

CONTROLE DE *SALMONELLA* EM SUÍNOS: SITUAÇÃO ATUAL E ESTRATÉGIAS BASEADAS NA RELAÇÃO HOSPEDEIRO-PATÓGENO

A salmonela ainda é uma das principais causas de intoxicação alimentar em todo mundo. As estratégias de controle de salmonela na produção de suínos apresentam diferentes focos. Alguns países preferem focar o controle dentro do abatedouro-frigorífico; outros baseiam-se no conceito da precaução, dirigindo suas intervenções também para as fases anteriores ao abate.

Por Jalusa Deon Kich¹ e Marisa Cardoso²

A persistência de salmonela nos sistemas de produção de alimentos propicia que esse patógeno atinja o consumidor, e que se mantenha como uma das principais causas de intoxicação alimentar em todo mundo. As estratégias de controle de salmonela na produção de suínos apresentam diferentes focos. No último International Pig Veterinary

Society Congress (IPVS), Dahl (2012) discutiu este tema, considerando a carcaça após o resfriamento como ponto final do processo de controle. Ao mesmo tempo, alertou que operações posteriores impróprias podem favorecer a multiplicação do patógeno, aumentando o risco para os consumidores. Alguns países preferem focar o controle dentro do abatedouro-frigorífico, em alguns casos lançan-

do mão da descontaminação de carcaças; outros países baseiam-se no conceito da precaução, dirigindo suas intervenções também para as fases anteriores ao abate.

SITUAÇÃO ATUAL

O papel de fontes de infecção específicas na contaminação final das carcaças é difícil de ser medido e varia entre sistemas de produção. Kich *et al.* (2011) determinaram como fontes de infecção em granjas terminadoras de suínos no Sul do Brasil: contaminação residual entre lotes na granja e na espera do abatedouro; leitões excretadores de salmonela no alojamento e presença da bactéria na ração. Somado a isso, a variabilidade genética dos isolados de *Salmonella*, recuperados de linfonodos mesentéricos ao abate, sugere infecção mista ou repetida ao longo da vida dos animais. Em termos de similaridade genotípica, isolados de linfonodos profundos (pré-escapular e subilíaco) estavam relacionados com isolados do piso da granja, recuperados anteriormente ao alojamento dos suínos. Isso demonstra um efeito do tempo, ou seja, infecções no início da terminação que possibilitaram a difusão até os linfonodos profundos, persistindo até o momento do abate. Por outro lado, isolados de carcaça estavam relacionados com aqueles encontrados na baia de espera do abatedouro, o que comprova a importância deste período. Na fase pré-abate, podem ocorrer contaminações externas (pele e cavidade oral) ou a infecção via oral, seguida de multiplicação e rápida excreção no conteúdo fecal (Hurd *et al.* 2001). As baias de espera, em nossa opinião, funcionam como um "funil" para onde são transportadas e depositadas as cepas de salmonela originadas das diversas exposições que ocorrem durante a vida dos animais, compreendendo todas as fases e fontes de infecção. Sem dúvida, a prevalência de animais excretadores de salmonela no abate impacta na contaminação final da carcaça. Por melhor que sejam as rotinas de abate e processamento, é difícil atingir "zero" de contaminação fecal durante a evisceração. Desta forma, a contaminação superficial das carcaças será decorrente tanto da prevalência de animais positivos, quanto dos riscos inerentes ao processo adotado pelo abatedouro-frigorífico, esse último foco permanente dos programas de controle de qualidade. Toda esta complexidade faz-nos acreditar que programas de controle integrados têm mais chance de sucesso do que aqueles direcionados a elos isolados da cadeia de produção de suínos.

Na última década, nosso grupo de pesquisa tem contribuído para a compreensão da dinâmica da transmissão, fontes de infecção e fatores de risco para a ocorrência de salmonela na suinocultura tecnificada do Sul do Brasil. Estudamos também pontos críticos para a contaminação durante o abate e evisceração, bem como no processo de fabricação de rações.

No abate e evisceração, foi confirmado que o chamuscamento deve constituir um ponto crítico de controle, apesar da APPCC genérica adotar a evisceração como PCC. A eficácia do chamuscamento bem conduzido na eliminação da contaminação superficial por salmonela foi claramente demonstrado, não obstante grande diferença na execução dessa etapa foi observada entre plantas frigoríficas (Silva *et al.*, 2012). Considerando as várias situações possíveis ao abate, podemos discriminar: i. plantas com práticas e processos impróprios de abate e que recebem animais portadores, sofrem a amplificação da contaminação ao longo da linha de processamento e apresentam alta prevalência de carcaças positivas; ii. plantas que recebem lotes com baixa prevalência e seguem um protocolo rígido de boas práticas de fabricação (BPF) e análise de pontos críticos de controle (APPCC), mantêm níveis baixos de contaminação de carcaças; iii. plantas que recebem lotes de animais com alta prevalência de portadores, mas apresentam bom programa de BPF e controle de pontos críticos, apresentam oscilação nos resultados de contaminação de carcaças (alto/baixo). Esta situação remete, novamente, a concluir que é preciso diminuir a pressão de contaminação ao abate, pela redução da prevalência de animais portadores e excretadores. Embora a soroprevalência de animais ao abate não seja um preditor linear da contaminação de carcaças, a correlação entre o nível de salmonela nas granjas e nas carcaças já foi anteriormente demonstrado (Sorensen *et al.* 2004; Baptista *et al.* 2010). Em nossa opinião, a soroprevalência dos lotes em idade de abate é um indicador do nível de biossegurança no qual esses animais foram criados ao longo do ciclo de produção. Sorologia positiva reflete o contato dos animais com a bactéria em algum momento após o desmame. Na maioria dos casos, a soroconversão ocorre na terminação; e os animais podem eliminar a infecção ou tornarem-se portadores/excretadores. Como salmonela tende a permanecer cronicamente nos linfonodos mesentéricos, animais portadores amplificam a excreção fecal em ocasiões de estresse, como o período pré-abate.



Crédito: Patricia Schwars

O CONTROLE DE PATOGENOS EXTREMAMENTE ADAPTADOS ÀS CONDIÇÕES DA PRODUÇÃO ANIMAL, COMO SALMONELA NA SUINOCULTURA, DEPENDE DE MULTIPLAS INTERVENÇÕES

Estudo conduzido em fábricas de ração que estavam em conformidade com a Instrução Normativa 4 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) (Brasil 2007), observou que o escore obtido no Roteiro de Inspeção dessa normativa não apresentava correlação com a média de coliformes totais verificada em itens em contato, direto ou indireto, com a ração durante sua elaboração. Os resultados demonstraram que a adequação à legislação é de extrema importância para a qualidade da ração produzida, porém o controle da carga microbiana depende de medidas suplementares. Especificamente em relação à salmonela, a superfície do transportador de ração demonstrou ser o local com maior probabilidade de isolamento, seguido da poeira coletada nas dependências da fábrica. Dessa forma, equipamentos de fácil limpeza e com mínimo acúmulo de poeira e resíduos devem ser incluídos nos programas de controle de salmonela concomitantemente ao controle de poeira nas instalações e às demais medidas preconizadas na IN4 (Pellegrini, 2012). Nas granjas, confirmamos a importância das fontes de infecção e dos fatores de risco estudados em diferentes empresas produtoras de suínos. A análise comparativa das prevalências médias de salmonela entre empresas demonstrou a existência de diferenças entre os sistemas de produção estudados, assim como na distribuição

dos fatores de risco identificados. Os principais fatores de risco associados a altas prevalências de salmonela foram: pré-fossa suja, presença de outros animais na granja além dos suínos, presença de produção intensiva de frangos de corte na mesma propriedade, Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado, número de origens de animais alojados em uma mesma granja, tempo de vazio sanitário e distância entre granjas (Schwarz *et al.* 2010).

Estratégias de controle que exploraram a relação patógeno-hospedeiro também têm sido foco de pesquisa e desenvolvimento. Os principais exemplos são: o desenvolvimento de vacinas, estudos de microbiota em resposta a infecção e resistência genética.

VACINAS

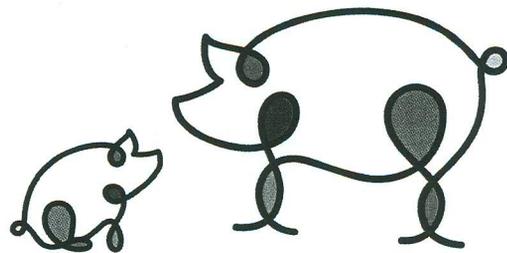
A vacinação é um conceito muito bem estabelecido nas práticas veterinárias e tem contribuído sobremaneira no controle de muitas enfermidades. No caso da infecção por salmonela em suínos é preciso destacar duas situações: i. a doença nos animais, septicemia e enterocolite, causadas basicamente pelos sorovares *S. Choleraesuis* (adaptado ao suíno) e *S. Typhimurium*; ii. a contaminação de carcaças nos frigoríficos por um vasto espectro de sorovares considerados de risco para a saúde do consumidor. No

caso de doença, alguns produtos estão disponíveis no mercado e podem ser indicados em granjas que têm o problema diagnosticado. Esta prática é adotada em países em que ocorre a salmonelose clínica de forma endêmica, porém esse quadro não é comum no Brasil. A redução de animais portadores de salmonela pela vacinação tem sido demonstrada em alguns trabalhos (Roesler *et al.* 2006; Selke *et al.* 2007; Farzan & Friendship 2010, Schwarz *et al.* (2011), Leyman *et al.* 2012).

Rostagno (2011) descreve a vacina ideal para proteção contra a infecção por salmonela em suínos, como sendo aquela que previne a colonização, excreção no ambiente, desenvolvimento de portadores sub-clínicos, bem como a doença clínica. Além disso, a vacina deveria induzir anticorpos que possam ser diferenciados daqueles induzidos pela infecção natural (DIVA=differentiation of infected from vaccinated animals). Infelizmente, não contamos com uma ferramenta tão completa; os produtos disponíveis, ou em estudo, reduzem a prevalência de portadores/excretadores, porém não evitam a colonização. Por conta disso, tem sido proposto o seu uso em associação a outras medidas de biossegurança, manejo e aditivos em ração e água.

O sucesso de uma vacina contra os sorovares de salmonela hospedeiro-específicos como *S. Typhi*, *S. Gallinarum* e *S. Abortusovis* (humanos, galinhas e ovinos, respectivamente, Wallis, 2006) e aqueles com hospedeiros restritos como *S. Dublin* e *S. Choleraesuis* (ruminantes e suínos) é mais fácil de ser alcançado do que contra aqueles considerados não adaptados ou ubíquos. Em outras palavras, é mais fácil controlar, por meio da vacinação, a salmonelose clínica nos animais do que prevenir a contaminação de carcaças no abatedouro, em função da variabilidade antigênica dos sorovares que infectam os suínos portadores.

Para contornar os problemas da variabilidade antigênica e da diferenciação da infecção natural por salmonela, vários projetos estão em desenvolvimento, lançando mão de engenharia genética e imunoproteômica. Selke *et al.* (2007) identificaram um antígeno peptídico localizado na membrana externa com característica DIVA. A partir disso construíram um mutante, deletado do gene que codifica o referido peptídeo, capaz de induzir a proteção nos animais e ser a base de uma vacina. A discriminação entre infecção e imunização seria propiciada pela ausência de anticorpos contra o peptídeo que está ausente



Diferença por Inovação



TETRACID 500™ | Ácidos Orgânicos

É um blend de ácidos orgânicos especialmente desenvolvido para suinocultura.

O ácido certo no ponto certo.

Nossos produtos inovadores são especificamente desenvolvidos para **fazer a diferença na produção animal.**



Jefo

Aditivos para cada espécie | jefo.com

Safeeds, distribuidor Jefo para todo o Brasil


safeeds
aditivos para nutrição animal

(45) 3278 7002 www.safeeds.com.br



A vacina ideal para proteção contra por salmonela em suínos é aquela que previne a colonização, excreção no ambiente, desenvolvimento de portadores sub-clínicos, bem como a doença clínica

na cepa vacinal (marcador negativo). Porém, esta vacina, baseada em antígeno protéico, não se adapta à maioria dos programas oficiais de monitoramento sorológico, que pesquisam anticorpos anti-lipopolissacarídeos de membrana externa (ELISA-LPS). Mais recentemente, Leyman *et al.* (2011) deletaram genes codificadores de LPS, e foram capazes de produzir mutantes que não perdessem a capacidade imunizante contra *S. Typhimurium* e que permitissem a diferenciação da infecção natural pelos testes sorológicos adotados nos programas de controle. Paralelamente, mutantes com alvo em genes de virulência, criando cepas atenuadas para compor vacinas vivas, têm sido estudados. A vacina viva tem um potencial de proteção superior às bacterianas, porque induz resposta celular e produção de IgA de mucosa, importantes na proteção contra um patógeno intracelular facultativo que invade a mucosa intestinal como salmonela. Haneda *et al.* (2011) atenuaram uma cepa de *S. Choleraesuis*, deletando o gene slyA, considerado um regulador global de virulência, com o objetivo de proteger os suínos contra salmonelose causada pelo sorovar homólogo e *S. Typhimurium*. Hur *et al.* (2011), deletaram os genes cpxR e lon e incluíram um plasmídeo que secreta a subunidade B da enterotoxina de *Escherichia coli* como adjuvante de mucosa. Esta candidata à vacina foi considerada segura e eficaz na proteção de leitões desafiados com *S. Typhimurium*, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a vacinação de porcas e leitões.

Características importantes para sobrevivência no ambiente, como resistência à luz ultravioleta e desinfetantes também estão sendo estudadas em cepas mutantes candidatas à vacina contra salmonelose em suínos (Leyman *et al.*, 2012). Com o objetivo de ampliar o espectro de proteção, Bearson and Bearson (2011) apresentaram proposta de uma vacina racionalmente desenhada para proteger contra vários sorovares. Este projeto ainda está em andamento e os detalhes científicos ainda não estão disponíveis.

No Brasil, a imunização como medida para o controle de salmonela foi avaliada, empregando uma vacina viva comercial baseada em linhagem atenuada de *S. Choleraesuis*, administrada no primeiro dia de vida (Schwarz *et al.*, 2011). A vacina não foi capaz de impedir a infecção dos lotes, porém a prevalência de isolamento de salmonela em linfonodos mesentéricos ao abate foi 31,1% menor no grupo vacinado comparado ao grupo não vacinado.

MICROBIOTA

A relação entre os componentes da microbiota intestinal baseada em conceitos de exclusão competitiva, probiose e prébiose, tem sido alvo de pesquisa na busca de antagonistas à patógenos de interesse em humanos e animais. Tanto a estrutura das comunidades microbianas, quanto a sua funcionalidade podem desvendar mecanismos de controle de patógenos. No passado, esta área estava limitada às técnicas de cultivo

bacteriano, capazes de recuperar uma pequena parcela dos micro-organismos que compõem a microbiota intestinal. Atualmente, por meio de técnicas de sequenciamento de DNA de nova geração em larga escala é possível documentar comunidades microbianas mais complexas e acompanhar sua dinâmica em estudos observacionais e na experimentação animal. Técnicas baseadas no sequenciamento de regiões variáveis do gene conservado 16S rRNA identificam as espécies bacterianas presentes na amostra. A nova ciência, denominada metagenômica, vai adiante e demonstra a funcionalidade destes componentes da microbiota (Lamendella *et al.*, 2011). Estas técnicas têm sido exploradas em estudos do efeito modulador na microbiota de ingredientes alimentares específicos (Kobayashi *et al.*, 2011), bem como de promotores de crescimento (Rattedal *et al.*, 2009, Looft *et al.* 2012).

A dinâmica entre a microbiota intestinal de suínos e a excreção de salmonela foi recentemente investigada por Bearson *et al.* (submetido). O perfil da microbiota de dois grupos de suínos, alto e baixo excretores de salmonela, foi determinado pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. A análise da estrutura da comunidade bacteriana revelou diferenças entre a microbiota dos

animais do grupo alto e baixo excretores de salmonela. No segundo dia após a infecção, foi observado decréscimo na quantidade do gênero *Prevotella* nos animais alto excretores e o aumento de outros gêneros bacterianos como (*Oscillibacter*, *Catenibacterium*, *Xylanibacter*). Os resultados também sugerem que a infecção por *Salmonella sp.* induziu alterações na maturação da microbiota após 21 dias de infecção. Estudos futuros devem esclarecer melhor o papel destas mudanças na microbiota e, quem sabe, indicar algum antagonista natural à colonização intestinal por *Salmonella sp.* em suínos.

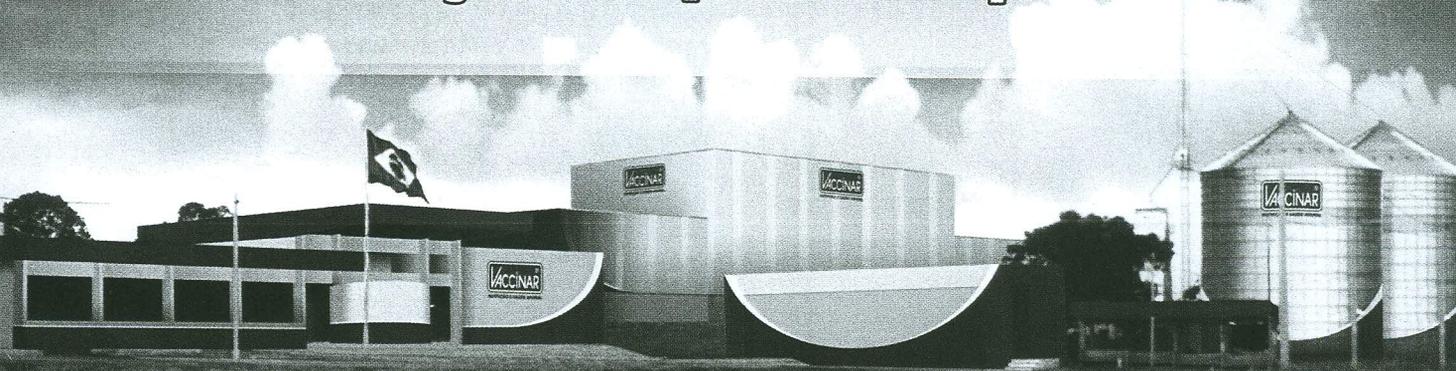
RESISTÊNCIA GENÉTICA

A resistência/susceptibilidade genética às doenças é outra área em que as atuais metodologias moleculares têm acelerado a investigação científica e aplicação clínica. Diferenças individuais na resposta aos patógenos são observadas cotidianamente na medicina veterinária. Alguns animais adoecem facilmente e desenvolvem quadros mais severos, outros têm maior capacidade de "se livrar" do patógeno. Embora muitos fatores contribuam para estes cenários, como a dose infectante, imunidade, nível de estresse, a variabilidade genética também tem seu papel. Precisar a variabilidade genética

Linha QualiFEED



A sua nutrição de precisão para suínos



Consulte o Departamento de Nutrição da VACCINAR
0800 0315959
www.vaccinar.com.br

NUTRIÇÃO E SAÚDE ANIMAL

é um grande avanço no melhoramento de características produtivas e também pode ser aplicado em programas de controle de doenças. A classificação fenotípica de infecção/doença é sempre crítica, portanto estes parâmetros devem ser cuidadosamente determinados.

Relacionado à infecção por *Salmonella* em suínos, o grupo de pesquisa norte-americano da Iowa State University, em parceria com NADC/ARS/USDA, tem investigado a expressão gênica e a variabilidade genética em suínos inoculados experimentalmente com salmonela. Wang *et al.* (2007) estudaram a resposta transcricional à inoculação por salmonela em linfonodos mesentéricos. Foram observados 848 genes com diferença de expressão relacionada à resposta imune, imunidade inata e resposta inflamatória. Estes genes são candidatos à estudos da associação entre as características imunológicas e variabilidade genética. Polimorfismos nestes candidatos podem ser marcadores moleculares importantes para o aumento da resistência à doença e melhoria da saúde dos animais empregados em programas de melhoramento genético.

As respostas de expressão gênica induzidas pelos sorovares *Typhimurium* e *Choleraesuis* foram comparadas por Uthe *et al.* (2007). Foram observadas diferenças tanto nos genes que são induzidos/reprimidos como no tempo de expressão após a infecção (pi). A resposta contra *S. Typhimurium* foi mais precoce (8-24h pi) do que contra *S. Choleraesuis*, que demonstrou os níveis mais altos de expressão gênica tardiamente (48h a 21 dias pi). As diferenças observadas na dinâmica de expressão gênica podem explicar a variação na progressão da doença causada pelos referidos sorovares (Uthe *et al.* (2007).

Posteriormente, Huang *et al.* (2011) identificaram diferenças nas rotas de expressão gênica associadas à variação no padrão de excreção de *S. Typhimurium*, excreção persistente e excreção transitória/baixa após a inoculação experimental. Muitos resultados foram obtidos neste estudo, entre eles foi observada a indução em mais de 30% dos genes envolvidos com a sinalização do TLR (Toll Like Receptor) indicando que esta rota foi ativada rapidamente em resposta a inoculação de salmonela. Especificamente, o TLR4 em conjunto com o IFN γ foram indutores da resposta transcricional nos suínos excretadores persistentes de salmonela.

O Toll-like receptor 4 (TLR4) é um receptor responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram negativas e também ativador da resposta

inflamatória no hospedeiro (Noreen *et al.* 2012; Yang, 2012). Mutações na sequência de nucleotídeos do TLR4, que codificam regiões de reconhecimento do patógeno e sinalização da tradução, podem afetar a susceptibilidade do hospedeiro à infecção e/ou doença (Schoreder and Schumann, 2005). Polimorfismos no TLR4 têm sido associados com doenças infecciosas em humanos, bovinos, aves e suínos (Noreen *et al.* 2012, Kataria *et al.* 2011, Leveque *et al.* 2003, Yang *et al.*, 2012). Desta forma, o estudo de polimorfismos de base única (SNPs – Single Nucleotide Polymorphism) no TLR4 têm sido propostos como potenciais marcadores genéticos para melhoria na resistência à doenças em suínos (Uenishi *et al.* 2011). Em estudos anteriores de variabilidade genética do TLR4 de suínos, 46 SNPs foram identificados sendo 22 deles localizados em região codificadora do gene (Shinkai, 2006, Thomas 2005, Palermo 2009, Pan 2011, Bao 2011, Shinkai 2012). Em trabalho recente (Kich *et al.* 2013, submetido), a análise das sequências do TLR4 de suínos inoculados com *Salmonella* revelaram 18 SNPs, 12 previamente identificados na literatura e seis desconhecidos. Oito destes SNPs estão localizados na região codificadora do exon 3 e três destes induzem alteração do aminoácido. Quatro SNPs foram associados com o padrão de excreção de salmonela ($p \leq 0.01$), revelando o relacionamento entre a excreção e a variação genética no gene TLR4 de suínos.

Para finalizar, concluímos que o controle de patógenos extremamente adaptados às condições da produção animal, como salmonela na suinocultura, depende de múltiplas intervenções. A pesquisa, por sua vez, demanda ações multidisciplinares que abrangem a microbiologia, genética, ecologia microbiana e bioinformática, para abordar o problema em diferentes ângulos. Por essa razão, a ciência avança, investigando os sistemas biológicos na relação patógeno-hospedeiro, para desenvolver estratégias de controle necessárias para a produção animal. 

¹pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves

²professora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

As referências bibliográficas deste artigo você encontra na página de *Suinocultura Industrial* através do link – www.suinoculturaindustrial.com.br/?salmonela0113