

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Matheus Ferreira Serafini

**SALMONELOSE EM REBANHO LEITEIRO BOVINO CONFINADO:
Caracterização dos isolados, aspectos clínicos, epidemiológicos e resistência
antimicrobiana**

Belo Horizonte

2020

Matheus Ferreira Serafini

**SALMONELOSE EM REBANHO LEITEIRO BOVINO CONFINADO:
Caracterização dos isolados, aspectos clínicos, epidemiológicos e resistência
antimicrobiana**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Clínica e Cirurgia
Veterinárias

Orientador: Antônio Último de Carvalho

Coorientadores: Elias Jorge Facury Filho,
Rodrigo Melo Meneses

Belo Horizonte

2020

S482s Serafini, Matheus Ferreira, 1990-
Salmonelose em rebanho leiteiro bovino confinado: Caracterização dos isolados, aspectos clínicos, epidemiológicos e resistência antimicrobiana /Matheus Ferreira Serafini, - 2020.
75 f.: il.

Orientador: Antônio Último de Carvalho
Coorientadores: Elias Jorge Facury Filho
Rodrigo Melo Menezes
Tese (Doutorado) Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias.

Bibliografia: f.: 68 - 74
Anexo: f.: 75

1- Bovino – Teses - 2. Doenças – Teses - 3. Salmonella – Teses - I. Carvalho, Antônio Último de – II. Filho, Elias Jorge Facury- III. Menezes, Rodrigo Melo - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.089 69

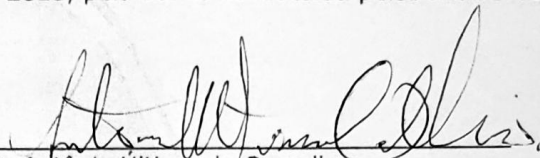
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

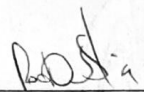
MATHEUS FERREIRA SERAFINI

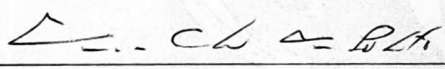
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

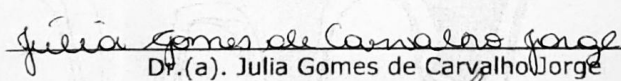
Aprovada em 15 de maio de 2020, pela banca constituída pelos membros:

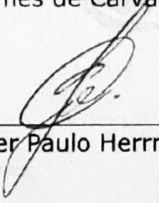

Dr.(a). Antônio Último de Carvalho
Presidente – Orientador(a)


Dr.(a). Elias Jorge Facury Filho


Dr.(a). Rodrigo Otávio Silveira Silva


Dr.(a). Francisco Carlos Faria Lobato


Dr.(a). Julia Gomes de Carvalho Jorge


Dr.(a). Geder Paulo Herrmann

*Aos meus pais e irmão
Que sempre fizeram presente, mesmo na distância,
com apoio e incentivo para continuar.*

*A minha noiva, Juliana
Meu refúgio seguro para todo e qualquer momento
e que tive a felicidade de encontrar nesta vida,
a metade que me faltava.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e caminhos que me permitiu trilhar.

A meus pais, Andréa e Ilonir, sempre ao meu lado, incentivando e encorajando que sempre podemos dar mais um passo, indo um pouco mais longe de onde já se está; meu irmão Thiago, melhor amigo não há, sempre com a realidade em mãos.

A Juliana, minha metade, sempre me apoiando em tudo, não deixando fugir a linha e nem a desistir, empurrando a frente, mesmo quando há insegurança, obrigado por estar ao meu lado.

Ao meu orientador, professor Último, grande amigo, que orienta e aconselha não só a formação acadêmica, mas para a vida.

Aos professores Elias (Lobão), Rodrigo Meneses e Rodrigo Otávio pelas lições, disponibilidade para ensinar e as orientações fornecidas ao longo da execução do projeto e da trajetória durante o doutorado, sem vocês, não seria possível.

Ao João Paulo, colega de doutorado, que compartilhou tempo na execução prática do projeto na fazenda, ajudando nas coletas, discussões e convívio.

Ao Gustavo, que me incentivou a começar essa jornada ainda no estágio de conclusão da graduação, esqueceu apenas de dizer que dava trabalho e era um pouco sinuosa.

Ao pessoal do Laboratório de Anaeróbios da EV/UFMG, sempre dispostos a me orientar e me ajudar, em especial a Carolina e ao Rafael pela paciência e pelo tempo pessoal disponibilizado.

A fazenda que cedeu espaço e tempo de pessoal, especialmente ao Pedro, que contribuiu para que o experimento fosse realizado, impondo soluções e um meio termo entre a necessidade da pesquisa e a disponibilidade da fazenda.

A clínica de ruminantes da EV/UFMG, que me acolheu e me proporcionou conviver com pessoas incríveis.

Ao professor Geder, da UFSM, amigo de todas as horas, me apontou o rumo para acabar na UFMG, além das boas conversas desde a graduação, questionando o conhecimento e incentivando a curiosidade.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo durante o doutorado.

A todos que de alguma forma, em algum momento, me ajudaram a chegar até aqui, neste momento.

RESUMO

A salmonelose dos bovinos é uma doença primariamente entérica que pode evoluir para forma sistêmicas. É causada por bactérias gram negativas do filo das proteobactérias e família Enterobacteriaceae. Os indivíduos de maior interesse são da espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e é composta por 2.600 sorovariedades. A doença acomete animais de diferentes idades e é mais grave em animais jovens. O objetivo do trabalho foi estudar a distribuição da *Salmonella* spp. em um rebanho portador nas diferentes categorias animais, caracterizando a sua sorovariedade e o perfil de resistência antimicrobiana. O experimento foi conduzido em propriedade bovina que utiliza sistema de confinamento para criação dos animais e que possui produção diária de 29.000 litros de leite. Foram coletadas amostras de fezes de 782 animais em três momentos de cada animal e distribuídos em todas as categorias da propriedade e seguido de cultura e isolamento de *Salmonella* spp. com posterior avaliação dos sorotipos presentes, perfil de similaridade pelo ERIC-PCR e o perfil de resistência antimicrobiana de todos os isolados. Foram encontrados 60 isolados de *Salmonella* spp. sendo que 72% destes eram de *S. Dublin* e apresentavam grande semelhança genética entre si (ERIC-PCR). Foi observado que 85% dos isolados de *Salmonella* spp. eram multirresistentes, circulam pelas categorias animais da propriedade e causam doença clínica nos animais jovens.

Palavras-chave: *Salmonella* spp.; *S. Dublin*; multirresistência antimicrobiana, diarreia, bovinos.

ABSTRACT

Bovine salmonellosis is a primarily enteric disease that can evolve into systemic forms. It is caused by gram negative bacteria from the phylum of the proteobacteria and Enterobacteriaceae family. The individuals of greatest interest are the species *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and is composed of 2,600 serovarieties. The disease affects animals of different ages and is more severe in young animals. The objective of the work was to study the distribution of *Salmonella* spp. in a dairy herd with different animal categories, characterizing its serovariety and antimicrobial resistance profile. The experiment was carried out on a property that uses a confinement system to raise the animals and has a daily production of 29,000 liters of milk. Stool samples were collected from 782 animals at three times of each animal every 48h and distributed in all categories of the property and followed by culture and isolation of *Salmonella* spp. with subsequent evaluation of the serotypes present, similarity profile by ERIC-PCR and the antimicrobial resistance profile of all isolates. In 60 isolates of *Salmonella* spp., 72% of them were from *S. Dublin* and had great genetic similarity to each other. It was observed that 85% of *Salmonella* spp. they were multidrug-resistant, circulate in the animal categories of the property and cause clinical disease in young animals.

Keywords: *Salmonella* spp.; *S. Dublin*; antimicrobial multiresistance; diarrhea, bovine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Instalações do tipo <i>free stall</i> adotadas na propriedade para animais na fase produtiva.....	36
Figura 2:	Higienização das instalações de free stall e camas de areia repostas com adição de cal.....	37
Figura 3:	Unidade de vacas secas, pré-parto e pós-parto (<i>free stall</i>).....	37
Figura 4:	Instalações de bezerreiro em gaiolas individuais suspensas.....	38
Figura 5:	Área de piquetes coletivos com sombrite 80% para a recria de 90 a 200 dias.....	39
Figura 6:	Laboratório para pré-isolamento utilizado na propriedade.....	42
Figura 7:	Resultado de reação de PCR para gênero <i>Salmonella</i>	44
Figura 8:	Antibiograma através de discos de difusão.....	45
Gráfico 1:	Distribuição de sorotipos de <i>Salmonella</i> spp. entre as categorias animais....	48
Figura 9:	Dendrograma de similaridade entre os isolados de <i>Salmonella</i> spp. e distribuição de sorotipos.....	49
Gráfico 2:	Prevalência de animais com salmonelose clínica entre as categorias.....	50
Gráfico 3:	Frequência de tratamentos com antimicrobianos por categoria animal.....	51
Figura 10:	Necropsias de bezerras da recria (idade entre 91 e 150 dias) com isolamento de <i>Salmonella</i> spp.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Animais adultos a serem coletados.....	40
Tabela 2:	Animais de cria e recria a serem coletados.....	40
Tabela 3:	Lotação na propriedade dos grupos de animais e número de animais a terem fezes coletadas.....	41
Tabela 4:	Frequência de positividade nas amostras coletadas durante a triagem e confirmação dos isolados.....	47
Tabela 5:	Similaridade gênica das estirpes de <i>Salmonella</i> spp. isoladas das diversas categorias animais pela técnica de ERIC-PCR.....	48
Tabela 6:	Frequência de animais clinicamente doentes e que apresentavam <i>Salmonella</i> spp. nas fezes ou tecidos.....	50
Tabela 7:	Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	51
Tabela 8:	Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	52
Tabela 9:	Protocolos terapêuticos de antimicrobianos utilizados na propriedade.....	60

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
INTRODUÇÃO.....	12
OBJETIVO.....	14
CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura.....	15
1. Caracterização de <i>Salmonella</i> spp.....	15
2. Métodos diagnósticos para salmoneloses.....	15
<i>Manifestações clínicas.....</i>	<i>16</i>
<i>Coleta de material.....</i>	<i>17</i>
<i>Cultura bacteriológica.....</i>	<i>17</i>
<i>Testes sorológicos.....</i>	<i>18</i>
<i>Ensaio moleculares.....</i>	<i>18</i>
3. Fatores de risco para contágio e disseminação da salmonelose.....	18
<i>Rebanho sem infecção prévia.....</i>	<i>19</i>
<i>Rebanho com infecção prévia.....</i>	<i>20</i>
<i>Fatores inerentes ao hospedeiro.....</i>	<i>20</i>
<i>Animais portadores.....</i>	<i>21</i>
<i>Transmissão entre rebanhos.....</i>	<i>21</i>
<i>Transmissão no rebanho.....</i>	<i>22</i>
4. Aspectos imunológicos da salmonelose.....	23
<i>Barreiras físicas.....</i>	<i>23</i>
<i>Sistema imune inato.....</i>	<i>24</i>
<i>Sistema imune adquirido.....</i>	<i>25</i>
<i>Infecção crônica.....</i>	<i>27</i>
5. Resistência antimicrobiana para <i>Salmonella</i> spp.....	28
<i>Resistência natural.....</i>	<i>29</i>
<i>Resistência adquirida.....</i>	<i>29</i>
<i>Resistência mediada por cromossomos.....</i>	<i>29</i>
<i>Resistência mediada por plasmídeo.....</i>	<i>30</i>
<i>Mecanismos de resistência antimicrobiana.....</i>	<i>30</i>
<i>Situação da resistência antimicrobiana de <i>Salmonella</i> spp.....</i>	<i>33</i>
CAPÍTULO 2: SALMONELOSE EM REBANHO LEITEIRO BOVINO CONFINADO: Caracterização dos isolados, aspectos clínicos, epidemiológicos e resistência antimicrobiana.....	35
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
Local e população de estudo.....	36
Cálculo amostral.....	39
Coleta e processamento a campo de amostras.....	41
Isolamento e caracterização de <i>Salmonella</i> spp.....	43
<i>Recuperação de amostras e PCR específico para identificação de gênero.....</i>	<i>43</i>
<i>Sorotipagem de isolados positivos para <i>Salmonella</i> spp.....</i>	<i>44</i>
<i>Técnica ERIC PCR para isolados positivos de <i>Salmonella</i> spp.....</i>	<i>44</i>
<i>Antibiograma de isolados positivos para <i>Salmonella</i> spp.....</i>	<i>44</i>
Análise estatística.....	46
RESULTADOS.....	46
<i>Isolamento e análise molecular de amostras.....</i>	<i>46</i>
<i>Avaliação clínica.....</i>	<i>50</i>
<i>Análise de sensibilidade a antimicrobianos.....</i>	<i>51</i>
DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÕES.....	64

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	74
Certificado do projeto na comissão de ética no uso de animais/ UFMG.....	74

INTRODUÇÃO

As salmoneloses em bovinos ocorrem no mundo todo, e são causadas pela *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, que contém mais de 2.600 sorotipos, prevalecendo Dublin e Typhimurium (Gyles *et al.*, 2010; Nielsen, 2003; Pereira *et al.*, 2004).

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos, anaeróbios facultativos, Gram negativos, pertencentes à família enterobacteriaceae, que podem sobreviver e multiplicar-se no ambiente, nas fezes dos animais (Mukhtar *et al.*, 2015). Virtualmente, todas as *Salmonella enterica* podem causar distúrbios digestivos. As salmonelas da subespécie *enterica* possuem potencial zoonótico. Em 2015, 70% das infecções em humanos na Europa foram causadas por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, com relatos de quadros graves com *S. Dublin*. Em bovinos, Dublin e Typhimurium representam 70% dos relatos. E apesar da sorovar Dublin ser adaptado ao bovino, possui potencial zoonótico (Ågren, 2017; Izzo *et al.*, 2011; Nielsen, 2003).

Animais infectados podem eliminar salmonela nas fezes mesmo na ausência de sinais clínicos e perpetuarem a doença nos rebanhos, podendo eliminar o agente por toda a vida. Em momentos de estresse (manejo, doença concomitante ou estresse ambiental) podem ocorrer aumento na taxa de eliminação e novas ocorrências da doença clínica (Gyles *et al.*, 2010).

Infecções sistêmicas podem ocorrer em condições de imunodeficiência (doença concomitante, estresse ambiental ou colostragem deficitária) quando a bactéria atinge a corrente linfática, atingindo diversos órgãos e tecidos. A manifestação de sinais clínicos e severidade dependem, além do *status* imune do animal, do sorotipo, da estirpe, do desafio e ainda da via de infecção (Ågren, 2017; Cummings *et al.*, 2012).

A rota de transmissão é usualmente fecal-oral. Água e alimentos podem ser contaminados com lodo, dejetos e fonte de irrigação contaminada. A salmonela pode sobreviver e multiplicar-se no ambiente, dejetos e efluentes dos sistemas de produção. A compra de animais infectados é uma das principais fontes de entrada em propriedades livres, principalmente com a mistura de lotes. Compartilhamento de pastos e contaminação de terreno de pastos em níveis diferentes (enxurradas) são importantes fontes indiretas (Izzo *et al.*, 2011).

Falhas de manejo são importantes para que ocorra contaminações e a propagação do agente. A área de parto é uma fonte importante para transmissão entre a vaca e o bezerro, principalmente de animais portadores assintomáticos para os bezerros, num momento de um sistema imune imaturo. *S. Dublin*, embora menos frequente, pode ser transmitida através de aerossóis, intrauterina e mucosa conjuntival, e menos frequentemente, através do leite de animais portadores (Losinger *et al.*, 1995; Wray *et al.*, 1990).

A doença clínica é mais comum em bezerros, ocorrendo principalmente entre duas e seis semanas de idade, com sinais clínicos variando de distúrbios entéricos com febre, prostração, anorexia,

diarreia, artrite e desidratação até a morte de animais, podendo ocorrer casos de sepse, com o agente sendo isolado no sangue e diversos outros tecidos (pulmão, fígado, meninges, articulações e necrose seca em extremidade de membros), sendo a pneumonia a manifestação secundária mais comum (Gyles *et al.*, 2010; Nielsen, 2013a). Alguns animais morrem com evolução rápida de até três dias sem presença de diarreia (Jones *et al.*, 2004).

Em animais adultos, a doença mais frequente é por *S. Dublin*. Além dos sinais observados em bezerros, há redução na produção de leite e abortos em animais gestantes, sendo que estes podem ocorrer mesmo em animais sem outros sinais clínicos (*S. Dublin*) (Gyles *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2004). A eliminação nas fezes ocorre de forma intermitente, e é mais frequente após o transporte, parto e doença concomitante, podendo ocorrer sem a manifestação dos sinais clínicos (USDA, 2005).

O impacto econômico pode chegar a até 315 euros a cada nova vaca infectada no primeiro ano, e oscilar entre nove e 196 euros por ano nos 10 anos seguintes. Um surto de salmonelose em rebanho de 100 cabeças pode representar um custo de até 7.870 euros, sendo que desse valor, aproximadamente 3.600 euros são em decorrência de redução na produção de leite. Em vacas com produção média de 7000 kg por lactação, a perda de produção foi de aproximadamente 200 kg por vaca (Nielsen, 2013a).

Em condições precárias de higiene, *S. Dublin* pode causar doença em mais de 80% dos bezerros e a mortalidade pode ultrapassar 50%. Usualmente, salmonelas adaptadas ao hospedeiro têm maior capacidade de causar quadros severos da doença, frente aquelas salmonelas generalistas (Ågren, 2017; Nielsen, 2003).

O diagnóstico é realizado utilizando-se de técnicas diretas (cultivo e PCR) e indiretas (ELISA) (Platts-Mills *et al.*, 2013). O uso de técnicas indiretas para pesquisa de anticorpos anti-antígeno-O pode conter resposta cruzada com outras salmonelas além de *S. Dublin* e *S. Typhimurium* que expressem esse antígeno na superfície celular. O uso de cultivos possui boa especificidade e permite a realização de genotipagem posterior, enquanto a especificidade depende do momento e da qualidade da colheita de material, uma vez que as amostras possuem diversos grupo de bactérias. Com isso, faz-se uso de meios de enriquecimento e seletivos e posteriormente o plaqueamento de colônias suspeitas em meio seletivo, seguido de testes bioquímicos e de aglutinação (Casburn-Jones *et al.*, 2004; Izzo *et al.*, 2011; Moal *et al.*, 2017).

O uso de vacinas, antibiótico em massa e probióticos têm sido estudados com resultados variáveis e pouco robustos. Vacinas autógenas produzem certa imunidade que são capazes de reduzir a severidade em bezerros, porém são ineficientes em reduzir a eliminação do agente. Antibióticos possuem bons resultados, mas devem ser desencorajados devido ao caráter zoonótico da enfermidade e indução de resistência às drogas. O método mais eficiente é o controle da biossegurança das propriedades e adequação de medidas de manejo para prevenir a transmissão no rebanho entre categorias e no uso de quarentenários e diagnóstico em animais adquiridos (Ågren, 2017).

O controle e erradicação da infecção são sempre mais custosos do que a prevenção, e o procedimento entre tratamentos, eliminação de portadores e mudanças de manejo podem durar anos até o controle e eventual erradicação da doença (Nielsen, 2013a).

Há pouca informação sobre a distribuição da *Salmonella* spp. em bovinos no Brasil. Os sorotipos envolvidos e os padrões de resistência dos isolados são amplamente desconhecidos no país. Em adição há carência de informação na literatura com relação a dinâmica de transmissão em rebanhos confinados, o que pode auxiliar em futuros protocolos de prevenção e controle dessa zoonose.

OBJETIVO

Objetivo Geral:

Determinar a distribuição por categoria animal de isolados de *Salmonella* spp. sorotificadas, os dados clínico-epidemiológicos, similaridade genética e resistência antimicrobiana em um rebanho bovino leiteiro confinado.

Objetivos Específicos:

1. Pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em fezes e espécimes clínicos pelo cultivo bacteriológico e PCR;
2. Determinar os sorotipos mais prevalentes por categoria animal pela sorotipagem;
3. Determinar os fatores de risco de infecção por *Salmonella* spp. no rebanho em estudo;
4. Determinar os sinais clínicos nos animais doentes e os achados macroscópicos nos animais que vieram a óbito;
5. Determinar a similaridade genética dos isolados;
6. Determinar a resistência antimicrobiana.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Caracterização de *Salmonella* spp.:

São patógenos do grupo das bactérias, pertencentes ao filo proteobactérias, classe gama proteobactérias, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae e gênero *Salmonella*, estando distribuídos ao longo de todo o mundo, que pode infectar humanos e animais. Os indivíduos da espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* possuem interesse clínico e são potenciais zoonoses. A Salmonelose, doença causada pela *Salmonella* spp. afeta aproximadamente dois milhões de americanos anualmente, comumente como uma toxinfecção alimentar que é autolimitante, com severidade moderada, podendo em alguns casos evoluir para uma doença sistêmica grave que requer atenção especial, cuidados intensivos e tratamento com antimicrobianos. Na produção animal, *Salmonella* spp. é responsável por grandes perdas produtivas em todas as espécies de animais domésticos (Ågren, 2017; Murray *et al.*, 2002).

São bacilos gram-negativos, flagelados, anaeróbicos facultativos e possuem três principais antígenos:

- a. Antígeno H ou flagelar: pode ocorrer em duas fases (1 ou 2) e a bactéria pode alternar entre elas;
- b. Antígeno O ou somático: ocorre na superfície da membrana celular, sendo determinados por sequências de açúcares específicos da parede celular;
- c. Antígeno Vi: sobrepõe o antígeno O depositado na membrana celular, está presente em apenas alguns sorotipos específicos.

A análise antigênica de *Salmonella* sp através de antissoros específicos permite a identificação com precisão do sorogrupo, fornecendo uma vantagem clínica no diagnóstico ao identificar a provável origem e fonte de contaminação para determinar a forma de contágio e disseminação do agente em uma população (Murray *et al.*, 2002).

Assim como outras bactérias gram-negativas, *Salmonella* spp. possui uma camada externa de lipopolissacarídeo (LPS) que é liberada na lise celular e em grau variado, durante o crescimento da população bacteriana. Esse LPS pode atuar como uma endotoxina e é um importante fator de virulência do gênero (Riva *et al.*, 2015).

O LPS possui diversas funções e aplicações, consistindo em três componentes principais:

- a. Porção externa de polissacarídeo-O: Responsável pela especificidade do antígeno O e determinar a virulência da cepa. *Salmonella* spp. que não possuem o polissacarídeo-O são chamadas rugosas devido à aparência das colônias e são menos virulentas ou completamente não virulentas quando comparadas às cepas que possuem o polissacarídeo;

- b. Porção intermediária (*R core*): *R core* é um antígeno comum às enterobactérias, onde anticorpos que se ligam a esse antígeno oferecem proteção cruzada contra diversos enteropatógenos em grau variado, podendo controlar a infecção, atenuar seus efeitos ou reduzir a letalidade, contribuindo no combate à doença.
- c. Porção interna de lipídeo A: Centro imunorreativo do LPS, possui um reconhecimento muito sensível pelos componentes celulares e humorais da resposta inata, responsável pela manifestação clínica das infecções por Gram negativos. As endotoxinas induzem febre, ativação do sistema complemento, coagulação vascular, depressão da função cardíaca e interferem com a função linfocitária. É responsável pelas principais manifestações do choque endotóxico por endotoxinas em infecções sistêmicas (Murray *et al.*, 2002; Reygaert, 2009).

2. Métodos diagnósticos para salmonelose:

A Salmonelose é uma doença primariamente entérica que, a depender da virulência do agente, pode manifestar sinais sistêmicos. Casos esporádicos de *Salmonella* spp. menos virulentas apresentam diarreia transitória leve e possuem cura espontânea, enquanto em surtos de grandes proporções, a doença se espalha rapidamente pelo rebanho susceptível, causando mortalidade muito alta de animais jovens e podendo acometer animais adultos.

Manifestações clínicas:

Animais adultos apresentam distúrbios entéricos agudos ou subagudos e animais gestantes podem apresentar aborto durante a fase aguda da doença. Sinais severos da doença incluem febre, depressão, inapetência, queda na produção de leite, seguidos de diarreia fétida, fezes com abundância de muco e podendo conter estrias de sangue. Também são observados fragmentos de fibrina, aos quais devem ser diferenciados de tecido necrótico da mucosa, que podem ser apresentados em casos muito graves. A fase aguda usualmente dura uma semana e animais costumam apresentar desidratação clínica nesse período. O principal sorotipo é *S. Dublin*, entretanto *S. Typhimurium* e *S. Newport* são bem documentadas causando doença sistêmica ou abortos em qualquer estágio da gestação, podendo ou não manifestar outros sinais clínicos. Vacas que abortam na ausência de sinal clínico podem apresentar distúrbios entéricos entre duas a quatro semanas após o aborto e aproximadamente 70% dos animais que abortam apresentam retenção de placenta. Se as complicações reprodutivas forem manejadas adequadamente, não há prejuízos reprodutivos futuros para o animal recuperado (Adem *et al.*, 2016).

Em bezerros, são observados sinais mais comumente em animais jovens. Os sinais clínicos variam e frequentemente são sinais entéricos com febre, depressão e anorexia seguidos de diarreia com muco e que pode conter fibrina e estrias de sangue ou conteúdo necrótico da mucosa intestinal. As fezes são fétidas e pegajosas. Bezerros acometidos clinicamente apresentam desidratação intensa e demandam intervenção. Após a fase digestiva, *Salmonella* spp. se torna sistêmica e acomete outros órgãos como

linfonodos, pulmões, rins e fígado. Animais recuperados, em sua maioria, não se tornam portadores. Apesar da intensidade de sinais clínicos ser variável, em surtos, animais podem morrer sem manifestação de sinais clínicos. A presença de isolados de *Salmonella* spp. em variados tecidos e no sangue é um indicativo de doença sistêmica aguda (Forshell *et al.*, 2006).

Coleta de material:

Achados clínicos e mesmo *post mortem* não são específicos para salmonelose, porém contribuem para a suspeita e direcionamento de solicitações de exames complementares.

Para a realização de diagnóstico laboratorial se faz necessário a coleta adequada de amostras representativas e confiáveis, que podem ser obtidas de animais doentes ou após a realização do exame *Post mortem*.

O principal material para detecção do agente são amostras de fezes coletadas via transretal com o uso de *swab* estéril anteriormente ao tratamento com antibiótico. No exame *Post mortem* o *swab* pode ser coletado na porção distal do jejuno e de área adjacente à lesão intestinal macroscópica. É recomendado o acondicionamento das amostras em meios de transporte ou enriquecimento e encaminhamento refrigerado entre 2 e 8°C ao laboratório em até 24h após a colheita (Adem *et al.*, 2016).

Apesar de ser possível a identificação da *Salmonella* spp. de *swab* oral e nasal e de cultivo de amostra de sangue, esses materiais são pouco sensíveis e não recomendados (Adem *et al.*, 2016).

Na avaliação *Post mortem* podem ser coletados fragmentos de tecidos como linfonodos mesentéricos, fígado, bile, baço, rins e pulmões e encaminhados refrigerados com ou sem o uso de meios de transporte, bem como o uso de *swab* nesses mesmos tecidos acondicionados em meios de transporte ou enriquecimento.

Amostras de sangue podem ser encaminhadas para exames indiretos para pesquisa de anticorpos mesmo após o tratamento dos animais (Murray *et al.*, 2002).

Cultura bacteriológica:

Para cultura são utilizadas as amostras de *swab* retal ou conteúdo intestinal e de tecidos de animais não tratados com antibióticos antes das colheitas.

O método tradicional de cultivo de *Salmonella* spp. é composto de quatro estágios, sendo eles o pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento da cultura pura e prova bioquímica. Esse método é o recomendado pelo USDA (*U. S. Department of agriculture*) e FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) e o tempo de realização varia de cinco a sete dias. O pré-enriquecimento requer cultivo em meio não seletivo, como caldo nutriente, por 6-24h com incubação a 37°C. Após isso, é realizado o enriquecimento seletivo utilizando-se caldo Rappapor-Vassiliadis ou caldo Muller Kauffmann tetrathionato incubados por 24h a 41,5° e 37°C respectivamente. A terceira etapa é o isolamento de culturas puras em placas de ágar com meio seletivo como Ágar Entérico Hektoen ou Ágar Verde

Brilhante por 24h. O último passo é a prova bioquímica utilizando Ágar tríplice açúcar ferro e Ágar lisina ferro requerendo entre 4 e 24h para conclusão (Hans *et al.*, 2006).

Testes sorológicos:

Ensaio imunoenzimático é uma ferramenta eficiente para avaliar de forma rápida e massiva a presença do agente, tanto no passado quanto no presente se associado à cultura tradicional. Também é uma ferramenta que pode ser utilizada para a pesquisa de animais portadores. O fator limitante do teste é a necessidade de uma resposta do hospedeiro, que pode demorar até 14 dias após a infecção para ser produzida, resultando em falsos negativos no início da infecção. No entanto, a vantagem é a não necessidade de incubações prolongadas para multiplicação do agente (Adem *et al.*, 2016).

As técnicas imunoenzimáticas são bem estabelecidas e diversos *kits* comerciais estão disponíveis para várias espécies animais. São baseados em anticorpos anti IgG ou IgM bovino (ou para a espécie de interesse), marcados com corante ou fluorescente, cujo resultado pode ser observado pela aglutinação ou avaliação de um espectrofotômetro a depender da técnica utilizada (Kemal, 2014).

As técnicas disponíveis são o ELISA, Soro Aglutinação e Fixação de Complemento, que fornecem resultados rápidos e com boa sensibilidade (Kemal, 2014).

Ensaio moleculares:

Entre os métodos moleculares, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, que apresentam grande especificidade, porém a sensibilidade em amostra direta depende da presença do agente em quantidade mínima. Pode ser utilizada após o isolamento de culturas puras em substituição à prova bioquímica, conferindo maior sensibilidade e especificidade com a combinação dos testes (Adem *et al.*, 2016).

3. Fatores de risco para contágio de disseminação da Salmonelose:

Fator de risco para ocorrência de doenças é uma variável que pode estar associada ao Agente, Hospedeiro ou Ambiente e que influencia, positiva ou negativamente, a ocorrência de um determinado evento. O evento pode ser a contaminação de animais, o qual pode se tornar doente ou portador e disseminar a doença (Vaessen *et al.*, 1998).

Fatores de risco são determinados através de modelos que incluem a presença ou não de determinada variável e, assim, avalia o resultado em probabilidade, podendo esta ser positiva ou negativa em relação ao evento (Nielsen, 2003).

A avaliação de ocorrências, devido à natureza de seus resultados e à forma de avaliar a intensidade de seus efeitos, é de difícil mensuração. Ainda, é difícil controlar determinados fatores ambientais e sua ligação com outras variáveis estudadas em propriedades diferentes, mesmo mantendo-se o sistema de produção. Porém, a avaliação dessas variáveis continua sendo importante para aferir o

risco de incidência e disseminação de doenças infecciosas entre rebanhos e animais, e assim determinar qual o grau de impacto de cada fator de risco na disseminação de uma doença (Ågren, 2017; Nielsen, 2003).

Fatores relacionados ao hospedeiro podem ser idade, sexo, raça, comportamentais e estado fisiológico (estresse, condição nutricional, comorbidades) (Watson *et al.*, 2010).

Fatores relacionados ao agente são a virulência, patogenicidade, capacidade de propagação, resistência antimicrobiana, resiliência ao sistema imune do hospedeiro e especificidade a um hospedeiro, sendo essas características definidas pela composição genética do agente (Blair *et al.*, 2015; Eng *et al.*, 2015).

Já os fatores relacionados ao ambiente estão interligados ao tipo de sistema de produção, estratégias sanitárias, alimentação, lotação de instalações, clima da região e intensividade de produção. Algumas condições são de aspecto natural, e o homem não possui controle sobre elas, porém, outras atividades como lotação, dieta, fonte de água, higiene de produtos e instalações (cargas infectantes ambientais), ventilação, formação de pastagens, locais de parição e de movimentação de animais, ou seja, aqueles relacionados a gerenciamento operacional de uma propriedade, são fatores ambientais controláveis (Cummings *et al.*, 2012).

Rebanho sem infecção prévia:

Rebanhos sem infecção previamente conhecida apresentam dois pontos críticos de risco, sendo eles as práticas de manejo (compras, arrendamentos, exposições etc.) e localização do rebanho (se rebanhos próximos são portadores e se o ambiente da fazenda é favorável à manutenção do agente).

Aumento na probabilidade de introdução do agente no rebanho está relacionado a um baixo nível de biosseguridade com relação a visitantes e profissionais externos (Van Schaik *et al.*, 2002).

Van Schaik *et al.* (2002), em trabalho realizado na Dinamarca, encontraram aumento significativo na probabilidade de introdução de organismos patogênicos (BVDV, BHV1, *Leptospira hardjo* e *Salmonella* Dublin) quando rebanhos permitiam:

- a. Animais retornassem após leilões, exposições e outros eventos externos à propriedade e em contato com outros animais (OR=12,6);
- b. Animais fossem recriados em contato com animais de outras fazendas (recria terceirizada ou recria de animais de outras fazendas na propriedade) (OR=7,0).

No mesmo trabalho, Van Schaik *et al.* (2002) encontraram um valor protetivo (OR=0,2) quando veterinários e inseminadores usavam vestimentas da propriedade para o trabalho de rotina.

Outro trabalho realizado em 126 fazendas na Dinamarca observou-se que a compra recorrente para a reposição de animais aumentou a probabilidade de se infectar com *Salmonella* Dublin (OR=4,29) (Vaessen *et al.*, 1998).

Além disso, um estudo com 1.429 rebanhos na Dinamarca mostrou que a presença de um rebanho positivo próximo é um fator agravante para contaminação de outros rebanhos, atribuído possivelmente a vetores mecânicos como aves e outros animais que passam os limites de propriedades, bem como ao atendimento de veterinários e outros técnicos externos que atuam em mais de uma propriedade (Wedderkopp *et al.*, 2001).

Rebanho com infecção prévia:

Em rebanhos portadores, é importante reduzir a contaminação ambiental e o risco de contaminação horizontal em determinadas categorias, principalmente em bezerros até 150 dias.

Losinger *et al.* (1995) relataram redução na probabilidade de eliminação de *Salmonella* spp. em bezerras nascidas em baias individuais quando comparadas a baias coletivas em fazendas americanas. No mesmo estudo foi observada redução (OR=0,35) na eliminação de *Salmonella* spp. em fazendas que forneciam sucedâneo medicado com antimicrobiano (tetraciclina, neomicina e decoquinato) até a desmama. O uso de antibióticos, mesmo que de baixa eficácia, em animais na fase de recria é indicado quando se sabe a condição de portador e que está eliminando *Salmonella* spp. nas fezes, uma vez que nessa categoria a eliminação é cessada, assim sendo, justificaria a redução de eliminação observada nos dados anteriores (Nielsen, 2013a).

Em um estudo na Dinamarca, Vaessen *et al.* (1998) encontraram que rebanhos maiores possuem OR=1,03, probabilidade discretamente maior de disseminação de *Salmonella* Dublin. Foi encontrado que fazendas com áreas de brejo e rios em que os animais possuem acesso e que, principalmente, são fonte da água de bebida desses animais apresentam uma OR=2,06 para eliminação de *S. Dublin*. Uma associação positiva foi observada com presença de Fascíola Hepática e a eliminação de *S. Dublin* (OR=14,16), justificada possivelmente pelo tipo de ambiente, onde a presença de áreas alagadas para contaminação por Fascíola é um bom ambiente para manutenção da *S. Dublin* (Nielsen, 2003).

Fatores inerentes ao hospedeiro:

Um dos principais fatores associados ao indivíduo para infecção por *Salmonella* spp. é a idade. Bezerros entre 14 dias e 3 meses de idade são mais susceptíveis a se infectarem, sendo que nessa idade aparecem comumente os sinais de Salmonelose (diarreia com fibrina, presença de sangue nas fezes, prostração e evolução para sinais de sepse), sendo que algumas cepas virulentas de *S. Dublin* não manifestam sinais clínicos, com mortes ocorrendo em até 48 após infecção em quadros hiperagudos (Barrington *et al.*, 2001; Muktar *et al.*, 2015).

Porém, animais jovens não são os únicos susceptíveis à infecção. Em rebanhos com infecção endêmica, qualquer animal pode ser um portador (Nielsen, 2003).

Um fator de risco relevante para disseminação da *Salmonella* spp. é o estado fisiológico dos portadores, que em condições de estresse e imunossupressão (transporte, deficiência nutricional, período

de transição, comorbidades, etc.) pode induzir um novo pico de eliminação do agente sem necessariamente com a presença de sinais clínicos (Ågren, 2017; Behnsen *et al.*, 2015; Moal *et al.*, 2017; Vaessen *et al.*, 1998).

Sistemas de produção como *Loose Housing* são mais propensos à propagação da *Salmonella spp.* entre indivíduos quando comparado a pastejo ou instalações do tipo *Free Stall* e *Tie Stall*. A lotação e a carga orgânica também são fatores que aumentam a disseminação de doenças infecciosas entre os indivíduos (Losinger *et al.*, 1995).

Animais portadores:

Em trabalho conduzido por Nielsen *et al.* (2004) foram estimadas as probabilidades de um indivíduo se tornar portador conforme a idade, a fase produtiva e o estado sanitário do rebanho na Dinamarca. Vacas e novilhas no periparto apresentam as maiores probabilidades (OR=7,9 e OR=4,0, respectivamente) de serem infectadas e de se tornarem portadoras de *S. Dublin* quando comparadas a animais em lactação (OR=1,0 e OR=1,6, respectivamente). Esse aumento no período periparto reforça a afirmativa de que imunossupressão e estresse são fatores de risco importantes para a infecção.

Trabalhos já sugeriram que bezerros que tiveram quadros de seps e se recuperaram têm maior probabilidade de se tornarem portadores, porém Nielsen *et al.* (2004) não encontraram diferenças que suportem essa teoria. Já infecções clínicas na forma clássica (diarreia com muco e fibrina) aumentaram a probabilidade em 1,2 vezes de o animal se tornar portador (Nielsen *et al.*, 2004).

No mesmo trabalho foi observado que a redução na incidência de *S. Dublin* em um rebanho após o surto, aumenta a ocorrência de animais portadores assintomáticos que eliminam *S. Dublin* nas fezes. No entanto, não fica claro se é uma consequência da recuperação de animais doentes ou se é a diminuição na carga infectante que induz a formação de portadores de longo prazo no rebanho, com respostas sistêmicas mais brandas e que permitem a *S. Dublin* infectar células linfoides e perdurar.

A estação do ano foi avaliada como fator de risco, sendo que animais infectados durante o inverno apresentam maior probabilidade (OR=4,0) quando comparados a animais infectados no verão (OR=0,7). Apesar de significativa a diferença observada, cabe salientar a diferença de rigor e sistema de produção entre os hemisférios norte e sul. No hemisfério norte há adensamento de animais no inverno, com um clima mais úmido que o verão, ao contrário do que ocorre no clima tropical do Brasil.

Transmissão entre rebanhos:

Vários estudos avaliam o risco e o mecanismo de transmissão entre os rebanhos, porém, é fato que fazendas fechadas possuem esse risco severamente reduzido, principalmente para agentes como *S. Dublin* que são agentes espécie específico (Ågren, 2017; Nielsen, 2003).

A transmissão entre rebanhos pode ocorrer tanto pela aquisição de animais infectados, quanto pelo transporte e mistura de animais com origens distintas (Wray *et al.*, 1990). Poppe *et al.* (1998)

mostraram que os animais adquiridos de leilões de múltiplos proprietários e comerciantes de bovinos apresentam risco quatro vezes maior de disseminação de *Salmonella* spp. do que aqueles adquiridos e transportados de uma única fazenda.

Portadores de infecções crônicas de *Salmonella* spp. apresentam um dos principais riscos de disseminação quando movidos do rebanho de origem para um rebanho novo. Estes animais apresentam infecção geralmente assintomática ou com sinais discretos e com o estresse do transporte, da reintrodução social e do novo alojamento, usualmente começam a eliminar o agente nas fezes. Dessa forma, contaminam um rebanho suscetível, sem imunidade e contato prévio, podendo desencadear um surto de Salmonelose e outras doenças (Nielsen, 2003).

É importante observar a contaminação de pastagens e forrageiras com dejetos de animais ou rebanho portador, seja esta contaminação oriunda do compartilhamento de pastagens como o arrendamento, ou a distribuição de dejetos por fértil adubação, tanto de origem da propriedade como adquirido de propriedades vizinhas, levando a surtos pela contaminação da dieta dos animais (Taylor *et al.*, 1971).

Vetores mecânicos como vestimentas (botas e roupas) podem manter *Salmonella* spp. viáveis por até 48h após o contato. Isto pode consistir num meio de disseminação carregada por técnicos, veterinários, inseminadores e outros profissionais temporários que atuam em mais de uma propriedade (Ruzante *et al.*, 2010).

Transmissão no rebanho:

A intensidade de transmissão de *Salmonella* spp. dentro de um mesmo rebanho varia muito, baseando-se em critérios de manejo relacionados à biossegurança do sistema produtivo, bem como o tipo de instalação e a lotação em cada sistema (Nielsen, 2003).

Animais apresentando quadros clínicos e portadores assintomáticos são a fonte de contaminação de animais sadios. O momento crítico dentro de um rebanho para essa transmissão ocorre durante o parto. No periparto, a vaca está em um estado de imunossupressão e estresse, que pode levar ao aumento na eliminação de *Salmonella* spp. e contaminação não só do bezerro, como também da própria baia ou piquete maternidade, podendo assim contaminar outras vacas e bezerros. Nessa condição, os procedimentos de higiene do local, monitoramento do parto e primeiros cuidados com o bezerro são fundamentais para controlar a disseminação da doença e produção de um novo surto em fazenda com surto prévio, bem como são medidas necessárias para controlar um surto em andamento (Ågren, 2017).

No bezerreiro, segundo ponto crítico de contaminação, sistemas de baia individual são indicados para fazendas com histórico da doença, preferencialmente instalações do tipo “*all-in-all-out*”, onde é realizado um momento de vazio sanitário para adequada limpeza e desinfecção da instalação. Transmissão em sistemas individuais já foram observadas através de fômites e equipamentos contaminados entre as baias (baldes, mamadeiras, bebedouros, pás e ancinhos) e pelo responsável ao

entrar em contato com animais de grupos de riscos diferentes. Equipamentos de limpeza de alta pressão (jatos pressurizados de água) não são recomendados para limpeza de baias onde não se utiliza o sistema “all-in-all-out”, uma vez que nessas condições *Salmonella* spp. podem ser transmitidas através de aerossóis para bezerros suscetíveis. Instalações que permaneçam úmidas por muito tempo após as higienizações também parecem contribuir para prolongar o período de sobrevivência da *Salmonella* spp. no ambiente (Vaessen *et al.*, 1998).

4. Aspectos imunológicos da Salmonelose:

Durante a passagem pelo hospedeiro, *Salmonella* terá de resistir a variados mecanismos de defesa. Diversos genes de virulência contribuem para garantir sucesso durante a infecção do hospedeiro. Em conjunto, esses fatores de virulência garantem sucesso na invasão do hospedeiro e colonização de células, interferindo com as funções fisiológicas dos sítios de infecção, modulando resposta imune e estabelecendo uma infecção intracelular para multiplicação do patógeno (Gerlach *et al.*, 2007).

Barreiras físicas:

Em se tratando de enterobactérias, o gênero *Salmonella* adentra no hospedeiro pela via oral, através de alimento e ambiente contaminados. O primeiro desafio a ser contornado é o baixo pH abomasal ocasionado pelo ácido clorídrico. O pH no abomaso é variável, sendo observado pH<1,0 em bezerros de duas semanas de idade após jejum de 8 horas, pH=2,0 em bezerros após a oitava semana (antes do fornecimento de leite) e pH=2,5 a 3,0 em vacas, chegando até pH 5,0 após alimentação em bezerros (Constable *et al.*, 2006). O baixo pH facilmente eliminaria as enterobactérias, porém estas adaptaram-se, produzindo diversos mecanismos para resistir à passagem pelo abomaso. Enquanto as *E. coli* são extremamente resistentes ao baixo pH, sobrevivendo por horas a pH 2,0, as bactérias do gênero *Salmonella* são menos resistentes.

Após passagem pelo pH do abomaso, no intestino, as células epiteliais são revestidas em muco, que é composto por duas camadas glicanas, no qual está difundido glicoproteínas (mucina) e oligossacarídeos complexos que protegem o epitélio do ambiente externo. Para adentrar no muco, as *Salmonella* spp. usam glicosil-hidrolases para solubilizar o muco e este se tornar mais permeável à sua passagem (Arabyan *et al.*, 2016; Marcobal *et al.*, 2013).

A bile, produto de composição variável da excreção e secreção hepática, é um bactericida químico capaz de degradar a membrana celular pela atividade detergente dos sais biliares. É capaz de alterar a conformação de proteínas e danificar ativamente o DNA microbiano. *Salmonella* spp. possuem um envoltório de lipopolissacarídeos (LPS) e o antígeno enterobacteriano comum (ECA) que protege a membrana de agentes ativos como os sais biliares (Prieto *et al.*, 2006; Ramos-Morales *et al.*, 2003).

Salmonella spp. também é capaz de identificar doses subletais de peptídeos antimicrobianos e assim acionar mecanismos de depleção como reorganização do LPS, sequestro e efluxo de proteínas livres e proteólise desses peptídeos. As modificações necessárias são:

- a. Regulação de tamanho do antígeno-O;
- b. Modificações de grupos fosfatos e lipídicos no LPS, uma ação regulada pelo PmrA, a qual leva a uma carga negativa na porção externa. Isto reduz a atividade dos peptídeos em contato com o LPS;
- c. Adição de um palmitato e um fosfatodiglicerol na membrana externa para aumentar a densidade da membrana.

Após suportar os desafios ambientais do TGI, *Salmonella* spp. têm que disputar espaço com a microbiota intestinal. O intestino é um ambiente rico em nutrientes ao longo de toda sua extensão, sendo que a população da microbiota cresce do abomaso até o cólon, onde atinge quantidades da ordem de 10^{12} bactérias por grama de conteúdo luminal. Os filos Firmicutes e Bacteroidetes são os mais prevalentes e, em menores quantidades, as Protobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia. Essas bactérias auxiliam a barreira física do organismo, disputando nutrientes e sítios de ligação, o que evita a colonização por bactérias patogênicas (Bäckhed *et al.*, 2005).

Para iniciar a colonização, *Salmonella* spp. faz uso de da enzima Hyb hidrogenase que permite o uso do hidrogênio produzido pela microbiota intestinal, disponibilizando elétrons para reações químicas, como produção de oxigênio e compostos tipo hidrocarbonetos, para aumento de crescimento, transporte de aminoácidos e expressão de proteínas periplasmáticas. Tudo isso melhora a captação e transporte de nutrientes através da membrana celular (Lamichhane-Khadka *et al.*, 2010). Após o início do crescimento, usando um modelo experimental de colite em camundongo, foi observada a ativação do sistema imune em infecção por *S. Typhimurium* e uma mudança na competição a seu favor (Bernal-Bayard *et al.*, 2018).

Espécies reativas de oxigênio produzidos por neutrófilos reagem com tiosulfato e produzem tetrationsato, que é utilizado pela *Salmonella* na respiração anaeróbica, conferindo uma vantagem ao tornar possível utilizar outros elementos, como a etanolamina, como fonte de carbono.

Stecher *et al.* (2012) descreveram em um estudo com colite em camundongos, um mecanismo sinérgico entre enterobactérias. Após infecção por *S. Typhimurium*, ocorreu grande crescimento de *E. coli* comensal, sugerido como resultado da disbiose intestinal causada pela *Salmonella* spp., de forma a fazer com que *E. coli* representasse até 80% do total de bactérias no conteúdo intestinal. Também foi observado transferência horizontal de genes, levando à troca de genes entre *Salmonella* spp. e *E. coli*, o que permite a transferência de plasmídeos de virulência e de resistência antimicrobiana.

Sistema imune inato:

Ultrapassando as barreiras físicas, *Salmonella* spp. iniciam a colonização do intestino, primeiramente na região do íleo, invadindo células M nas placas de Peyer. Elas também possuem capacidade de invadir diretamente as células epiteliais ou ainda serem fagocitadas por linfócitos TCD18⁺, monócitos e células dendríticas. Em infecções sistêmicas, *Salmonella* spp. podem se espalhar para diversos órgãos além do TGI (Watson *et al.*, 2010).

No ambiente intracelular, o sistema PhoQ/PhoP também é ativado para identificar e evitar a ação de mudanças de pH em fagócitos e atividade de peptídeos antimicrobianos, mas não evita que esses peptídeos sinalizem infecção sistêmica (Bernal-Bayard *et al.*, 2018).

Após fagocitose, *S. Typhimurium* tem a habilidade de lisar o vacúolo em formação, permanecendo livre no citoplasma celular. Neste local ela pode hiper replicar até a lise da célula, com liberação de substâncias pró-inflamatórias e de *Salmonella* spp. para o meio extracelular. Apesar de menos de 20% das células infectadas apresentarem hiper replicação, elas são responsáveis pela maioria das salmonelas produzidas no meio intracelular (Knodler *et al.*, 2014).

A inflamação inicial para superar a microbiota natural do intestino é benéfica às *Salmonella* spp. Quando a fase intracelular inicia, *Salmonella* spp. possuem mecanismos para moderar a inflamação. Entre os mecanismos, estão a diminuição da expressão da flagelina para reduzir a ativação do NLRC4, modular a produção de TCA (ácido tri-carboxílico) para evitar a ativação de NLRP3 (inflamassoma) de macrófagos. Vários efetores do gene T3SS possuem atividades anti-inflamatórias como o SpvC (codificado por plasmídeo) suprime a expressão de PAMP's e desfosforila MAPK6 (proteína quinase ativada por mitogênio em macrófagos) inibindo sinais de defesa e recrutamento celular (Bernal-Bayard *et al.*, 2018; Neumann *et al.*, 2014).

Algumas *Salmonella* spp. possuem a capacidade de interferir com o sistema complemento. *S. Typhi* expressa o gene Vi capsular polissacarídeo ao passar pelo intestino. Este polissacarídeo possui propriedades anti-inflamatórias e capacidade de inibir a deposição de complemento. Proteases de superfície reduzem a atividade do complemento ao quebrarem os componentes C3b, C4b, C5, B e H, conferindo proteção à *Salmonella* spp. sobre o sistema imune (Riva *et al.*, 2015).

Sistema imune adquirido:

A comunicação entre imunidade inata e adquirida se dá através das células dendríticas apresentadoras de antígenos. Sendo assim, *Salmonella* spp. desenvolveram mecanismos para evitar a sua apresentação às células dendríticas e assim, evitar o início da resposta adaptativa.

Através da translocação do gene T3SS1 *Salmonella* spp. conseguem induzir fagocitose por células epiteliais no intestino, levando à internalização do agente. Já a fagocitose por células dendríticas é regulada por proteínas efetoras do gene T3SS1, para evitar a entrada de grande quantidade de células para o meio intracelular de macrófagos, que resultaria em uma grande resposta imune, dificultando a replicação do agente (Bueno *et al.*, 2010). Por outro lado, Riquelme *et al.* (2012) mostraram que

Salmonella spp. opsonizadas por IgG são reconhecidas por diferentes receptores de membrana expressos na superfície de células dendríticas e esses imunocomplexos são internalizados e degradados pela rota lisossomal, podendo, novamente, essas células apresentarem antígenos a linfócitos T, iniciando a resposta adaptativa. Entretanto, esse mecanismo proporcionado pela opsonização por IgG não está bem elucidado.

Após a fagocitose, *Salmonella* spp. produzem substâncias para evitar o funcionamento do conjunto fagossoma e lisossoma. Dentre os mecanismos utilizados para este fim estão os efetores SPI2 (ilha de patogenicidade de salmonela tipo 2), que são injetados no citosol através dos vacúolos que contêm *Salmonella* spp. por ação do gene T3SS2. Tobar *et al.* (2006) mostraram que espécimes mutantes com atividade reduzida do T3SS2 têm baixa capacidade de sobreviver e multiplicar em células dendríticas, mostrando terem atividade atenuada em camundongos.

Já os efetores do gene T3SS1 (SPI1, SopB e SopE) impedem a maturação do lisossoma e evitam a fusão deste com o fagossoma. Enquanto efetores do T3SS1 impedem a fusão e maturação de fagossomas e lisossomas, efetores do T3SS2 impedem transporte de substâncias entre organelas e reduzem a capacidade de resposta à infecção (D’Costa *et al.*, 2015).

S. Typhimurium também parece ser capaz de atrasar a apresentação de antígeno através de MHC-I, retardando a proliferação e a atividade de TCD8⁺. Curiosamente, os linfócitos TCD8⁺ de memória não conseguem produzir uma resposta rápida em infecções por *S. Typhimurium* (Luu *et al.*, 2006).

A regulação de expressão de flagelina, utilizado pra evitar o sistema imune inato e, se tratando de um antígeno alvo para início da imunidade adquirida também reduz a apresentação e ativação de linfócitos T. Além disso, *Salmonella* spp. podem tornar a flagelina já produzida indisponível para apresentação (Bernal-Bayard *et al.*, 2018).

Salmonella spp. também interferem com a proliferação de células T ao bloquearem a expressão de receptores para células T (TCR). A inibição ocorre tanto em TCD4 quanto em TCD8. O mecanismo pelo qual *Salmonella* spp. interferem na expressão de TCR se dá pela enzima L-asparaginase II, que ao reduzir expressão do receptor, leva à supressão da blastogênese de linfócitos T, bloqueia a produção de citocinas e, portanto, inibe a proliferação de linfócitos T (Kullas *et al.*, 2012).

Entretanto, *Salmonella* spp. também estimulam diretamente proliferação de células T independente do MHC, através do uso de TLR’s e NLR’s, o que resulta na liberação de citocinas pró inflamatórias, as quais induzem migração de linfócitos T ao sítio de infecção, principalmente TCD4, sendo inclusive o agente utilizado como modelo de estudo para a via alternativa de resposta TCD4⁺ (Broz *et al.*, 2013).

Linfócitos B são importantes para infecções futuras devido à produção de memória duradoura contra agentes. Além disso, apresentam função reguladora na imunidade, estimulando e inibindo a resposta imune de forma controlada. Linfócitos B apresentam atividade APC (capazes de apresentar e

fagocitar antígenos), sendo essenciais nas infecções por *Salmonella* spp. ao produzirem citocinas inflamatórias, sinalizando local de lesão com ativação do sistema imune e recrutamento celular. Já a função inibitória dos linfócitos B, oriunda da atividade de IL-10, está relacionada a doenças autoimunes (Mcsorley *et al.*, 2000; Ugrinovic *et al.*, 2003).

Essa modulação da resposta imune pela IL-10 aumenta a suscetibilidade do hospedeiro ao agente. Há também estudos em camundongo, os quais demonstraram que na ausência da expressão de IL-35, que também tem função anti-inflamatória, em linfócitos B apresentaram melhora na resistência à infecção por *S. Typhimurium*, onde o melhor desempenho se deve a uma proliferação maior com mais ativação de linfócitos B e T e com maior atividade APC pelos linfócitos B (Shen *et al.*, 2014; Ugrinovic *et al.*, 2003).

Um estudo mostrou que em infecções por *Salmonella* spp. há atraso no desenvolvimento dos centros germinativos nos tecidos linfoides, que são responsáveis pela produção de anticorpos de alta afinidade ao antígeno. Para evadir da atividade de linfócitos B, *Salmonella* spp. atrasam o desenvolvimento desses centros até o segundo mês após início da infecção, diferindo daquela normalmente envolvida em doenças infecciosas, sendo essa em média sete dias (Cunningham *et al.*, 2007).

Infecção crônica:

Se o hospedeiro sobreviver à fase aguda da salmonelose, a infecção tende a se tornar crônica, e o indivíduo se torna portador. Em humanos, o percentual de indivíduos que após contraírem salmonelose se tornam portadores chega a 6%. Indivíduos portadores na população são responsáveis pela manutenção do agente, eliminando esporadicamente o agente nas fezes, concluindo assim o ciclo de vida de *Salmonella* spp. (Monack *et al.*, 2004).

Mesmo sendo reconhecida a importância dos portadores assintomáticos, pouco se sabe sobre a interação entre a cronicidade da infecção e a atividade do sistema imune. Porém, cabe ressaltar que a capacidade de *Salmonella* spp. tornarem-se crônicas é dependente das ilhas de patogenicidade do microrganismo (SPI) 1 e 2 (Lam *et al.*, 2014).

Salmonella spp. possuem a capacidade de produzir biofilme em seres vivos e no ambiente. A correlação entre infecções crônicas e presença de biofilme em cálculos biliares em humanos é bem documentada. Mesmo não sendo necessária a presença do cálculo para a existência de infecção crônica, 90% dos indivíduos portadores apresentam algum grau de cálculo biliar. *S. Typhimurium* já foi identificada em cálculos biliares de camundongos (Escobedo *et al.*, 2011). A presença da bile melhora a capacidade de *Salmonella* spp. produzirem biofilme. Crawford *et al.* (2010) descreveram as proteínas FliC e OmpC como sendo responsáveis pela adesão inicial em superfícies revestidas de colesterol (como a dos cálculos biliares).

Uma característica de formação de biofilme é a produção de uma matriz extracelular para conferir integridade. No caso de *Salmonella* spp., essa matriz é composta de EPS (substância polimérica extracelular) e água. O EPS é composto principalmente por celulose, ácido colônico e antígeno capsular O (Escobedo *et al.*, 2011; Lam *et al.*, 2014).

É consenso que *Salmonella* spp. consegue sobreviver dentro de macrófagos e outras células imunes. Porém, devido à dificuldade de um modelo viável que sobreviva à infecção por uma estirpe virulenta de *Salmonella* spp., faltam estudos para determinar os mecanismos exatos e a duração a longo prazo de células infectadas. Monack *et al.* (2004) conseguiram um modelo experimental em ratos com infecção crônica a partir de uma estirpe virulenta de *S. Typhimurium* e conseguiram monitorar a atividade da bactéria nos macrófagos ao longo de um ano. É então proposto que macrófagos são reservatórios de longo prazo de bactérias em um estado similar à dormência, mas mantêm discreta atividade de replicação.

Outro estudo mostra uma preferência da *Salmonella* spp. por macrófagos M2 (anti-inflamatórios) no final da infecção. Talvez por esses macrófagos não apresentarem um maquinário de proteção tão eficientes em eliminar microrganismos. Também são identificadas bactérias em órgãos como fígado, baço e medula óssea em células B (Medina *et al.*, 2015).

O mecanismo pelo qual a *Salmonella* spp. consegue eliminar e infectar novos animais em uma infecção crônica assintomática é pouco compreendido. Há certa evidência de que a *Salmonella* spp. armazenada na bile é liberada em “ondas” no intestino e assim atingindo o ambiente. Também parece haver certo controle da eliminação pela microbiota residente, uma vez que animais cronicamente infectados, mas que não estejam eliminando, quando tratados com antibióticos, voltam a eliminar o agente (Lawley *et al.*, 2008).

5. Resistência antimicrobiana para *Salmonella* spp.:

A resistência antimicrobiana é conhecida há quase tanto tempo quanto os próprios antimicrobianos. Evolutivamente, a resistência antimicrobiana tem origem na disputa entre integrantes da flora por espaço em um ambiente com condições adequadas para proliferação, onde determinadas populações buscam a eliminação de outras concorrentes (Ugboko *et al.*, 2014).

A resistência ou suscetibilidade antimicrobiana não é uniforme em uma população para nenhum agente antimicrobiano. A suscetibilidade é medida em função da MIC (concentração inibitória mínima), a menor concentração de um determinado antibiótico que irá inibir o crescimento de uma dada população de bactérias, podendo variar entre espécies e grupos bacterianos. No entanto, alguns grupos de bactérias podem ser naturalmente resistentes a alguns antimicrobianos (Reygaert, 2018).

No advento dos primeiros antibióticos, no início dos anos 1930, a resistência aos antimicrobianos não era relevante, uma vez que poucas espécies patogênicas possuíam resistência a alguma das drogas, e a troca por outra resolvia facilmente o problema. A resistência começou a ser vista

como um problema quando surgiram, próximo da década de 80, relatos consistentes e frequentes de bactérias multirresistentes em diversos países, onde a disponibilidade de medicamentos sensíveis começou a ficar restrita, e combinações começaram a ser realizadas (Amenu, 2014).

Os mecanismos de resistência de *Salmonella* spp. ocorrem por aquisição de genes via plasmídeo ou mutação de cromossomos. A aquisição de plasmídeos ocorre via transferência horizontal de genes entre bactérias, absorção de plasmídeos de bactérias destruídas e recombinação de DNA de outras bactérias. Já a mutação pode ocorrer em diferentes locais do DNA da bactéria (Ugboko *et al.*, 2014).

Resistência natural:

A resistência natural ocorre naturalmente em uma espécie de bactérias. Pode ser dividida em intrínseca e induzida. Intrínseca é aquela que a espécie possui naturalmente, independente da aquisição de genes, mutação ou exposição prévia. Um exemplo de resistência intrínseca seria a *Listeria monocytogenes* e resistência natural às cefalosporinas. Já resistência induzida ocorre quando a bactéria possui os genes naturalmente, porém necessita de contato com a droga para a sua ativação (Reygaert, 2018).

Resistência adquirida:

A aquisição de resistência é possível por diversas rotas, seja ela por transformação (quando a bactéria absorve material genético exógeno), transposição (genes que são relativamente flexíveis e mudam sua posição no genoma, alterando em grau variável sua expressão, também conhecidos como genes “saltadores”) e conjugação (troca de material genético entre duas bactérias, sendo que ambas estão vivas e continuam seres independentes) ou ainda, através de mutação, cuja aquisição pode ser temporária ou permanente (Reygaert, 2018).

Transmissão por plasmídeos é a principal e mais eficiente rota de adquirir imunidade contra um antimicrobiano. Mutação é menos comum, porém fatores ambientais agressivos (como falta de nutriente, raios UV, radiação e compostos químicos) podem amplificar a ocorrência de mutações. Estas ocorrem numa taxa extremamente baixa de uma ocorrência a cada 10^6 a 10^9 divisões. Adicionalmente, a maioria das mutações é deletéria e leva à morte do organismo (Davies, 2010).

Mutações que conferem resistência também são menos interessantes ao microrganismo, já que muitas vezes essa vantagem vem com um custo, como, por exemplo, a aquisição de resistência à Meticilina pelo *Staphylococcus aureus*, que reduz drasticamente a taxa de crescimento bacteriano (Reygaert, 2009).

Resistência mediada por cromossomos:

É menos comum que a resistência adquirida por plasmídeo, sendo clinicamente menos relevante. É atribuída à mudança pontual em um gene que modifica a expressão de receptores alvo da droga, ou então que altera o sistema de transporte transmembrana da célula (Ugboko *et al.*, 2014).

A chance de ocorrência desse tipo de resistência é uma potência de 10^{-6} a 10^{-9} , sendo expressivamente menor daquela obtida com plasmídeo. Ainda, de modo evolutivo, a resistência através de cromossomos é transferida quando a célula sofre mitose, enquanto uma bactéria pode produzir diversas cópias do plasmídeo, transferidas na troca de material genético entre bactérias ou absorvidas por outras bactérias quando esta morre. Este último ocorre, inclusive, entre bactérias de espécies diferentes, como *Salmonella* spp. e *E. coli* (Bayard *et al.*, 2018; Zaki *et al.*, 2011).

As resistências mais frequentes de origem cromossomal para *Salmonella* spp. são para trimetoprim, uma mudança pontual no genoma que leva à codificação da enzima di-hidrofolato redutase, a qual reduz di-hidrofolato em tetra-hidrofolato, inativando a ação da droga. Também há resistência cromossomal às sulfas, ocorrendo mutação no gene que codifica a enzima di-hidropteroato sintetase, que reduz a afinidade de ligação da droga ao alvo (Ugboko *et al.*, 2014).

Recentemente foi relatado resistência mediada por cromossomo para as fluorquinolonas, sendo resultado da pressão de seleção pelo uso indiscriminado na última década. Ocorre uma mutação pontual no gene topoisomerase *gyrA*, que codifica a enzima DNA gyrase (Zaki *et al.*, 2011).

Resistência mediada por plasmídeo:

A resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. usualmente surge da aquisição de plasmídeos. Plasmídeos usualmente codificam enzimas que degradam ou modificam a estrutura química das drogas antimicrobianas. Por exemplo a hidrólise causada pela β -Lactamase na Penicilina ou então, a acetilação do Cloranfenicol. Em indivíduos multirresistentes, o principal grupo de plasmídeo responsável é o IncHI1, responsáveis por codificar genes e mecanismos de resistência a diversos tipos e classes de antimicrobianos (Cain *et al.*, 2013; Zaki *et al.*, 2011).

O primeiro relato de *Salmonella* spp. contendo o plasmídeo IncHI1 foi em 1972 durante um surto no México, onde foi detectado resistência para tratamentos médicos com Cloranfenicol, Tetraciclina, Estreptomicina e Sulfas (Eng *et al.*, 2015).

Mecanismo de resistência antimicrobiana:

Inativação de antimicrobiano:

O princípio desse mecanismo é inibir a atividade da droga, podendo ser por degradação ou modificação de estrutura. É o sistema mais comum de resistência. A inativação usualmente ocorre pela atividade de enzimas produzidas pela bactéria (Ugboko *et al.*, 2014).

As β -Lactamases são um grande grupo de enzimas que hidrolisam e destroem o antibiótico. São responsáveis por quebrar o anel β -Lactâmico das penicilinas, algumas cefalosporinas e o gene *tetX* codifica a enzima capaz de degradar tetraciclinas (BLAIR *et al.*, 2015).

Redução da permeabilidade de membrana:

Confere resistência às drogas que possuem alvos internos da célula bacteriana. Quando há presença da droga, há codificação de genes para alteração da permeabilidade da membrana, suprimindo ou trocando os poros presentes, alterando o tipo e/ou conformação de proteínas da membrana, interferindo na entrada de antibiótico na membrana celular. Enterobactérias são capazes de reduzir o número de poros, conferindo assim um adicional intrínseco de proteção após reconhecimento da droga (Cornaglia *et al.*, 1996; Willey *et al.*, 2013).

A redução de permeabilidade é comum em bactérias gram-negativas devido à presença do LPS, fornecendo proteção natural contra moléculas grandes de antibiótico. Os poros usualmente são permeáveis à substâncias hidrofílicas e sendo resistentes a compostos lipofílicos (Kumar *et al.*, 2005).

A produção de biofilmes também aumenta a seletividade da absorção de químicos pelos microrganismos. Por exemplo, a microbiota do intestino, que convive como um biofilme de múltiplas espécies, é relativamente resistente à ação de tóxicos produzidos por bactérias patogênicas e a alguns antibióticos (Reygaert *et al.*, 2018).

Bactérias alojadas em biofilmes também estão, em sua maioria, em estágio estacionário, com pouco crescimento e divisão celular, e os antibióticos que atuam na replicação se tornam inefetivos. Além disso, devido à proximidade dos organismos em um biofilme, fica facilitada a transferência horizontal de genes entre as bactérias (Van Acker *et al.*, 2014).

Modificação do sítio alvo:

Existem diversos componentes celulares que podem ser alvo de antibióticos, dentre os quais, os mais comuns são estruturas da parede celular, ribossomos, enzimas e atividades relacionadas ao DNA. Mudanças pontuais podem ser feitas (na estrutura ou função) pelo patógeno no sítio alvo da droga para reduzir ou incapacitar a atividade, sem que suas funções sejam comprometidas (Beceiro *et al.*, 2013).

Em sendo gram-negativo, *Salmonella* spp. são naturalmente resistentes a glico e lipopeptídeos (como vancomicina e daptomicina). Usualmente, drogas que possuem afinidade com a parede celular de bactérias possuem pouca ou nenhuma atividade em Gram negativos, sendo ainda intrínseca a capacidade de *Salmonella* spp. aumentarem a espessura ou inverter a polaridade do LPS (Bayard *et al.*, 2018; Herman *et al.*, 2010).

Para drogas que possuem afinidade à atividade de ribossomos (aminoglicosídeos, tetraciclinas e macrolídeos), as alterações são produzidas por genes transferidos. Estes mecanismos possuem grandes variações e estão relacionados à capacidade da droga ligar-se ao ribossomo (Reygaert, 2018).

Fluorquinolonas, que interferem com a síntese de ácidos nucleicos, são evitadas por mutações na produção da DNA girase, levando à incapacidade ou à redução da habilidade da droga se ligar a ela, porém permitindo o seu funcionamento no substrato (Redgrave *et al.*, 2014).

Drogas como Sulfonamida e Trimetoprim, que atuam nas vias metabólicas, a aquisição de resistência depende da modificação de enzimas como dihidroperoxo sintetase (que catalisa o ácido-paraminobenzóico – PABA) e a dihidrofolato redutase, que atuam no metabolismo do ácido fólico. O mecanismo de ação dessas drogas é por inibição competitiva ao se ligarem e indisponibilizarem a atividade da enzima. Entretanto, ao serem modificadas próximos ao sítio ativo, essas enzimas têm sua afinidade pelo PABA aumentada e logo, funcionando mesmo na presença de antibióticos (Ugboko *et al.*, 2014; Vedantam *et al.*, 1998).

Efluxo de antibiótico:

Bactérias possuem codificado no genoma genes para a produção ou ativação de bombas de efluxo para compostos químicos na membrana celular. A função primária das bombas de efluxo é eliminar toda e qualquer substância química que seja ou tenha potencial tóxico de dentro da célula, sendo algumas específicas e outras capazes de eliminar grande variedade de substâncias (bombas multidroga resistentes) (Blair *et al.*, 2014).

Bombas de efluxo estão amplamente distribuídas em gram-negativos, sendo a RND a mais relevante clinicamente. À exceção do RND, os demais são do tipo componente único de transporte, enquanto o RND é do tipo multicomponente. RDN é encontrado quase que somente em bactérias gram-negativas, sendo compostas de uma proteína peri plasmática-membrana (MFP) e outra proteína de membrana (OMP-porin), realizando o transporte por todo envelope celular (membrana e LPS). Em algumas situações, os demais sistemas podem atuar como multicomponente ao interagirem com outras proteínas de membrana em bactérias gram-negativas (Poole, 2007).

O grupo ABC é o único a usar energia proveniente da hidrólise do ATP. Possui função em duas vias (entrada e saída de componentes), sendo responsáveis pelo transporte de aminoácidos, íons, polissacarídeos, proteínas, açúcares e compostos químicos (Kumar *et al.*, 2005). Este grupo possui substrato específico, apresentando pouca relevância clínica (Lubelski *et al.*, 2007).

O grupo MATE usa Na^+ como fonte de energia, sendo eficientes na eliminação de fluorquinolonas e, mais recentemente, alguns aminoglicosídeos, além de íons diversos. Poucas bombas do grupo MATE foram caracterizadas, sendo que sua maioria estão em bactérias gram-negativas (Piddock, 2006).

O grupo SMR usa H^+ para efetuar o transporte. Este conjunto de bombas é hidrofóbico e elimina principalmente cátions lipofílicos, possuindo um espectro de atividade bem restrito. Genes desse sistema de transporte, além de codificados no DNA, estão presentes em plasmídeos e podem ser horizontalmente transferidos. Poucas bombas desse grupo foram identificadas eliminando medicamentos, sendo mais

comum a eliminação de tetraciclina, vancomicina e eritromicina (identificadas na *E. coli*) (Blair *et al.*, 2014).

O grupo Facilitador Principal (MFS) usa tanto H^+ quanto Na^+ para eliminar compostos tóxicos. Estão envolvidos no transporte de ânions, metabólitos (como sais biliares), açúcares e antibióticos. Como grupo, possui a maior gama de compatibilidade com substratos. Porém, individualmente são específicas para cada composto (a bomba que elimina sais biliares não irá eliminar medicamentos, apesar de serem do mesmo grupo) (Reygaert, 2018).

O RDN usa H^+ para efetuar a eliminação de compostos, sendo um grupo de bombas multicomplexas (chegando a mais de 14 estruturas transmembrana). São um grupo encontrado em abundância nas bactérias gram-negativas, sendo capazes de transportar componentes do meio intracelular até o meio externo à camada de LPS (Martinez *et al.*, 2009).

Estão envolvidos no transporte de antibióticos (tipo multidroga, eliminando diversos complexos de antimicrobiano em cada bomba), detergentes (como sais biliares), corantes, solventes entre outros complexos químicos. Mesmo as bombas mais seletivas, possuem capacidade de eliminar diversos antibióticos dentro do mesmo grupo farmacológico (tetraciclina e macrolídeos), enquanto que outras, eliminam uma grande variedade como β -lactâmicos, Cloranfenicol, Tetraciclina, Trimetoprim, Sulfonamida e fluorquinolonas (Poole, 2007).

As bombas do grupo RND compartilham parte de seus componentes entre si, alterando mais comumente a porção mais interna, mudando o tipo de componente captado (Blair *et al.*, 2014).

A bomba do grupo RND mais estudada é a AcrAB-TolC, que confere resistência à Penicilinas, Macrolídeos, Fluorquinolonas e Tetraciclina. O conjunto AcrAB-TolC aumenta em quantidade na presença do composto tóxico, sendo a proteína AcrB (interna) capaz de se ligar e transportar componentes de tamanho e composição muito diferentes entre si (Bayard *et al.*, 2018; Poole, 2007).

Situação da resistência antimicrobiana de Salmonella spp.:

A emergência da resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. é uma preocupação não somente para a produção animal, mas também para a saúde humana, uma vez que a transmissão horizontal de genes, capazes de codificar estruturas e mecanismos de resistência, ocorre com muita frequência.

O primeiro relato confirmado de resistência ao Cloranfenicol, descoberto em 1948 e determinado como primeira escolha para tratamento de febre tifoide e outras formas de Salmonelose, foi no início dos anos 1960, seguindo-se um surto em larga escala na América Central. Porém, em 1950 já havia suspeitas de resistência à cloranfenicol na Inglaterra devido ao uso indiscriminado do antibiótico naquela época (Eng *et al.*, 2015; Ugboko *et al.*, 2014).

Após, Cotrimexazol continuou efetivo como droga alternativa até 1975, quando foram relatados os primeiros focos de resistência na França. Esta droga foi então substituída pela Ampicilina, que foi utilizada até início dos anos 80, quando surgiram as primeiras estirpes consideradas multirresistentes.

Tais estirpes eram resistentes às três drogas da primeira linha de escolha, em simultâneo (Cloranfenicol, Cotrimexazol e Ampicilina). Em se tratando de uma classe de plasmídeos comuns às enterobactérias como *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp., que pode ser a fonte de manutenção e disseminação de genes de resistência (Mandal *et al.*, 2012; Stecher *et al.*, 2012; Zaki *et al.*, 2011).

A ausência de drogas seguras e eficientes no final da década de 80, principalmente para crianças, para tratamento da Salmonelose, médicos começaram a utilizar Ciprofloxacino, apesar dos riscos de segurança, pela falta de opção. Então, estudos subsequentes mostraram que a droga era eficiente para salmonelose e segura para uso em pacientes pediátricos. Devido a alta eficácia, as Fluorquinolonas se tornaram então referência para tratamento de salmonela multirresistente (Ugboko *et al.*, 2014).

Em 1992 houve o primeiro relato de resistência a quinolonas, reportado no Reino Unido e seguido de relatos em diversos outros países ao redor do mundo. Com o surgimento, nessa época, das cefalosporinas de terceira geração, elas foram adotadas para o tratamento das salmonelas resistentes à quinolonas, mas em pouco tempo já foram reportados os primeiros episódios de resistência na África do Sul em 92 e em outros países a partir dos anos 2000 (Kumar *et al.*, 2007).

Dados de 2005 a 2006 apresentados pelo NARMS (*National Antimicrobial Resistance Monitoring System*) revelam que 84% dos isolados clínicos de salmonela não tifoide (NTS) são fenotipicamente multirresistentes e 4,1% são apenas marginalmente sensíveis a Cefalosporinas nos Estados Unidos. Dados da mesma entidade de 1996-2007 também comprovam a evolução para um estado de resistente das *Salmonella* spp. para Ceftriaxona e Ácido Nalidíxico. Outro estudo realizado na Europa entre 2000 e 2004 mostrou que 15% das amostras eram multirresistentes e 20% apresentaram resistência ao Ácido Nalidíxico (Eng *et al.*, 2015; Meakins *et al.*, 2008).

CAPÍTULO 2

SALMONELOSE EM REBANHO LEITEIRO BOVINO CONFINADO: Caracterização dos isolados, aspectos clínicos, epidemiológicos e resistência antimicrobiana

INTRODUÇÃO

As salmoneloses em bovinos ocorrem no mundo todo. A subespécie *enterica* possui potencial zoonótico, e em 2015, 70% das infecções em humanos na Europa foram causadas por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Há relatos de quadros graves envolvendo *S. Dublin*. Em bovinos, *Dublin* e *Typhimurium* representam 70% dos relatos. E apesar da sorotipo *Dublin* ser adaptado ao bovino, possui potencial zoonótico (Ågren, 2017; Izzo *et al.*, 2011; Nielsen, 2003)

Em animais jovens, *S. Typhimurium* causa diarreia em intensidade variável, enquanto *S. Dublin* é bem relatada como causa de doença septicêmica além de manifestações entéricas. (Blau *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2012). Bezerros entre 14 dias e 3 meses de idade são mais susceptíveis a se infectarem, sendo os sinais de salmonelose a diarreia com fibrina, presença de sangue nas fezes, prostração e evoluindo para sinais sistêmicos, com mortes ocorrendo em até 48 após infecção em quadros hiperagudos (Barrington *et al.*, 2001; Muktar *et al.*, 2015).

S. Dublin pode causar doença septicêmica em animais adultos, apesar de menos frequente, onde usualmente são observados quadros de diarreia e aborto, e comumente a ausência completa de sinais clínicos (Nielsen, 2013). Em condições precárias de higiene, *S. Dublin* pode causar doença em mais de 80% dos bezerros e a mortalidade pode ultrapassar 50% (Ågren, 2017; Nielsen, 2003).

Entretanto não é relatado a distribuição da *Salmonella* spp. dentro de um rebanho para a identificação de focos de disseminação e manutenção do agente, bem como onde ocorrem as transmissões. É descrito que animais jovens possuem maior recuperação de amostras positivas em rebanhos portadores comparado a animais adultos e Nielsen *et al.* (2004) observaram que os surtos tendem a ser mais comuns no outono, e a maior frequência de eliminação ocorre no inverno, mas não confirma os motivos. Considerando-se características climáticas, na região centro-oeste do Brasil as características de verão e inverno são bem diferentes daquelas observadas no trabalho de Nielsen *et al.* (2004), com inverno seco e temperaturas amenas, enquanto o outono é quente e ainda com presença esporádica de precipitações.

Assim busca-se entender como a *Salmonella* spp. se distribui ao longo de um rebanho portador em diferentes categorias, podendo então determinar as atitudes de risco a serem evitadas e implementar práticas de controle adequadas a biosseguridade do rebanho, diminuindo a taxa de infecção e consequentemente a incidência da doença clínica nos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e população de estudo:

O experimento foi conduzido em uma fazenda comercial localizada na região centro-oeste do Brasil. A fazenda possuía atividade leiteira e produzia aproximadamente 29.000 litros de leite por dia em sistema intensivo, com lotação total de 2.390 animais. A atividade na pecuária leiteira iniciou em 2009 e em 10 anos atingiu a marca de 29.000 litros diários devido à grande compra de animais nos anos que se seguiram a sua instalação. A fazenda possuía um histórico de surto de salmonelose, que ocorreu em 2017 após as últimas aquisições, quando então, o rebanho se tornou fechado, produzindo os próprios animais de reposição e expansão (RAMOS *et al.*, 2018).

O rebanho era composto de animais da raça Holandês, contando com 890 vacas em lactação. As vacas eram mantidas em sistema de confinamento do tipo *free stall* (Figura 1) com lotação entre 0,9 e 1,0 animal por cama (90 a 100%) e recebiam dieta do tipo TMR (*total mix ration*). As vacas eram ordenhadas três vezes ao dia.



Figura 1: Instalações do tipo *free stall* adotadas na propriedade para animais na fase produtiva.

A higienização dos *free stall* era realizada com o auxílio de um sistema de *flush* associado a raspagem mecânica com um trator (figura 2), realizado três vezes ao dia, quando os animais eram retirados do galpão para a ordenha. As camas eram de areia e a fazenda possuía sistema de reaproveitamento da areia. As camas eram repostas conforme a necessidade e, semanalmente, cal era adicionada para que permanecessem secas.

O grupo de vacas secas era composto de 174 animais em *free stall* com lotação de 1,2 animal por cama (120%). A dieta era composta por TMR com adição de *Cynodon* spp. picado *in natura*.



Figura 2: Higienização das instalações do tipo *free stall* e camas de areia repostas com adição de cal.

O pré-parto era dividido entre novilhas de primeira cria (primíparas) e vacas com mais de uma cria (múltiparas), sendo que os animais eram alocados num galpão exclusivo para animais no pré e pós-parto e fase seca da lactação (figura 3A). O pré-parto era composto de um lote de 28 primíparas e outro de 34 múltiparas, e a lotação era de até 0,7 animal por cama (70%). Os animais eram movidos para o pré-parto uma vez por semana quando estavam há 27 $\pm$ 3 dias da data prevista do parto. No momento do parto os animais eram movidos para uma baia de parição, individual, com cama de palha de *Cynodon* spp., que era substituída semanalmente, possuindo um total de 4 baias de parição (figura 3B). Não havia critérios para a escolha de qual animal seria alocado em qual baia. Após o parto, os bezerros eram separados, pesados e colostrados com colostro congelado, possuindo concentração igual ou maior que 22% de grau brix ou substituto de colostro na ausência de colostro, fornecendo 10% do peso ao nascimento por mamadeira ou sonda esofágica.



Figura 3: Unidade de vacas secas, pré-parto e pós-parto (*free stall*). A) Camas de areia e pista convencional para vacas em pré-parto. B) Baia de parições com cama de palha.

Após o parto os animais eram movidos para outros lotes no mesmo galpão, denominados de pós-parto, um composto de primíparas e outro para múltiparas, até 15 dias pós-parto, com lotação de 22 e 33 animais, respectivamente, com uma taxa de lotação de até 0,9 animais por cama (90%).

O bezerreiro era composto de gaiolas suspensas (Figura 4B). O piso de metade das gaiolas era de material vazado de poliuretano e a outra metade das gaiolas utilizava piso de madeira com frestas de 1,5 cm. Eram revestidas com cama de palha de milho, substituída a cada três dias. As gaiolas possuíam dimensões de 1 m de largura por 1,5 m de comprimento. A capacidade era para 264 bezerros e, no período do experimento, 173 bezerros encontravam-se alojados. O galpão possuía pé direito com 3,5 m de altura e telhado com lanternim para ventilação. As laterais eram cercadas com tela de malha 5 cm e com mureta de 50 cm. O galpão era construído no sentido norte sul, o que permitia a entrada de sol na instalação (figura 4A). Os bezerros eram alimentados com seis litros de leite de descarte (tratados por pasteurização lenta) até os 30 dias de idade divididos em dois fornecimentos. Após este período, era utilizado leite de descarte e complementados com sucedâneo (Kalvolac Quick®), reconstituído conforme recomendação do fabricante e adicionado ao leite de descarte em volume suficiente para completar a demanda, divididos em duas refeições. Havia fornecimento de concentrado de baixa granulometria e água *ad libitum*, disponíveis desde o primeiro dia de vida. A higienização das instalações era realizada com substituição completa da cama a cada três dias e uma vez ao dia era realizado limpeza com o sistema de *flush* na canaleta de dejetos localizada abaixo das gaiolas. Quando os bezerros eram desaleitados, limpeza com mangueira de alta pressão e solução desinfetante de hipoclorito 5% era realizada em cada gaiola.



Figura 4: Instalações de bezerreiro em gaiolas individuais suspensas. A) Instalação geral com galpão de laterais abertas. B) Gaiola individual para bezerro de piso ripado.

A recria era realizada em sistema de piquetes coletivos de tamanho variado e não rotacionados (figura 5A), com a dieta sendo fornecida no cocho (figura 5B). Os animais entre 90 e 200 dias de idade permaneciam alojados em piquetes que variavam de 10 a 20 bezerros, conforme a área, em instalação adjacente ao bezerreiro em ponto superior da propriedade, compondo um total de 118 animais. Animais entre 200 dias até o pré-parto eram alojados em área oposta da propriedade, em relevo de nível inferior, em piquetes de até 50 animais, alojando um total de 700 animais.



Figura 5: Área de piquetes coletivos com sombrite 80% para a recria de 90 a 200 dias. A) Visualização dos piquetes coletivos com bezerreiro ao fundo. B) Área para manejo e alimentação presente em cada piquete.

A fazenda apresentava alto índice de infestação por carrapatos na fase de recria, culminando em alta incidência de tristeza parasitária bovina (TPB), causada por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. Assim, para diferenciar manifestações clínicas suspeitas de infecção por *Salmonella* spp. daquelas causadas pela TPB, a fazenda adotou o diagnóstico de TPB através de microscopia ótica com avaliação da riquetsemia e parasitemia em esfregaços sanguíneos para melhor direcionamento dos tratamentos.

Cálculo amostral:

Os animais utilizados foram aqueles que estavam presentes na propriedade no momento do estudo. Os animais foram divididos em grupos conforme a categoria e probabilidade de risco de cada uma delas. Divididos da seguinte forma: *bezerreiro* (0 a 90 dias), *recria menor* (91 a 150 dias), *lactação* (primíparas e multíparas), *pré-parto* (primíparas e multíparas) e *pós-parto* (primíparas e multíparas).

Não foram objeto de estudo os animais pertencentes à recria maior (150 dias até o período pré-parto) e nem aqueles pertencentes ao grupo de vacas secas devido a impossibilidade de manejo na propriedade durante o experimento.

Animais que vieram a óbito, independente da causa ou condição clínica, durante o período experimental foram necropsiados por integrantes da equipe de pesquisa. Material desses animais foi coletado para análise laboratorial e pesquisa de *Salmonella* spp. em fluidos e tecidos.

Para a seleção do número de animais em cada grupo, buscou-se definir o menor número de amostra para manter a confiabilidade dos testes aplicados, mesmo com prevalências baixas. Para isso, utilizou-se a distribuição hipergeométrica para a estimativa e calculou-se o número amostral a fim de obter um erro tipo 1 máximo de 5% (correspondendo a uma confiabilidade de 95%) para detectar ao menos um animal infectado em cada grupo.

As análises foram realizadas através do Software R versão 3.5.1 (Team, 2018). Como o programa utiliza teste padrão ouro para determinar o tamanho da amostra, e o experimento não usou teste ouro, o resultado foi corrigido através da fórmula:

$$Prev. Real = \frac{Prev. Aparente + Especif. - 1}{Sensib. + Especif. - 1}$$

Obteve-se então os seguintes resultados:

Tabela 1: Animais adultos a serem coletados.

	Primípara			Multípara		
	Pré-parto	Pós-parto	Lactação	Pré-parto	Pós-parto	Lactação
Lotação	22**	24**	368	45**	30**	522
Prevalência	0-0,5%	0-0,5%	0-0,5%	0-0,5%	0-0,5%	0-0,5%
Literatura						
Ponto	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%
Médio						
Literatura						
Nº Min.	1	1	4	1	1	6
Animais						
Infectados						
Prevalência	4,5%	4,2%	1,1%	2,2%	3,3%	1,1%
Estimável						
Tamanho	21*	23*	193	43*	29*	204
Amostrai						
Erro tipo 1	4,5%	4,2%	5,0%	4,4%	3,3%	5,0%
Erro tipo 2	0,0%	0,0%	34,9%	0,0%	0,0%	16,5%

*Tamanho amostral próximo ao tamanho da população, optando-se pela coleta de toda a população. **Cálculo realizado com dados fornecidos pela fazenda no início do trabalho, porém houve diferença no número de animais presentes nos dias de realização das coletas.

Tabela 2: Animais de cria e recria a serem coletados.

	Cria		Recria
	0-28 Dias	29-90 Dias	91-150 Dias
Lotação	74**	89**	113**
Prevalência Literatura	1,1-5,4%	0,9-2,3%	0,9-2,3%
Ponto Médio Literatura	3,3%	1,6%	1,6%
Nº Min. Animais Infectados	3	2	2
Prevalência Estimável	8,3%	2,2%	2,0%
Tamanho Amostral	74	85*	108*
Erro tipo 1	0,0%	4,4%	4,8%

Erro tipo 2	0,0%	0,0%	0,0%
--------------------	------	------	------

*Tamanho amostral próximo ao tamanho da população, optando-se pela coleta de toda a população. **Cálculo realizado com dados fornecidos pela fazenda no início do trabalho, porém houve diferença no número de animais presentes nos dias de realização das coletas.

Com os ajustes realizados e a real presença de animais nos dias de coleta de cada grupo, obteve-se os valores da tabela 3 para lotação e número de animais coletados.

Tabela 3: Lotação na propriedade dos grupos de animais e número de animais a terem fezes coletadas.

	Lotação	Animais Coletados
Bezerreiro (0-90 dias)	168	168
Recria (91-150 dias)	72	72
Recria (H)	28	28
Pré-parto (P)	28	28
Pré-parto (M)	34	34
Pós-parto (P)	22	22
Pós-parto (M)	31	31
Lactação (P)	368	194
Lactação (M)	522	205
Total	1273	782

Coleta e processamento a campo de amostras:

Foram realizadas coletas de fezes dos animais sorteados em cada grupo através da introdução de *swab* seco estéril no reto após higienização do períneo com papel toalha, quando necessário. O *swab* era atritado contra a mucosa do reto e então acondicionado em frasco rosqueado contendo 6 mL de meio caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck®) estéril e armazenado em recipiente isotérmico entre 2 e 8°C. Foram coletadas três amostras de cada animal com intervalo de 48 horas entre as coletas, sendo que cada grupo de três amostras compôs uma unidade amostral.

Para isolamento de *Salmonella* spp. foi utilizada a técnica descrita por Ramos *et al.* (2019), uma vez que utilizando os meios caldo Rapapport-Vassiliadis e Ágar Hektoen Entérico era possível fazer a triagem das amostras na propriedade utilizando-se estrutura semelhante a de cultura em *on farm* para diagnóstico de agentes causadores de mastite.

As amostras acondicionadas em caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck®) foram encaminhadas para laboratório montado na fazenda em até 8h após o início da coleta e então incubadas em aerobiose em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas (figura 6D).

Posteriormente, essas amostras eram semeadas em placas de petri (90x15mm) descartáveis contendo meio Ágar Hektoen Entérico (Acumedia®) com o auxílio de alças descartáveis calibradas em

10 μ L, com uma amostra por placa (figura 6C). Essas placas eram então incubadas em aerobiose em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas (figura 6D).

Após o crescimento, colônias isoladas que apresentaram crescimento com características sulfitorredutoras (colônias escuras com bordas transparentes e lisas (figura 6A e 6B)) eram coletadas, com o uso de alça de platina (10 μ L) previamente flambadas, e acondicionadas em criotubo com rosca de 2 mL contendo 0,75 mL de meio caldo BHI (Acumedia®) (infusão de cérebro e coração bovino) e 0,75 mL de solução de glicerol como crioprotetor. Essas amostras eram identificadas e acondicionadas em *freezer* convencional a -20°C para posterior análise no laboratório de anaeróbios da UFMG.

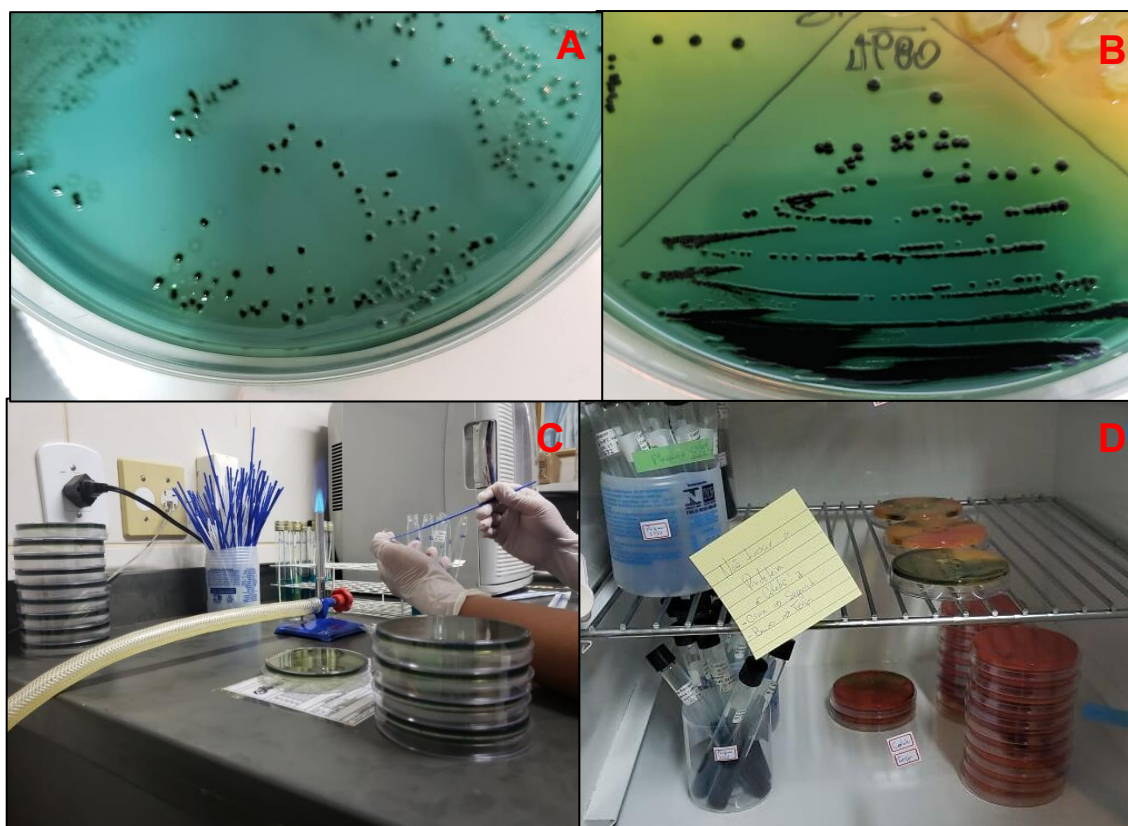


Figura 6: Laboratório para pré-isolamento utilizado na propriedade. A e B) Colônias isoladas com características sulfitorredutoras (escuras). C) Semeadura em placas contendo ágar entérico hektoen. D) Estufa bacteriológica de aerobiose com placas de ágar hektoen e tubos com caldo Rappaport-vassiladis.

Os animais que vieram a óbito durante o período experimental foram necropsiados e foram coletadas as seguintes amostras:

- a. *Conteúdo intestinal:* Realizado abertura com bisturi estéril na região distal do jejuno e introduzido *swab* seco estéril, atritando-se contra a mucosa intestinal e posteriormente sendo acondicionado em meio caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck®). Quando da presença de lesão na área externa do intestino ou alteração macroscópica nas estruturas das placas de Peyer, o conteúdo intestinal era coletado nessa região;

- b. *Conteúdo de vesícula biliar*: Realizada abertura por punção com bisturi estéril na base da vesícula biliar e introduzido *swab* seco estéril, atritando-se contra a mucosa da vesícula e posteriormente sendo acondicionado em meio caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck®);
- c. *Líquidos cavitários*: Sempre que era observada a presença anormal de líquidos cavitários (ascite e hidrotórax), foram coletadas amostras com a imersão de *swab* seco estéril e posterior acondicionamento em meio caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck®);
- d. *Pulmão*: Abertura da borda distal do lobo caudal com o uso de bisturi estéril e perfuração do parênquima pulmonar com a introdução de *swab* seco estéril e posterior acondicionamento em meio caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck®);
- e. *Linfonodos*: Abertura longitudinal de linfonodos mesentéricos e fricção de *swab* seco estéril na superfície de corte e posterior acondicionamento em meio caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck®).

Todas as amostras coletadas durante as necropsias foram processadas da mesma forma e critérios utilizados para as amostras de fezes.

Isolamento e caracterização de *Salmonella* spp.

Recuperação de amostras e PCR específico para identificação de gênero:

Os isolados armazenados em caldo BHI com glicerol foram encaminhadas ao final do período de coleta para o Laboratório de Anaeróbios da EV/UFGM, e foram processadas seguindo protocolos descritos por Ramos *et al.* (2019).

Os isolados foram recultivadas em placas de petri descartáveis (90x15mm) contendo meio ágar BHI (Kasvi®) incubando-se em estufa bacteriológica a 37°C por 24h em aerobiose, selecionando-se as placas que continham crescimento de colônias isoladas e bem demarcadas, e descartando-se aquelas com crescimento de colônias difusas sugestivas de *Proteus* spp. para a seleção de amostras submetidas à reação de PCR específico para gênero *Salmonella* (Ramos *et al.*, 2018).

Entre as placas contendo colônias isoladas, foram coletadas de três a cinco colônias com o uso de alça estéril descartável calibradas em 10µL e acondicionadas em microtubo de congelamento tipo eppendorf® contendo 400µL de água ultra-pura, sendo posteriormente colocadas em um ciclo de 20 min a 98°C em termobloco para extração térmica de DNA. Após extração, os microtubos foram centrifugados a 6.000 rpm por 10 min, separando-se o sobrenadante em novo microtubo e acondicionado em refrigerador entre 2 e 8°C até realização da reação de PCR.

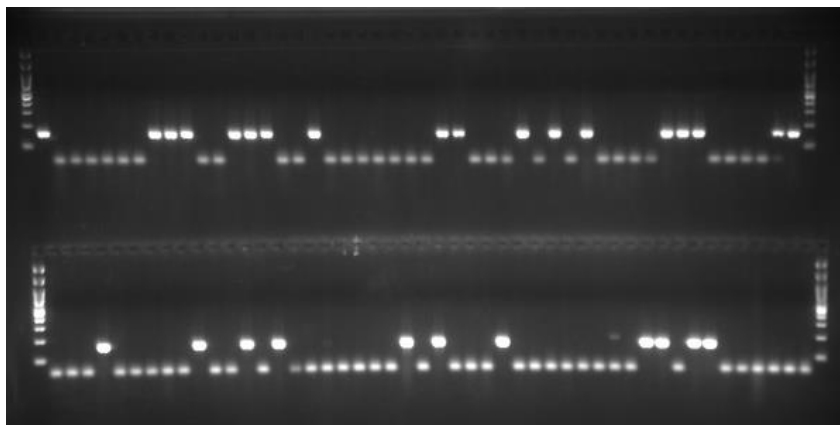


Figura 7: Resultado de reação de PCR para gênero *Salmonella*.

Para realização da PCR convencional para identificação do gênero *Salmonella* nos isolados (Figura 7) utilizou-se a estirpe de referência ATCC 14028 conforme descrito por Ramos *et al.* (2019).

Sorotipagem de isolados positivos para Salmonella spp.:

A diferenciação em espécie e subespécie dos isolados (sorotipagem) das amostras positivas na reação de PCR para *Salmonella* spp. foram encaminhadas para o Laboratório Nacional de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (LABENT – FIOCRUZ), vinculado ao Ministério da Saúde.

A sorotipagem foi realizada através de caracterização antigênica pelo esquema de *White-Kauffmann-Le Minor*, sendo realizada a aglutinação em lâmina com antisoros poli e monovalente somático (O), Flagelar (H), e eventualmente Capsular (Vi) (Ramos *et al.*, 2019; Steve Yan *et al.*, 2003).

A identificação das sorovariedades foi realizada conforme descrito por Grimont e Weill (2007).

Técnica ERIC PCR para isolados positivos de Salmonella spp.:

A técnica de ERIC-PCR foi empregada para avaliar a similaridade gênica dos isolados e aplicada conforme Ramos *et al.* (2018) utilizou em estudo prévio na mesma propriedade. Os isolados foram marcados usando os primers ERIC-1 e ERIC-2. Os produtos da amplificação foram utilizados para realização de eletroforese em gel de agarose e posteriormente analisados utilizando o software Bionumerics versão 7.6 (*Applied Maths, Belgium*).

A análise dos agrupamentos foi baseada no coeficiente de similaridade de Dice e pelo método de grupo de pares não ponderados com algoritmos de média aritmética conforme descrito por (Ramos *et al.*, 2018).

Antibiograma de isolados positivos para Salmonella spp.:

O padrão de resistência antimicrobiana foi avaliado pela formação do halo de inibição pelo método de discos de difusão conforme descrito pelo manual VET 01-A4 e VET01-S2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2013) (Ramos *et al.*, 2018).

Os isolados foram incubados em placas petri (90x15mm) contendo meio ágar BHI (Kasvi®) em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Após o crescimento, duas a cinco colônias isoladas de *Salmonella* spp. foram coletadas com alça descartável e diluídas em tubo contendo salina estéril até obter um grau de turbidez similar a 0,5 na escala de McFarland para cada isolado.

A suspensão foi inoculada uniformemente em placas de petri (90x15 mm) contendo meio ágar Mueller-Hinton (Kasvi®) utilizando-se um *swab* estéril e estriando-se quatro vezes por toda a placa, mudando-se o local de início para garantir a uniformidade de distribuição, sendo produzidas duas placas por isolado. Após foi aplicado os discos contendo as bases de antibiótico testas que foram Enrofloxacina (05µg), Ciprofloxacina (05µg), Cefalotina (30µg), Ceftriaxona (30µg), Ceftiofur (30µg), Florfenicol (30µg), Gentamicina (10µg), Amicacina (30µg), Amoxicilina com Clavulanato (30µg), Ampicilina (10µg), Tetraciclina (30µg) e Sulfazotrin (25µg). Os discos tiveram distribuição equidistante com 6 discos por placa.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica em aerobiose a 37°C por 24 horas e posteriormente foi aferido o halo de inibição conforme orientado pelos manuais VET01-A4 e VET01-S2 (Ramos *et al.*, 2019).

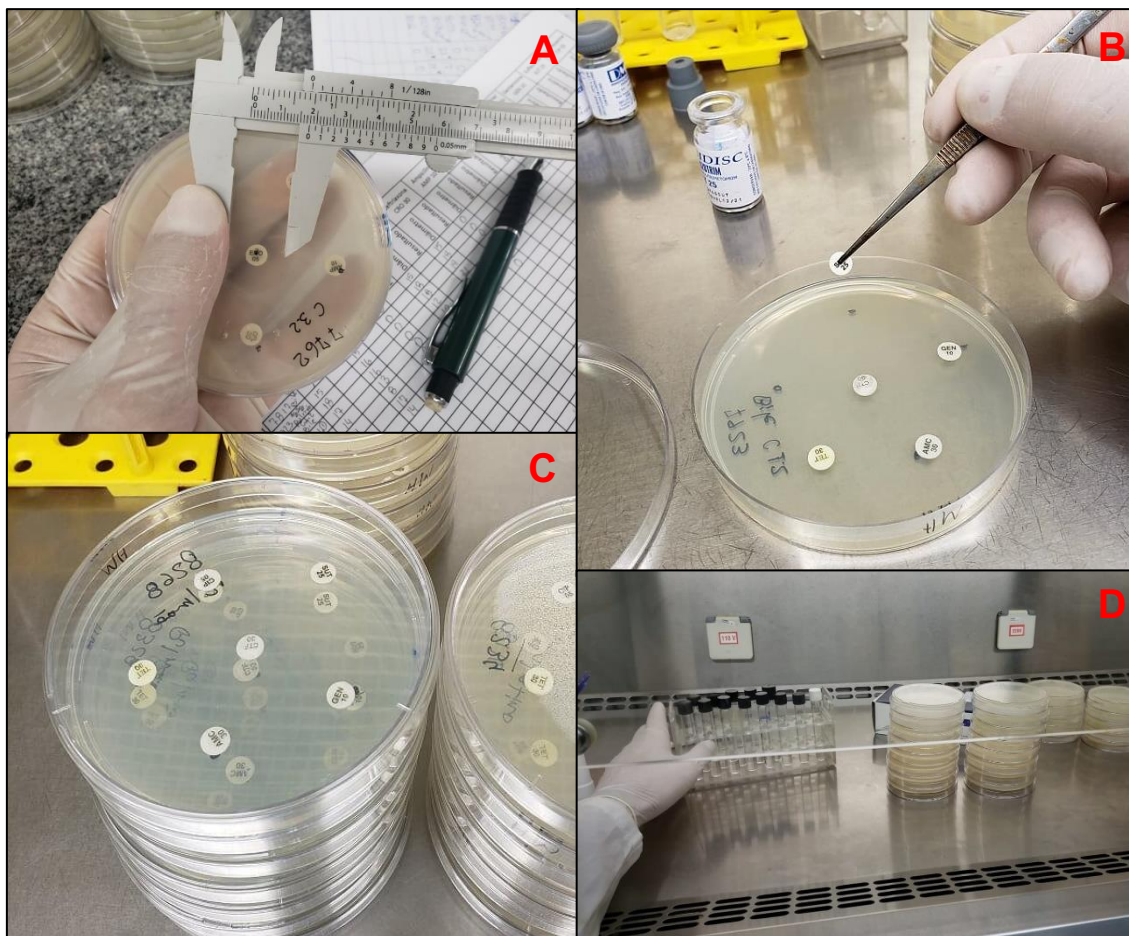


Figura 8: Antibiógrama através de discos de difusão. A) Medição do halo de inibição. B) Distribuição dos discos de antimicrobianos. C) Discos distribuídos com seis discos por placa. D) diluição de colônias conforme escala de McFarland.

Análise estatística

Para testar as diferenças de prevalências entre grupos, foram ajustados modelos lineares generalizados com a distribuição binomial (regressão logística), que são modelos adequados a respostas dicotômicas (positivo ou negativo). O ajuste do modelo logístico clássico impediu que algumas comparações fossem realizadas, porque alguns grupos tiveram prevalências observadas iguais a zero ou 100% (problema da separação completa). Devido a este impedimento, aplicou-se um método inferencial bayesiano conforme descrito por Gelman et al. (2008). Após o ajuste do modelo, avaliou-se o valor *p* de forma global (*overall*) e calcularam-se os valores médios e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo. Para verificar a significância da diferença entre grupos, foi necessária a aplicação de testes de comparações múltiplas (*pairwise*). Para estes testes aplicou-se a correção de Tukey.

Para avaliação de associação entre duas variáveis categóricas, construíram-se tabelas de contingência e avaliou-se a significância da associação através de um teste de qui-quadrado, ou teste exato de Fisher (para valores de frequências esperadas menores que cinco).

Para avaliar as diferenças no número médio de tratamentos, ajustou-se um modelo linear generalizado clássico com a distribuição de Poisson, que é adequada a dados de contagem.

Para avaliar a relação entre a frequência de uso do antibiótico e o seu padrão de resistência, foi calculado o índice de correlação não paramétrico de Spearman.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (Team, 2018).

RESULTADOS

Foram coletados um total de 782 animais na propriedade, realizando três coletas em cada animal com intervalo de 48h, totalizando 2.346 amostras coletadas (Tabela 4). Também foram realizadas 28 necropsias. Desse total de 782 animais, 36 apresentaram isolados de *Salmonella* spp. em ao menos uma coleta, e 20 das 28 necropsias apresentaram isolados em pelo menos um tecido coletado. Esses resultados são apresentados na tabela 4.

Isolamento e análise molecular de amostras:

Foram observadas as frequências de isolamento do gênero *Salmonella* por categoria: Bezerreiro 1,2% (2/168); Recria 4,1% (3/72); Pré-parto múltipara 2,9% (1/34); Pós-parto múltipara 19,4% (6/31); Lactação primípara 3,6% (7/194); Lactação múltipara 3,4% (7/205). A tabela 4 mostra a frequência de animais positivos para gênero *Salmonella* e presença de colônias suspeitas no meio ágar Hektoen (HK) separados em cada momento de coleta.

Tabela 4: Frequência de positividade nas amostras coletadas durante a triagem e confirmação dos isolados.

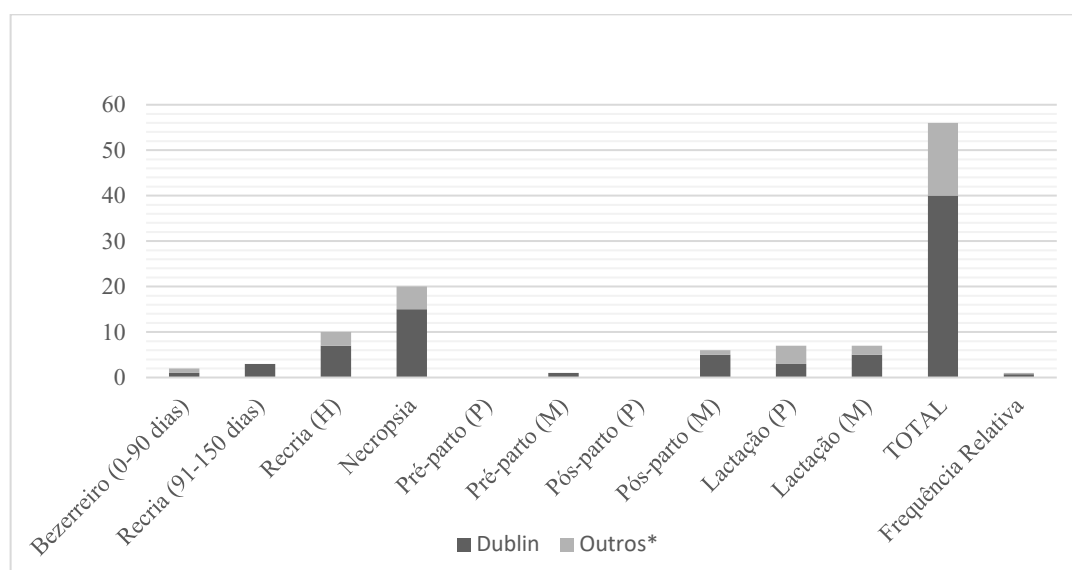
Categoria	Momento	Amostragem	Suspeito	Confirmados	Frequência
			Hektoen	PCR	Positivos
Bezerreiro (0-90 dias)	0 h	168	5	0	0%
	48 h		9	2	1,2%
	96 h		5	0	0%
	Total	504	19	2	1,2%
Recria (91-150 dias)	0 h	72	4	1	1,4%
	48 h		3	2	2,8%
	96 h		2	0	0%
	Total	216	9	3	4,1%
Recria (H***) (91-150 dias)	0 h	28	3	3	10,7%
	48 h		8	8	28,5%
	96 h		10	9	32,1%
	Total	84	10	10	35,7%
Pré-parto (P**)	0 h	28	0	0	0%
	48 h		1	0	0%
	96 h		0	0	0%
	Total	84	1	0	0%
Pré-parto (M*)	0 h	34	3	1	2,9%
	48 h		4	0	0%
	96 h		0	0	0%
	Total	102	7	1	2,9%
Pós-parto (P**)	0 h	22	1	0	0%
	48 h		1	0	0%
	96 h		1	0	0%
	Total	66	3	0	0%
Pós-parto (M*)	0 h	31	2	0	0%
	48 h		7	4	12,9%
	96 h		4	2	6,5%
	Total	93	13	6	19,4%
Lactação (P**)	0 h	194	17	1	0,5%
	48 h		10	6	3,1%
	96 h		0	0	0%
	Total	582	27	7	3,6%
Lactação (M*)	0 h	205	19	0	0%
	48 h		18	3	1,4%
	96 h		10	4	2%

	Total	615	47	7	3,4%
Total	Animais	782	136	36	4,6%
	Amostras	2346	136	56	1,5%

*Múltipara. **Primípara. ***Hospital.

Foram identificados 14 sorotipos dentre os 56 isolados de *Salmonella* spp., sendo eles: *S. Dublin*; *S. Enterica*; *S. Enteritidis*; *S. Infantis*; *S. Mbandaka*; *S. Minnesota*; *S. Newport*; *S. Panama*; *S. Saintpaul*; *S. Senftenberg*; e três isolados não identificados no laboratório. O gráfico 1 apresenta a distribuição dos isolados de *S. Dublin* e outros isolados entre as categorias animais estudadas.

Gráfico 1: Distribuição de sorotipos de *Salmonella* spp. entre as categorias animais.



*Outros sorotipos correspondem a: (O:6, 7); (O: 4,5); (Rugosa); *S. Enterica*; *S. Enteritidis*; *S. Infantis*; *S. Mbandaka*; *S. Minnesota*; *S. Newport*; *S. Panama*; *S. Saintpaul*; *S. Senftenberg*.

Foram identificados oito clados com similaridade gênica de 99,8%. Um desses clados, denominado Clado A continha 42 isolados, e os demais foram agrupados como Outros Clados devido à baixa frequência de isolados em cada um. A tabela 5 compila esses dois grupos e a figura 9 mostra a distribuição de cada isolado com o grau de similaridade e os respectivos sorotipos.

Tabela 5: Similaridade gênica das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas das diversas categorias animais realizada pela técnica de ERIC-PCR.

	Clado A	Outros Clados
Bezerreiro (0-90 dias)	0	2
Recria (91-150 dias)	3	1
Recria (H)	7	2
Necropsia	19	3

Pré-parto (P)	0	0
Pré-parto (M)	1	0
Pós-parto (P)	0	0
Pós-parto (M)	5	1
Lactação (P)	3	4
Lactação (M)	4	3
TOTAL	42	16
Frequência Relativa	72%	28%

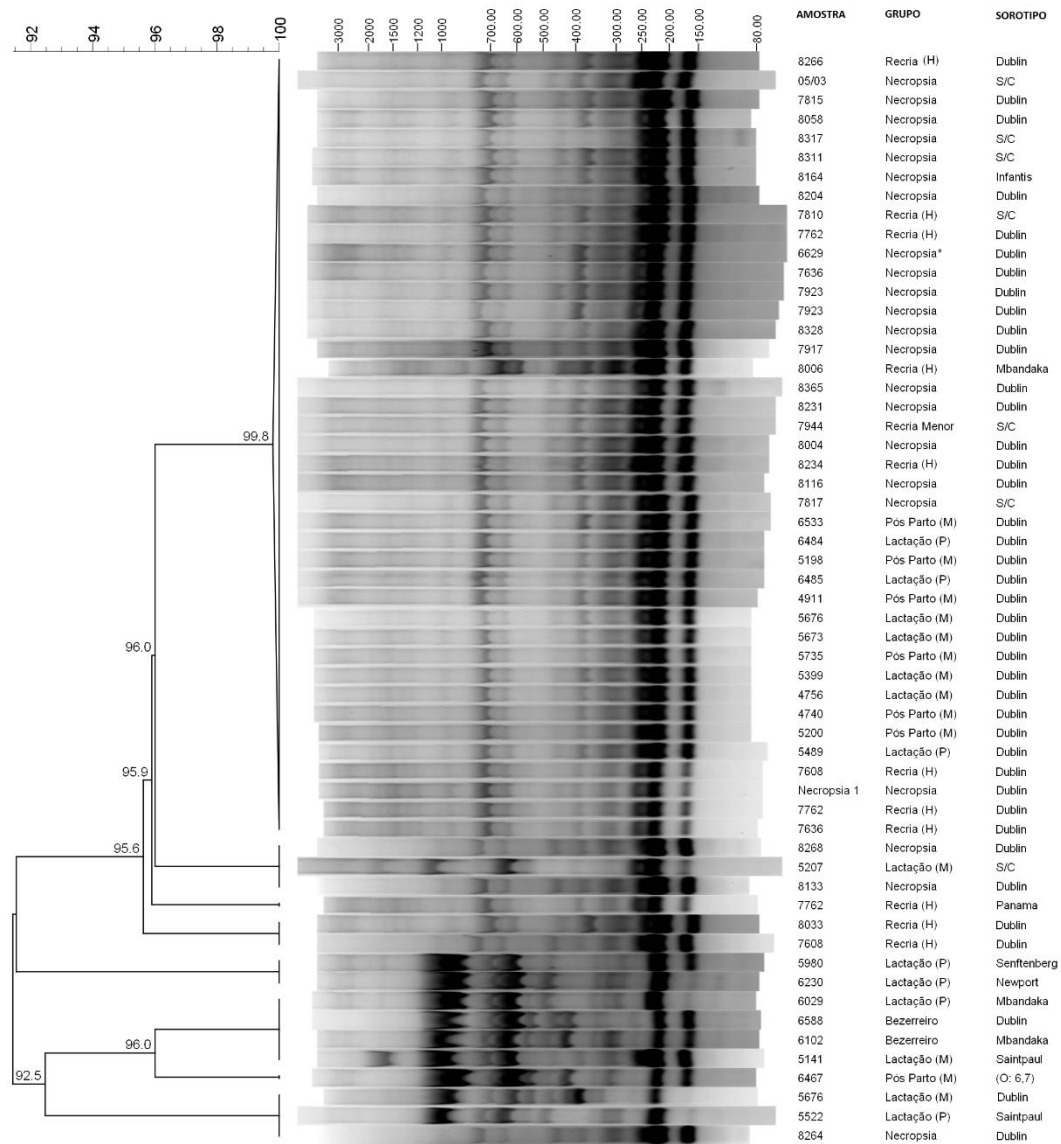
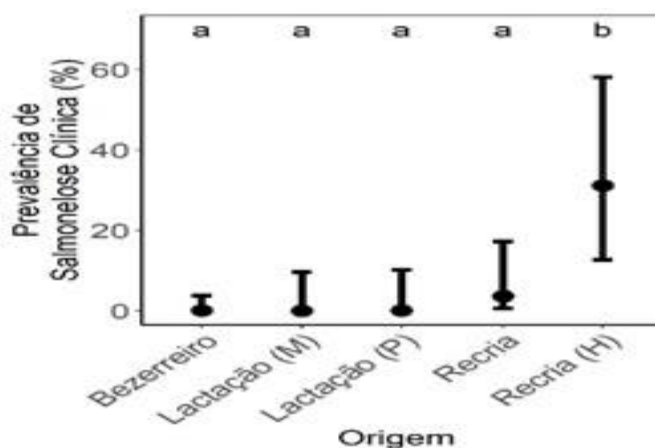


Figura 9: Dendrograma de similaridade entre os isolados de *Salmonella* spp. e distribuição de sorotipos

Avaliação clínica:

Foi avaliado a frequência de animais apresentando quadro clínico compatível com salmonelose, e foi observado que o grupo Recria (H) apresentou uma prevalência superior quando comparado com Lactação, Bezerreiro e Recria, onde ocorreram animais com manifestação clínica ($p < 0,001$). O gráfico 2 apresenta essa distribuição.

Gráfico 2: Prevalência de animais com salmonelose clínica entre as categorias

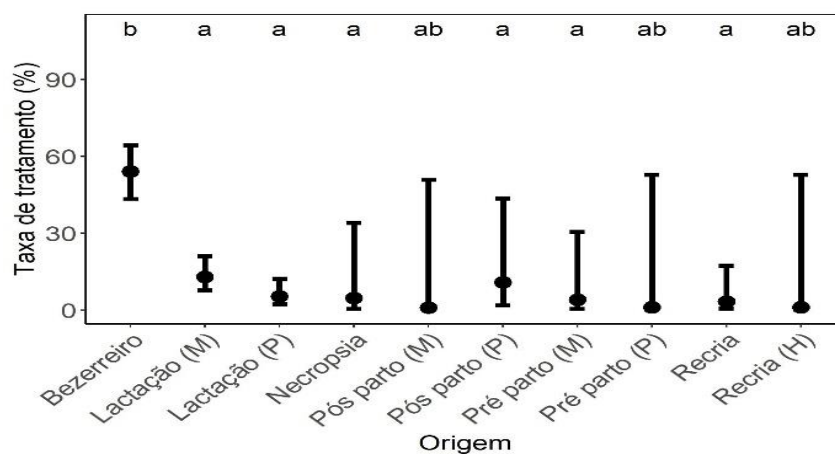


A tabela 6 mostra uma relação significativa ($p < 0,001$) entre animais com sinais clínicos para salmonelose e o isolamento de *Salmonella* spp. quando comparado a animais sem sinais clínicos.

Tabela 6: Frequência de animais clinicamente doentes e que apresentavam *Salmonella* spp. nas fezes ou tecidos.

	Sem sinais clínicos	Com sinais clínicos	TOTAL
Negativo	747	3	750
Positivo	36	24	60
TOTAL	783	27	810

Foi observada diferença significativa na frequência de tratamentos antimicrobianos entre as categorias animais na propriedade ($p < 0,001$) conforme mostra o gráfico 3.

Gráfico 3: Frequência de tratamentos com antimicrobianos por categoria animal*Análise de sensibilidade a antimicrobianos:*

A tabela 7 reúne a frequência de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de *Salmonella* spp. encontrados para todas as bases testadas através dos discos de difusão.

Tabela 7: Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados de *Salmonella* spp.

	Sensível	Frequência Sensibilidade
Enrofloxacina	6	10%
Ciprofloxacina	0	0%
Cefalotina	11	18%
Ceftriaxona	17	28%
Ceftiofur	8	13%
Florfenicol	14	23%
Gentamicina	23	34%
Amicacina	52	87%
Amoxicilina	28	47%
Ampicilina	20	33%
Tetraciclina	2	3%
Sulfametoxazol Trimetoprima	21	35%

Foram testadas 36 amostras com 12 bases antimicrobianas.

Foi observada resistência a Enrofloxacina, Ciprofloxacina, Cefalotina, Florfenicol, Gentamicina, Ampicilina e Tetraciclina. A tabela 8 mostra a prevalência de amostras resistentes aos antibióticos, separadas conforme o Clado A e Outros Clados, associando resistência antimicrobiana com uma origem ancestral comum.

Tabela 8: Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Salmonella* spp.

Antibiótico	Clado A	Demais Clados	Valor p
Enrofloxacina	24	0	< 0,001
Ciprofloxacina	39	11	0,026
Cefalotina	21	2	0,006
Florfenicol	30	5	0,019
Gentamicina	27	4	0,007
Ampicilina	30	6	0,019
Tetraciclina	39	9	0,002

DISCUSSÃO

A realização desta pesquisa nesta fazenda foi motivada pelo diagnóstico de um surto de salmonelose, realizado dois anos antes da execução do projeto, no qual ocorreu grande mortalidade na fazenda em animais da categoria de recria (100 a 150 dias de idade) (Ramos *et al.*, 2018). Neste surto, a doença apresentou alta morbidade e mortalidade e se apresentava com quadros de enterite com fibrina intensa nas fezes, sendo isolado nesse surto *Salmonella* sorotipo Ndolo e associada como causa dessas apresentações. No presente trabalho, foram observadas principalmente manifestações sistêmicas, com pneumonia e depressão, posteriormente apresentando diarreia protusa com estrias de fibrina e sangue.

A infecção estava distribuída em todo o rebanho (gráfico 1). Foi observada ausência de animais apresentando sinais clínicos entre os adultos, porém na recria (91-150 dias) havia uma prevalência elevada de animais sintomáticos (gráfico 2) e pouco isolamento de *Salmonella* spp. naqueles animais saudáveis dessa mesma categoria (4,1%), comparados aos animais enfermos mantidos no piquete hospital (Recria (H)), o isolamento de *Salmonella* spp. apresentou alta frequência (35,7%) (tabela 1 e gráfico 1).

Esses isolados apresentaram uma elevada taxa de similaridade genética (tabela 5) e de sorotipo, igualmente distribuída ao longo das categorias estudadas conforme mostram (Figura 9).

A exceção da Recria (H), houve grande presença de falsos positivos na triagem com o meio Ágar Entérico de Hektoen, es. Entretanto fica claro a necessidade da realização de três coletas para a triagem de animais portadores na propriedade em cada categoria animal (tabela 4).

O sorotipo mais prevalente foi *S. Dublin*, que apresenta grande relevância como causa de diarreia por salmonelose em bovinos jovens, sendo responsável também por quadros septicêmicos e pneumônicos (Izzo *et al.*, 2011), que foram as apresentações mais observadas resultando em óbito por *Salmonella* dentre os animais necropsiados no experimento. As demais sorovariedades foram pouco expressivas, contendo um ou dois isolados apenas e sem distribuição pelas categorias de animais.

S. Dublin apresentou alta frequência em amostras oriundas de necropsia e animais da recria do grupo Hospital, indicando maior patogenicidade dessa estirpe (gráfico 1). Todos os animais que vieram a óbito ou apresentaram sinais clínicos de salmonelose eram portadores de *S. Dublin*. Houve predomínio dos isolados pertencentes ao clado A (figura 2), sendo o único grupo de isolados que esteve distribuído em todas as categorias animais, seja causando doença ou em portadores assintomáticos. Esse clado contempla 42 isolados (72% das amostras) e destes 78% (33/42) são dos sorotipos *S. Dublin* (tabela 5), evidenciando forte similaridade gênica entre esses isolados (99,8%) (figura 9) sugerindo serem estirpes clonais. Esses isolados se distribuem pela propriedade e causam doença em condições favoráveis, mantendo um grande número de portadores assintomáticos, características já descritas por Nielsen *et al.* (2004) e Eng *et al.* (2015).

No bezerreiro (0 a 90 dias de idade), onde esperava-se uma maior frequência de animais positivos, foram observados valores relativamente baixos, de 1,2% (tabela 4). A baixa prevalência pode ser justificada pela limitação técnica do método diagnóstico, uma vez que animais dessa categoria que recebem qualquer tratamento com antibiótico apresentam redução ou cessam a eliminação de salmonela nas fezes como descreveram Nielsen (2003) e Carvalho (2013). São descritos valores de prevalência média nessa categoria entre 2,3 a 5,4% em fazendas com surto prévio, principalmente em animais mais jovens com até 15 dias de idade (Nielsen, 2013b).

A propriedade utilizava para alimentação dos bezerros leite de descarte com resíduo de antimicrobianos, fornecendo apenas esse produto até 30 dias de idade, e após, era adicionado sucedâneo para completar o volume total de leite para os animais até 90 dias de idade, conforme disponibilidade de leite de descarte. A variação na composição do produto pode contribuir para a infecção dos animais nessa categoria, e pode interferir com a capacidade de isolamento, uma vez que o volume de antimicrobiano presente no leite não é estimável e pode impedir a recuperação de isolados nas fezes dos animais e animais do Bezerreiro também podem já serem infectados, tanto no momento do parto, quanto pelo compartilhamento de equipamentos como mamadeiras, ferramentas de limpeza das gaiolas e contato com pessoas. Nielsen (2013a) e Vaessen *et al.* (1998) já haviam observado que essa prática reduz a eliminação ou isolamento do agente, mas que não previne a infecção do animal. Dessa forma, o fornecimento do antimicrobiano não impede a colonização intestinal, mas interfere com a recuperação do agente na cultura realizada.

Todos os bezerros apresentavam quadros de diarreia transitória em algum momento nos primeiros 15 dias de idade. Foram realizados exames de OPG e OOPG (ovos por grama de fezes e pesquisa de oocistos por grama de fezes) e pesquisa de *Cryptosporidium* spp., entretanto não foram observadas contagens significativas que justificassem a ocorrência da diarreia. De acordo com o protocolo da fazenda, todo episódio de diarreia era tratado com antimicrobiano enumerados na tabela 9, sem um protocolo definido. Já bezerros com mais de 30 dias de idade apresentavam uma incidência moderada de pneumonia, sendo utilizados antimicrobianos para tratamentos (tabela 9). Essa condição

de administração de antimicrobianos em grande parte dos animais pode ter contribuído para a baixa frequência de isolamento nas fezes, porém não interferiu nas frequências maiores observadas na recria e muito altas observadas no grupo hospital (Recria H).

O acompanhamento clínico individualizado dos bezerros possivelmente contribuiu para a reduzida prevalência, destoando daquilo observado por Cummings *et al.* (2012) que aponta a doença como mais frequente em animais jovens, entre 5 e 15 dias de idade, a até 2 meses. Ainda, como particularidade desse sistema na região tropical do Brasil, há alta incidência de carrapatos (*R. microplus*), que além da espoliação que produzem, transmitem a *A. marginale*, cuja incidência na propriedade é de 100%, ou seja, todos os animais da recria serão tratados para anaplasmoses pelo menos uma vez. Essa condição parece predispor a ocorrência de Salmonelose na categoria, e a alta densidade animal nos piquetes contribui para a transmissão entre os animais, conforme descrevem Taylor e Burrows (1971). Entretanto, não fica claro se a Salmonelose é predisposta devido a anaplasmoses ou o contrário.

A observação de categorias consideradas menos susceptíveis (lactação e pós parto) (tabela 4) sendo portadoras da bactéria corroboram com a suspeita de que a pressão de uso de antimicrobianos entre os animais mais jovens interferiu na recuperação de isolados na cultura bacteriana, assim sendo, possivelmente as taxas de infecção do bezerreiro podem ser mais elevadas como descrito por outros autores (Ågren, 2017; Cho *et al.*, 2012) e estando subestimadas nesse trabalho.

Isolados de *S. Dublin* estiveram bem distribuídos entre os animais adultos sem serem observadas manifestações clínicas (gráfico 1), indicando que esses animais possivelmente são portadores de estirpes patogênicas e que podem servir como fonte de infecção para os bezerros. Cummings *et al.* (2012) descreve que o momento do parto, devido as alterações hormonais e metabólicas do periparto, ocorre maior eliminação do agente. E uma vez que a cama não é substituída a cada parto na propriedade e ainda podendo o funcionário da maternidade pode servir como vetor ao transportar os bezerros para o bezerreiro podem contribuir para a contaminação desses animais ainda na maternidade e que irão manifestar forma mais grave da doença na recria, quando ocorre redução no fornecimento de antimicrobianos e perda da observação individual dos animais.

No grupo Recria (91 a 150 dias de idade) foi observada uma frequência maior de indivíduos eliminando *Salmonella* spp. nas fezes que aquele descrito na literatura (ÅGREN, 2017). Esse valor de 4,1% é maior se considerarmos que os animais doentes confinados no lote considerado hospital, que apresentou prevalência de 35,7% (tabela 4), era composto por animais da recria. Particularmente nessa propriedade, os valores podem estar subestimados devido à alta prevalência de anaplasmoses (*A. marginale*) nos animais, resultando em alto uso de antimicrobianos (tabela 9). Dos animais participantes no estudo, é relatado que todos receberam antibioticoterapia em até 30 dias que antecederam a coleta, porém não há registro de qual antimicrobiano foi utilizado e em qual animal no período. Mesmo assim, a frequência encontrada já é considerada elevada se comparada com a descrita na literatura (Ågreen,

2017; Nielsen, *et al.*, 2004). Em trabalho semelhante, realizado na Dinamarca, Nielsen (2013b) descreve um valor esperado de até 2,3% para a categoria recria, ou seja, a metade da frequência observada no trabalho.

A alta taxa de tratamento dessa categoria pode camuflar uma taxa de animais portadores mais elevada, devido à alta frequência de animais eliminando *Salmonella* spp. no grupo de recria (H) (hospital) de 35,7% (tabela 4 e gráfico 1). Esses animais apresentam um quadro sanitário ruim, com deterioração da condição imunitária e corporal, o que pode predispor a maior frequência de eliminação, como foi observado também por Veling *et al.* (2002), justificando o fato de ser a única categoria em que isolados de *Salmonella* spp. foram encontrados em mais de uma coleta do mesmo animal.

Os bezerros que vieram a óbito e foram necropsiados pertenciam ao grupo da recria, reforçando a hipótese de que ocorreu uma subestimação da frequência de animais com salmonelose nesse grupo. Cabe salientar que no material coletado durante as necropsias não foram isoladas *Salmonella* spp. de conteúdo fecal, porém foi possível isolar de outros tecidos como pulmão em frequência elevada de 71% (20/28) (gráfico 1), sugerindo que um índice elevado de animais está portando de forma assintomática estirpes de *Salmonella* spp. Também indica que apesar de tratamentos reduzirem a eliminação de *Salmonella* spp. nas fezes (Cho *et al.*, 2012), parece que em animais tratados não há relação entre o tratamento e o isolamento do agente em órgãos, bile e conteúdos cavitários, apontando que a necropsia e a coleta adequada de materiais são imprescindíveis para monitorar a eficácia do controle da salmonelose em fazendas comerciais.

O comportamento de isolados entre os grupos de animais adultos apresentou variações, com prevalências mais altas no grupo pós-parto de múltiparas com 19% (6/31) (Tabela 4). Contudo, o número de isolados nos grupos em lactação (primíparas e múltiparas) também é elevado comparado a literatura (Nielsen, 2013b). Já a ausência de isolamentos nos grupos de pré-parto é possivelmente oriundos do *status* imunológico desses animais, onde há pouco manejo devido ao período seco, conferindo um bom *status* sanitário e reduzindo a circulação da *Salmonella* spp. bem como do baixo número de animais que compuseram essa amostra, o que poderia impossibilitar a identificação do agente em baixas frequências de eliminação.

O alto índice de isolados no pós-parto de múltiparas (19,4%) quando compara a nenhum isolado no mesmo grupo de primíparas pode ser devido a maior probabilidade desses animais se infectarem ao longo da permanência no sistema de produção (tabela 4). Também há um considerável risco no grupo de múltipara oriundo do alto fornecimento de capim picado na dieta de vacas secas, que é proveniente de uma área de fértil irrigação e sem controle da qualidade e inocuidade do produto utilizado, e nem de intervalo de aplicação até a colheita para o fornecimento aos animais. Essa dieta com capim não é fornecida as primíparas nos períodos que antecedem o parto. Taylor e Burrows (1971) relatam transmissão de *Salmonella* em vacas alimentadas com forragens contaminadas, porém nesse estudo não foi avaliado o risco de contaminação e transmissão pela forragem.

O aumento de frequência de animais positivos para *Salmonella* nas vacas no pós-parto imediato em relação às aquelas observadas nas vacas no pré-parto (0 para 19,4%) indicam que as alterações hormonais e metabólicas do período no entorno do parto são relevantes para um momento de imunossupressão, acompanhado de alterações de manejo, dieta e lotes, e o início da fase produtiva desses animais. Essas condições foram descritas por Nielsen *et al.* (2004) e Ågren (2017) e puderam ser observadas no trabalho.

A prevalência de animais positivos em lactação, de 45 dias até o final da lactação é similar entre primíparas e múltiparas (3,6 e 3,4% respectivamente na tabela 4) é explicada pelo manejo similar e compartilhamento das mesmas instalações, dieta e ambiente por esses animais, não havendo mais diferenças entre os fatores de risco dessas categorias. Esses valores se mostram muito elevados para a categoria, mostrando uma presença grande e ativa da *Salmonella* spp. circulando no rebanho. Em trabalho realizado por Nielsen, (2013b) foi observada prevalências entre 0 e 0,5% em fazendas com surtos já controlados, porém, cabe salientar que Nielsen (2013b) utilizou-se de coletas únicas a cada momento e que aguardaram refrigeradas para cultura por mais de 8h, comparados ao método adotado no trabalho, em que as amostras eram processadas no local e eram realizadas coletas em 3 momentos distintos, aumentando a sensibilidade do teste. A tabela 4 traz as frequências obtidas em cada coleta separadamente, e evidencia a importância de múltiplas coletas por animal independente da condição clínica deste.

Esse achado nos animais adultos de aproximadamente 3,5% de positividade nas amostras pode justificar a falta de isolados observados nos grupos menores como pré-parto e pós-parto de primíparas (28 e 22 animais respectivamente), uma vez que a baixa densidade animal não permitiria a identificação de uma prevalência pequena de animais portadores eliminando o agente. Talvez um estudo longitudinal nessa categoria seja necessário para responder essa questão.

O trânsito entre os funcionários da fazenda de diferentes setores e categorias animais é intenso e não há medidas de biossegurança, sendo que o contato com os animais e instalações desses animais portadores podem servir como vetores mecânicos, transportando nas botas e vestimentas, disseminando *S. Dublin* entre as categorias susceptíveis. Essa condição é também comum em outras propriedades no país, e por falta de diagnóstico pode estar havendo subnotificações da doença. Van Schaik *et al.* (2002) já mostrou relação de proteção quando funcionários mudam os trajes entre as seções de risco e Ruzante *et al.* (2010) mostrou que *Salmonella* spp. continua viável em botas e roupas por até 48h após contato. Kirchner *et al.* (2012) também mostrou que *S. Dublin* e *S. Typhimurium* podem sobreviver por longos períodos no ambiente e fezes parcialmente desidratadas e em superfícies sujas, em variadas condições ambientais. Essas características dificultam a eliminação do agente do ambiente e permitem a reinfecção em novos animais quando estes são alojados nas instalações.

Entre os animais que tiveram amostras de *Salmonella* spp. isoladas, apenas 9 animais apresentaram sinais clínicos de salmonelose durante o período de coleta, que durou 90 dias, entretanto,

outros 18 animais da propriedade morreram após esse período em um monitoramento realizado pela fazenda por mais 90 dias, apresentando sinais clínicos sugestivos de salmonelose. Todos os animais eram oriundos da categoria de recria (91 a 150 dias de idade), e apresentavam febre, prostração intensa, diarreia profusa, aumento da frequência respiratória e inapetência, alguns animais apresentavam pneumonia, icterícia e mucosas cianóticas que antecederam o óbito. Os sinais clínicos de salmonelose são inespecíficos e se assemelharam a de outras enfermidades digestivas, da doença respiratória dos bovinos ou de TPB, o que dificulta a precisão do diagnóstico pela observação clínica, assim como foi observado por Marques *et al.* (2013).

À necropsia, esses animais apresentavam icterícia intensa, petéquias difusas distribuídas pelos órgãos (intestino, pulmão e fígado), edema pulmonar em grau moderado (figura 10A, B, C, D, E e F) e vesícula biliar distendida e com conteúdo espesso, similares aos observados por Marques *et al.* (2013). Não foram observados outros achados macroscópicos significativos, porém era frequente a identificação de úlceras de abomaso (figura 8H), muitas vezes em resolução, nesses animais. Essas úlceras sugerem uma dieta de alto desafio, e que poderiam estar produzindo alterações com grau variado de acidose rumenal, excesso de carboidratos de alta fermentabilidade e alterando a composição da microbiota, que nessas condições tende a reduzir a proporção de bacteroidetes e firmicutes e aumentar a relação de organismos do grupo das proteobactérias, levando ao desequilíbrio dessas populações e podendo favorecer a colonização por bactérias patogênicas ou oportunistas (Bi *et al.*, 2017).

A frequência maior de animais doentes no grupo hospital da recria se deve a particularidade desse grupo angariar os animais em pior condição sanitária (gráfico 2). Os sinais clínicos observados para salmonelose em sua maioria são compatíveis a doença sistêmica, ficando evidenciado pelo achado de isolados de *Salmonella* spp. nos tecidos de animais necropsiados, frequentemente no pulmão e conteúdo de vesícula biliar.

O gráfico 2 evidencia uma diferença significativa ($p < 0.001$) na prevalência de animais doentes do hospital da recria quando comparados a bezerreiro (0 a 91 dias de idade) e recria (91 a 150 dias de idade). Apesar da dificuldade de definir no exame clínico animais com comorbidades e diferenciar da salmonelose, observa-se que a categoria de recria está sob maior risco de desenvolvimento da forma clínica da doença, provavelmente devido a mistura de animais de lotes e idades diferentes e a alta taxa de lotação nos piquetes, associado a falta de rotação e vazios sanitários nos piquetes e a constante recontaminação das instalações.

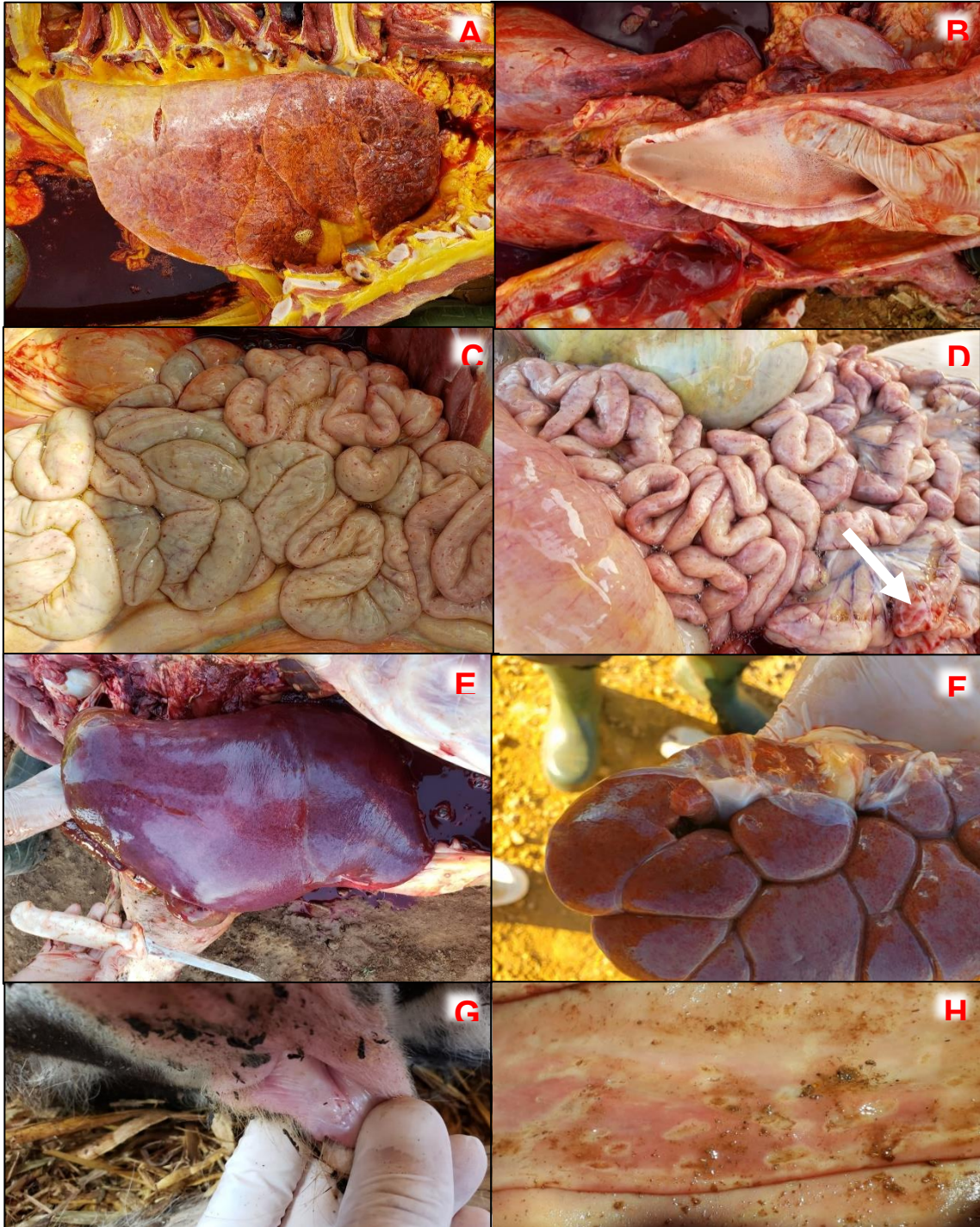


Figura 10: Necropsias de bezerras da recria (idade entre 91 e 150 dias) com isolamento de *Salmonella* spp. A) Pulmão com edema grave, icterícia acentuada e petéquias difusas por toda a superfície. B) Traqueia com exsudato e espuma em grande quantidade. C e D) Intestino com petéquias difusas ao longo da serosa, com áreas de sufusão na serosa (seta), sem alterações nos linfonodos e placas de Peyer. E) Fígado aumentado, com coloração irregular e bordas abauladas. F) Rim com superfície irregular e petéquias difusas por toda a superfície. G) Vulva com petéquias na mucosa e mucosa de coloração pálida. H) Abomaso com múltiplas úlceras pequenas e não hemorrágicas.

A baixa frequência de animais doentes no bezerreiro se deve ao maior acompanhamento clínico desses animais, uma vez que no período de coleta de amostras estava sendo realizado um projeto de monitoramento pulmonar para pneumonia, e eventuais tratamentos eram aplicados assim que alterações clínicas discretas eram observadas. Também cabe salientar que como a criação era individualizada a transmissão do agente entre os bezerros era menor, além de estes estarem protegidos de intempéries climáticas, enquanto que a recria estava alojada em ambiente aberto, com pouca proteção e em lotes comunitários com alta incidência de doenças concomitantes como pneumonia e tristeza parasitária bovina, aumentando o risco de transmissão e desenvolvimento de doença clínica, condições de risco estas descritas por Moal *et al.* (2017).

Houve uma alta correlação entre o animal ser avaliado clinicamente acometido por salmonelose e realmente ser portador do agente (tabela 6). Dos 27 animais avaliados com sinais clínicos sugestivos de salmonelose, 24 em foi isolado *Salmonella* spp., quando comparado ao valor global de 810 animais coletados e sendo 60 destes positivos.

Foi observada uma alta taxa de letalidade entre os animais doentes, uma vez que 66,6% dos animais identificados com salmonelose clínica vieram a óbito mesmo recebendo tratamento, devido a severidade da doença e a possível ineficácia do tratamento realizado. A falta de acompanhando do perfil de resistência aos antimicrobianos utilizados pela propriedade e a falha da adoção de protocolos terapêuticos contribuíram para o desgaste precoce da eficiência das drogas disponíveis e o surgimento de estirpes multirresistentes.

O grupo bezerreiro apresentou taxas significativamente mais elevadas de tratamentos em comparação as demais categorias, atingindo 56% dos animais sendo tratados pelo menos um protocolo. Esse fato pode ser resultado do melhor acompanhamento desses animais, uma vez que estão individualizados e o fornecimento de leite duas vezes ao dia mantém um monitoramento individual de cada animal, permitindo a identificação precoce de alterações clínicas e a implementação de tratamento com agilidade.

Esse grupo também apresentou uma diferença significativa ($p < 0,001$) para o número de tratamentos por animal (gráfico 3), recebendo quase um tratamento e meio para cada animal alojado no período. Observa-se assim a maior pressão de tratamento sobre esses animais, e podendo ser responsável pela menor frequência de isolados quando comparados a categoria de recria e pós-parto.

Entretanto, é importante ressaltar que o elevado uso de antimicrobianos por esta categoria pode estar associado ao surgimento dos isolados com padrões de resistência a antimicrobianos (tabelas 7 e 8). O excesso de tratamentos também pode apontar falta de acurácia na avaliação clínica e estando correlacionado a falta de protocolos sanitários específicos (tabela 9) e padronizados para cada tipo de alteração clínica nessa categoria animal na propriedade, resultando no baixo número de isolados no experimento, porém não necessariamente reduzindo o número de infecções, assim como foi observado

por Nielsen (2003). Carvalho (2013) também observou redução no isolamento de *Salmonella* spp. em bezerros após a administração de Enrofloxacin.

A recria (91 a 150 dias) apresentou um alta incidência de tristeza parasitária bovina (TPB) por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, onde o controle é realizado através de contagem de hemoparasitas em lâmina por microscopia ótica por funcionários da fazenda, e apesar do relato de que os animais participantes no estudo receberam tratamento com antimicrobiano, conforme protocolos da tabela 9, em até 30 dias que antecederam a coleta, não há registro de quais antimicrobianos e quando foram utilizados em cada animal no período. Nielsen (2013b) descreveu um valor esperado de até 2,3% de isolamentos para essa categoria, porém não discute o impacto de tratamentos, mesmo citando sua interferência.

Assim, grupo Recria possivelmente camuflou uma taxa de animais portadores mais alta, devido à alta frequência de animais eliminando *Salmonella* spp. no grupo de Recria (H) (hospital) de 36%, indicando a presença do agente nos animais. Reforçando a hipótese o fato de que todos os animais pertencentes ao grupo necropsia eram desse grupo, e que apesar de não serem isolados *Salmonella* de conteúdo fecal, foi possível isolar de outros tecidos como pulmão e bile durante a realização da necrópsia, com frequência de 71% entre todos os animais que vieram a óbito, sendo predominante (77%) de isolados de *S. Dublin*, que apresenta maior patogenicidade (Cummings *et al.*, 2012), sugerindo assim que uma parcela de animais pode estar portando estirpes de *Salmonella* spp. de forma assintomática mesmo nas categorias de Bezerreiro e Recria. Também sugere que apesar de tratamentos reduzirem a eliminação de *Salmonella* spp. nas fezes, parece que em animais tratados não há interferência entre o tratamento e o isolamento do agente nos tecidos, o que indica que esse é um bom material para monitorar a eficácia do controle da salmonelose em fazendas comerciais.

Tabela 9: Protocolos terapêuticos de antimicrobianos utilizados na propriedade

Antimicrobiano	Protocolo terapêutico	Suspeita Clínica
Enrofloxacin	7,5 mg/kg, dose única, IM*	Anaplasmose
	2,5 mg/kg, três dias, VO**	Diarreia bezerro
	7,5 mg/kg, três aplicações com intervalo de 48h, IM*	Pneumonia
		Salmonelose
Ceftiofur	2 mg/kg, cinco dias, IM*	Otite
		Salmonelose
		Mastite
		Pneumonia
Florfenicol	20mg/kg, três dias, IM*	Salmonelose
Gentamicina	4 mg/kg, três dias, IM*	Endometrite
		Mastite
		Pneumonia

		Salmonelose
Amoxicilina	15 mg/kg, cinco dias, IM*	Pneumonia
		Otite
		Diarreia
		Anaplasmosse
Oxitetraciclina	20 mg/kg, duas aplicações com intervalo de 72h, IM*	Pneumonia
		Otite
		Endometrite
Sulfadoxina e Trimetoprim (Fortgal injetável)	15 ml/animal (recria), IM*	Salmonelose
		Pneumonia
		Endometrite
Penicilinas (Pencivet plus)	15 ml/250kg PV, cinco dias, IM*	Pneumonia
		Otite
		Diarreia

Ao antibiograma, observou-se diferença significativa, com valor de $p < 0,03$, para o isolamento de *Salmonella* spp. em animais tratados com Enrofloxacina, que foi amplamente utilizado no grupo Recria para o tratamento de *A. marginale* e no grupo Bezerreiro para o tratamento de diarreias, independente da causa. Nos animais que fizeram uso do antimicrobiano não houve isolamento de *Salmonella* spp. nas fezes, vindo de encontro com o relato de Nielsen (2013b) onde observou que animais jovens medicados com antimicrobianos, independentemente da eficácia, tem redução na eliminação do agente nas fezes. Porém, não é descrito se há de fato uma redução na eliminação ou apenas uma redução na capacidade da cultura isolar o agente, uma vez que foram isolados de animais tratados, com Enrofloxacina e outros antimicrobianos, que vieram a óbito em tecidos como pulmão, linfonodos e conteúdo de vesícula biliar.

Os isolados encontrados na propriedade apresentaram grande resistência as bases testadas, sendo que 85% dos isolados são estirpes multirresistentes, ou seja, resistentes a mais de três classes de antimicrobianos. Marques *et al.* (2013) também observou multirresistência em estirpes de *S. Dublin* em um surto no Maranhão, ressaltando a importância da realização de antibiograma para o estabelecimento de protocolos terapêuticos adequados, entretanto, não foi descrita no trabalho quais antimicrobianos eram utilizados na propriedade regularmente e se inferiram no perfil de resistência do agente.

Dentre os antimicrobianos testados (tabela 7), Amicacina foi o único que os isolados se mostraram sensíveis. Isso se deve ao fato de que a Amicacina, dentre as bases antimicrobianas testadas, é a única não utilizada na rotina da propriedade e por isso mantém sua eficiência.

A exceção da Amicacina, todos os antimicrobianos testados apresentaram mais de 50% dos isolados resistentes. Isolados de *Salmonella* Dublin e aqueles pertencentes ao clado A são os isolados com maior frequência (62%) de multirresistência, e todas foram resistentes a pelo menos duas classes antimicrobianas. Vilela *et al.* (2020) observou em um estudo que a maior prevalência de resistência

antimicrobiana observada em estirpes de *S. Dublin* isoladas ao longo de 33 anos de animais e humanos no Brasil foi a tetraciclinas e quinolonas. Tetraciclinas são amplamente utilizadas sem orientação nas fazendas brasileiras, e as quinolonas apresentam uso crescente para enfermidades como TPB, doença respiratória dos bovinos e distúrbios digestivos, sendo que esse uso impreciso de medicamentos se mostrou eficiente em reduzir a eficácia das bases antimicrobianas da propriedade.

Foi observado que *S. Dublin*, que envolve agentes mais patogênico e com preocupante característica zoonótica, apresentou um leque muito grande de resistência a classes de drogas muito usadas na medicina veterinária no Brasil e que, ou são compartilhadas com drogas de uso na medicina humana, ou compartilham a classe antimicrobiana. Holschbach e Peek (2018) apontam quinolonas e Ciprofloxacina como as principais medicações para tratamento de salmonelose em humanos e neste trabalho observou-se que os isolados de *Salmonella* spp. mesmo que não patogênicos, não apresentam sensibilidade a Ciprofloxacina, e possuem pouca sensibilidade às quinolonas.

Os isolados do Clado A apresentaram maior resistência a Enrofloxacin, Ciprofloxacina, Cefalotina, Florfenicol, Gentamicina, Ampicilina e Tetraciclina (tabela 8) quando comparado aos demais Clados ($p < 0,05$). O Clado A foi mais frequente entre animais jovens e associado a manifestação de sinais clínicos e óbitos, associado a isso ainda constitui o grupo que reúne o maior número de estirpes multirresistentes, agravando o risco de recorrência de surtos e o risco zoonótico das *Salmonella* spp.

Os isolados de *S. Dublin* incluem a maior parte das estirpes do Clado A (figura 9), mostrando uma origem comum dentre as salmonelas que apresentaram maior patogenicidade entre os isolados encontrados. Mesmo que as infecções por *S. Dublin* em humanos sejam pouco comuns, a similaridade gênica entre *S. Dublin* e *S. Enteritidis* é grande e Kemal (2014) sugere que ambos possuem um ancestral comum próximo. *Salmonella* spp. é capaz de compartilhar genes de resistência horizontalmente entre bactérias diferentes, podendo, se presente em alimentos, transferir resistência para sorotipos que causem doença mais comumente em humanos. Vilela *et al.* (2020) encontrou uma alta similaridade entre estirpes de *S. Dublin* isoladas no Brasil entre humanos e animais ao longo de 33 anos (112 isolados), sugerindo um ancestral comum e pouca diferenciação da *S. Dublin*. Corroborando assim que a *S. Dublin* se adapta ao ambiente e consegue assimilar características de virulência e resistência para causar doenças graves em humanos e animais, evidenciando o potencial zoonótico do agente e riscos à saúde pública. Holschbach e Peek (2018) descrevem a eliminação de bactérias no leite, identificado em culturas de tanque, mesmo que na ausência de mastite por *Salmonella* spp.

A propriedade faz uso das vacinas J5 e Paratifo para redução da incidência de salmonelose, entretanto a ocorrência da doença se mantém elevada e preocupa quanto a saúde pública, uma vez que não há métodos de prevenção além da higiene e boas práticas na produção animal e preparo de alimentos, e assim como em veterinária, não há uma vacina eficiente para a prevenção em humanos (KEMAL, 2014).

Foi relatado a transmissão de *Salmonella* pelo leite cru e carne crua em surtos na Dinamarca e Irlanda (Ågren, 2017; Kemal, 2014), evidenciando a necessidade de controle da doença na propriedade para assegurar a qualidade e inocuidade do produto, para a segurança do consumidor e o bem-estar sanitário da propriedade.

Observou-se também que *S. Dublin* apresentou tendência a menor sensibilidade a Gentamicina, Amoxicilina com ácido clavulânico e Sulfadoxina e Trimetoprim. Uma vez que o perfil de resistência se manteve próximo da mesma faixa, é possível que estirpes menos patogênicas dos demais sorotipos estejam adquirindo resistência, seja por exposição as drogas, ou seja por transferência horizontal de genes pela *S. Dublin*.

Esses resultados mostram que apesar de a pressão de tratamento ser maior nas unidades de bezerreiro e recria, os isolados dos animais adultos, que possuem menor frequência de tratamento e menor variação na seleção de drogas também são multirresistentes, evidenciando que o agente se distribui pela propriedade e compartilha os perfis de sensibilidade entre todas as categorias.

CONCLUSÕES

O diagnostico exclusivo pela cultura de fezes apenas subestima a real prevalência da doença na propriedade, uma vez que todos os bezerros que morreram tiveram *Salmonella* spp. recuperadas de algum órgão ou fluido corporal que não as fezes.

Apesar da *Salmonella* spp. estar presente em todas as categorias estudadas e apresentar uma alta similaridade genética, recria é o grupo em risco de manifestar sinais clínicos devido ao manejo e ambiente mais desafiador que estão expostos.

A presença de estirpes multirresistentes em diversas categorias evidencia que a circulação do agente não é linear, e há presença de mecanismos de contaminação ao longo da fazenda que precisam de mais estudos.

A ausência de diagnóstico específico de etiologia de diarreias e pneumonias associado a falta de protocolos terapêuticos claros para essas enfermidades e para TPB e o desconhecimento dos agentes infecciosos presentes no rebanho levam a um desgaste rápido e de diversas bases antimicrobianas, reduzindo as opções de tratamento e agravando a severidade das enfermidades quando ocorrem.

O uso indiscriminado de antimicrobianos em veterinária é preocupante, pois o esgotamento de medicações disponíveis e o aspecto zoonótico da enfermidade podem comprometer a eficácia de tratamentos não só na fazenda, mas em humanos, agravando a severidade da doença.

A avaliação e compilação de multirresistência entre isolados de *Salmonella* spp. em animais é essencial para monitorar o risco para saúde humana.

Faltam informações sobre a dinâmica da *Salmonella* spp. em propriedades, e este trabalho mostra que há circulação ativa mesmo em categorias separadas. Entretanto, mais estudos são necessários para entender essas associações.

O controle da salmonelose em um rebanho é difícil, e pode levar anos identificando portadores e atualizando protocolos a fim de mitigar ou reduzir a ocorrência de casos clínicos, entretanto, prevenir a entrada da enfermidade deve ser a prioridade do manejo sanitário de um rebanho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho contribui para o entendimento da dinâmica da *S. Dublin* em um rebanho confinado, apesar de ser um resultado restrito a nível nacional. Ficou claro a falta de trabalhos que monitorem as dinâmicas em diferentes regiões e sistemas ao longo do Brasil.

Apesar de ter sido observada uma relação entre a tristeza parasitária bovina, em especial a anaplasmoses (*A. marginale*), não ficou claro como a dinâmica dessas doenças funciona, levantando a necessidade de mais estudo, uma vez que sinais clínicos são comuns entre as doenças e dificultam o diagnóstico clínico, uma vez que não se conhece a extensão da influência da salmonelose no país, mas sabe-se que a TPB está distribuída. Também levanta a suspeita sobre a relação com outras comorbidades, como a tripanossomose, que se difundiu em diversas regiões na última década e apresenta sinais clínicos inespecíficos, com alto índice de morbidade e podendo ocorrer também alta mortalidade.

Mesmo com alto índice de tecnificação das grandes fazendas no país, ficou evidente que faltam a adoção de medidas sanitárias quanto ao comércio de animais e a biossegurança interna da propriedade, com uma filosofia do tratamento muito presente entre os técnicos e não o objetivo da prevenção de entrada das enfermidades. Há uma grande preocupação na redução do uso de bases nos animais em lactação e a manutenção de drogas eficazes com protocolos estritos e claros, porém essa mesma condição não é observada nos mesmos moldes na recria, que utiliza mais antimicrobianos por animal e, apesar da preocupação, ficou claro que a transmissão de resistência entre os microrganismos ocorre, e mesmo que sejam utilizados menos tratamentos nos animais adultos, o perfil de resistência é constante entre as categorias.

Também faltam registros sanitários individuais dos animais, tanto de tratamentos quanto de evolução e condição clínica do animal nos estágios iniciais. A confiabilidade e presença de informação aumenta quando os animais estão no estágio produtivo, provavelmente devido as restrições de descartes e período de carência que são exigidos pelos compradores dos produtos.

O uso indiscriminado de antibióticos para tratamentos de diversas enfermidades, e muitas vezes sem diagnóstico apurado, contribui para o estabelecimento de resistência as drogas antimicrobianas, uma vez que a ocorrência de transmissão entre bactérias diferentes, inclusive da própria microbiota é bem documentada, levando assim ao esgotamento das opções de tratamento a novas enfermidades na propriedade. *Salmonella* spp. também é extremamente resiliente e adaptada a desenvolver resistência a diferentes compostos em curtos períodos, haja visto que historicamente a cada 5 a 6 anos é relatado o ganho de resistência a um novo antibiótico ou grupo farmacológico, em relatos datados desde 1950 no Reino Unido. A maior parte dos genes de resistência das *Salmonellas* spp. não interferem na capacidade de crescimento bacteriano, ou seja, as cepas tendem a se tornarem multirresistentes.

São necessárias investigações para definir os portadores e protocolos a serem realizadas com esses animais em fazendas positivas. Uma vez que não há meios diagnósticos satisfatórios para

identificação precisa de portadores, com os métodos atuais apresentando muito falsos negativos no rebanho em métodos diretos e possíveis falso positivos em métodos indiretos. Uma modernização no diagnóstico se faz necessária para controle em larga escala em países com rebanhos extensos.

Mais estudos de dinâmica nas populações são necessários, tanto para entender como a doença se distribui nos variados rebanhos brasileiros e se correlacionam com as comorbidades presentes no Brasil, como para um possível alerta à autoridades de que a salmonelose nos bovinos é importante e programas nacionais devam ser criados para controle e prevenção da propagação. Atualmente as opções de controle são identificação e descarte de animais, porém a baixa sensibilidade do isolamento direto e a baixa especificidade de animais que realmente são portadores nos exames indiretos não são ferramentas suficientes para o controle. Como desafio maior, em propriedades de bovinocultura, seja corte ou leite, não é economicamente viável realizar o descarte e vazio sanitário de toda a propriedade como é possível em outras espécies de produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEM, J.; BUSHRA, E. Bovine Salmonellosis and Its Public Health Importance: A Review. *Advances in Life Science and Technology*, v. 44, 2016.

ÅGREN, E. *Salmonella in Swedish Cattle Epidemiology and aspects on control*. 2017. 2017. Disponível em: <https://pub.epsilon.slu.se/14155/17/agren_e_170313.pdf>.

AMENU, D. Antimicrobial Resistance for Enteric Pathogens Isolated from Acute Gastroenteritis Patients. v. 1, n. 1, p. 1–14, 2014.

ARABYAN, N. *et al.* Salmonella Degrades the Host Glycocalyx Leading to Altered Infection and Glycan Remodeling. *Scientific Reports*, v. 6, n. July, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep29525>>.

BÄCKHED, F. *et al.* Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, v. 307, n. 5717, p. 1915–1920, 2005.

BARRINGTON, G. M; PARISH, S. M. BOVINE NEONATAL IMMUNOLOGY. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 17, n. 3, p. 463–476, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30001-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30001-3)>.

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 2, p. 185–230, 2013.

BEHNSEN, J. *et al.* Exploiting host immunity: The Salmonella paradigm. *Trends in Immunology*, v. 36, n. 2, p. 112–120, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.12.003>>.

BERNAL-BAYARD, J.; RAMOS-MORALES, F. Molecular Mechanisms Used by Salmonella to Evade the Immune System. *Current issues in molecular biology*, v. 25, p. 133–168, 2018.

BI, Y. *et al.* Effects of dietary supplementation with two alternatives to antibiotics on intestinal microbiota of preweaned calves challenged with Escherichia coli K99. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-05376-z>>.

BLAIR, J. M.A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3380>>.

BLAIR, J. M.A.; RICHMOND, G. E; PIDDOCK, L. J.V. *Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance*. *Future Microbiology*. [S.l: s.n.], 2014

BLAU, D. M. *et al.* Salmonella in dairy operations in the United States: Prevalence and antimicrobial drug susceptibility. *Journal of Food Protection*, v. 68, n. 4, p. 696–702, 2005.

BROZ, P.; MONACK, D. M. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 8, p. 551–565, 2013.

BUENO, S. M. *et al.* *Salmonella* pathogenicity island 1 differentially modulates bacterial entry to dendritic and non-phagocytic cells. *Immunology*. [S.l: s.n.], 2010

CAIN, A. K.; HALL, R. M. Evolution of IncHII1 plasmids: Two distinct lineages. *Plasmid*, v. 70, n. 2, p. 201–208, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.03.005>>.

CARVALHO, J. G. Influência Do Volume De Sucedâneo Ingerido E Do Tratamento Com Antibiótico E Anti-Inflamatório Sobre O Perfil Bioquímico, Eletrolítico E A Etiologia Da Diarreia Em Bezerros. 2013. 1–92 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

CASBURN-JONES, A. C.; FARTHING, M. J.G. Management of infectious diarrhoea. *Gut*, v. 53, n. 2, p. 296–305, 2004.

CHO, Yong-Il *et al.* *Ecology of Calf Diarrhea in Cow-Calf Operations*. 2012. 219 f. 2012.

CONSTABLE, P. D *et al.* Abomasal pH and emptying rate in the calf and dairy cow and the effect of commonly administered therapeutic agents. *World buiatrics congress*, v. 2, p. 15, 2006. Disponível em: <<http://www.ivos.org>>.

CORNAGLIA, G. *et al.* Diffusion of carbapenems through the outer membrane of enterobacteriaceae and correlation of their activities with their periplasmic concentrations. *Microbial Drug Resistance*, v. 2, n. 2, p. 273–276, 1996.

COSTA, L. F. *et al.* Salmonellosis in cattle: Advantages of being an experimental model. *Research in Veterinary Science*, v. 93, n. 1, p. 1–6, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.03.002>>.

CRAWFORD, R. W. *et al.* Gallstones play a significant role in Salmonella spp. gallbladder colonization and carriage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 9, p. 4353–4358, 2010.

CUMMINGS, K. J. *et al.* Farm animal contact as risk factor for transmission of bovine associated Salmonella subtypes. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 12, p. 1929–1936, 2012.

CUNNINGHAM, A. F. *et al.* Salmonella Induces a Switched Antibody Response without Germinal Centers That Impedes the Extracellular Spread of Infection. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 10, p. 6200–6207, 2007.

D’COSTA, V. M. *et al.* Salmonella Disrupts Host Endocytic Trafficking by SopD2-Mediated Inhibition of Rab7. *Cell Reports*, v. 12, n. 9, p. 1508–1518, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.063>>.

DANIEL S. H. *et al.* Enhanced expression of dltABCD is associated with development of daptomycin nonsusceptibility in a clinical endocarditis isolate of Staphylococcus aureus. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2010.

DAVIES, J. *Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiología (Madrid, Spain)*. [S.l: s.n.], 2010

ENG, S. K. *et al.* Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, v. 8, n. 3, p. 284–293, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>>.

GERLACH, R. G.; HENSEL, M.. Salmonella Pathogenicity Islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of Salmonella enterica. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, v. 120, n. 7–8, p. 317–327, 2007.

GONZALEZ, G. E.; MARSHALL, J. M.; GUNN, J. S. Chronic and acute infection of the gall bladder by Salmonella Typhi: Understanding the carrier state. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 9–14, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2490>>.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. 9th. ed. [S.l.]: Institut Pasteur, 2007.

GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4. ed. [S.l.: s.n.], 2010.

HANS, P. R.; DEAN, O. C.; MORRIS, P. *Foodborne Infections and Intoxications 3rd Edition*. 3th. ed. [S.l.]: Academic Press, 2006.

HOLSCHBACH, C. L.; PEEK, S. F. Salmonella in Dairy Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, v. 34, n. 1, p. 133–154, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.005>>.

IZZO, M. M. *et al.* Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Australian Veterinary Journal*, v. 89, p. 167–173, 2011.

KEMAL, J. A review on the public health importance of bovine salmonellosis. *Journal of Veterinary Science and Technology*, v. 5, n. 2, 2014.

KIRCHNER, M. J. *et al.* Comparison of the environmental survival characteristics of Salmonella Dublin and Salmonella Typhimurium. *Veterinary Microbiology*, v. 159, n. 3–4, p. 509–514, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.009>>.

KNODLER, L. A.; NAIR, V.; STEELE, O. M. Quantitative Assessment of Cytosolic Salmonella in Epithelial Cells. v. 9, n. 1, 2014.

KULLAS, A. L. *et al.* L-asparaginase II produced by salmonella typhimurium inhibits t cell responses and mediates virulence. *Cell Host and Microbe*, v. 12, n. 6, p. 791–798, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.018>>.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 10, p. 1486–1513, 2005.

KUMAR, R.; GUPTA, N.; SHALINI. Multidrug - Resistant typhoid fever. *Indian Journal of Pediatrics*, v. 74, n. 1, p. 39–42, 2007.

LAM, L. H.; MONACK, D. M. Intraspecies Competition for Niches in the Distal Gut Dictate Transmission during Persistent Salmonella Infection. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 12, 2014.

LAMICHHANE, R. K.; KWIATKOWSKI, A.; MAIER, R. J. The Hyb Hydrogenase Permits Hydrogen-Dependent Respiratory. v. 1, n. 5, p. 1–8, 2010.

LAWLEY, T. D. *et al.* Host transmission of Salmonella enterica serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 1, p. 403–416, 2008.

LOPEZ, M. M. *et al.* Salmonella induces PD-L1 expression in B cells. *Immunology Letters*, v. 167, n. 2, p. 131–140, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2015.08.004>>.

LOSINGER, W. C. *et al.* Management Factors Related to Salmonella Shedding by Dairy Heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 78, n. 11, p. 2464–2472, 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76874-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76874-6)>.

LUBELSKI, J.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology*

Reviews, v. 71, n. 3, p. 463–476, 2007.

LUU, R. A. *et al.* Delayed Expansion and Contraction of CD8 + T Cell Response during Infection with Virulent *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 3, p. 1516–1525, 2006.

MANDAL, S.; DEBMANDAL, M.; PAL, N. K. Antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovar typhi in Kolkata, India, and in vitro experiments on effect of combined chemotherapy. *The Scientific World Journal*, v. 2012, n. ii, 2012.

MARCOBAL, A. *et al.* 2013 - A refined palate Bacterial consumption of host glycans in the gut - 9p..pdf. *Glycobiology*, v. 23, n. 9, p. 1038–1046, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/glycob/cwt040>>.

MARQUES, A. L. A. *et al.* Surto de salmonelose pelo sorovar Dublin em bezerros no Maranhão. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 33, n. 8, p. 983–988, 2013.

MARTINEZ, J. L. *et al.* Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 33, n. 2, p. 430–449, 2009.

MCSORLEY, S. J.; JENKINS, M. K. Antibody is required for protection against virulent but not attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 6, p. 3344–3348, 2000.

MEAKINS, S. *et al.* Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000–2004: A report from the Enter-net international surveillance network. *Microbial Drug Resistance*, v. 14, n. 1, p. 31–35, 2008.

MOAL, V. L. L.; SERVIN, A. L. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms : Mucins , Antimicrobial ... The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms : Mucins , Antimicrobial Peptides ,. v. 19, n. May 2006, p. 315–337, 2017.

MONACK, D. M.; MUELLER, A.; FALKOW, S. Persistent bacterial infections: The interface of the pathogen and the host immune system. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 9, p. 747–765, 2004.

MUKTAR, Y. *et al.* Journal of Veterinary Medicine and Animal Health A review on major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method. v. 7, n. 5, p. 173–185, 2015. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/JVMAH>>.

MURRAY, P. R. *et al.* *Medical Microbiology*. 4th. ed. [S.l.]: Mosby, 2002.

NEUMANN, C. *et al.* The *Salmonella* effector protein SpvC, a phosphothreonine lyase is functional in plant cells. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. OCT, p. 1–13, 2014.

NIELSEN, L. R. Gross margin losses due to *Salmonella* Dublin infection in Danish dairy cattle herds estimated by simulation modelling. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 111, n. 1–2, p. 51–62, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.03.011>>.

NIELSEN, L. R. *et al.* *Salmonella* Dublin infection in dairy cattle: Risk factors for becoming a carrier. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 65, n. 1–2, p. 47–62, 2004.

NIELSEN, L. R. Within-herd prevalence of *Salmonella* Dublin in endemically infected dairy herds. p. 2074–2082, 2013b.

NIELSEN, L. R. *Salmonella* Dublin in cattle: Epidemiology, design and evaluation of surveillance and

eradication programmes. 2013. 398 f. university of copenhagen, 2013.

NIELSEN, L. R. *Salmonella Dublin in Dairy Cattle Use of diagnostic tests for investigation of risk factors and infection dynamics*. 2003. 209 f. The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, 2003.

PEREIRA, R. N.; ÁVILA, F. A.; FERNANDES, S. A. Estudo Do Perfil Epidemiológico Da Salmonelose Em Bezerros E Da Sensibilidade a Antimicrobianos Na Região De Ribeirão Preto – Sp , Brasil. v. 20, p. 62–66, 2004.

PIDDOCK, L. J.V. *Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria*. *Clinical Microbiology Reviews*. [S.l: s.n.]. , 2006

MILLS, J. A. P.; LIU, J.; HOUP, E. R. New concepts in diagnostics for infectious diarrhea. *Mucosal Immunology*, v. 6, n. 5, p. 876–885, 2013.

PLYM FORSHELL, L.; WIERUP, M. Salmonella contamination: A significant challenge to the global marketing of animal food products. *OIE Revue Scientifique et Technique*, v. 25, n. 2, p. 541–554, 2006.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, v. 39, n. 3, p. 162–176, 2007.

POPPE, C. *et al.* Salmonella typhimurium DT104: A virulent and drug-resistant pathogen. *Canadian Veterinary Journal*, v. 39, n. 9, p. 559–565, 1998.

PRIETO, A. I.; MORALES, F. R.; CASADESÚS, J. Repair of DNA damage induced by bile salts in Salmonella enterica. *Genetics*, v. 174, n. 2, p. 575–584, 2006.

MORALES, F. R.; PRIETO, A. I.; BEUZO, C. R. Role for Salmonella enterica Enterobacterial Common Antigen in Bile Resistance and Virulence. *Microbiology*, v. 185, n. 17, p. 5328–5332, 2003. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=181002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

RAMOS, C. P. *et al.* Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of salmonella serovar ndolo isolated from outbreaks in cattle and horses. *Ciencia Rural*, v. 48, n. 12, p. 1–7, 2018.

RAMOS, C. P. *et al.* Identification and characterization of escherichia coli, salmonella spp., clostridium perfringens, and c. difficile isolates from reptiles in brazil. *BioMed Research International*, v. 2019, 2019.

REDGRAVE, L. S. *et al.* Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, v. 22, n. 8, p. 438–445, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>>.

REYGAERT, W. aureus (MRSA): Molecular Aspects of Antimicrobial Resistance and Virulence. *CLINICAL LABORATORY SCIENCE*, v. 22, n. 2, p. 115–119, 2009.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018.

RIQUELME, S. A.; BUENO, S. M.; KALERGIS, A. M. IgG keeps virulent Salmonella from evading dendritic cell uptake. *Immunology*, v. 136, n. 3, p. 291–305, 2012.

RIVA, R.; KORHONEN, T. K.; MERI, S. The outer membrane protease PgtE of Salmonella enterica

interferes with the alternative complement pathway by cleaving factors B and H. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. FEB, p. 1–9, 2015.

RUZANTE, J. M. *et al.* Factors associated with Salmonella presence in environmental samples and bulk tank milk from US dairies. *Zoonoses and Public Health*, v. 57, n. 7–8, 2010.

SHEN, P. *et al.* IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*, v. 507, n. 7492, p. 366–370, 2014.

STECHEER, B. *et al.* Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [S.l: s.n.], 2012

YAN, S. S. *et al.* An overview of Salmonella typing: Public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v. 4, n. 3, p. 189–204, 2003.

TAYLOR, R J; BURROWS, M R. The Survival Of Escherichia Coli And Salmonella Dublin In Slurry On Pasture And The Infectivity Of S . Dublin For Grazing Calves. *British Veterinary Journal*, v. 127, n. 11, p. 536–543, 1971. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)37287-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1935(17)37287-1)>.

TEAM, R Core. *A language and environment for statistical computing*. . Vienna: Foundation fo Statistical Computing. , 2018

TOBAR, J. A. *et al.* Virulent Salmonella enterica serovar typhimurium evades adaptive immunity by preventing dendritic cells from activating T cells. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 11, p. 6438–6448, 2006.

UGBOKO, H.; DE, N. Review Article Mechanisms of Antibiotic resistance in Salmonella typhi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 3, n. 12, p. 461–476, 2014.

UGRINOVIC, S. *et al.* Characterization and Development of T-Cell Immune Responses in B-Cell-Deficient (Igh-6-/-) Mice with Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 12, p. 6808–6819, 2003.

USDA. Salmonella on U.S . Dairy Operations: Prevalence and Antimicrobial Drug Susceptibility. *APHIS Veterinary Services*, n. October, 2005.

VAESSEN, M. A. *et al.* Risk factors for salmonella dublin infection on dairy farms. *Veterinary Quarterly*, v. 20, n. 3, p. 97–99, 1998.

VAN ACKER, H.; VAN DIJCK, P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology*, v. 22, n. 6, p. 326–333, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.001>>.

VAN SCHAIK, G. *et al.* Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: A cohort study. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 54, n. 3, p. 279–289, 2002.

VEDANTAM, G. *et al.* Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 1, p. 88–93, 1998.

VELING, J. *et al.* Risk factors for clinical Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium infection on Dutch dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 54, n. 2, p. 157–168, 2002.

VILELA, F. P. *et al.* High similarity and high frequency of virulence genes among Salmonella Dublin strains isolated over a 33-year period in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 497–

509, 2020.

WATSON, K. G.; HOLDEN, D. W. Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella* in vivo. *Cellular Microbiology*, v. 12, n. 10, p. 1389–1397, 2010.

WEDDERKOPP, A.; STRØGER, U.; LIND, P. *Salmonella* dublin in Danish Dairy Herds: Frequency of Change to Positive Serological Status in Bulk Tank Milk ELISA in Relation to Serostatus of Neighbouring Farms. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 42, n. 2, p. 295–302, 2001.

WILLEY, J.; SHERWOOD, L.; WOLVERTON, C. *Prescott's Microbiology*. 9. ed. New York: McGraw-Hill, 2013.

WRAY, C *et al.* The epidemiology of salmonella infection of calves : the role of dealers. p. 295–305, 1990.

ZAKI, Syed Ahmed; KARANDE, Sunil. Multidrug-resistant typhoid fever: A review. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 5, n. 5, p. 324–337, 2011.

ANEXO**1. Certificado do projeto na comissão de ética no uso de animais/ UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 176/2019

Título do projeto: Estudo Epidemiológico da *Salmonella* spp. em fazenda leiteira

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Antonio Último de Carvalho

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 07/10/2019. Validade: 07/10/2019 à 06/10/2024

Belo Horizonte, 07/10/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br