains; *weak*, when the clumping level observed for the *Salmonella* strain was lower than the control strain; *none*, when no clumping was observed. All assays were conducted in triplicate. A suspension of MOS 0.1% in PBS kept at 4°C for 1 hour was used as negative control.

Statistical analysis: Results of mannose sensitive- hemmagglutination and agglutination of MOS were analyzed using the MacNemar test (Graphpad InStat 3.06) with significance level $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

One hundred and eight *Salmonella* strains isolated from carrier pigs submitted to multiplex PCR, targeting *fimA* and *fimH* gene, amplified fragments of the expected size (Figure 1). Strains from other related bacteria tested in the same assay were all negative, demonstrating that the assay is specific. Cohen et al. (7) proposed the primer set for the amplification of *fimA* gene and were able to detect 376 strains of *Salmonella* comprising over 80 serovars. The primers demonstrated a high specificity and were proposed as target to the detection of *Salmonella* in food samples. Similarly in our study, the gene *fimA* was detected in porcine strains of 27 *Salmonella* serovars, including *S. Rissen*, *S. Gold Coast*, *S. Newport*, *S. Lexington* e *S. Gruposensis*, which were not tested in the previous report.

For the purpose of our study, it was also important to detect the gene *fimH* that codes for the lectin, responsible for adhesion to the mannose receptor on the cell surface. The same mechanism is proposed for the agglutination of MOS by *Salmonella*, resulting in decrease of intestinal adherence (11, 19, 21). Thus, the detection of both genes in all tested porcine *Salmonella* strains indicated the potential capability to agglutinate MOS.

In the type-1 fimbriae expression assays, 31 strains (28.7%) presented mannose-sensitive agglutination of erythrocytes, and were considered as expressing type-1 fimbriae. In the assays using MOS, 30 strains (27.8%) showed a strong agglutination, 24 (22.2%) a weak reaction, and 54 (50.0%) none (Table 1). Considering only strains expressing the type-1 fimbriae, 23 (74.2%) presented a strong agglutination of MOS, 3 (9.6%) a weak reaction and 5 (16.2%) none. Among strains negative for mannose-sensitive hemagglutination, 49 (63.7%) were also negative on assays with MOS, 21 (27.3%) presented a weak reaction and 7 (9%) presented a strong agglutination. A good agreement between mannose-sensitive hemagglutination reaction and agglutination of MOS on the

slide assay was observed ($P < 0.0001$), demonstrating that *Salmonella enterica* strains expressing type-1 fimbriae *in vitro* can effectively agglutinate MOS.

No difference on the ability of MOS agglutination was found between strains isolated from feces and lymph nodes. Among strains isolated from feces ($n=42$), 47.6% agglutinated MOS, while 48.5% of the strains isolated from lymph nodes and tonsils ($n=66$) showed positive results.

Although multiple adhesins have been described for *Salmonella* Typhimurium, the type-1 fimbriae is the only one which have been shown to contribute to the colonization of the porcine intestinal tract (1, 2, 3, 5). In spite of that, a switch to a nonagglutinating phenotype can occur at a rate of 10^{-2} to 10^{-5} per generation of *Salmonella* (1), and it has been demonstrated that some *Salmonella* strains with the *fimA* sequence could present a nonfimbriated phenotype *in vitro* (14, 22). The expression of type-1 fimbriae has been related to signals like temperature, osmolarity and bile salts concentration, which correspond to the environment present in the intestine (22). Recently, the on-off-phase variable expression pattern that has been proposed for the type-1 fimbriae of *Salmonella* (23, 24) was associated to global regulator proteins in addition to *fim*-specific proteins. This regulation form is likely to make the *fim* gene cluster sensitive to environmental stimuli and to physiological state of the cell (1, 3). Thus, the low frequency of *Salmonella* strains expressing type-1 fimbriae in our study can be related to any one of these factors, since the tested strains were stored at low temperatures and cultivated in artificial media prior testing. However, the widespread presence of the gene *fimA* and *fimH* among the porcine *Salmonella* strains indicate the potential of expressing type-1 fimbriae and agglutinating MOS. Further investigation on potential of this feed additive to control *Salmonella* infection need to be conducted in pigs inoculated with strains expressing type-1 fimbriae.

CONCLUSION

The results indicated that MOS can be effectively agglutinated by porcine *Salmonella enterica* strains expressing type-1 fimbriae, and has potential to be tested to control the colonization of the intestine by *Salmonella* strains.

REFERENCES

1. Althouse, C.; Patterson, S.; Fedorka-Cray, P.; Isaacson, R. (2003). Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infect Immun.*,71: 6446-6452.
2. Bäumlér, A.J.; Tsolis, R.M.; Heffron, F. (1996). Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 64: 1862-1865.
3. Bäumlér, A. J.; Tsolis, R.M.; Heffron F. (1997). Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 412:149–158.
4. Bessa, M.C., Costa, M., Cardoso, M. (2004) Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. *Braz. J. Vet. Res.*, 24: 80-84.
5. Boyen, F.; Haesebrouck, F.; Mae, D.; Van Immerseel, F.; Ducatelle, R.; Pasmans, F. (2008). Non-typhoidal *Salmonella* infection in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet. Microbiol.*,130: 1-19.
6. Castagna, S.M.F., Schwarz, P., Canal, C.W., Cardoso, M. (2004). Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. *Acta Sci. Veter.*, 32: 141-147.

7. Cohen H.J., Mechanda S.M. and Lin W. (1996). PCR amplification of the fimA gene sequence of *Salmonella* Typhimurium, a specific method for detection of *Salmonella* sp. *Appl Environ Microbiol.*, 62:4303-4308.
8. Firon, N., I. Ofek, Sharon N. (1982). Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 105:1426–1432.
9. Gahring, L.C.; Heffron, F.; Finlay, B.B.; Falkow, S. (1990). Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect. Immun.*, 58: 443-448.
10. Hurd, H.S.; Enoe, C.; Sorensen, L.; Wachman, H.; Corns, S.M.; Bryden, K.M.; Greneier, M. (2008). Risk-based analysis of the Danish pork Salmonella program: past and future. *Risk Analysis*, 28, 341-350.
11. Kisiela D., Sapeta A., Kuczkowski M. Stefaniak T. Wieliczko A. and Ugorrski M. (2005) Characterization of FimH adhesions expressed by *Salmonella enterica* Serovar gallinarum biovar gallinarum and pullorum. Reconstitution of mannose-binding properties by single amino acid substitution. *Infect. Immun.*, 73: 6187-6190.
12. Letellier, A.; Messier, S.; Lessard, L.; Chenier, S.; Quessy, S. (2001). Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Can. J. Vet. Res.*, 65: 168-172.
13. McFarland, K.A.; Lucchini, S.; Hinton, J.C.D.; Dorman, C.J. (2008). The leucine-responsive regulatory protein, Lrp, activates transcription of the fim operon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium via the fimZ regulatory gene. *J. Bacteriol.*, 190: 602-612.
14. Mirelmann, D.; Altman, G.; Eshdat, Y. (1980). Screening of bacterial isolates for mannose-specific lectin activity by agglutination of yeast. *J. Clin. Microbiol.* 11: 328-331.
15. Muller K.H., Collinson S.K., Trust T.J., Kay W.W.: J. (1991) Type 1 fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *J. Bacteriol.*, 173:4765-72.

16. Naravaneni R., Jamil K. (2005). Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. *J. Med. Microbiol.* 54: 51–54.
17. Naughton, P. J., G. Grant, S. Bardocz, E. Allen-Vercoe, M. J. Woodward, and A. Pusztai. (2001). Expression of type 1 fimbriae (SEF 21) of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in the early colonisation of the rat intestine. *J. Med. Microbiol.*, 50:191–197.
18. Newman, K. E., M. C. Newman. (2001). Evaluation of mannanoligosaccharide on the microflora and immunoglobulin status of sows and piglet performance. *J. Anim. Sci.*, 79: 189-191.
19. Oyofe, B.A.; DeLoach, J.R.; Corrier, D.E.; Norman, J.O.; Ziprin, R.L.; Mollenhauer, H.H. (1989). Effect of carbohydrates on *Salmonella* Typhimurium colonization in broiler chickens. *Avian Dis.*, 33: 531-534.
20. Sokurenko E.V. Courtney H.S, Ohman D.E, Klemm P.,And Hastyl D.L. (1994). FimH family of Type 1 fimbrial adhesins: Functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *J.Bacteriol.*, 176: 748-755.
21. Spring, P.; Wenk, C.; Dawson, K.A.; Newman, K.E. (2000). The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. *Poultry Sci.*, 79: 205-211.
22. Swenson, D.L.; Clegg, S.; Old, D.C. (1994). Frequency of the fim genes among *Salmonella* serovars. *Microb. Pathogen.*, 10: 487-490.
23. Tinker, J.K.; Clegg, S. (2000). Characterization of FimY as a coactivator of type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.*, 68: 3305-3313.

24. Tinker, J.K.; Hancox, L.S.; Clegg, S.(2001). FimW is a negative regulator affecting type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.*, 183: 435-442.
25. Truszczynski, M., Osek, J. (1987). Occurrence of mannose resistant hemagglutinins in *Escherichia coli* strains isolated from porcine colibacillosis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis*,10 :117-124.
26. Tzortzis, G.; Goulas, A.K.; Gee, J.M.; Gibson, G.R. (2005). A novel galactooligosaccharide mixture increases the Bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *J. Nutr.*, 135: 1726-1731.

Table 1. Agglutination with mannanoligosaccharide (MOS) and hemmagglutination
mannose sensitive in *Salmonella enterica* strains isolated from pigs.

Serogroup	Serovar	Number of isolates	MOS agglutination			Hemmagglutination mannose sensitive	
			Strong	Weak	None	Positive	Negative
B	Agona	2	1	1		2	
	Brandenburg	1			1		1
	Bredeney	6	4		2	3	3
	Derby	4		1	3		4
	Heidelberg	3		1	2	1	2
	Typhimurium	38	10	9	19	10	28
C1	Infantis	3		2	1	1	2
	Mbandaka	3	1		2	1	2
	Montevideo	4		1	3		4
	Ohio	1		1			1
	Rissen	4	1	1	2	1	3
	Tennessee	5	1	1	3	2	3
	Gold Coast	3		2	1		3
	Newport	4			4		4
D1	Enteritidis	2			2		2
	Panama	2	1		1	1	1
E1	Anatum	3	3				3
	Give	3	2	1		2	1
	London	2	2			2	
	Orion	3	1	1	1	2	1
E4	Senftenberg	3	1		2	1	2
F4	Lexington	1			1		1
G2	Grupensis	2			2		2
	Havana	1			1		1
K	Cerro	3	2	1		1	2
L	Minnessota	2		1	1	1	1
Total		108	30	24	54	31	77

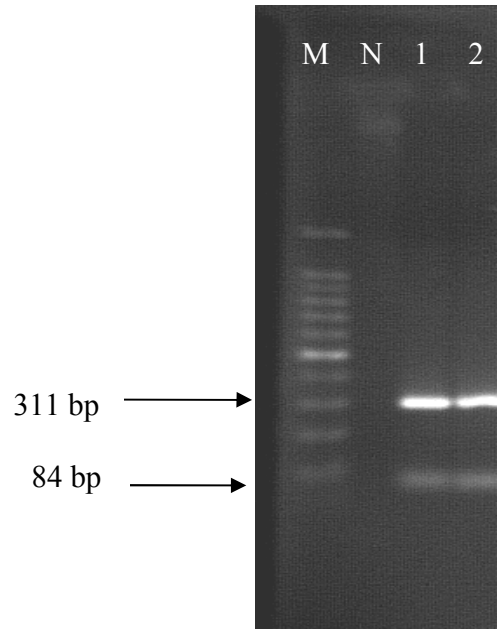


Figure 1. PCR multiplex amplicons (311bp *fimH* e 84 bp *fimA*) in 1.2% agarose: 100 bp molecular weight (M); negative control (N); *Salmonella* Typhimurium (1); *Salmonella* Bredeney (2).

RESUMO

Aglutinação de cepas de *Salmonella enterica* isoladas de suínos portadores ao mananoligossacarídeo

Fímbrias tipo 1 estão presentes na maioria dos sorovares de *Salmonella enterica* e são fatores essenciais para a colonização do hospedeiro. Mananoligossacarídeo (MOS), um prebiótico que aglutina com fímbria tipo 1, tem sido proposto para o controle da colonização de enterobactérias e pode ser uma alternativa para o controle da infecção por *Salmonella* sp. em suínos. O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade *in vitro* de aglutinação ao MOS em cepas de *Salmonella* sp. isoladas de suínos. Um total de 108 cepas de *Salmonella* sp. foram avaliadas quanto à presença dos genes *fimA* e *fimH*, aglutinação ao MOS e hemaglutinação. Em todas as cepas testadas, fragmentos de tamanho esperado foram amplificados para ambos os genes. Nos testes de hemaglutinação, 31 (28,7%) cepas apresentaram aglutinação de hemácias inibida pela manose, indicando que havia expressão de fímbria tipo 1. Considerando apenas as cepas com a expressão de fímbria tipo 1, 23 (74,2%) apresentaram uma aglutinação forte ao MOS, 3 (9,6%) uma reação fraca e 5 (16,2%) não aglutinaram. Os resultados indicam que MOS pode aglutinar *in vitro* de forma efetiva com cepas de *Salmonella enterica* que estejam expressando fímbria tipo 1.

Palavras-chave: *Salmonella*, suíno, mananoligossacarídeo.

3.2 Artigo 2: The effect of dietary mannanoligosaccharide on *Salmonella* infection and concentration of enteric bacteria in pigs challenged with a low dose of *Salmonella* Typhimurium

Artigo submetido na "Research in Veterinary Science"

Research in Veterinary Science

Manuscript: The effect of dietary mannanoligosaccharide on Salmonella infection and concentration of enteric bacteria in pigs challenged with a low dose of *Salmonella* Typhimurium

Dear Dr. Cardoso,

Your submission has been received by the journal Research in Veterinary Science.

The effect of dietary mannanoligosaccharide on *Salmonella* infection and concentration of enteric bacteria in pigs challenged with a low dose of *Salmonella* Typhimurium

Luciane Borowsky^a; Gertrudes Corção^b; Jalusa Deon Kich^c; Arlei Coldebella^c; Marisa Cardoso^{a,*}

^a Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

^b Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

^c Embrapa Suínos e Aves

*Corresponding Author: Marisa Cardoso, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 90540-000. Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55-51-3308-6123, Fax: +55-51-3308-7305.

E-mail address: mcardoso@ufrgs.br

Abstract

A 28-d experiment evaluated the effect of mannanoligosaccharide addition to diets free of antibiotic administered to *Salmonella*-challenged weaned pigs on *Salmonella* Typhimurium shedding rate; population of enterobacteria, lactobacilli and enterococci in the gut and immunoglobulin A production against *Salmonella*. A total of 23 weaned 21-day-old pigs were allotted to a negative control treatment with no feed additives, or to the test treatment fed mannanoligosaccharide (4.0 ppm for 21-d until 35-d pigs, followed by 2.0 ppm until 49 days of age). *Salmonella* enumeration demonstrated that pigs excreted a low number of bacteria in feces throughout the experiment. The median of *Salmonella* excretion was lower in the treatment group at both 14 and 21 days p.i (0.18 cfu.g⁻¹ and 0.3 cfu.g⁻¹, respectively) compared to the control group (0.36 cfu.g⁻¹ on day 14 p.i., and 1.1 cfu.g⁻¹ on day 21 p.i), however the observed difference was not statistically significant. Two pigs from the treatment group and four pigs from the control group were negative in all sampled organs. Tonsil samples displayed the higher number of *Salmonella* isolation in both groups. ELISA IgG and IgA OD's of both groups showed no significant difference. The medians of coliforms, enterococci and lactobacilli were similar throughout the experiment in both groups. In conclusion, the dietary addition of MOS did not affect the enteric bacteria concentration and was not able to decrease the *Salmonella* infection rate in pigs, although a lower excretion for a shorter period may occur in pigs challenged with a low *Salmonella* dose.

Keywords: Swine, *Salmonella*, mannanoligosaccharide.

1. Introduction

Over the last few years, *Salmonella enterica* isolation has been reported in pigs and pork in Brazil (Bessa et al., 2005; Kich et al., 2007; Mürmann et al., 2009), pointing to the need to adopt control measures on farm. *Salmonella enterica* often causes an asymptomatic infection in swine (Wilcock and Schwarz, 1992), and contaminated feces of carrier animals can lead to cross-infection of cohabitating animals on farm, or during transport and lairage (McKean et al., 2001; Funk et al., 2004). Moreover, the high level of infected animals resulting from the spread of *Salmonella* on the pre-harvest, contributes to the enhancement of the hazard of carcass contamination (Berends et al., 1997; Swanenburg et al., 2001, Vieira-Pinto et al., 2006).

Intervention measures implemented on farm have been based on control of risk factors previously identified (LoFoWong et al., 2004; Funk et al., 2004), most of them related to cleanliness, housing, biosecurity and feeding practices (Mousing et al., 1997). Additionally, intervention strategies like vaccines, competitive exclusion and antimicrobial treatments have been tested in experimental settings with variable success (Letellier et al., 2000; Letellier et al., 2001).

The use of antimicrobials for treating *Salmonella enterica* carrier state in pigs has led to conflicting results in terms of frequency of fecal *Salmonella* excretion (Baggensen et al., 1999; Erbner and Mathew, 2000; Burkey et al., 2004). Moreover, in a trial reporting a lower rate of *Salmonella* excretion after a long term treatment with various antimicrobial groups, a significant increase in the frequency of resistant *Salmonella* fecal strains over time was detected (Baggensen et al., 1999). Antimicrobial resistance emergence in bacteria related to the treatment of animals on farm has become a concern worldwide (Prescott, 2008), and has led to the ban of antimicrobial use in European countries (Casewell et al., 2003; Begtsson and Wierup, 2006). Thus, the control of *Salmonella* carrier pigs through antimicrobial treatment, besides leading to doubtful results, has become unacceptable.

Compounds that have prebiotic effects have been proposed as an alternative way of improving intestinal health and performance in the absence of antimicrobials used as growth promoters (Biggs et al., 2007). Mannan oligosaccharides (MOS) are complex carbohydrates, derived from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, with mannose receptors that can bind to type 1 fimbriae of enterobacteria, avoiding their attaching to the

epithelium (Newman and Newman, 2001). Further advantageous effects of MOS, like the improvement of intestinal health, have been reported (Baurhoo et al, 2007). Moreover, MOS has also been shown to increase the production of immunoglobulin A in rats (Kudoh et al., 1999) and turkeys (Savage et al., 1996), which may contribute to the inhibition of the attachment and penetration of bacteria in the intestinal lumen.

The effect of dietary MOS on the concentrations of enteric bacteria in the ceca of broiler chicks has been evaluated in a number of studies (Spring et al., 1999, Bigs et al., 2006, Baurhoo et al., 2007). While an increase of populations of lactobacilli and bifidobacteria was not always observed, a decrease in populations of *E. coli*, *Salmonella* and *Clostridium perfringens* was reported. On the contrary, the administration of MOS to weaned pigs was reported to improve the gain/feed rate, but was not able to decrease the shedding of *Salmonella* Typhimurium in challenged animals (Burkey et al, 2004).

Thus, the objectives of this study were to evaluate the effect of mannanoligosaccharide addition to diets free of antibiotic administered to *Salmonella*-challenged weaned pigs on: *i.* *Salmonella* Typhimurium shedding rate; *ii.* population of enterobacteria, lactobacilli and enterococci; *iii.* immunoglobulin A production against *Salmonella*.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental design

The experimental protocol used in this study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Process number 2007962). A total of 23 weaned 21-day-old pigs were randomly allotted to one of two treatments in a 28-day study. Treatments had three replicates (pens) and were arranged in the same room. The two treatments were as follows: a negative control with no additives, and the test diet containing mannanoligosaccharide (MOS; BioMos®, Alltech, Kentucky, USA). The level of MOS inclusion was consistent with manufacturer-recommended levels of 4.0 ppm for 21-d until 35-d pigs, followed by 2.0 ppm until 49 days of age.

All pigs were housed seven days before the experiments began in temperature-controlled rooms, and received water and feed “ad libitum”. Prior to inoculation, pigs were checked for *Salmonella* fecal shedding. Pigs were inoculated by oral gavage with 10^3 cfu

of *Salmonella* Typhimurium DT177 isolated from a carrier pig at slaughter (Bessa et al., 2007). This strain was previously tested and presented a strong in vitro agglutination of MOS (Borowsky et al., 2009).

Blood and fecal samples were obtained from all pigs on days 0, 7, 14 and 21 following ST challenge. On day 21 after challenge pigs were euthanised and necropsied as blind. Samples of intestine, liver, spleen, tonsils and mesenteric lymph nodes were taken immediately after the bolt stunt. For IgA testing, a 10 cm portion of ileum was removed from each pig and washed with 20 mL of PBS (pH 7.2). The washing liquid was recovered with a syringe, centrifuged and kept frozen until testing.

2.2. *Salmonella* isolation

Approximately 25 g of sample (feces, liver, spleen, tonsil or mesenteric lymph nodes) were added to 225 mL of buffered peptone water (BPW, Merck, Darmstadt, Germany) and homogenized in a stomacher (Interscience, St. Nom, France). After incubation at 37°C for 18 h, aliquots of 0.1 mL or 1.0 mL were transferred to Rappaport-Vassiliadis broth (RV, Merck) or Tetrathionate broth (Difco Laboratories, Detroit, USA), respectively. After incubation at 42°C for 24 h, aliquots taken from broth cultures were streaked onto both XLT4 (Difco) agar and Brilliant Green Lactose Saccharose (BPLS, Merck) agar. Plates were incubated at 37°C for 24 h. Up to 5 colonies were selected from each plate and were streaked on triple sugar iron agar (TSI, Merck), lysine decarboxylase iron agar (LIA, Merck) and inoculated into urea broth (Merck). Colonies presumptively identified as *Salmonella* were submitted to slide agglutination tests using poly-O antiserum (Probac, São Paulo, Brasil) and were serotyped at the Brazilian *Salmonella* Reference Institute (Instituto Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil).

2.3. *Salmonella* quantification

Feces samples were submitted to estimation of *Salmonella* using a Most Probable Number (MPN) technique (Sinell et al., 1990). From each sample, three portions of each 10 g, 1 g and 0.1 g were taken aseptically and added individually to tubes with 10 mL of BPW. After incubation of the pre-enrichment tubes at 37°C for 18 h, aliquots of 0.1 mL were transferred to 9.9 mL of RV (Merck). Following incubation of the tubes of selective enrichment media at 42°C for 24 h, the samples were streaked onto XLT4 (Difco) agar.

After 24 h incubation at 37°C, suspected colonies from each plate were confirmed as *Salmonella* by biochemical tests and agglutination using poly O-antiserum (Probac). The number of tubes in each dilution, from which colonies were confirmed as *Salmonella*, was used to estimate *Salmonella* quantification using the MPN table (BAM, 1998).

2.4. *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Enterobacteria* enumeration in feces samples.

Feces samples (10 g) were individually placed in a sterile plastic bag with 90 mL of peptone water (0.1%). The samples were homogenized in a stomacher (Interscience) for 60 s, decimally diluted in peptone water and 1 mL aliquots were pour-plated in Violet Red Bile Agar (VRB, Merck) for *Enterobacteria* enumeration, Rogosa Agar (Difco) for *Lactobacillus*, and Bile-aesculin Agar (Merck) for *Enterococcus* enumeration. Plates were incubated at 37°C for 48-72 hours, Rogosa Agar plates were incubated in anaerobiosis. Typical colonies in each media were counted and the results expressed as presuntive enumeration of the bacteria.

2.5. ELISA assay

Blood samples were analyzed for IgG antibodies against *Salmonella* O-antigens with an in-house ELISA test developed and performed as previously described (Kich et al, 2007). The test is based on the *Salmonella* Typhimurium O-antigens 1, 4, 5 and 12 and detects *Salmonella* infections with serotypes B and D1. Results were expressed in optical-density (OD) and the cut-off point of the test was 0.169.

The aforementioned in-house ELISA was adapted to test intestinal washing fluid samples for IgA antibodies against *Salmonella*. The test was performed as previously described (Kich et al., 2007) with the following modifications. Instead of sera, undiluted intestinal fluid samples were added to the plates in triplicates. After incubation for 30 minutes at 37°C, the plates were washed as described above. In each well, 100µL of anti-pig IgA (Bethyl Laboratories Inc.) conjugated to horseradish peroxidase diluted 1:6,000 in PBS-TA was added. The plates were incubated, washed and developed as described (Kich et al., 2007). After 15 min at room temperature, the reaction was stopped with 50µL of 2M sulfuric acid. All tests were performed in triplicate. The optical density (OD) at 450 nm was read using a Titertek-Multiscan reader (ICN Flow Ltd). ODs median values of both treatment and control groups were compared, since no cut-off point has been established for this test.

2.6. Histopathology

Evaluation of lesions on spleen, liver and intestinal samples was performed following routine procedures (Luna 1968). Tissues were fixed in 10% buffered formalin, paraffin-embedded, sectioned at 3-4 μm , and stained with hematoxylin-eosin stain.

2.7. Statistical analyses

Mann-Whitney non-parametric test was used for the *S. Typhimurium* shedding analyses, intestinal bacteria (coliforms, lactobacilli and enterococci) enumeration and IgA or IgG OD's comparison. Intestinal bacteria counts were transformed to base-10 logarithms before analysis.

3. Results

No clinical signs were observed in the pigs throughout the experiment, and histopathologic exams did not reveal lesions in liver, spleen, lymph nodes and tonsils.

No significant difference was observed between groups regarding *Salmonella* excretion throughout the experiment. On day 14 p.i. seven and six pigs, respectively of the control and treatment group, were excreting *Salmonella* in the feces. On day 21 p.i., *Salmonella* was isolated from the gut of seven pigs from both groups. *Salmonella* was isolated from feces collected on both sample days in three pigs from the treatment group and four pigs from the control group. *Salmonella* was not detected in any feces samples from one pig belonging to the control group, while two pigs from the treatment group were negative in all feces sampling.

None liver sample was positive and on the other sampled organs, no significant difference was detected on *Salmonella* isolation between groups. Two pigs from the treatment group and four pigs from the control group were negative in all sampled organs, while from one pig in each group *Salmonella* was isolated from the spleen, tonsils and mesenteric lymph nodes. Tonsil samples displayed the higher number of *Salmonella* isolation in both groups, while spleen samples presented the lowest isolation frequency (Table 1). Serovar Typhimurium was identified in all positive samples, but *S. Panama* and

S. Schwarzengrund were also isolated from the feces and tonsils of two pigs, indicating that the pigs were challenged with other serovars present in the environment.

Salmonella enumeration demonstrated that pigs excreted a low number of bacteria in feces throughout the experiment. The median of *Salmonella* excretion was lower in the treatment group at both 14 and 21 days p.i (0.18 cfu.g⁻¹ and 0.3 cfu.g⁻¹, respectively) compared to the control group (0.36 cfu.g⁻¹ on day 14 p.i., and 1.1 cfu.g⁻¹ on day 21 p.i), though the difference was not statistically significant (Table 1).

ELISA IgG and IgA OD's of both groups showed no significant difference. IgG median titer was higher on day seven prior inoculation, declined until day 7 p.i and remained on the same level until the end of the experiment (Figure 1). One pig from the control group and two pigs from the treatment group were positive on day 21 p.i. The IgA median titer observed in the control group was 0.239 (0.013 to 0.682), while in the treatment group it was 0.060 (0.016 to 0.654).

No significant difference was observed between groups in the median of enterococci and lactobacilli counts throughout the experiment. The median of coliform was also similar in both groups, except on day 14 p.i., when it was significantly greater in the treated group than in the control group (Table 2).

4. Discussion and conclusions

No clinical signs were detected in the inoculated pigs, in accordance with previous observations that *Salmonella* Typhimurium transmission to pigs results mostly in subclinic infections and carrier state (Wilcock and Schwarz, 1992; Nielsen et al., 1995; Letellier et al., 2001; Kich et al., 2007). Infected pigs that shed *Salmonella* in their feces are one of the most important sources of contamination on pre-harvest, thus intervention measures that are capable of avoiding *Salmonella* colonization of the gut or decreasing the shedding period after infection may contribute to control the fecal-oral route of transmission on farm. Among the strategies adopted in food animal production, diet supplementation with MOS has demonstrated to be effective on the control of *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium* gut colonization of chicks (Fernandes et al., 2000; Spring et al., 2000; Fernandes et al., 2002), and was proposed as an additional measure to be included in a hazard analysis critical control point program of poultry production.

Similar results were not achieved in weaned pigs challenged with a high dose (10⁹ cfu) of *Salmonella* Typhimurium (Burkey et al., 2004). However, as proved by infection experiments aiming to simulate exposure of pigs to *Salmonella* on farm and in the pre-

slaughter period, pigs are usually exposed to a relatively low level (10^3) of *Salmonella* in the environment. Since the hypothesis for MOS addition to the diet is to offer bacteria a surrogate source of attachment other than the gut wall, challenging with a high *Salmonella* dose may negatively influence the performance of the additive and may not represent the exposure dose found in the contaminated environment. Based on this, we hypothesized that MOS would affect *Salmonella* infection and shedding rates in pigs exposed to *Salmonella* dose found in the environment.

However, even with a low dose challenge, no statistical decrease in the *Salmonella* isolation from pigs fed the diet containing MOS was observed in our study. Although, a tendency to lower *Salmonella* shedding in the treatment group apparently occurred, in terms of the number of pigs excreting *Salmonella* on each sampling day as well as the isolation of *Salmonella* from feces samples over time. Moreover, two pigs from the MOS-group have apparently not been infected, since *Salmonella* could not be isolated from any sample of feces or organs.

Salmonella invasion by alternative routes such as the nasal associated lymphoid tissue (NALT), lungs and tonsils, can be pointed out as a factor that may have influenced the effect of MOS on infection rates. Fedorka-Cray et al. (1995) demonstrated that esophagotomized pigs inoculated intra nasally with S.Typhimurium presented the bacteria in the gut and lymph nodes after 12 hours p.i. Furthermore, other studies demonstrated that this route may represent another site of invasion and an additional way to maintain carrier pigs in the herd (Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2008). In our study, the tonsils contributed to the largest rate of *Salmonella* isolation, demonstrating that it was an important entry for bacteria. Thus, intervention measures like MOS may exert some detrimental effect upon the fecal-oral route of transmission, as can be supposed in our study by the tendency of lower fecal excretion exhibited by the pigs from the treatment group, but it will not be able to completely prevent the infection of pigs.

Serology results demonstrated that pigs from both groups presented a relatively high IgG titer at weaning, possibly related to the maternal antibodies acquired through the colostrum. Those antibodies titers decreased until day 14 p.i, while at the necropsy an increase tendency could be observed and two pigs were already seropositive, demonstrating that seroconversion was initiating. Antibodies titers against *Salmonella* in piglets is reported in other studies (Kranker et al., 2003; Merialdi et al., 2008) and reflect the high frequency of positive sows in swine herds due to the continuous exposition to this ubiquitous agent. Whilst the maternal antibodies may protect the piglet against *Salmonella*

infection during the lactation phase, in the post-weaning period antibodies titers decline and the nursery represents the first critical phase for *Salmonella* infection in pigs (Kranker et al., 2003; Beloeil et al., 2003). In our study, pigs were infected by *Salmonella* in the post-weaning phase and started the fecal excretion on day 7 p.i., in spite of that, only two pigs were seropositive until the end of the experiment. Seroconversion has been often observed 14 days p.i. in pigs experimentally infected with high *Salmonella* dose (Nielsen et al., 1995; Kich et al., 2007), while in studies conducted on farm, pigs became seropositive up to 60 days after the *Salmonella* excretion peak (Kranker et al., 2003; Merialdi et al., 2008). This may be related to the *Salmonella* exposure level, which is often higher in pigs artificially inoculated compared to the *Salmonella* number reported in the contaminated environment (McKean et al., 2001). In this connection, the inoculation of a low dose of *Salmonella* and the fecal excretion of a low number of a bacteria throughout the experiment period in our study may have provided a low challenge level, resulting in a delayed seroconversion.

The local immune response has been pointed out as involved in the reduction of *Salmonella* in the porcine ileum, and higher IgA titer was detected in the small intestine of pigs vaccinated with an attenuated *Salmonella* strain (Letellier et al., 2001). Since addition of MOS to the diets of rats and turkeys demonstrated to be able to enhance IgA levels in the gut (Savage et al., 1996; Kudoh et al., 1999), in the present study we tested the IgA titers against *S. Typhimurium*. The individual OD's found in both treatment and control groups displayed a great variation, and no relation between IgG and IgA OD's values was found at individual basis. The median values found in both groups were not statistically different, demonstrating that MOS was not able to influence the IgA titers against *Salmonella* in our study.

Another positive effect related to the addition of MOS to poultry diets has been the enhancement of lactobacilli and bifidobacteria, which are associated with gut health (Spring et al., 2000; Baurhoo et al, 2007). In our study no beneficial effect could be detected and both groups presented similar median values throughout the experiment period. Only enterobacteria median value was statistically higher on day 14 p.i. in the treatment group and may have been related to pig exposition to *E.coli* in the nursery. Since *E.coli* presents mannose-specific type-1 fimbriae, MOS is able to adsorb and the bacteria are ultimately excreted without colonization of the gut (Newman and Newman , 2001).

In conclusion, the dietary addition of MOS did not affect the enteric bacteria concentration and was not able to decrease the *Salmonella* infection rate in pigs, although a lower excretion for a shorter period may occur in pigs challenged with a low *Salmonella* dose.

Acknowledgements

This study was supported by the Coordenação de Apoio ao Pessoal de Ensino Superior-CAPES (L. Borowsky scholarship).

References

- Baggesen, D.L., Wingstrand, A., Carstensen, B., Nielsen, B., Aarestrup, F.M., 1999. Effects of the antimicrobial growth promoter tylosin on subclinical infection of pigs with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Am. J. Vet. Res.* 60, 1201-1206.
- BAM, 2003. Bacteriological Analytical Manual. (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html). Appendix 2: Most Probable Number Determination from Serial Dilutions. (9th ed.).
- Baurhoo, B., Letellier, A., Zhao, X., Ruiz-Feria, C.A., 2007. 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. *Poult. Sci.* 86, 2509-2516.
- Beloil, P.A., Chauvin, C., Proux, K., Rose, N., Queguiner, S., Eveno, E., Houdayer, C., Rose, V., Fravallo, P., Madec, F., 2003. Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Prev. Vet. Med.* 60, 207-226.
- Bengtsson, B., Wierup, M., 2006. Antimicrobial resistance in Scandinavia after ban of antimicrobial growth promoters. *Anim. Biotechnol.* 17 (2), 147–56.
- Berends, B.R., Van Knapen, F., Snijder, J.M.A., Mossel, D.A.A., 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 199-206.
- Bessa, M.C., Michael, G.B., Canu, N., Canal, C.W., Cardoso, M., Rabsch, W., Rubino, S., 2007. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. *Res. Vet. Sci.* 83, 302-310.

- Biggs, P., Parsons C. M., Fahey G.C., 2007. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poult. Sci.* 86, 2327-2336.
- Borowsky, L., Corção, G., Cardoso M., 2009. Mannanligosaccharide agglutination capability of *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. *Braz. J. Microbiol.* *in press*.
- Burkey, T.E., Dritz, S.S., Nietfeld, J.C., Johnson, B.J., Minton J.E., 2004. 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. *J. Anim. Sci.* 82, 397-404.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., Phillips, I., 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 159-161.
- Ebner, P.D., Mathew, A., 2000. Effects of antibiotic regimens on the fecal shedding patterns of pigs infected with *Salmonella* Typhimurium. *J. Food Prot.* 63, 709-714.
- Fedoraka-Cray, P.J., Kelley, C., Stabel, T.J., Gray, J.T., Laufer, J.A., 1995. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. *Infect. Immun.* 63 (7), 2658-2664.
- Fernandez, F., Hinton, M., Van Gils, B., 2002. Dietary mannanligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Pathol.* 31 (1), 49-58.
- Funk, J., Wondwossen, A.G., 2004. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *J. Swine Health Product.* 12 (5), 246-251.
- Kich, J.D., Schwarz, P., Silva, L. E., Coldebella, A., Vizzoto R. Cardoso M., 2007. 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.* 19, 510–517.
- Krunker S., Alban L., Boes J., Dahl J., 2003. Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *J. Clin. Microbiol.* 41(6), 2282-2288.
- Kudoh, K.,J., Shimizu, A., Ishiyama, M., Wada, M., Takita, T., Kanke, Y., Innami, S., 1999. Secretion and excretion of immunoglobulin A to cecum and feces differ with type of indigestibles saccharides. *J. Nutrit. Sci. Vitaminol.* 45, 173–181.

- Letellier, A., Messier, S., Lessard, L., Chénier, S., Quessy, S., 2001. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Can. J. Vet. Res.* 65, 168-172.
- Letellier, A., Messier, S., Lessard, L., Quessy, S., 2000. Assessment of different treatments to reduce *Salmonella* in swine. *Can. J. Vet. Res.* 64, 27-31.
- Lo Fo Wong, D.M.A., Dahl, J., Stege, H., van der Wolf, P.J., Leontides, L., von Altrock, A., Thorberg, B.M., 2004. Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Prev. Vet. Med.* 62, 253-266.
- Luna, L.G., 1968. Manual of the histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, New York McGraw Hill, 258p.
- McKean, J.D., Hurd, H.S., Larsen, S., Rostagno, M., Griffith, R., Wesley, I., 2001. Impact of commercial pre-harvest processes on the prevalence of *Salmonella enterica* in cull sows. *Ber. Munch. Tierarz. Wochenschr.* 114, 353-355.
- Merialdi, G., Barigazzi, G., Bonilauri, P., Tittarelli, C., Bonci, M., D'Incau, M., Dottori, M., 2008. Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow-to-finish swine herds. *Zoon. Pub. Health* 55(4), 222.
- Mousing, J., Thode-Jensen, P., Halgaard, C., Bager, F., Feld, N., Nielsen, B. Nielsen, J.P. Bech-Nielsen, S., 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev. Vet. Med.* 29, 247-261.
- Mürmann, L., Santos, M.C., Cardoso, M., 2009. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. *Food Control* 20, 191-195.
- Newman, K.E., Newman, M.C., 2001 Evaluation of mannanoligosaccharide on the microflora and immunoglobulin status of sows and piglet performance. *J. Anim. Sci.* 79, 189-191.
- Nielsen, B., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J., Lind P., 1995. The serological response to *Salmonella* serovars Typhimurium and Infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet. Microbiol.* 47, 205-218.
- Oliveira, C.J.B., Carvalho, L.F.O.S., Garcia, T.B., 2006. Experimental airborne transmission of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Typhimurium in weaned pigs. *Epidemiol. Infect.* 134, 199–209.

- Oliveira, C.J.B., Garcia, T. B., Carvalho, L.F.O.S, Givisiez, P.E.N., 2007. Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. *Vet. Microbiol.* 125, 355–361.
- Prescott J.F., 2008. Antimicrobial use in food and companion animals. *Anim. Health Res. Rev.* 9(2), 127-133.
- Savage, T.F.; Cotter, P.F.; Zakrzewska, E.I., 1996. The effects of feeding mannanoligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA, of Wrolstad MW male turkeys. *Poultry Sci.* 75 (Suppl. 1),143 (Abstr.).
- Sinell, H.J., Pietzsch, O., Klingbeil, H., Benner, M., 1990. Estimation of most probable number of *Salmonella* in retail samples of miced pork. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 135-142.
- Spring, P., Wenk, C., Dawson, K.A., Newman, K.E., 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*- challenged broiler chicks. *Poultry Sci.* 79, 205-211.
- Swanenburg, M., Urlings, H.A.P., Snijders, J.M.A., 2001. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 243–254.
- Vieira-Pinto, M., Tenreiro, R., Martins, C., 2006. Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 77-84.
- Wilcock, B.P., Schwarz, K.J., 1992. Salmonellosis. *In*: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling W.L. (ed). *Diseases of Swine*, 7th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 570-583.

Table 1

Salmonella quantification (cfu.g⁻¹) in the feces and *Salmonella* isolation from organs of pigs fed antibiotic-free diets (control) and diets supplemented with mannanoligosaccharide (MOS, 4.0 ppm for 21-d until 35-d pigs, followed by 2.0 ppm until 49-days of age) and challenged with 10³ cfu *Salmonella* Typhimurium.

Animal	<i>Salmonella</i> count in feces			<i>Salmonella</i> isolation		
	cfu.g ⁻¹			Spleen	Tonsil	Mesenteric lymph nodes
	Day 7 p.i.	Day 14 p.i.	Day 21 p.i.			
Control						
1	0	0	3.5	-	-	-
2	0	0	2.0	-	-	+
3	0	0	0	-	+	+
4	0	0.36	2.9	-	+	-
5	0	2.1	0.74	-	+	-
6	0	0.36	2.0	+	+	+
7	0	1.1	0	-	-	-
8	0	0.72	1.1	-	+	+
9	0.36	0.74	0	-	-	-
10	7.5	0	1.1	-	-	-
11	0	0.3	0	+	-	-
MOS						
1	0	0	9.3	-	+	-
2	0	110	0.3	-	-	+
3	0	0.36	0	-	+	-
4	0	0.36	0.36	-	+	-
5	0	0	0.74	-	+	+
6	0	1.1	0	+	+	+
7	0	0	1.5	-	+	-
8	0	7.5	1.1	-	+	+
9	0.36	0	0.3	-	+	+
10	0	9.3	0	-	+	-
11	0	0	0	-	-	-
12	0	0	0	-	-	-

Table 2

Median of coliforms, enterococci and lactobacilli counts (\log_{10} cfu-g⁻¹) in the feces of pigs fed antibiotic-free diets (control) and diets supplemented with mannanoligosaccharide (MOS, 4.0 ppm for 21-d until 35-d pigs, followed by 2.0 ppm until 49-days of age) and challenged with 10³ cfu *Salmonella* Typhimurium. Values with different letters are different (Mann-Whitney non parametric test, P<0.05)

	Day 0		Day 14 p.i.		Day 21 p.i.	
	Control	MOS	Control	MOS	Control	MOS
Coliforms	5.71	5.32	5.50 ^a	6.9 ^b	6.36	6.35
Enterococci	4.32	3.57	5.21	4.44	5.17	4.84
Lactobacilli	5.57	5.85	7.23	6.14	7.0	7.38

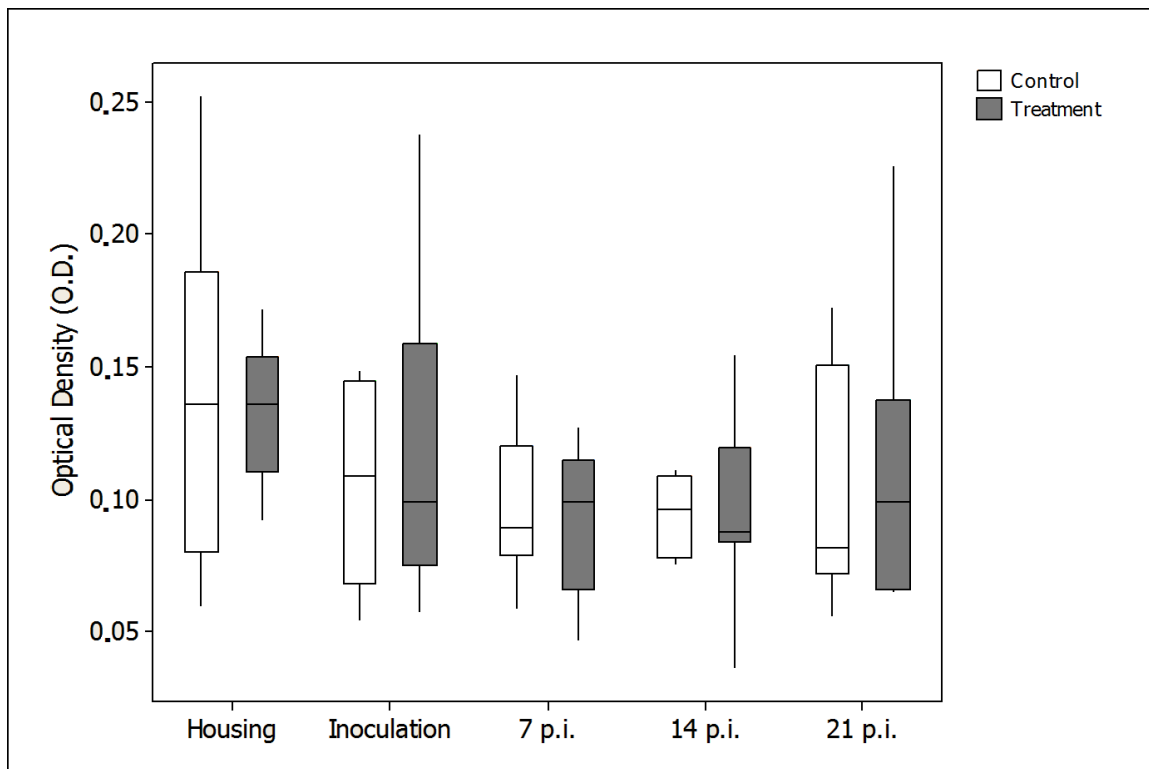


Fig. 1. Box-plot of the Optical Density on the ELISA-IgG test of serum samples taken from pigs fed antibiotic-free diets (control) and diets supplemented with mannanoligosaccharide (MOS, 4.0 ppm for 21-d until 35-d pigs, followed by 2.0 ppm until 49-days of age), before and after challenging with 10^3 cfu *Salmonella* Typhimurium.

4. DISCUSSÃO GERAL

A presença de *Salmonella* sp. na cadeia produtiva de suínos brasileira demonstra a necessidade da implementação de um programa de controle nas agroindústrias que desejam ser competitivas no mercado de consumidores exigentes quanto à qualidade e inocuidade dos alimentos. No cenário atual de elevada prevalência de suínos portadores ao abate encontrado em matadouros-frigoríficos brasileiros (Bessa et al., 2004; Castagna et al., 2006; Kich et al. 2006), impõem-se a implementação de medidas de intervenção nas granjas, uma vez que apenas as boas práticas de abate e processamento não serão capazes de evitar a contaminação das carcaças.

As medidas de fundo nos programas de controle instituídos nas fases pré-abate incluem a correção de fatores de risco previamente identificados em estudos epidemiológicos, os quais estão relacionados à biossegurança e ao manejo adotados nas granjas (Lo Fo Wong et al., 2004; Funk & Gebreyes, 2004; Kich et al., 2005). O uso de antimicrobianos para o controle de portadores de *Salmonella* sp. é ineficiente e, pelos padrões de uso prudente de antimicrobianos

em animais, inaceitável (Costa et al., 2007). Dessa forma, outras medidas devem ser buscadas para que, em associação com a correção de fatores de risco, possam contribuir para a diminuição do número de suínos portadores em intervalo de tempo razoável.

Mananoligossacarídeos (MOS) têm sido propostos como uma alternativa ao uso de antimicrobianos, observando-se eficácia variável nos estudos conduzidos (Cromwell et al., 1991; Davis et al., 1999; Davis et al., 2000; Pettigrew, 2000). MOS é um carboidrato derivado da parede celular externa do *Saccharomyces cerevisiae* e tem a capacidade de interferir com a colonização de bactérias Gram-negativas que utilizam lectinas, presente nas fímbrias aderentes à manose (Fernandes et al., 2003). Entre as fímbrias que apresentam essa capacidade, a fímbria tipo 1, também denominada de manose-sensível, é a mais encontrada em enterobactérias (Podshun & Ullman, 1998). Em *Salmonella* Typhimurium, é a fímbria tipo 1 que tem demonstrado contribuir de forma efetiva para colonização no trato intestinal (Althouse et al., 2003; Bäumlner et al., 1997).

A partir disso, o presente estudo foi conduzido para avaliar o uso do MOS como alternativa para o controle de *Salmonella* na primeira fase crítica da produção de suínos, ou seja, após a entrada dos animais na fase de creche.

Na primeira etapa do estudo, cepas de *Salmonella enterica* isoladas de suínos foram avaliadas quanto à expressão de fímbria tipo 1 por meio de teste de hemaglutinação; à adsorção ao MOS; e à presença dos genes *fimA* e *fimH*. Dos 108 isolados de *Salmonella* sp. isoladas de suínos que foram submetidas ao PCR

multiplex para os genes *fimA* e *fimH*, todos apresentaram fragmentos amplificados. Isolados de outras enterobactérias testadas foram negativos para ambos os genes, demonstrando a especificidade do teste. Anteriormente, Cohen et al. (1996), pesquisando o gene *fimA* em 376 isolados de *Salmonella* sp., obtiveram amplificação em 80 sorovares diferentes. Igualmente em nosso estudo, o gene *fimA* foi detectado em 27 diferentes sorovares de *Salmonella*, incluindo *S.* Rissen, *S.* Gold Coast, *S.* Newport, *S.* Lexington e *S.* Gruposensis, onde não havia sido relatada a presença desse gene até o momento.

Em relação à expressão da fímbria tipo 1, 31 isolados (28,7%) apresentaram hemaglutinação manose-sensível, sendo considerados isolados que expressavam fímbria tipo 1. A expressão da fímbria tipo 1 tem sido relacionada com sinais externos como temperatura, osmolaridade, concentração de sais biliares, que correspondam ao ambiente intestinal (Swenson et al., 1994). A variação no padrão de expressão da fímbria tipo 1 de *Salmonella* sp. também foi associada com proteínas reguladoras, o que, provavelmente, torna o gene *fim* sensível a estímulos ambientais e ao estado fisiológico da célula. (Tinker 2000; 2001; Althouse et al., 2003). Dessa forma, a baixa frequência de isolados de *Salmonella* sp. expressando fímbria tipo 1 em nossos estudos pode estar relacionada a algum desses fatores, uma vez que as amostras testadas estavam estocada a baixas temperaturas e foram cultivadas em meio de cultura antes do teste, não sendo isolados recentemente obtidos de animais infectados.

Na avaliação usando MOS, 30 isolados (27,8%) apresentaram forte adsorção, 24 (22, 2%) fraca reação e 54 (50%) foram negativos. Considerando

somente isolados expressando fímbria tipo 1, 23 (74,2%) apresentaram adsorção forte ao MOS, 3 (9,6%) uma fraca reação e 5 (16,2%) nenhuma reação. Uma boa concordância entre hemaglutinação manose-sensível e adsorção ao MOS foi observado ($P < 0.0001$), demonstrando que isolados de *Salmonella enterica* expressando fímbria tipo 1 *in vitro* podem efetivamente adsorver ao MOS. Dessa forma, a partir da presença dos genes *fimA* e *fimH* em todos os isolados de *Salmonella enterica*, e da concordância entre expressão de fímbria tipo 1 e adsorção ao MOS, concluiu-se que MOS apresentava potencial para ser testado para controle de *Salmonella* sp. em suínos.

A partir disso, iniciou-se um experimento em animais infectados artificialmente com uma baixa dose (10^3 ufc) de um isolado de *S. Typhimurium* que havia apresentado uma forte adsorção ao MOS “in vitro”. Leitões desmamados aos 21 dias de idade foram alocados em grupo tratamento com adição de MOS à dieta (4.0 ppm de 21 até 35 dias, seguido de 2.0 ppm até os 49 dias de idade), ou em grupo controle (dieta sem adição de MOS) e acompanhados por 28 dias. Nesse período, foram observados quanto à frequência e quantidade de excreção de *Salmonella* sp., índice de animais infectados ao final do período, composição da microbiota intestinal (lactobacilos, enterococos e enterobactérias), e nível de IgG sérica e IgA de mucosa contra *Salmonella* sp.

Sinais clínicos de salmonelose, como diarreia, não foram observados nos suínos durante o experimento, bem como os exames histopatológicos não revelaram lesões no fígado, baço, linfonodos e tonsilas. Suínos desafiados com uma dose elevada (10^9 ufc) de *S. Typhimurium* podem apresentar sinais clínicos

(Burkey et al., 2004). No entanto, os suínos são geralmente expostos a um nível relativamente baixo (10^3) de *Salmonella* no ambiente da granja e do pré-abate (Rostagno et al., 2003). Uma vez que a hipótese para a utilização do MOS na dieta é oferecer à bactéria um sítio de ligação alternativo ao enterócito, desafiar com alta dose de *Salmonella* sp. poderia influenciar negativamente o desempenho desse aditivo e não representaria a dose de exposição encontrada no ambiente contaminado. Baseado nisso, optou-se por testar o MOS em suínos expostos às doses de *Salmonella* sp. encontradas no ambiente.

Entretanto, mesmo com a baixa dose de desafio, não houve diferença estatística no isolamento de *Salmonella* sp. a partir das amostras colhidas dos suínos de ambos os grupos. As amostras de tonsilas apresentaram a maior frequência de isolamento de *Salmonella* sp., o que concorda com os resultados obtidos por outros autores, que também encontraram uma alta frequência de *Salmonella* sp. em tonsilas (Castagna et al., 2004). O alto índice de contaminação das tonsilas se explica pela reinfecção frequente por via oral. Ao lado disso, estudos comprovaram que a invasão de *Salmonella* sp. pode ocorrer através de rotas alternativas, como pelos tecidos linfóides associados ao sistema respiratório, pulmões e tonsilas (Fedorka-Cray et al., 1995; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007), sendo essa uma forma adicional de manter os suínos portadores no rebanho. Em nosso estudo, as tonsilas contribuíram com a maior taxa de isolamento de *Salmonella*, demonstrando que essa forma de entrada para a bactéria foi muito importante, e podendo explicar a falha do MOS em alterar o índice de animais infectados no grupo tratamento.

Em relação à excreção fecal de *Salmonella* sp. no dia 14 pós-infecção (p.i.), sete e seis suínos, respectivamente do grupo controle e tratamento, estavam excretando *Salmonella* sp. nas fezes, comprovando que ocorreu a infecção dos animais. No dia 21 p.i., *Salmonella* sp. foi isolada do intestino de sete suínos de ambos os grupos. Houve isolamento a partir de amostras de fezes em ambos os dias em três suínos provenientes do grupo tratamento e quatro suínos do grupo controle. *Salmonella* sp. não foi detectada em nenhuma amostra de fezes de um suíno pertencente ao grupo controle, enquanto no grupo dos tratados dois suínos foram negativos em todas as amostras de fezes. A quantificação de *Salmonella* demonstrou que os suínos excretaram um baixo número de bactérias nas fezes durante o experimento. A média de excreção de *Salmonella* sp. no grupo tratamento nos dias 14 e 21 pós-infecção foi mais baixa (0.18 ufc.g^{-1} e 0.3 ufc.g^{-1} , respectivamente) em comparação ao grupo controle (0.36 ufc.g^{-1} no dia 14 p.i., e 1.1 ufc.g^{-1} no dia 21 p.i.), embora não tenha havido diferença estatística.

Dessa forma, ocorreu uma aparente tendência de menor excreção de *Salmonella* sp. no grupo tratamento, em termos do número de suínos excretando *Salmonella* em cada dia de amostragem, bem como sobre o isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras de fezes ao longo do tempo. Além disso, dois suínos do grupo tratamento aparentemente não foram infectados, uma vez que *Salmonella* sp. não foi isolada de nenhuma amostra de fezes ou órgãos. Suínos infectados, que excretam *Salmonella* sp. nas fezes são a principal origem de contaminação no pré-abate, logo medidas de intervenção que sejam capazes de evitar a colonização intestinal de *Salmonella* sp. ou decréscimo do período de

excreção podem contribuir no controle da transmissão fecal-oral (Wilcock & Schwarz, 1992; Nielsen et al., 1995; Letellier et al., 2001; Kich et al., 2007). Dessa forma, a tendência de menor excreção fecal exibida pelos suínos do grupo tratamento pode vir a exercer algum efeito de controle sobre a via fecal-oral de transmissão, mas não parece ser capaz de evitar completamente a infecção dos suínos.

Paralelamente, estudos conduzidos com MOS tem apontado efeito benéfico em termos de aumento de imunidade de mucosa, o que constituiria uma barreira à colonização de patógenos intestinais (Brandtzaeg, 1998; MacFarlane & Cummings, 1999). Dessa forma, no presente estudo a resposta de IgA, paralelamente à resposta de IgG sérica nos animais, foi avaliada. As densidades óticas observadas nos testes de ELISA, IgG e IgA, de ambos grupos não apresentaram diferença estatística. Os resultados sorológicos demonstraram que suínos de ambos os grupos apresentaram alto título de IgG no desmame (sete dias antes da inoculação), possivelmente relacionados aos anticorpos maternos adquiridos através do colostro. Esses títulos de anticorpos decresceram até o dia 7 p.i., enquanto que no dia da necropsia pode ser observada uma tendência de aumento nesses títulos e dois suínos já haviam soroconvertido. Títulos de anticorpos contra *Salmonella* sp. em leitões recém-nascidos são relatados em outros estudos (Kranker et al., 2003; Schwarz et al., 2006; Merialdi et al., 2008) e refletem a alta frequência de fêmeas positivas em rebanhos suínos, em decorrência da contínua exposição a esse agente. Embora os anticorpos maternos possam proteger o leitão contra infecção por *Salmonella* sp. durante a fase de

lactação, no período pós-desmama os títulos anticorpos decrescem e surge a primeira fase crítica para a infecção por *Salmonella* sp. em suínos (Kranker et al., 2003; Beloeil et al., 2003).

O período de soroconversão é de mais ou menos duas semanas em suínos infectados com alta dose de *Salmonella* sp. (Nielsen et al.; 1995; Kich et al., 2007; Van der Gaag et al., 2004), porém em estudos realizados a campo, os animais soroconverteram em até 60 dias p.i. (Kranker et al., 2003; Merialdi et al., 2008). Como em nosso estudo os animais foram inoculados com uma baixa dose de *Salmonella* sp., é possível compreender o baixo número de animais soropositivos encontrado na necropsia (21 dias pós-infecção).

Os valores de IgA em ambos grupos não foram diferentes, ao lado disso, as Densidades Óticas (DO) individuais tanto no grupo controle quanto no tratado, apresentaram grande variação, e não houve relação entre os valores de DO de IgG e IgA. Para a avaliação da DO de IgG sérica empregou-se um teste de ELISA previamente desenvolvido e validado (Kich et al., 2007), enquanto para IgA o mesmo teste foi adotado, após algumas adaptações. Dessa forma, é possível que mais adaptações sejam necessárias para melhorar o desempenho do teste adaptado. Porém, usando apenas as leituras de DO como parâmetro, o MOS não foi capaz de influenciar os títulos de IgA contra *Salmonella* em nosso estudo. A resposta imune local tem sido relatada como envolvida na redução de *Salmonella* sp. no íleo de suínos, e um título maior de IgA foi detectada em suínos vacinados com uma cepa atenuada de *Salmonella* sp. (Letellier et al., 2001). Porém, resultados obtidos por Gray et. al (1996) quanto à concentração de IgA intestinal

em suínos desafiados com *S. Cholerasuis* também não foram conclusivos, uma vez que foi observada grande variação na quantidade de IgA ao longo do período pós-inoculação.

Finalmente, a alteração favorável da microbiota intestinal propiciada pelo MOS tem sido descrita, com um incremento de bifidobactérias e lactobacilos e diminuição de enterobactérias (Radecki & Yokoyama, 1991; Spring et al., 1999, Biggs et al., 2006, Baurhoo et al., 2007). No presente estudo, não foi observada diferença estatística entre as contagens de enterococos e lactobacilos nos grupos durante o experimento. A contagem de coliformes também foi similar em ambos os grupos, exceto no dia 14 p.i., onde o grupo tratado foi significativamente superior ao grupo controle, podendo estar relacionado à exposição do suíno a *E.coli* na creche. Uma vez que *E.coli* apresenta fímbria tipo 1, o MOS é capaz de adsorver à bactéria que será excretada sem colonizar o intestino (Newman, 1994).

Estudos sobre a utilização do MOS em dietas de suínos como forma de controlar a colonização e excreção de *Salmonella* sp. ainda são escassos. Porém, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com Burkey et al. (2004) que desafiaram suínos com *Salmonella* sp. e compararam três diferentes aditivos para dietas (MOS, clorato de sódio e antimicrobianos). Nesse estudo, o MOS não apresentou diferença em relação ao antimicrobiano na excreção de *Salmonella* sp., porém ambos os tratamentos apresentaram um desempenho inferior ao uso do clorato de sódio. Já no presente trabalho, não houve uma influência nas freqüências de infecção dos animais, mas uma tendência à menor excreção pode ser observada. Esses resultados demonstram que as respostas

biológicas na nutrição animal nem sempre são facilmente evidenciadas, e que outros estudos confirmando o desempenho do MOS em termos de quantidade e duração da excreção de *Salmonella* sp., inclusive nas demais fases críticas de infecção, são requeridos para esclarecer as condições nas quais há vantagem em sua suplementação.

5.CONCLUSÕES

Os resultados indicam que MOS pode adsorver “in vitro” de forma eficaz a isolados de *Salmonella enterica* que expressam fímbria tipo 1. Em suínos em fase de creche inoculados com *Salmonella* Typhimurium, a adição de MOS na dieta não parece ser capaz de diminuir o índice de animais infectados, aumentar a concentração de IgA de mucosa contra *Salmonella* sp., nem alterar a população intestinal de lactobacilos, enterococos e enterobactérias. Porém, uma tendência à menor excreção fecal de *Salmonella* sp. parece ocorrer.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALBAN, L. STARK, K. D. C. Alban and Stark, Where should the effort be put to reduce the Salmonella prevalence in the slaughtered swine carcass effectively, **Preventive Veterinary Medicine** , v.68, p. 63–79, 2005.

ALTIER C. Genetic and Environmental Control of *Salmonella* Invasion .**The Journal of Microbiology**, v.43, p.85-92, 2005.

ALTHOUSE, C.; PATTERSON, S.; FEDORKA-CRAY, P.et al. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. **Infection Immunity**, v.71, p.6446-6452, 2003.

ANONYMOUS, 2004. Annual Report on Zoonoses in Denmark. Danish Zoonosis Centre, Copenhagen, Denmark, 31p, 2003.

ASHKENAZI, S.; CLEARY, T.G.; MURRAY, B.E. et al. Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains. **Infection Immunity**, v.56, p.3089–3094, 1988.

AXELSSON L. **Lactic acid bacteria: classification and physiology**. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, editors. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; p.1-66, 2004.

BANWART, G.J. **Basic food microbiology**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold. 774 p., 1989.

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.

BELOEIL, P.A.; CHAUVIN, C.; PROUX, K. et al. Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 60, p.207-226, 2003.

BERENDS, B.R.; URLINGS, A.P.; SNIJDERS, J.M.A. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* sp. in pigs. **International Journal Food Microbiology**, v.30, 37-53, 1996.

BERK, P.A., JONGE, R., ZWIETERING, M.H., et al. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Journal Applied Microbiology**, v. 99, p.859–866, 2005.

BERTECHINI, A. G.; HOSSAIN, S. M. Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frango de corte. *In*: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA. *Anais...*Santos, 1993.

BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.24, p.80-84, 2004.

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.

BOTTELDOORN, N. ;HERMAN, L.; RIJPENS, N.; HEYNDRICKX, M. Phenotypic and Molecular Typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. **Applied Environmental Bacteriology**, v.70, p. 5305-5314, 2004.

BOYEN A.F.; HAESEBROUCK, A.; MAES, D. et al. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. **Veterinary Microbiology**, v.130, p. 1–19, 2008.

BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. **Nutrition Review**, v.56, p 5-18, 1998.

BRENNER F.W.; VILLAR R.G.; ANGULO F.J. et al. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2465-2467, 2000.

BURKEY, T.E.; DRITZ, S.S.; NIETFELD, J.C.; JOHNSON, B.J.; MINTON J.E. Effect of dietary mannanoligosaccharide 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.

CASTAGNA, S.M.F.; SCHWARZ, P.; WAGECK, C. et al. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.141-147, 2004.

CEGELSKI L.; MARSHALL G.R.; ELDRIDGE G.R. et al. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nature Review**, v.6, p. 17-27, 2008.

CHARY, P.; PRASAD, R.; CHOPRA, A.K. et al. Location of the enterotoxin gene from *Salmonella* Typhimurium and characterization of the gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v.111, p.87-92, 1993.

CHRISTENSEN, J. et al. Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish pig herds after implementation of the Danish *Salmonella* Control Program with reference to a pre-implementation study 2002. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 175-188, 2002.

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

COHEN H.J.; MECHANDA S.M.; LIN W.. PCR amplification of the fimA gene sequence of *Salmonella* Typhimurium, a specific method for detection of *Salmonella* sp. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.4303-4308, 1996.

COSTA L.B; TSEM.L.P.; MIYADA V.S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p. 116-123, 2007

CROMWELL, G. L.. Antimicrobial and promicrobial agents. In: Swine Nutrition 2nd ed. A. J. Lewis and L. L. Southern, ed. Swine Nutrition. CRC Press, Boca Roton, FL, 2001.

D'AOUST, J.Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. **International Journal Food Microbiology**, v. 12, p. 17-40, 1997.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. **Clinical Microbiology Review**, v. 12, p. 405-428, 1999.

DAUGA, C., ZABROVSKAIA, A.; GRIMONT, P.A.D. Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p. 2835–2843, 1998.

DAVIS, M. E., C. V. MAXWELL, E. B. KEGLEY. Efficacy of mannan oligosaccharide (Bio-Mos) addition at two levels of supplemental copper on performance and immunocompetence of early-weaned pigs. **Journal Animal Science**, 77(Suppl. 1):63 (Abstr), 1999.

DAVIS, M. E., C. V. MAXWELL, E. B. KEGLEY, et al. Efficacy of mannan oligosaccharide (Bio-Mos) supplementation with and without zinc oxide on performance and immunocompetence of weanling pigs. *Journal Animal Science*, 78(Suppl. 2):61 (Abstr.), 2000.

DAWSON, K. A.; PIRVULESCU, M. Mananoligossacarídeos derivados de leveduras como moduladores da resposta imunológica e alternativas aos promotores de crescimento antimicrobianos. In: RONDA LATINO-AMERICANA DA ALLTECH,9., 1999, Curitiba. Anais...p.33-41, 1999.

DOMIG, K. J.; MAYER, H. K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. **International Journal Food Microbiology**, v. 88, p. 147–164, 2003.

EDWARDS R.A.; PUENTE, J.L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v.6, n.7, p.282-287, 1998.

EDWARDS R.A.; OLSEN G.J.; MALOY S.R. Comparative genomics of closely related salmonellae. **Trends in Microbiology**, v.10, n.2, p.94-99, 2002.

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

FEDORKA-CRAY, P.J., KELLEY, C., STABEL, T.J. et al. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella Typhimurium* in swine. **Infection Immunity**, v 63, p. 2658-2664, 1995.

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, 2003, Campinas, SP. Anais... Campinas: CBNA.p. 135-166, 2003.

FINLAY, B.B.; CAPARON M.. Bacterial adherence to cell surfaces and extracellular matrix. **Cellular Microbiology**, v.2, p.105-120, 2004.

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

FIRON, N.; OFEK; I.; SHARON N. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.105, p1426–1432, 1982.

FLEMMING, J.S.; FREITAS,R.J.S. Evaluation of the effect of prebiotics (MOS), probiotics (*Bacillus licheniformis* and *Bacillus sibtillis*) and growth promoter in broiler diets). **Archives of Veterinary Science** ,v. 10, n. 2, p. 41-47, 2005.

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.

FUNK, J.A.; GEBREYES, W.A. Risk factor associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. **Journal of Swine Health and Production**, v.12, p.246-251, 2004.

GALLAND, J.C. et al. Prevalence of *Salmonella* in beef feeder steers as determined by bacterial culture and ELISA serology. **Veterinary Microbiology**, n. 76, p. 143–151, 2000.

GEIMBA, M.P.; TONDO, E. C., OLIVEIRA, F. A. et al. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v.67, n.6, p.1229-1233, 2004.

GERLACH, R.M.; MANFRED, R. C. N.; JÄCKEL ,D. et al. Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. **Cellular Microbiology**, v. 10, p.2364–2376, 2008.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. Antigenic Formulae of Salmonella Serovars, 9th ed (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France), 2007.

HALD, T.; WEGENER, H. C. Quantitative assesment of the sources of human salmonellosis atributable to pork. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3, Washington. Proceedings...Washington, p. 200-205, 1999.

HENSEL M. Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p.95–102, 2004.

HERIKSTAD, H.; MOTARJEMI Y.; TAUXE, R.V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiology and Infection**, v.129, p.1-8, 2002.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9. ed. Baltimore: **Williams & Wilkins**, 787p., 1994.

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

HUGHES, C.; GILLESPIE, I.A.; O'BRIEN, S.J. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. **Food Control**, v.18, p. 766-772, 2007.

HURD, H.S.; MCKEAN, J.D.; GRIFFITH, R.W. et al. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.2375–2381, 2002.

HURD, H.S.; ENOE C.; SORENSEN L. et al. Risk-based Analysis of the Danish Pork *Salmonella* Program: Past and Future. **Risk Analysis**, v.28, n.2 p.341351, 2008.

HUYGHEBAERT, G. Replacement of antibiotics in poultry In: EASTERN NUTRITION CONFERENCE, 2003. Quebec City. Anais... Quebec City: OUN, p.1-23, 2003.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005.

JANSEN A ; FRANK C.; STARK K. Pork and pork products as a source for human salmonellosis in Germany. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.120, p.340-346, 2007.

JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of enterococos. **Clinical Microbiology Review**, v.7, p. 462– 478, 1994.

KICH, J.D. COLDEBELLA, A.; MORÉS, N. et al. 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.; MORES, N.; PIFFER, I. A.. et al. Fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos. **Ciência Rural**, v.35, n.2, p.398-405, 2005.

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.* 19, 510–517, 2007.

KNIGHT S.D.; BERGLUND J.; CHOUDHURY D. Bacterial adhesins: structural studies reveal chaperone function and pilus biogenesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p.653-660, 2000.

KRANKER S., ALBAN L., BOES J. et al Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. **Journal Clinical Microbiology**, v 41, p. 2282-2288, 2003

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

LIBBY, S.J.; GOEBEL, W.;L UDWIG, A., et al. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.. 91, p. 489–493, 1994.

LIMA, E. S.; PINTO, P.S.A., SANTOS, J. L.; VANETTI, M.C.D.; et al.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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 185-190, 2004.

LINDBERG, A. A.; SEGALL T.; WEINTRAUB A. et al. Antibody response and protection against challenge in mice vaccinated intraperitoneally with a live *aroA* O4,O9 hybrid *Salmonella dublin* strain. **Infection Immunology**, v. 61, p.1211-1221, 1993.

LO FO WONG, D.M.A.; DAHL J.; STEGE H. et al Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v.62, p. 253-266, 2004.

MACHADO, H.G., PIFFER, I.A., GUIDONI, A.L. et al. Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico de infecções provocadas pelos sorotipos 3, 5, 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.513-522, 2001.

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

MACNAB, R.M. Flagella and motility In: *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium Cellular and Molecular Biology* (Niedhardt, F.C., Ed.), pp. 2788–2802. ASM Press, Washington, 1996.

MAGUIRE, H. C.; CODD A.; MACKAY VE. et al. A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. **Epidemiology and infection**, v.110, n. 2, p. 239-246, 1993.

MARCUS, S.L; BRUMELL J.H.; PFEIFER B. et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v.2, p. 145-156, 2000.

MASTROENI, P., SIMMONS, C., FOWLER, R., et al. *Igh-6^{-/-}* (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. **Infection Immunity**, v. 68, p.46–53, 2000.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V. et al. Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerging Infections Diseases**, v. 5, p. 607-625, 1999.

MELLOR, S. Alternatives to antibiotic. **Pig Progress**, v.16, p.18-21, 2000.

MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos em nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba, Anais... Piracicaba: SBZ, p.141-157, 2001.

MERIALDI, G.; BARIGAZZI, G.; BONILAUDI, P., et al. Longitudinal study of *Salmonella* infection in Italian farrow-to-finish swine herds. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 222, 2008.

MILLER, G.Y.; LIU X.; MCNAMARA, P.E. et al. Influence of *Salmonella* in pigs preharvest and during pork processing on human health costs and risks from pork. **Journal Food Protection**, v.68, p.1788-98, 2005.

MINELLI, E.B.; BENINI, A.; MARZOTTO, M. et al. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal**, v.14, p.723-736, 2004.

MILTENBURG, G. Promotores e aditivos de crescimento em avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2000, Campinas. Anais... Campinas: FACTA, p.206-215, 2000.

MITTRUCKER, H. W., RAUPACH, B., KOHLER, A. et al. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. **Journal Immunology**, v.164, 1648–1652, 2000.

MORES, N., SOBESTIANSKY, J., VIEIRA, R.P. et al. Estudo ecopatológico sobre problemas e leitões lactentes em criações no sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 47, p. 549-559, 1995.

MORES, N.; SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; MORENO, A.M. Manejo do leitão desde o nascimento até o abate. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; SESTI, L.A.C. (Ed). **Suinocultura intensiva**. Concórdia: EMBRAPA, p.135-162, 1998.

MORENO, M F.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E; et al. The role and application of enterococcos in food and health. **International Journal Food Microbiology**, v.106, p 1–24, 2006.

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.

NEWMAN, K. E.; NEWMAN M.C. Evaluation of mannan oligosaccharides on the microflora and immunoglobulin status of sows and piglet performance. **Journal Animal Science**, 79(Suppl.1):189 (Abstr.), 2001.

NEWMAN K., 1994. Mannan-oligosaccharides: natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. Proceed. Alltechs 18th Annual Symp.Nutr.Biotechn. in Feed and Food Industry, 13-15 May 1994. Nottingham Univ. Press, 167-174, 1994.

NIELSEN, B.; BAGGESEN D.; BAGER F.et al. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. **Veterinary Microbiology**, n. 47, p. 205–218, 1995.

NISBET D. Defined competitive exclusion cultures in the prevention of enteropathogen colonization in poultry and swine. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81 p.481-486, 2002.

OELSCHLAEGER, T.A., ZHANG, D., SCHUBERT, S. et al. The high pathogenicity island is absent in human pathogens of enterica pathogenicity island SPI-7. **Journal Bacteriology**, v. 185, p.5055–5065, 2003.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: A model for Bacterial Pathogenesis. **Annual Review of Medicine**, v.52, p. 259-274, 2001.

OLESEN, B. ; KOLMOS H.J.; ORSKOV F. et al., Bacteraemia Bacteremia due to *Escherichia coli* in a Danish university hospital,1986-1990.**Scand Journal Infection Disease** , v.27, p.253-257, 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. **Epidemiology Infection**, v.134,p. 199–209, 2006.

OLIVEIRA, C.J.B.; GARCIA, T. B.; CARVALHO, L.F.O.S. et al.. Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 125, p. 355–361, 2007.

OLSEN, J.E., BROWN, D.J., THOMSEN L.E., et al. Difference in carriage and the ability to utilize the serotype associated virulence plasmid in strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium investigated by use of a self-transferable virulence plasmid, pOG669. **Microbial Pathogenesis**, v.36, p.337-347, 2004.

PASCUAL, M.; HUGAS, M.; BADIOLA, J.I., et al. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. **Applied Environmental Microbiology**, v.11, p.4981-4986, 1999.

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.

PODSCHUN, R.; U. ULLMANN. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Review**, v.11, p.589-603,1998.

PRAGER, R., FRUTH, A. AND TSCHA"PE, H. Salmonella enterotoxin (stn) gene is prevalent among strains of Salmonella enterica, but not among Salmonella bongori and other Enterobacteriaceae. **Immunology Medical Microbiology**, v. 12, p. 47–50, 1995.

PROUX, C.; HOUDAYER F.; HUMBERT, R. et al. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharide of various serogroups allowing to detect all infected pigs. **Veterinary Research** v.31, p. 481–490, 2000.

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.

ROSTAGNO, M.H., HURD, H.S., MCKEAN J.D. et al. Pre slaughter 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. **Probiotics and prebiotics – microbial in menu**. Capturado em 21 de novembro de 1999. Online. Disponível na internet <http://www.babelfish.altavista.com/cgi-bm>.

RUIZ, R.L. **Microbiologia Zootécnica**. São Paulo: (Ed). Roca, p.314, 1992.

SANDBERG, M.; HOPP, P.; JARP, J. et al. An evaluation of the Norwegian Salmonella surveillance and control program in live pig and pork. **International Journal of Food Microbiology**, n.72, p. 1 11, 2002.

SANTOS R.L.; TSOLIS R.M.; BAUMLER A.J. Pathogenesis of salmonella –induce enteritis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.3-12, 2003.

SCHAUSER, K., OLSEN, J.E., LARSSON, L.I. Immunocytochemical studies of *Salmonella* Typhimurium invasion of porcine jejunal epithelial cells. **Journal Medical Microbiology**, v.53, p.691–695, 2004.

SCHWARZ, P.; HIROSE, F.; KOLB, J. et al. Longitudinal study of *Salmonella enterica* infection in a swine herd in southern Brazil. In: 19th IPVS Congress, 2006, Copenhagen. Proceedings 19th IPVS Copenhagen, v.2. p. 376-376, 2006.

SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. *et al.* (Eds.). **Diseases of Swine**. 8th ed., Ames: Iowa State University Press. cap.39, p. 535-551, 2000.

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

SMITH, J.L. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. **Journal Food Protection**, v.66, p. 1292–1303, 2003.

SPANÒ S.; GALÁN J.E. A novel pathway for exotoxin delivery by an intracellular pathogen. **Current Opinion Microbiology**, v.11, p. 15–20, 2008.

SILVA, L.E.; GOTARDI, C.P.; VIZZOTTO R. et al. Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.455-461, 2006.

SILVA, L.P.; NÖRNBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v.33, n.4, p. 55-65, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. **Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos**. Campinas: Ital, 1995.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N.. **Clínica e Patologia Suína**. Goiânia, p. 383-387, 1999.

SOTO G.E.; HULTGREN S.J. Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p.1059-1071, 1999.

SPRICIGO D.A.; MATSUMOTO S.R.; ESPÍNDOLA M.L et al. Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiças suínas tipo frescal em Lages, SC. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.60, n.2, p.517-520, 2008.

SPRING, P. The move away from antibiotic growth promoters in Europe. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 15, 1999, Nottingham. Proceedings... Nottingham: Alltech, p.173–183,1999.

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.

STEGE, H. J.; CHRISTENSEN J.; NIELSEN J.P. et al. Prevalence of subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish finishing pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 44, p. 175–188, 2000.

SWANENBURG, M.; URLINGS H.A.P.; SNIJDERS J. et al. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. **International Journal of Food Microbiology**, n. 70, p. 231-242, 2001.

SWENSON, D.L.; CLEGG, S.; OLD, D.C. Frequency of the fim genes among *Salmonella* serovars. **Microbiology Pathogenicity**, v. 10, p. 487-490, 1994.

TINKER, J.K.; CLEGG, S. Characterization of FimY as a coactivator of type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, v.68, p. 3305-3313, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Introducion a la Microbiologia**. 3 ed. Zaragoza: Acribia, 792 p., 1993.

VAN ASTEN F. J.A.M.; DIJK J.E.V. Distribution of classic virulence factors among *Salmonella* sp.. **Immunology and Medical Microbiology**, v.44, p. 251-259, 2005.

VAN DER GAAG, M.A.; VOS, F.; SAATKAMP, H.W. et al. A state transition simulation model for he spread *Salmonella* in the pork supply chain. **European Journal Operation Research**, v. 156, n. 3, p.782-798, 2004.

VAN DER WOLF, P.J. et al. Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. **Veterinary Microbiology**, n. 78, p. 205 – 219, 2001.

VAN WINSEN R.L.; VAN NES A.; KEUZENKAMP D. et al. Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods, **Veterinary Microbiogogy**, v.80, p. 267–274, 2001.

VIEIRA-PINTO, M.; TENREIRO, R.; MARTINS, C. Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v.110, p.77-84, 2006.

WEGENER, H. C. D.; BAGGENSEN, D. L. Investigation of an outbreak human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* spp. *enterica* serovar *Infantis* by use of pulse field electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 32, p.125- 131, 1996.

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, 1993.

ANEXO 1

ÁGAR CFA

Casaminoácido	10g
Extrato de Levedura	1,5g
MgSO ₄ (Sulfato de Magnésio)	0,05g
MnCl ₂ (Cloreto de Mangânes)	0,005g
Ágar Bacteriológico	20g
Água destilada	1000mL

Aquecer até dissolver o ágar. Ajustar o pH para 7,4 e esterilizar em autoclave a 121⁰C por 15 minutos.

ANEXO 2

Protocolo do teste de ELISA para pesquisa de IgG

O teste de “ELISA” (do inglês “**E**nzyme **L**inked **I**mmunono**S**orbent **A**ssay) se baseia reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. A enzima mais comumente utilizada nestas provas é a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento da água oxigenada (H_2O_2) em H_2O mais O_2 . Existem vários modelos de testes de ELISA; em sua forma mais simples, chamada ELISA indireto, um antígeno aderido a um suporte sólido (placa de ELISA) é preparado; a seguir coloca-se sobre este os soros em teste (ex. soro humano), na busca de anticorpos contra o antígeno. Se houver anticorpos no soro em teste ocorrerá a formação da ligação antígeno-anticorpo, que posteriormente é detectada pela adição de um segundo anticorpo dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde se busca detectar os anticorpos (humana, no caso), a qual é ligada à peroxidase. Este anticorpo anti-IgG, ligado à enzima denomina-se conjugado. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima (isto é, H_2O_2 dissolvida em uma substância química que dá uma reação colorida quando H_2O_2 é desdobrada). Os orifícios onde ocorreu a reação antígeno-anticorpo apresentam uma coloração (variável dependendo do substrato).

Placas DYNEX IMMULON 2 HB serão impregnadas com 100 μ L, por cavidade, do antígeno diluído 1:1000 em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 – 0,05M. As placas serão deixadas em repouso por 24 horas a 4° C, a seguir serão

congeladas por, no mínimo, uma hora a -70°C . No momento do uso, após o descongelamento em temperatura ambiente, a placa será lavada três vezes por 3 minutos com tampão fosfato, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), pH 7,4. Os soros serão diluídos 1:400 em PBS-T, contendo 1% de albumina bovina (PBS-TA) e serão adicionados, em triplicata, à placa teste. A placa contendo os soros será incubada a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Após a placa será lavada novamente como descrito acima. Em cada cavidade serão distribuídos $100\ \mu\text{L}$ do soro conjugado com peroxidase (Anti-pig) na diluição 1:25000 em PBS -TA. A seguir serão incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, lavadas e acrescidas de $100\ \mu\text{L}$ do revelador por cavidade. O revelador será preparado no momento do uso, adicionando $100\ \mu\text{L}$ do substrato e $3,5\ \mu\text{L}$ de H_2O_2 e $230\ \mu\text{L}$ de NaOH 10N para cada 10 mL de tampão revelador (solução reveladora) e deixada por 15 minutos em temperatura ambiente. A intensificação da cor será bloqueada com acréscimo de $50\ \mu\text{L}$ por cavidade de ácido sulfúrico 2M (H_2SO_4). A placa será agitada levemente e lida em espectrofotômetro com filtro 450nm e DO correspondente (ICN -TiterteK Multiskan). A leitura será realizada no programa ELISUAVE com padrões já definidos.

VITA

Dados pessoais

Nome: Lucianew Martins Borowsky

Nascimento: 06/06/ 19749, Porto Alegre, RS, Brasil

Filiacao: Waldo Borowsky

Maria Tatiana Martins Borowsky

Email: lborowsky@yahoo.com

Formacao Academica / Titulacao

2005 - 2009 Doutorado em Microbiologia Agricola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

2003 – 2005 Mestrado em Ciência Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

1996 – 2001 Graduacao em Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre,, RS, Brasil.

1989 – 1991 Ensino Medio (2o grau).

Colegio Nossa Senhora da Glória, Porto Alegre, RS, Brasil

Atuacao profissional

Colaborador da Disciplina de Medicina Veterinária Preventiva Microrganismos (VET02244) da Faculdade de Medicina Veterinária.

Ministrou Palestra "Tratamento de água no meio rural" e "Controle de Vetores'para a disciplina de Medicina Veterinária Preventiva Da UFRGS. Ministrou Seminário "Staphylococcus intermedius em mastite".

Estágio de 5 meses no setor de Microbiologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA.

Estágio no Laboratório de Medicina Veterinária preventiva UFRGS 200 horas

2006 Colaborador da Disciplina de Medicina Veterinária Preventiva Microrganismos (VET02244) da Faculdade de Medicina Veterinária.

2000 Estagio Curricular em Inspeção de Carnes e Laboratorio de Microbiologia.