

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

VINICIUS BUIATTE DE ANDRADE ALVES

**Detecção de *Enterobacteriaceae* e avaliação do perfil de resistência  
aos antimicrobianos de cepas isoladas a partir de fluido oral de  
suínos**

---

Pirassununga

2020



VINICIUS BUIATTE DE ANDRADE ALVES

**Detecção de *Enterobacteriaceae* e avaliação do perfil de resistência aos antimicrobianos de cepas isoladas a partir de fluido oral de suínos**

**“Versão corrigida”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Mestrado em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientadora: Profa. Dra. Vera Letticie de Azevedo Ruiz

---

Pirassununga

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474d      Alves, Vinicius Buiatte de Andrade  
            Detecção de Enterobacteriaceae e avaliação do  
perfil de resistência aos antimicrobianos de cepas  
isoladas a partir de fluido oral de suínos /  
Vinicius Buiatte de Andrade Alves ; orientadora  
Vera Letticie de Azevedo Ruiz. -- Pirassununga,  
2020.  
            57 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação  
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e  
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Suínos. 2. Fluido orgânico animal. 3.  
Enterobacteriaceae. 4. Antibióticos. I. Ruiz, Vera  
Letticie de Azevedo, orient. II. Título.

VINICIUS BUIATTE DE ANDRADE ALVES

**Detecção de *Enterobacteriaceae* e avaliação do perfil de resistência aos antimicrobianos de cepas isoladas a partir de fluido oral de suínos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Mestrado em Biociência Animal.

**Data de aprovação:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Vera Letticie de Azevedo Ruiz

Instituição: FZEA/USP \_\_\_\_\_

Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Robson Carlos Antunes

Instituição: FAMEV/UFU \_\_\_\_\_

Dra. Maria Nazaré Torres Simões Lisboa

Instituição: CONSUIEC \_\_\_\_\_



## AGRADECIMENTOS

Agradeço à todos que contribuíram para a minha construção como profissional e ser humano. O mestrado foi um divisor de águas na minha vida e que me fez ter momentos inimagináveis. Foi tempo de crescimento, amadurecimento e de certeza de estar no caminho certo.

Agradeço à minha família que sempre me apoiou e incentivou a seguir uma carreira acadêmica. Pelo amor e pela paciência em muitas vezes ter que me apoiar financeiramente e emocionalmente. Nas vezes que pensei que tudo isso seria obsoleto, eu lembrava que de alguma forma eu estava atingindo meus sonhos e aos seus também.

À minha mestra, Profa Dra. Letticie, por ter me proporcionado a melhor experiência que já tive profissionalmente. Por ter me ensinado muito além da técnica, me apresentado a ética, a sabedoria, a determinação e a paixão por fazer algo que gosta. Obrigado por ter me aceitado como seu aluno e amigo, e espero um dia poder retribuir de alguma forma tudo aquilo que aprendi com você.

Aos meus amigos que tanto me apoiaram durante todo esse tempo. Obrigado pelas viagens, pelas visitas, pelos jantares. Obrigado por estarem nos melhores e piores momentos, e principalmente, por terem me incentivado a seguir em frente, mesmo quando tudo parecia muito difícil.

Agradeço imensamente aos meus colegas de pós-graduação da USP que me ajudaram a passar por todo o processo. Obrigado pelos almoços no “bandex”, seminários intermináveis e companhia de aulas e palestras.

Agradeço à todos os colegas de laboratório, em especial, a Dra. Andreia que tanto me ajudou com os experimentos, conselhos e “terapias” nas nossas intermináveis tardes de quarta-feira. Obrigado pelo carinho, pelos churrascos e pela diversão de trabalhar em um grupo tão divertido.

Agradeço à Profa. Dra. Ana Maria, por ter me ajudado em tantos pontos do meu mestrado, me aconselhando e motivando. Obrigado pelos queijos, doces de leite, cafés e bate-papo nos momentos de descontração.

Agradeço à todas as pessoas que fizeram parte nestes dois anos que estive em Pirassununga. Sou grato por ter dividido um dos mais importantes da minha vida com vocês.

Agradeço aos meus alunos, que me ensinaram muito mais do que eu pude ensinar. Obrigado por terem feito parte da minha história e me apoiado durante esse tempo. As minhas aulas com vocês eram um momento de descontração e diversão. Toda a experiência que tive nessa aventura me fez acreditar ainda mais na possibilidade de um dia ser professor.

Agradeço à CAPES e à FAPESP por terem proporcionado os recursos financeiros que foram tão importantes para o desenvolvimento deste trabalho e dos muitos outros que serão realizados. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto 2017/22184-7.

Agradeço a todos os colaboradores e proprietários das fazendas que pude conduzir meus experimentos. Vocês contribuíram igualmente para o meu desenvolvimento, quanto também para a suinocultura brasileira.

Agradeço aos animais que foram utilizados nessa pesquisa, e que todo procedimento, por menos invasivo que tenha sido, que seja convertido em melhor bem-estar animal.

Por fim, agradeço à mim, por ter persistido em um sonho que seria me tornar mestre pela Universidade de São Paulo. Por ter lutado e nunca deixado de sonhar. A FZEA/USP foi minha casa, e como todos os lugares que passei, levo um pedaço dela e deixo um pedaço de mim.

O meu muito obrigado,

Vinicius Buiatte de Andrade Alves



“Would you tell me, please, which way I ought to go from here?”

“That depends a good deal where you want to get to.”

“I don’t care where.”

“Then it doesn’t matter which way you go.”

“So long as I get somewhere!”

“Oh, you sure to do that, if only you walk long enough.”

- Lewis Carroll, Alice no País das Maravilhas



## RESUMO

ALVES, V. B. A. **Detecção de *Enterobacteriaceae* e avaliação do perfil de resistência aos antimicrobianos de cepas isoladas a partir de fluido oral de suínos.** 2020. 56 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

O monitoramento de doenças na suinocultura é muito importante para manter o bem-estar animal e aumentar a produtividade. O fluido oral tem sido apresentado como uma amostra biológica alternativa para a detecção de patógenos e anticorpos. Apesar de muitos estudos descreverem o uso dessa amostra para detecção de agentes virais, pouco tem sido aplicado para o monitoramento de doenças bacterianas de importância na saúde pública. Este trabalho avaliou o isolamento de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* através do fluido oral de suínos, assim como avaliou o perfil de resistência das cepas isoladas e a presença de genes de toxinas de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), em cinco granjas comerciais de ciclo completo do Estado de São Paulo. Não houve resultados de isolamento de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* através dos protocolos de cultura, assim como não houve detecção de genes de *Salmonella* spp. por PCR convencional. Não houve diferença entre os isolamentos de *E. coli* realizados através de fezes e fluido oral ( $P>0,05$ ), e os mesmos obtiveram resistência à antimicrobianos importantes para a saúde humana. Sugere-se assim que o fluido oral possa ser utilizado como amostra biológica para a monitoria sanitária de *E. coli*, e ressalta-se a importância do monitoramento do perfil de resistência de cepas isoladas como indicadores do impacto do uso de antimicrobianos nas produções animais.

**Palavras-chave:** Suínos, Fluido oral, Resistência bacteriana, Bem-estar.



## ABSTRACT

ALVES, V. B. A. **Detection of *Enterobacteriaceae* and evaluation of the antimicrobial resistance profile of isolated strains from swine's oral fluid.** 2020. 56 p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de Sao Paulo, Pirassununga, 2020.

The screening of diseases in swine production is very important to maintaining animal welfare and increasing productivity. The oral fluid has been shown as an alternative biological sample for detecting pathogens and antibodies. Although many studies have described the utilization of this sample for viral agents, little has been applied in monitoring bacteria diseases of public health importance. This study tested the isolation of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from pigs' oral fluid, and evaluated the antimicrobial resistance profile of the isolated strains, as well as the presence of virulence genes of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) from five swine farms in the state of Sao Paulo, Brazil. There was no isolation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* through the protocols tested, neither there was detection of *Salmonella* spp. genes through conventional PCR. There was no difference when comparing the isolation of *E. coli* from feces and oral fluid ( $P>0,05$ ), and the isolates showed resistance to important antimicrobial formulas in human health. We suggest that oral fluid can be used as a biological sample for the detection of *E. coli*, and we highlight the importance of monitoring the resistance of isolated strains as an indicator of antimicrobial usage in animal husbandry.

**Keywords:** Swine, Oral fluid, Antimicrobial resistance, Welfare.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de isolados de <i>Escherichia coli</i> por propriedade e tipo de amostra coletada.....	34
Tabela 2. Proporção de isolados classificados como resistentes e intermediários no teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	35
Tabela 3. Médias de resistência e de resistência intermediária por isolado de <i>E. coli</i> em cinco propriedades do Estado de São Paulo.....	36
Tabela 4. Resultados das reações de PCR em tempo real (Ct) para os genes pesquisados.....	37
Tabela 5. Presença de genes de toxinas detectadas através de PCR em tempo real considerando a baia de alojamento dos animais.....	38
Tabela 6. Bactérias isoladas a partir de fluido oral e fezes.....	39





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gráfico de detecção (Ct) dos genes de fatores de virulência de *E. coli*. ....36
- Figura 2. Gel de agarose corado com SYBR safe™ com produtos de amplificação da reação de PCR para detecção de *Salmonella* spp.....38



## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. O cenário da produção de suínos no Brasil e no mundo.....	12
2.2. <i>Escherichia coli</i> e o impacto na cadeia produtiva de suínos.....	13
2.3. <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> .....	17
2.4. Resistência aos antimicrobianos e seus impactos em saúde pública .....	20
2.5. A relação da suinocultura com a resistência aos antimicrobianos.....	22
2.6. Utilização do fluído oral como amostra biológica alternativa .....	24
3. OBJETIVOS .....	26
3.1. Objetivo Geral.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
4.1. Animais selecionados.....	28
4.2. Coleta das amostras.....	28
4.3. Cultura microbiológica .....	28
4.3.1. Protocolo para isolamento de <i>E. coli</i> .....	29
4.3.2. Protocolo para isolamento de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> .....	29
4.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos importantes para bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	30
4.5. PCR convencional para detecção de <i>Salmonella</i> spp. ....	30
4.5.1. Amostras.....	30
4.5.2. Extração.....	30
4.5.3. Reação em cadeia pela polimerase.....	31
4.5.4. Eletroforese.....	31

4.6.	PCR em tempo real para detecção de genes de fatores de virulência de <i>E. coli</i>	31
4.6.1.	Extração.....	32
4.6.2.	PCR em tempo real para amplificação de genes de fatores de virulência de <i>E. coli</i>	32
4.7.	Análise estatística.....	33
5.	RESULTADOS.....	34
6.	DISCUSSÃO.....	40
7.	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) fazem com que milhares de pessoas adoçam todos os dias no mundo todo, causando mortes e gerando impactos econômicos. A apresentação clínica mais comum são as enterites causadas, principalmente, por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e a *Escherichia coli*.

As bactérias pertencentes a esta família são comumente encontradas no trato gastrointestinal da maioria dos animais e podem ser transmitidas aos seres humanos pela via oral, através de água e alimentos contaminados. Além disso, muitas cepas possuem fatores de virulência que são responsáveis pelo aparecimento dos sinais clínicos e fatores de resistência aos antimicrobianos, o que representa um risco iminente para a saúde pública.

Com um mundo cada vez mais populoso e globalizado, onde há maior circulação de pessoas, é importante que as questões ligadas à saúde sejam observadas conjuntamente. O termo Saúde Única surgiu com o intuito de estimular o entendimento de que a saúde pública é um conceito que vai além da saúde humana. Portanto, todos os setores participantes, como, saúde humana, animal, agricultura e meio ambiente devem trabalhar juntos na erradicação de doenças, e consequentemente, proporcionar melhores condições de saúde para todos.

Para isso, é importante que as áreas consideradas elos entre a saúde animal, humana e ambiental sejam tratadas de forma igualmente necessária. A garantia de alimentos saudáveis e seguros, combate às doenças zoonóticas e a conscientização sobre o uso de antimicrobianos fazem parte dessa linha de planejamento.

A produção de suínos tem crescido em muitos países, e atualmente, é o principal produto de origem animal comercializado no mundo. O aumento da demanda fez com que o setor se desenvolvesse tecnicamente de forma a aumentar a produtividade de seus rebanhos. Com uma densidade animal cada vez maior, há também o desafio de manter o plantel saudável de forma a preservar o bem-estar animal e aumentar a lucratividade do negócio.

O fluido oral dos suínos tem sido apresentado como uma amostra biológica alternativa para busca de patógenos e anticorpos, que por ser pouco invasiva, preserva o bem-estar animal no momento da coleta. Essa amostra biológica tem

sido muito utilizada no monitoramento de doenças viriais, mas pouco tem sido aplicado para doenças bacterianas.

Diante deste cenário, considera-se importante a utilização do fluido oral como amostra biológica para busca de agentes bacterianos relevantes na suinocultura e na saúde pública. É fundamental que se faça o monitoramento desses patógenos e de seus perfis de resistência, a fim de promover uma avaliação precoce de potencial contaminação de carcaças e controle dos níveis de resistência aos antimicrobianos, aspectos que representam risco para a saúde pública.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O cenário da produção de suínos no Brasil e no mundo

A carne suína é o principal produto de origem animal produzido no mundo. Desde a década de 60, houve uma mudança na demanda de carne pela população mundial. Nesta época, a carne bovina era a mais consumida, seguida pela carne suína e de frango. A demanda mundial mudou com o decorrer dos anos, e atualmente, a carne suína lidera a produção, seguida da carne de frango, e deixando a carne bovina em terceiro lugar (MARTINS; FILHO; TALAMINI, 2018).

No Brasil, esse cenário difere do que ocorre no mundo. Nos anos 2000 a carne bovina liderava a produção, seguida da carne de frango e da carne suína, em terceiro lugar. A produção de carne de frango saltou para o primeiro lugar em 2007 e desde então manteve sua liderança, seguida da carne bovina e suína (MARTINS; FILHO; TALAMINI, 2018).

O Brasil segue como o quarto maior produtor de carne suína no mundo em 2020. Esse ranking é liderado pela China, seguido da União Européia e Estados Unidos. Em 2019, o Brasil havia produzido 3,97 milhões de toneladas de carne. A previsão para 2020 era de que essa produção tivesse um aumento de 4,33%. Entretanto, com a emergência da Covid-19, houve uma queda abrupta da demanda por proteína animal no mundo todo, ocasionada pelas incertezas econômicas, fechamento de restaurantes, queda do turismo, dentre vários outros fatores (USDA, 2020). Do total produzido, 19% em média são destinados para a exportação. A partir de 2018, a Rússia, que era até então o maior importador do produto brasileiro, interrompeu sua demanda alegando a presença de ractopamina na carne. Essa demanda acabou sendo canalizada para a China, que havia perdido uma parte considerável de sua produção pela emergência da Peste Suína Africana no país (MARTINS; FILHO; TALAMINI, 2018). Esses fatores levaram o Brasil a bater o recorde de exportações em 2019, e cerca de 1,597 bilhões de dólares foram faturados. Dentre todos esses acontecimentos, a alta do dólar também colaborou para o aumento das exportações.

Em 2018, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os estados brasileiros com maior produção de suínos eram Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, respectivamente. O estado de São

Paulo encontrava-se em sexto lugar nesta classificação e produziu naquele ano 183 mil toneladas de carne (MAPA, 2020).

A principal forma de consumo de carne suína no Brasil ainda é através de produtos industrializados. O consumo per capita atingiu 15,9 kg, e coloca o Brasil em quinto lugar na classificação mundial dos países que mais consomem carne suína (ABPA, 2019).

Parte da população brasileira ainda acredita em alguns mitos em relação à carne suína, como sendo uma carne não saudável, ou de ter menos qualidade. Atualmente, o setor produtivo investe em várias ações que visam uma melhora da percepção do produto pelos consumidores, com divulgação de receitas culinárias, aumento da variedade e disponibilidade de produtos e campanhas de conscientização acerca de suas qualidades nutricionais e sanitárias (THOMS et al., 2010; MARTINS; FILHO; TALAMINI, 2018).

O consumo de carne possui uma correlação positiva com a renda média dos consumidores. Devido aos maiores custos de produção e comercialização, a carne é um produto mais caro quando comparada a outros produtos. Apesar da carne suína ser competitiva no mercado, a demanda por carnes em geral tende a diminuir em momentos de crise (ABCS, 2016).

Além dos impactos econômicos gerados por fatores de mercado, existem também aqueles causados ao longo do processo produtivo. Nas granjas de produção, o controle sanitário é fundamental para alcançar resultados positivos. Dentre as várias doenças que acometem os suínos, as doenças entéricas, causadas por agentes como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*, levam a inúmeras perdas produtivas e econômicas devido aos gastos com tratamento, aumento de mortalidade, perdas em índices zootécnicos, além de colocar em risco a segurança dos alimentos (CIACCI ZANELLA; MORÉS; BARCELLOS, 2016).

## **2.2. *Escherichia coli* e o impacto na cadeia produtiva de suínos**

Dentre as doenças que impactam a suinocultura, as infecções causadas por *E. coli* representam grandes perdas econômicas no mundo todo. Os prejuízos ocorrem, principalmente, pelo aumento de mortalidade de animais em fase de maternidade e creche, diminuição dos índices produtivos e aumento dos custos de produção com vacinas e medicamentos para tratamento (LUPPI, 2017).



Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, a *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, de aproximadamente 1,0 micrômetro, anaeróbio facultativo, que possui flagelos e fímbrias, importantes para sua colonização no epitélio intestinal e o estabelecimento dos sinais clínicos. A maioria dessas bactérias são comensais e abundantes no trato gastrointestinal dos animais. Entretanto, muitas possuem fatores de virulência que são responsáveis por causar danos ao hospedeiro, levando ao desenvolvimento de diferentes quadros clínicos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As cepas de *E. coli* podem ser identificadas através de teste de soroaglutinação para detecção de antígenos de superfície (O), de fímbrias (F), flagelos (H) e também antígenos capsulares (K). Entretanto, devido à limitação da detecção dos soros disponíveis no mercado, esse tipo de diagnóstico tem sido substituído por ferramentas de biologia molecular, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), para detecção de genes de virulência. Através da identificação de alguns genes é possível caracterizar a forma com que a doença se apresenta e classificar as cepas em tipos patogênicos (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019).

Os patótipos são determinados por genes de virulência e podem ser classificados em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada à meningite (MNEC), *E. coli* patogênica para aves (APEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (NATARO; KAPER, 1998; MOBLEY, 2004; FAIRBROTHER; NADEAU, 2019).

As apresentações clínicas dependem do tipo patogênico envolvido, de fatores ambientais e também do hospedeiro. As formas mais comuns são quadros clínicos entéricos, caracterizados por diarreias, assim como sepses, infecções urinárias e meningites (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As principais cepas que acometem os suínos pertencem ao grupo ETEC. Esse grupo foi primeiramente descrito nestes animais e podem causar quadros de diarreia severa nas fases de maternidade e creche. As cepas pertencentes a este grupo conseguem aderir à superfície apical dos enterócitos do intestino delgado através de suas fímbrias e produzem toxinas que levam a apresentação dos quadros de diarreia (NATARO; KAPER, 1998; LUPPI, 2017). A presença das fímbrias pode

ser utilizada para determinação sorológica. Atualmente, 25 fímbrias já foram descritas e as principais encontradas em suínos com quadros clínicos na maternidade e creche são F4, F5, F6, F18 e F41 (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019; WANG et al., 2019).

As toxinas produzidas por esse tipo patogênico determinam a virulência da cepa, e são responsáveis pelo estabelecimento da infecção e do desenvolvimento dos quadros clínicos observados. As principais toxinas produzidas por esse grupo são: as toxinas termo-lábeis (LT) e as termoestáveis (ST) (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019).

De acordo com o código genético e a capacidade de induzir resposta imune, as toxinas LT podem ser classificadas em dois tipos: LT-I e LT-II (DUAN et al., 2019). As toxinas LT tipo II ainda possuem três variações (IIa, IIb e IIc) e tem sido mais descritas em diarreias de bezerros (WANG et al., 2019). Foi demonstrado em experimentos realizados com leitões, que essas toxinas são importantes para o estabelecimento da colonização das bactérias no intestino (ZHANG et al., 2006). Isso ocorre por um complexo de interferências causadas pelas toxinas LT na camada mucosa do epitélio intestinal e que pode inclusive aumentar a susceptibilidade dos animais a infecções por *Salmonella enterica* (VERBRUGGHE et al., 2015; DUAN et al., 2019).

Assim como as toxinas LT, as toxinas ST também possuem uma importante função no estabelecimento da infecção e no desenvolvimento dos quadros clínicos. Elas podem ser classificadas em STa e STb, o que é importante para o entendimento epidemiológico dos achados clínicos. A proteína STa é codificada pelo gene plasmidial estA, e está mais relacionada com o desenvolvimento de quadros clínicos de diarreia em leitões recém-nascidos, que caracteriza a diarreia neonatal. A toxina STb, codificada pelo gene estB, tem maior relação com os quadros clínicos observados em leitões de creche, e causa a diarreia pós-desmame. Esses peptídeos são capazes de se ligar em receptores da borda ciliar do epitélio do intestino delgado e causar um distúrbio eletrolítico, que tem como resultado o desenvolvimento do quadro de diarreia (WANG et al., 2019).

Além das ETEC, as cepas pertencentes ao grupo de *E. coli* produtoras de toxina do tipo Shiga (STEC) são importantes na suinocultura. Elas produzem toxinas Shiga (Stx), também conhecidas como Verotoxinas (VT). Estas causam quadros clínicos importantes tanto para os animais, quanto para os humanos. Nos suínos,

essas cepas produzem a toxina Stx2e, responsável por causar a doença do edema. O desenvolvimento dessa doença ocorre quando a toxina é liberada no sistema circulatório e danifica a parede do endotélio vascular, resultando em extravasamento de líquidos. Diferente dos outros grupos, as STEC não causam diarreia. Os principais sinais clínicos, quando observados, são: inapetência, edema na região dos olhos e cabeça, edema subcutâneo, sinais clínicos nervosos, prurido e morte súbita (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019).

Sabe-se que as cepas patogênicas de *E. coli* possuem a capacidade de transferir fatores de virulência de forma horizontal. As cepas possuem ilhas genômicas compostas pelos genes responsáveis pela expressão dos fatores de virulência e podem ser compartilhadas entre diferentes bactérias presentes no organismo animal ou no ambiente. Assim, uma mesma cepa de *E. coli* pode produzir mais de um tipo de toxina conforme ocorrem esses compartilhamentos. (ELSAS et al., 2011).

As cepas patogênicas de *E. coli* tem presença cosmopolita e causam problemas sanitários para suinocultores no mundo todo. Elas tem como principal habitat o sistema gastrointestinal dos animais, mas podem ser encontradas em ambientes contaminados, solo e água (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019).

Assim, quando presente no hospedeiro, a *E. coli* consegue sobreviver ao baixo pH estomacal, condições intestinais inóspitas e competição por nutrientes com outras bactérias da microbiota. No ambiente, elas se adaptam a diferentes temperaturas, disponibilidade de nutrientes, variações de oxigênio e pH. Essa capacidade fisiológica de adaptação faz com que a *E. coli* seja persistente no ambiente, e consiga contaminar o solo, água, e até mesmo plantas, fazendo com que o problema que ela causa em saúde pública não seja estritamente relacionado com o consumo de produtos de origem animal (ELSAS et al., 2011).

A prevenção é importante para o controle das infecções por *E. coli*. A execução de medidas profiláticas e práticas de manejo que visem diminuir o estresse causado nos animais podem se mostrar eficazes no controle de doenças no plantel. O vazio sanitário é uma medida que facilita o manejo correto de limpeza e desinfecção das instalações e dos sistemas de alimentação. Essas medidas, quando executadas com seriedade, são muito importantes para o controle das doenças causadas por *E. coli* e por outros agentes (FAIRBROTHER; NADEAU, 2019).

A vacinação para ETEC tem sido um tópico muito pesquisado e a eficácia diverge em alguns estudos. Para que haja uma proteção segura, é ideal que as vacinas desenvolvidas permitam que o animal estabeleça uma resposta de imunoglobulinas A (IgA) efetiva no intestino, especialmente nos tecidos linfáticos associados ao intestino (GALT). Entretanto, as vacinas desenvolvidas até o momento não são capazes de desenvolver proteção para todos os tipos de toxinas produzidas por ETEC, devido às diferenças na resposta imune às diferentes fímbrias. A via de administração e a idade correta para vacinação também são pontos importantes a serem observados e que muitas vezes são limitantes para a eficácia da vacina (MELKEBEEK; GODDEERIS; COX, 2013).

O controle de infecções por *E. coli* é muito importante na suinocultura industrial, pois esta pode levar a grandes perdas econômicas por impactar diretamente leitões em fase de maternidade e creche. Além disso, a *E. coli* é importante para saúde pública, pois algumas cepas são capazes de causar quadros clínicos sérios em humanos. Assim, é importante realizar o diagnóstico correto das cepas envolvidas, para que se faça um controle e prevenção eficazes no plantel a fim de diminuir os riscos para os animais e para os humanos.

### **2.3. *Salmonella enterica* subsp. *enterica***

Todos os anos cerca de 550 milhões de pessoas, incluindo 220 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade, adoecem após ingestão de alimentos contaminados, e cerca de 230.000 morrem (WHO, 2018). As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são caracterizadas por gerar quadros de enterites e representam riscos para crianças, idosos e pessoas imunossuprimidas. Dentre os principais agentes infecciosos envolvidos nas DTA, a *Salmonella enterica* é um dos mais importantes, e também causa problemas na suinocultura industrial (GRIFFITH; CARLSON; KRULL, 2019).

Por serem bactérias abundantes no trato gastrointestinal dos animais, a maioria das infecções em seres humanos são derivadas de água contaminada ou ingestão de alimentos de origem animal contaminados (MILLER; PEGUES, 2000), o que a torna uma das principais causas de DTA no mundo (LYNCH et al., 2018).

No Brasil, a *Salmonella enterica* representa cerca de 35% dos casos de surtos de DTA, em dados registrados de 2000 a 2017. Entretanto, a falta de

diagnóstico e investigação epidemiológica nos surtos faz com que mais de 46% dos casos não tenham identificação do alimento envolvido ou do agente responsável pela infecção (BRASIL, 2018).

Dentre os alimentos envolvidos na transmissão de doenças, a carne suína tem sido considerada uma importante fonte de infecção de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* para humanos, sendo a segunda maior em vários países da UE (HAUSER et al., 2010). No Brasil, 0,81% dos casos de DTA são de origem suína. Entretanto, os dados podem não representar a realidade, pois há falta de investigação da maioria dos surtos (BRASIL, 2018).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria Gram-negativa, na forma de bacilo não-esporulado, com flagelos e fímbrias, anaeróbia facultativa, catalase positiva e oxidase negativa (MOXLEY, 2013). Atualmente, essa bactéria é classificada em duas espécies: *S. enterica*, constituída de seis subespécies, com mais de 2.600 sorovares e *S. bongori*, constituída de dezoito sorovares (GRIMONT; WEILL, 2007; RYAN; DWYER; ADLEY, 2017)

Dentre os diferentes sorovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, os principais envolvidos nas infecções adquiridas pelos suínos são a *S. Typhimurium* e a *S. Choleraesuis* (SCHWARZ et al., 2009). O sorovar *Typhimurium* não é espécie-específico e pode estar relacionado com os casos de enterocolites nos suínos. Já o sorovar *Choleraesuis* é adaptado ao hospedeiro e desenvolve doença grave nos suínos devido a septicemia (KICH; MENEGUZZI; REICHEN, 2017).

A *S. Typhimurium* é um sorovar não-tifóide presente no mundo todo e está entre os principais envolvidos nas DTA (SCALLAN et al., 2011). Este sorovar é constantemente isolado de suínos, logo, o controle feito dentro das unidades produtoras deve ser realizado não somente para evitar sinais clínicos ocasionados nos animais, como também para prevenção dos trabalhadores e dos consumidores que podem ser infectados (GRIFFITH; CARLSON; KRULL, 2019).

Com menor frequência, a *S. Choleraesuis* tem sido relatada como agente causador de doença em humanos (GRIFFITH; CARLSON; KRULL, 2019). Há relatos do envolvimento desse sorovar com quadros clínicos entéricos e extra-intestinais e sua ocorrência tem sido relacionada com o consumo de carne suína, principalmente em grupos populacionais que tem hábito cultural de comer carne malcozida, como os asiáticos (VUGIA et al., 2004; SUGIMOTO et al., 2017).

Nos suínos, parte das infecções por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* são consideradas assintomáticas, pois há limitação dos tecidos que são infectados e os hospedeiros adquirem a condição de portador após a recuperação dos sinais clínicos, quando existentes (WALES; COOK; DAVIES, 2011).

A infecção ou contaminação pode ocorrer em qualquer ponto da produção dos suínos, desde a criação até o abate e processamento dos produtos dentro da indústria (ARGUELLO et al., 2013). Porém, existe uma forte associação entre a contaminação de carne com a alta soroprevalência de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* nas granjas de produção (BAPTISTA; DAHL; NIELSEN, 2010).

A apresentação clínica da doença pode ocorrer, principalmente, em animais em fase de creche com 21 a 70 dias de idade e com maior ocorrência em animais acima de oito semanas de vida (VANUCCI et al., 2014).

Nos suínos, os principais sinais clínicos causados por *S. Typhimurium* são diarreia autolimitante, que persiste por até sete dias, febre, inapetência e desidratação. Em alguns casos o quadro entérico pode se agravar e os animais apresentarem diarreia mucoide com presença de sangue. Pode não haver um aumento expressivo de mortalidade, porém, muitos animais podem adquirir estado de portador e transmitir a bactéria através das fezes pelo período de até cinco meses (GRIFFITH; CARLSON; KRULL, 2019).

O sorovar *Choleraesuis* acomete, principalmente, animais jovens com menos de cinco meses de vida, e tem como principal quadro clínico a septicemia, que pode ocasionar lesões necróticas nos intestinos, danos hepáticos, pneumonias e danos vasculares cerebrais. É comum observar animais febris, com problemas respiratórios, além de extremidades cianóticas, e aumento da mortalidade (SHIM et al., 2016; GRIFFITH; CARLSON; KRULL, 2019).

Para o diagnóstico de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, o teste de referência é a cultura e identificação através de amostras biológicas, mais frequentemente, de fezes, e comparação com outros achados clínicos ou de necropsia. Apesar dos protocolos de cultura serem altamente específicos, a sensibilidade pode variar devido as diferenças de protocolos, tipo de amostra utilizada, população pesquisada, dentre outros fatores (WILKINS et al., 2010). Testes de ELISA e PCR também podem ser utilizados, mas seus resultados devem ser cuidadosamente interpretados, pois a sensibilidade e a especificidade podem variar (GRIFFITH; CARLSON; KRULL, 2019).

A vacinação tem sido considerada eficiente e segura, apesar das variações encontradas na literatura. É desejável que as vacinas sejam capazes de conferir imunidade duradoura tanto celular quanto humoral, através da produção de anticorpos IgA. Cerca de 76% dos estudos são realizados com vacinas vivas e quase um terço trabalham com administração por via oral. Os principais sorovares estudados são *S. Typhimurium* e *S. Choleraesuis*, e apesar de ambos terem eficácia parecida, as vacinas inativadas são mais eficazes para *S. Choleraesuis*, visto que as mesmas conferem melhor imunidade humoral, e esse sorovar está mais relacionado em quadros de septicemia (CRUZ et al., 2017).

O tratamento dos animais acometidos visa diminuir a severidade dos sinais clínicos e evitar a transmissão e recorrência da doença. Como a *Salmonella enterica* é intracelular facultativa, o tratamento com antibióticos pode ser desafiador, já que ela tem habilidade de se resguardar da ação desses antibióticos dentro das células. É recomendável que testes de sensibilidade aos antimicrobianos sejam feitos para escolha do tratamento correto, mesmo que esse tratamento já tenha sido iniciado. Dessa forma, os profissionais de campo contribuem para diminuição da resistência a antimicrobianos importantes tanto na suinocultura, quanto para a saúde pública (GRIFFITH; CARLSON; KRULL, 2019).

Apesar de ser muito questionado, o uso de antimicrobianos para profilaxia através da ração tem sido utilizado e mostrado eficácia para o controle de *Salmonella* spp. e outras bactérias (WELLS et al., 2012). Entretanto, medidas de biossegurança orientadas no controle e prevenção dos focos de infecção, como limpeza e desinfecção das instalações, separação de animais doentes e hígidos e melhoria do bem-estar animal, são consideradas as mais eficazes para mitigar a doença e prevenir recorrências (REIS; REIS, 2014).

#### **2.4. Resistência aos antimicrobianos e seu impacto em saúde pública**

Desde a descoberta dos antibióticos, as infecções causadas por bactérias passaram a ter um enfrentamento mais direto e eficaz. A penicilina foi o primeiro antibiótico descoberto em 1929 pelo biólogo Alexander Fleming, e foi extraída e isolada para uso na medicina em 1940, por um grupo de pesquisa de Oxford liderado por Howard Florey. Apesar da penicilina ser um marco de Fleming, que lhe rendeu um prêmio Nobel, os estudos feitos com as propriedades antimicrobianas

das relações entre dois ou mais microrganismos já aconteciam anos antes com pesquisas desenvolvidas por Pasteur, em 1877, e, posteriormente, com outros cientistas, que juntos basearam a descoberta que revolucionou o tratamento das doenças bacterianas (BRUNEL, 1951).

Entretanto, existem relatos que desde o período pré-histórico, os microrganismos já tinham desenvolvido habilidades de resistência que foram adquiridas através de mutações genéticas ou de transferência de plasmídeos entre as cepas resistentes e susceptíveis (PERRON et al., 2015; BRENNER; STEVENS, 2018).

A resistência aos antimicrobianos é preocupante no mundo todo e tem sido tratada como um problema de Saúde Única, pois, atualmente, entende-se que a saúde dos seres humanos, dos animais e do meio ambiente são interdependentes. Esse problema afeta negativamente tanto o tratamento das doenças, quanto os custos gerados no sistema de saúde (CDC, 2019).

Uma análise de previsão feita pela Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) relata que nos próximos 30 anos haverá cerca de 2,4 milhões de óbitos na Austrália, Estados Unidos e Europa devido a infecções causadas por microrganismos multirresistentes. Além das vidas humanas perdidas, os custos gerados com esse problema podem chegar a 3,5 bilhões de dólares todos os anos (OECD, 2018).

Estima-se que, anualmente nos Estados Unidos, mais de 2,8 milhões de pessoas são infectadas, e quase 36 mil morrem de infecções causadas por microrganismos multirresistentes (CDC, 2019). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, infecções por estes microrganismos já representam 40% a 60% das infecções. Esses números tendem a crescer até sete vezes mais até 2030, quando comparado com outros países desenvolvidos (OECD, 2018).

Isso ocorre porque a resistência aos antimicrobianos não depende apenas do uso excessivo e incorreto desses medicamentos. Fatores como, pobreza, investimento em políticas públicas de saúde, qualidade de governança, infraestrutura e educação, podem impactar o número de casos. Isso significa que ações que visem apenas a diminuição do uso de antibióticos não serão mais suficientes para conter o avanço das infecções causadas por microrganismos multirresistentes (COLLIGNON et al., 2018)



A implementação de medidas como, melhoria dos hábitos de higiene, diminuição das prescrições de antibióticos, diagnóstico diferencial para infecções bacterianas, parcimônia ao implementar antibioticoterapia, e educação em saúde para a população através dos meios midiáticos, podem poupar 1,6 milhões de vidas e 4,8 bilhões de dólares até 2030 (OECD, 2018). Além destas ações, possibilitar o acesso a água potável e de qualidade, governos mais eficientes e maiores investimentos em políticas públicas de saúde são importantes para a diminuição dessas infecções (COLLIGNON et al., 2018).

## **2.5. A relação da suinocultura com a resistência aos antimicrobianos**

Diferentes estratégias de uso de antimicrobianos na produção suína visam o controle das doenças bacterianas dentro do plantel. Essas estratégias podem ser terapêuticas, quando já existe uma infecção bacteriana em curso; metafiláticas, quando animais doentes e saudáveis de um mesmo lote recebem o tratamento; profiláticas, quando o tratamento é feito com intuito de prevenir uma infecção; e como aditivos melhoradores de desempenho, que é a utilização dos antimicrobianos na ração em subdoses, objetivando melhor desenvolvimento dos animais (AARESTRUP, 2005).

Em 2006, a União Europeia banuiu o uso de antimicrobianos como aditivos melhoradores de desempenho em todas as produções animais da comunidade europeia, além das importações de produtos que receberam estes aditivos. Entretanto, após a implementação dessas medidas, foi observado um aumento de enfermidades na produção animal e muitos cientistas divergiam em relação a real influência do uso dos antimicrobianos em animais na saúde pública (PLAIL et al., 2006).

Nos últimos anos o Brasil também tem adotado medidas que visam o uso consciente de antimicrobianos. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) implementou o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos na Agropecuária – AgroPrevine (Instrução Normativa Nº 41, 2017) que objetiva a execução de ações para o uso consciente dos antimicrobianos. Dentre as ações previstas, incluem, educação sanitária, estudos epidemiológicos e monitoramento da resistência aos antimicrobianos no Brasil.

Em 2018, o Brasil lançou o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária (PAN-BR AGRO) que terá duração de 5 anos e promoverá ações que possuem o objetivo de controlar o problema de resistência no Brasil e garantir a qualidade dos produtos agropecuários brasileiros visando a Saúde Única.

Com o problema crescente de resistência e a exigência dos mercados externos, o Brasil também tem tomado medidas mais incisivas como a proibição do uso de alguns princípios ativos de antimicrobianos como aditivos melhoradores de desempenho. Dentre eles, o sulfato de colistina (Instrução Normativa Nº 45, 2016), tilosina, lincomicina e tiamulina (Instrução Normativa Nº 1, 2020).

Como mencionado anteriormente, a resistência aos antimicrobianos pode ser adquirida através de mutações do código genético, que então é transmitida através da multiplicação bacteriana, ou horizontalmente, entre uma cepa e outra através da transferência de plasmídeos de resistência. A forma horizontal é considerada a principal via de aquisição de resistência entre as bactérias, porém o uso indiscriminado de antibióticos fez com que houvesse uma pressão e seleção maior das cepas resistentes, levando ao problema atual (WINTERSDORFF; PENDERS; NIEKERK, 2016).

Essa capacidade de transmitir plasmídeos fez com que bactérias patogênicas, comensais e ambientais pudessem trocar informações genéticas que conferiram às cepas, antes susceptíveis, resistência a antimicrobianos importantes para a saúde humana. Isso levantou a preocupação em relação ao desenvolvimento de resistência bacteriana nas produções animais, principalmente, através do uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho (HOLMES et al., 2016).

Os plasmídeos são considerados os vetores de resistência entre as bactérias. Portanto, é importante que se conheça geneticamente estes componentes bacterianos, pois, o agente, o hospedeiro, o ambiente, e a distribuição demográfica são importantes para entender a ocorrência dos plasmídeos epidêmicos. Atualmente, há descritos na literatura 28 plasmídeos de resistência pela técnica PCR-based replicon typing (PBRT) em bactérias da família *Enterobacteriaceae* (ROZWANDOWICZ et al., 2018).

Segundo uma revisão sistemática feita por Lekagul, Tangcharoensathien e Yeung (2019), uma boa parte dos antibióticos na suinocultura é utilizada para tratamento de doenças gastrointestinais. As principais classes de antibióticos

utilizadas para o tratamento dessas enfermidades são as tetracilinas, lincosamidas e os macrolídeos. Já a colistina era muito utilizada em leitões em fase de maternidade e creche.

O avanço das infecções por bactérias multirresistentes levou a uma busca por tratamentos alternativos na medicina veterinária, que possam substituir de maneira eficaz o uso de antibióticos que são importantes para a medicina humana. Muitos deles tem sido amplamente utilizados na suinocultura e em outras produções animais. Dentre eles, os tratamentos imunológicos com soro, probióticos, bacteriófagos, óleos essenciais, nutrientes, e muitos outros (GHOSH et al., 2019; KARRIKER et al., 2019)

O uso consciente dos antimicrobianos auxilia o controle de zoonoses e o combate ao problema de resistência iminente na nossa sociedade, que pode levar a complicações sem precedentes no futuro. O diagnóstico correto das enfermidades e testes de sensibilidade são ferramentas importantes para a contenção deste problema.

## **2.6. Utilização do fluido oral como amostra biológica alternativa**

Segundo Côrtes (1993), a via oral e a mucosa do aparelho digestório são definidas como portas de entrada da cadeia epidemiológica, sendo os pontos de penetração mais utilizados por agentes veiculados por alimentos. Já as fezes correspondem a uma das principais vias de eliminação.

Sendo assim, o fluido oral, composto de saliva e transudato da mucosa oral, tem sido descrito como uma amostra biológica alternativa para busca de anticorpos e microrganismos. Tem sensibilidade semelhante aos materiais biológicos tradicionais e causa menos impacto ao bem-estar animal no momento da coleta, além de ser um procedimento de fácil realização pelos técnicos (PRICKETT et al., 2008).

A coleta das amostras pode ser feita de forma representativa de um lote em uma baia ou individual (WHITE et al., 2014). A coleta em baias é usualmente realizada através da utilização de uma corda de três fios de algodão, com 1,27 cm de diâmetro e com a extremidade inferior distante 60 cm do chão da baia (WHITE et al., 2012) ou na altura da cernelha dos animais (BJUSTROM-KRAFT et al., 2018).

Os suínos, por serem animais muito curiosos, voluntariamente mascam a corda de algodão, que devido ao seu potencial absorvivo de líquidos, retém o fluido oral (OLSEN et al., 2013). Para coleta de fluido oral individual, Zanella (2015) propôs a utilização de roletes de algodão hidrofílico presos a um fio resistente, oferecidos manualmente ao animais.

A coleta pode ser realizada em qualquer fase do ciclo de produção dos suínos, desde a maternidade até a fase de terminação. Para animais que ainda estão na maternidade é recomendado que se faça uma amostra da matriz e da prole conjuntamente, pois tem-se observado maior sucesso para detecção de agentes (SEDDON; GUY; EDWARDS, 2012; WHITE et al. 2014; ALMEIDA et al., 2017; BJUSTOM-KRAFT et al., 2018).

A utilização do fluido oral já foi descrita para detecção de vários microrganismos, como o vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína (PRRSV), Influenza A, Vírus da Diarreia Epidêmica dos Suínos (PEDV), Delta Coronavírus Suíno (PDCoV), Circovírus Suíno 2 (PCV-2) e Senecavírus A (SVA). Entretanto, poucos estudos têm sido realizados para agentes bacterianos, nos quais utilizam-se ferramentas de biologia molecular, como o PCR e métodos indiretos por detecção de anticorpos (BJUSTOM-KRAFT et al., 2018; PILLMAN et al., 2019). Até o momento, não foi encontrado na literatura pesquisada estudos que tenham utilizado o fluido oral como uma amostra biológica alternativa para isolamento de bactérias patogênicas, ou que tenham determinado o perfil de bactérias presentes na amostra.

Diante disso, é importante que se façam mais investigações acerca do perfil bacteriano do fluido oral de suínos, assim como estudos que envolvam a descrição de seu microbioma, para fins de utilização dessa amostra alternativa para controle e prevenção de infecções por agentes patogênicos entéricos no rebanho suíno, com menos impacto ao bem-estar dos animais e avaliação precoce de possível contaminação de carcaça.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Identificação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* através do fluido oral de suínos em fase de creche em granjas comerciais de ciclo completo do estado de São Paulo.

#### 3.2. Objetivos específicos

- I. Comparar a detecção de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e *E. coli* em fluido oral e fezes de suínos de fase de creche em granjas comerciais de ciclo completo, através de isolamento e identificação bacteriana;
- II. Determinar fatores de virulência de *E. coli* presentes nas amostras coletadas;
- III. Avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos nos isolados bacterianos.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais selecionados

Amostras de fluido oral e fezes foram coletadas em cinco granjas de ciclo completo de produção comercial de suínos, no estado de São Paulo. Os animais selecionados estavam na fase de creche (21 a 70 dias de idade).

Para cada propriedade foram utilizados dois grupos de cinco animais, sendo que cada grupo pertencia a uma baia distinta. No total, 50 animais e 10 baias foram amostrados neste estudo. As coletas deste trabalho foram previamente aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, registrado pelo CEUA nº 9741230818.

### 4.2. Coleta das amostras

Para cada animal foram coletadas amostras em duplicata de fluido oral e fezes. Seguindo a metodologia proposta por Zanella (2015), o fluido oral foi coletado com um dispositivo composto de um rolete de algodão hidrofílico, preso a um fio resistente e previamente armazenado e esterilizado em um tubo de fundo cônico de 50 mL (tipo Falcon®). Cada animal recebia dois roletes ao mesmo tempo para mastigação voluntária durante um minuto.

A coleta das fezes era feita através da contenção do animal e massagem na região abdominal, e o material coletado diretamente em tubos de fundo cônico de 50 mL (tipo Falcon®). Após o procedimento, as amostras eram armazenadas em caixa isotérmica com gelo até a chegada ao laboratório.

### 4.3. Cultura microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP para cultura e isolamento bacteriano. As amostras foram submetidas a um protocolo de isolamento de *Salmonella enterica* subsp *enterica* e outro para isolamento de *Escherichia coli*.

#### 4.3.1. Protocolo para isolamento de *E. coli*

Para o isolamento de *E. coli*, parte das amostras de fluido oral e fezes eram inoculadas em tubos de fundo cônico de 50 mL contendo 10 mL de caldo de enriquecimento *Tryptic Soy Broth* (TSB), e incubadas por 18 a 24 horas a 37°C. Após incubação, as amostras seguiam para o plaqueamento nos ágaros MacConkey e XLD, e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas.

As colônias selecionadas como sugestivas de *E. coli* eram submetidas ao teste de oxidase e de identificação através do perfil bioquímico, com auxílio de kit comercial API 20E (BioMérieux®).

#### 4.3.2. Protocolo para isolamento de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Para o isolamento de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, foram utilizados os caldos de enriquecimento Tetrionato, Rappaport-Vassiliadis Soja e Selenito-Cistina, suplementados com solução de Novobiocina (40 mg/μL). Os caldos eram preparados segundo as instruções do fabricante e a solução de Novobiocina era preparada em laboratório de acordo com o recomendado pela ISO 6579 (2014) e Vital Álvares Pessôa e Sandoval Peixoto (1971). Após inoculação nos caldos, as amostras eram incubadas de 18 a 24 horas à 37°C para os caldos Tetrionato e Selenito-Cistina, e à 42°C para o caldo Rappaport-Vassiliadis Soja.

Após o período de incubação, as amostras eram reinoculadas nos mesmos caldos de origem, adicionando-se 1 mL da cultura em 9 mL de caldo suplementado com solução de Novobiocina (40 mg/μL).

As amostras então seguiam para a etapa de isolamento em seis ágaros: MacConkey, Verde-Brilhante, *Salmonella-Shigella*, XLD, XLT-4 e Hektoen. Por não haver um consenso na literatura sobre qual protocolo de isolamento de *Salmonella* spp. é mais eficiente, foi decidida a utilização dos principais meios descritos para diferenciação de *Salmonella* spp. de outras *Enterobacteriaceae*.

As colônias consideradas sugestivas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* eram submetidas a uma segunda etapa de diferenciação nos meios *Triple Sugar Iron* (TSI) e *Lysine Iron Agar* (LIA). Caso o resultado fosse sugestivo, as amostras seguiam para etapa de identificação final, com teste de oxidase e caracterização bioquímica através do kit comercial API 20E (BioMérieux®).



#### **4.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos importantes para bactérias da família *Enterobacteriaceae***

Todos os isolados encontrados neste estudo foram submetidos a teste de sensibilidade a antimicrobianos. O teste de difusão em ágar foi realizado no Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar da FZEA/USP, com um kit comercial (POLISENSIDISC 15 - DME®) composto de 15 discos de antimicrobianos importantes para *Enterobacteriaceae*: Amicacina, Amoxicilina/Ácido Clavulânico, Ampicilina, Aztreonam, Cefazolina, Cefepime, Cefoxitina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina, Meropenem, Sulfazotrim e Tetraciclina.

A metodologia deste kit é baseada no teste recomendado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). O procedimento para realização dos testes e a interpretação dos resultados foram realizados de acordo com o disposto no manual do fabricante.

#### **4.5. PCR convencional para detecção de *Salmonella* spp.**

##### 4.5.1. Amostras

Para detecção de gene de *Salmonella* spp. foi realizada PCR convencional da amostra composta de *pool* dos caldos de enriquecimento (Tetrionato, RVS e Selenito-Cistina) da primeira e segunda incubação de cada amostra (tempos de incubação 24 e 48 horas, respectivamente).

Além das amostras analisadas, foi utilizado como controle positivo da reação uma amostra de *Salmonella* Enteritidis (ATCC® 13076™) incubada em caldo TSB a 37°C por 24 horas. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo.

##### 4.5.2. Extração

A extração de DNA bacteriano foi realizada através de método de fervura simples. Os microtubos do tipo Eppendorf® com 1,2 mL dos caldos de enriquecimento eram colocados em banho seco a 100°C durante 10 minutos. Após o procedimento, o material era centrifugado a 13.000 g a 4°C durante cinco minutos. O

DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria (DeNovix<sup>®</sup> DS-11) antes de seguir para etapa de amplificação.

#### 4.5.3. Reação em cadeia pela polimerase

Para detecção de região gênica comum a 116 sorovares de *Salmonella* spp. (dentre os gêneros *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. houtenae*, *S. bongori* e *S. indica*), foi utilizado o protocolo adaptado de Aabo et al. (1993) e Soumet et al. (1999), no qual são indicados os oligonucleotídeos iniciadores ST11 (5'-GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA-3') e ST15 (5'-GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G-3'). A reação foi conduzida em termociclador (Veriti, Applied Biosystems<sup>®</sup>) com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 56°C para hibridização, e 30 segundos a 72°C para extensão, com extensão final a 72°C por 10 minutos.

#### 4.5.4. Eletroforese

Os produtos das amplificações foram submetidos à migração eletroforética em cuba horizontal com gel de agarose 1,5% corado com SYBR *safe*<sup>™</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>, concentração 10<sup>-3</sup>) imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,045 M Tris-Borato, 1,0 mM EDTA) a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10 V/cm de gel). O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado a padrão de tamanho molecular (100bp) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas a cada análise feita, por visualização por meio de transiluminação com luz ultravioleta.

### **4.6. PCR em tempo real para detecção de genes de fatores de virulência de *E. coli***

As amostras destinadas para cultura de *E. coli* foram analisadas para detecção de genes de fatores de virulência. Para cada baia de animais testados foi criado um *pool* dos caldos de cultura das amostras de fezes de todos animais, assim como um *pool* das culturas de amostras de fluido oral. Dessa forma, cada baia obteve duas amostras para serem analisadas sobre os fatores de virulência presentes entre os animais que ali estavam alojados.

#### 4.6.1. Extração

A extração do material genético foi realizada com o kit comercial NewGene®, seguindo todas as recomendações do fabricante. Na primeira etapa, as amostras passam por um processo de solubilização dos ácidos nucleicos com a solução tampão NewGene Prep. O material foi então colocado em banho seco durante 10 minutos a 60°C.

Após esse procedimento, o material seguia para a etapa de purificação do material genético (DNA e RNA) com o NewGene Preamp. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante um minuto, e 500 µL do sobrenadante eram transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 20 µL de suspensão de sílica. As amostras eram homogeneizadas com vórtex por 10 segundos e então colocadas em temperatura ambiente durante 10 minutos, agitando por inversão a cada dois minutos.

Os microtubos foram centrifugados por um minuto a 10.000 g e o sobrenadante descartado por inversão, para seguirem para o procedimento de purificação do *pellet* seguindo as recomendações do fabricante. Após purificação e eluição do *pellet*, o material seguiu para a etapa de amplificação.

#### 4.6.2. PCR em tempo real para amplificação de genes de fatores de virulência de *E. coli*

As amostras foram testadas para seis fatores de virulência de *E. coli*: LT, Sta, Stb, Stx1, Stx2 e Stx2α. O procedimento foi realizado com kit comercial EXOone *Escherichia coli* Basic Kit (Exopol®) e seguiram-se todas as recomendações do fabricante.

A reação foi realizada em termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems®) e os dados analisados em software v 2.3. O termociclador foi programado para um ciclo de ativação enzimática a 95°C durante cinco minutos, e 42 ciclos compostos de período de desnaturação dos ácidos nucléicos durante 15 segundos a 95°C e um minuto para hibridização a 60°C.

As amostras foram consideradas positivas para cada fator de virulência quando apresentaram valores  $Ct \leq 40$  (*cycle threshold*, ou limiar de detecção).

Também foi utilizado um controle positivo utilizando as referências do controle de qualidade do kit, assim como controle negativo em todas as reações.

#### **4.7. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas em software Minitab® 18.

Para fins de comparação das médias de isolamento entre as amostras de fluido oral e fezes foi utilizado o teste de hipótese T-Student para amostras pareadas, considerando nível de confiança de 95%, e as médias foram consideradas diferentes quando  $P \leq 0,05$ .

Os dados de resistência média e de resistência intermediária média entre as granjas foram sujeitos a teste de análise de variância (ANOVA), considerando  $P \leq 0,05$  para determinação de diferença entre as médias por propriedade. As análises de ANOVA que obtiveram significância estatística, foram comparadas pelo teste de Tukey com 95% de nível de confiança para diferenciação dos grupos.

## 5. RESULTADOS

Foram coletadas amostras de fluido oral e fezes de 50 animais de fase de creche em cinco granjas de ciclo completo localizadas no estado de São Paulo.

Primeiramente, as amostras coletadas foram submetidas a protocolos de isolamento e identificação de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Através do protocolo de isolamento de *E. coli* foram identificados dezessete isolados. A distribuição por granjas e o tipo de amostra coletada estão demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Ocorrência de isolados de *Escherichia coli* por propriedade e tipo de amostra coletada.

Propriedade	Fezes	Fluido oral
A	2	1
B	1	2
C	1	1
D	3	0
E	3	3
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>7</b>

Intervalo de confiança de 95% da diferença das médias (-1,283, 2,483). (P=0,426)

Do total de isolados de *E. coli*, 41,17% (7) foram de amostras de fluido oral e 58,83% (10) de fezes. As amostras de fluido oral obtiveram uma média de isolados de 1,4 por propriedade e desvio padrão 1,14. Já as amostras de fezes obtiveram média de 2 isolados por granja e desvio padrão 1. As amostras apresentaram distribuição normal e não houve diferença estatística entre as médias por tipo de amostra biológica (P=0,426).

As cepas isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos no qual foram testados quinze princípios ativos importantes para bactérias da família *Enterobacteriaceae*. No kit comercial utilizado, a cefazolina possui dois discos diferentes que testam a sensibilidade da cepa às suas apresentações oral e parenteral. Os resultados com as proporções de isolados considerados resistentes, intermediários e sensíveis para cada antimicrobiano testado estão demonstrados na Tabela 2. O antimicrobiano que obteve maior

sensibilidade pelas cepas foi a Amicacina (88,24%) e o que apresentou maior resistência foi a Tetraciclina (94,12%).

**Tabela 2.** Proporção de isolados classificados como resistentes e intermediários no teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Isolados Resistentes (%)</b>	<b>Resistência Intermediária (%)</b>	<b>Isolados Sensíveis (%)</b>
Amicacina	11,76	0,00	88,24
Amoxicilina	11,76	29,41	58,82
Ampicilina	47,06	5,88	47,06
Aztreonam	70,59	5,88	23,53
Cefazolina (Parenteral)	47,06	0,00	52,94
Cefazolina (Oral)	17,65	11,76	70,59
Cefepime	17,65	17,65	64,71
Cefoxitina	23,53	0,00	76,47
Ceftazidima	29,41	29,41	41,18
Ceftriaxona	17,65	0,00	82,35
Ciprofloxacina	58,82	5,88	35,29
Cloranfenicol	29,41	0,00	70,59
Gentamicina	29,41	0,00	70,59
Meropenem	5,88	17,65	76,47
Sulfazotrim	47,06	11,76	41,18
Tetraciclina	94,12	0,00	5,88

Todos isolados apresentaram resistência ao menos a dois antimicrobianos testados. As médias de resistência e de resistência intermediária dos isolados de cada propriedade estão representadas na Tabela 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de resistência encontradas nas propriedades ( $P=0,213$ ) no teste de ANOVA. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de resistências intermediárias para as propriedades A e B, nas comparações pelo teste de Tukey com 95% de confiança ( $P=0,030$ ).

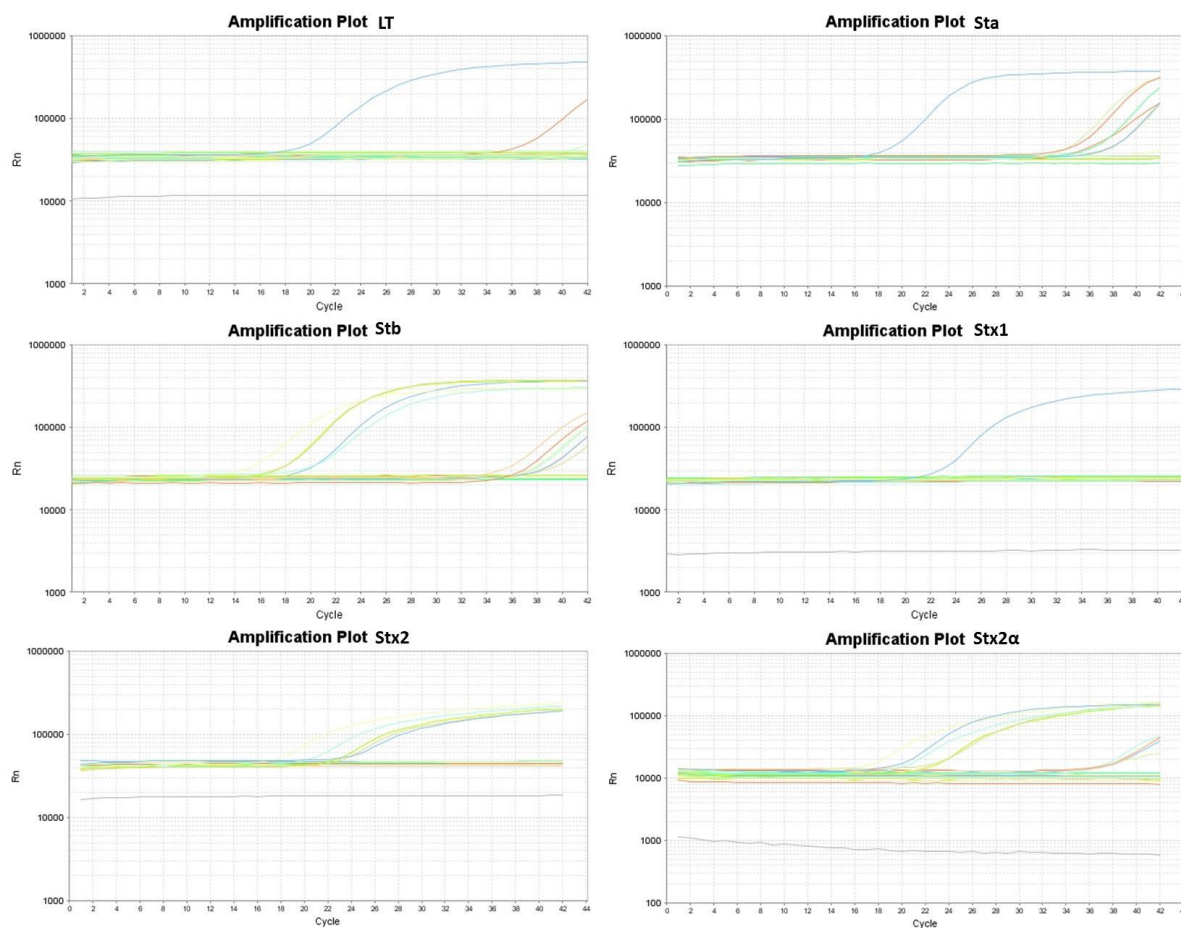
**Tabela 3.** Médias de resistência e de resistência intermediária por isolado de *E. coli* em cinco propriedades do Estado de São Paulo.

Propriedade	Número de isolados	Resistência média	Resistência intermediária média
A	3	2,33	0,33 <sup>a</sup>
B	3	3,66	2,66 <sup>b</sup>
C	2	9,00	1,50 <sup>ab</sup>
D	3	4,67	2,00 <sup>ab</sup>
E	6	7,50	0,83 <sup>ab</sup>

Legenda: Grupos com letras diferentes na mesma coluna representam médias que obtiveram diferença estatística com 95% de confiança no teste de Tukey.

Para que fosse determinada a presença de toxinas importantes de ETEC para o desenvolvimento da infecção e dos sinais clínicos, realizou-se teste de PCR em tempo real do *pool* dos caldos de enriquecimento de fluido oral e fezes por baia (Figura 1).

**Figura 1.** Gráfico de detecção (Ct) dos genes de fatores de virulência de *E. coli*.



Dentre os seis genes de toxinas de ETEC testados (LT, STa, STb, Stx1, Stx2 e Stx2 $\alpha$ ), apenas o gene para toxina Stx1 não foi detectado em nenhuma propriedade (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultados das reações de PCR em tempo real (Ct) para os genes pesquisados.

Propriedade	Baia	Amostra	LT	STa	STb	Stx1	Stx2	Stx2 $\alpha$
A	1	Fezes	ND	<b>19.380</b>	<b>21.699</b>	ND	<b>21.264</b>	<b>21.761</b>
A	1	Fluido oral	ND	<b>22.174</b>	<b>19.028</b>	ND	<b>23.907</b>	<b>24.736</b>
A	2	Fezes	ND	<b>16.428</b>	<b>16.639</b>	ND	<b>18.606</b>	<b>18.942</b>
A	2	Fluido oral	ND	<b>22.092</b>	<b>18.944</b>	ND	<b>23.613</b>	<b>24.048</b>
B	3	Fezes	ND	<b>36.880</b>	<b>36.998</b>	ND	ND	<b>39.469</b>
B	3	Fluido oral	<b>38.343</b>	<b>36.243</b>	<b>37.973</b>	ND	ND	<b>39.468</b>
B	4	Fezes	ND	<b>35.479</b>	<b>38.798</b>	ND	ND	40.846
B	4	Fluido oral	ND	<b>37.934</b>	ND	ND	ND	ND
C	5	Fezes	ND	<b>39.342</b>	40.016	ND	ND	ND
C	5	Fluido oral	ND	ND	<b>39.015</b>	ND	ND	<b>38.391</b>
C	6	Fezes	ND	<b>39.339</b>	40.863	ND	ND	ND
C	6	Fluido oral	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D	7	Fezes	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D	7	Fluido oral	ND	ND	<b>39.898</b>	ND	ND	ND
D	8	Fezes	ND	<b>37.729</b>	ND	ND	ND	ND
D	8	Fluido oral	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	9	Fezes	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	9	Fluido oral	ND	ND	ND	ND	ND	<b>39.687</b>
E	10	Fezes	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E	10	Fluido oral	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Legenda: ND: Ct não determinado

A presença ou ausência dos genes de toxinas de ETEC por propriedade estão demonstradas na Tabela 5. As propriedades A e B apresentaram o maior número de toxinas detectadas no teste e o gene de toxina com maior ocorrência nas dez baias pesquisadas foi o STa (70%).



**Tabela 5.** Presença de genes de toxinas detectadas através de PCR em tempo real considerando a baía de alojamento dos animais.

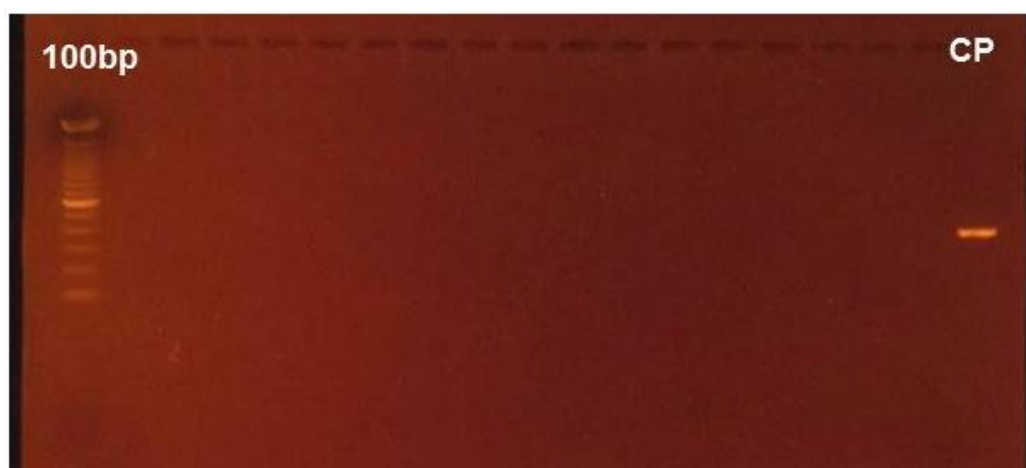
Propriedade	Baía	LT	STa	STb	Stx1	Stx2	Stx2 $\alpha$
A	1	-	+	+	-	+	+
	2	-	+	+	-	+	+
B	3	+	+	+	-	-	+
	4	-	+	+	-	-	-
C	5	-	+	+	-	-	+
	6	-	+	-	-	-	-
D	7	-	-	+	-	-	-
	8	-	+	-	-	-	-
E	9	-	-	-	-	-	+
	10	-	-	-	-	-	-

Legenda: +: positivo (Ct<40); -: negativo (Ct>40). ANOVA ( $P=0,064$ ). Sem diferença estatisticamente significativa.

A análise de variância (ANOVA) indicou que não houve diferença estatística sobre a detecção média de genes de toxinas para ETEC entre as propriedades ( $P=0,064$ ) com 95% de nível de confiança.

Em nenhuma das propriedades pesquisadas houve isolamento e identificação de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. O teste de PCR convencional também não detectou a presença de gene de *Salmonella* spp. no pool dos caldos de enriquecimento utilizados no processo de cultura (Figura 2).

**Figura 2.** Gel de agarose corado com SYBR safe™ com produtos de amplificação da reação de PCR para detecção de *Salmonella* spp.



Legenda: CP – controle positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076)

Outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* foram detectadas ao acaso nos protocolos de isolamento de *E. coli* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e estocadas em glicerol a -80°C para futuras análises. Cinquenta e quatro isolados foram identificados bioquimicamente pelo kit API 20E®, incluindo as dezessete *E. Coli*, *Citrobacter feundii*, *Citrobacter youngae*, *Enterobacter cloacae*, *Ewingella americana*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leciencia adecarboxylata*, *Proteus mirabilis* e *Providencia rettgeri*. Dentre esses isolados, 31 foram identificados através de amostras de fluido oral e 23 de fezes (Tabela 6).

**Tabela 6.** Bactérias isoladas a partir de fluido oral e fezes.

<b>Isolados</b>	<b>Fluido oral</b>	<b>Fezes</b>
<i>Citrobacter feundii</i>	3	2
<i>Citrobacter youngae</i>	2	1
<i>Escherichia coli</i>	7	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	4
<i>Ewingella americana</i>	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	3
<i>Leciencia adecarboxylata</i>	1	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	2
<i>Providencia rettgeri</i>	2	1
<b>TOTAL</b>	<b>31</b>	<b>23</b>

## 6. DISCUSSÃO

A suinocultura industrial tem crescido no Brasil nos últimos anos, com o desenvolvimento de sistemas de produção cada vez mais intensivos, nos quais há otimização de instalações para maior produtividade dos animais. Assim, é fundamental que se tenha um controle sanitário cada vez mais eficiente, com diagnóstico preciso de enfermidades e estratégias de controle de doenças visando o bem-estar animal e a segurança dos alimentos.

O uso do fluido oral tem sido bastante estudado e utilizado como amostra biológica alternativa para monitorar a presença de agentes patogênicos em animais e humanos em vários países do mundo. Além de facilitar a coleta de materiais biológicos para os técnicos, essa amostra também preserva o bem-estar animal por ser uma técnica pouco invasiva (PRICKETT; ZIMMERMAN, 2010).

Em suínos, o fluido oral tem sido usado para a detecção de diversos agentes patogênicos. Nos Estados Unidos, alguns laboratórios já comercializam os testes para atender aos produtores. Dados levantados entre 2010 e 2016 mostram que o diagnóstico de doenças através de fluido oral aumentou cerca de 95% em três laboratórios pesquisados (BJUSTROM-KRAFT et al., 2018).

O fluido oral tem sido utilizado em várias técnicas de detecção. Os testes de ELISA, RT-PCR e análises de sequenciamento são os mais descritos para diagnóstico de doenças virais. Quando comparado com o diagnóstico realizado através de amostras de soro sanguíneo, o fluido oral tem sido considerado eficiente para vários agentes, como o vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (PRRSv), vírus da Influenza A, Circovirus suíno tipo 2 (PCV-2), vírus da Gastroenterite Transmissível (TGEv), vírus da Diarreia Epidêmica Suína (PEDv), dentre outros (BJUSTROM-KRAFT et al., 2018).

Entretanto, estudos que demonstrem o diagnóstico de agentes bacterianos através do fluido oral de suínos ainda são escasso na literatura, o que demonstra a necessidade de pesquisas envolvendo o uso deste material biológico como alternativa para o diagnóstico de doenças bacterianas em plantéis de suínos.

A maioria das pesquisas que envolve o diagnóstico de patógenos bacterianos descrita na literatura utilizou-se de técnicas de biologia molecular, como o PCR. Cheong et al. (2017) realizaram uma pesquisa dos principais agentes bacterianos e virais envolvidos no Complexo Respiratório Suíno, utilizando o fluido oral como

amostra biológica e as técnicas de RT-PCR e PCR convencional. Foi possível identificar *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* e *Streptococcus suis*. Os resultados mostraram que o uso do fluido oral foi eficiente na detecção dos agentes.

As técnicas de detecção de anticorpos por ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, também têm sido eficazes para a detecção de anticorpos específicos para bactérias. Em estudos envolvendo infecção experimental de *S. Typhimurium* foi possível identificar em ELISA padronizado em laboratório níveis elevados de IgA, IgG e IgM. Dentre eles, os níveis de IgA foram os que demonstraram maior resposta. Isso é importante para a tomada de decisão sobre o método de análise das amostras. Muitos kits comerciais, frequentemente estabelecidos para detecção em soro sanguíneo, podem não identificar os anticorpos de maior ocorrência no fluido oral, prejudicando o diagnóstico (ATKINSON et al., 2019).

Não foram identificados na literatura estudos que tenham realizado isolamento bacteriano através de amostras de fluido oral de suínos. Como um dos objetivos deste estudo foi comparar as detecções de *Escherichia coli* entre amostras de fluido oral e fezes de suínos de fase de creche através de isolamento e identificação bacteriana, as análises demonstraram que não houve diferença entre as médias de detecção das duas amostras ( $P > 0,05$ ), indicando que o fluido oral pode ser considerado uma alternativa para a detecção deste agente em técnicas de isolamento.

Em experimentos realizados com bovinos, o uso do fluido oral foi considerado uma ferramenta alternativa eficaz para o isolamento de *Escherichia coli* O157:H7. Apesar de que em produções de bovinos existem muitos fatores limitantes em relação às instalações, influências climáticas e comportamento animal, o estudo demonstrou eficácia do método em comparação às amostras de fezes retais, suabe oral e *pool* de amostras de fezes (STANFORD et al., 2005).

A presença de ETEC nas produções suinícolas é um desafio que precisa ser enfrentado de forma eficiente. Para isso, é importante que haja monitoramento constante do plantel, com diagnóstico dos agentes envolvidos nos casos clínicos e testes de sensibilidade aos antimicrobianos para uma implantação eficiente de estratégias de tratamento e controle. O uso incorreto dos antimicrobianos leva ao desenvolvimento de resistência pelas cepas, o que pode impactar o tratamento de

futuras infecções dentro das granjas, além de representar risco à saúde humana (LUPPI, 2017).

Em pesquisa realizada na Bélgica em 50 rebanhos de suínos demonstrou-se que 47,3% dos tratamentos por antibiótico via oral foram subdosados e que 79,5% dos injetáveis foram superdosados. Cerca de 48% das propriedades visitadas pelos pesquisadores administraram antimicrobianos de importância crítica para a saúde humana segundo recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), como, cefalosporinas de terceira e quarta geração. Isso ocorre muitas vezes porque a tomada de decisão no tratamento de enfermidades do plantel é feita pelo próprio produtor (CALLENS et al., 2012). Os dados ressaltam a importância e responsabilidade do médico veterinário como o profissional capacitado para estabelecer estratégias de tratamento, dosagem e via de administração de antimicrobianos em todas as produções animais.

No presente estudo, a Tetraciclina foi a droga que apresentou a maior proporção (94,12%) de cepas de *E. coli* resistentes. A tetraciclina se encontra na lista de antimicrobianos altamente críticos da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2019) e tem sido amplamente utilizada na suinocultura através da alimentação dos animais para o tratamento de diversas infecções (LEKAGUL; TANGCHAROENSATHIEN; YEUNG, 2019).

O uso de cefalosporinas de terceira e quarta geração é imprescindível no tratamento de infecções graves causadas por enterobactérias como *E. coli* e *Salmonella* spp. em humanos, e atualmente, fazem parte da classe de maior prioridade de antibióticos criticamente importantes da OMS (WHO, 2019). Dentre os isolados de *E. coli* neste estudo houve uma alta ocorrência de isolados que apresentaram algum nível de resistência (intermediária ou total) às cefalosporinas de terceira e quarta geração. A Cefotaxima e a Ceftriaxona, ambas de terceira geração, obtiveram 29,41% e 17,65% de resistência respectivamente, enquanto que o antimicrobiano de quarta geração Cefepime apresentou 17,65% de isolados resistentes.

Em caso de resistência às últimas gerações de cefalosporinas, profissionais de saúde tendem a adotar tratamentos com carbapenêmicos de amplo espectro, como o Meropenem. Estes são considerados de última linha para infecções hospitalares e por isso constituem um tratamento mais caro e controlado em alguns países (WHO, 2014). As cepas resistentes aos carbapenêmicos possuem genes que

codificam enzimas capazes de inativar a ação desses antimicrobianos (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012). Neste estudo, houve a detecção de resistência (5,88%) e resistência intermediária (17,65%) nos isolados estudados.

Sabe-se que os genes de resistência podem ser transmitidos entre as bactérias de forma horizontal e difundidos no ambiente de várias formas, como por meio de dejetos. Mesmo com o uso de biodigestores anaeróbicos é possível que algumas bactérias e genes continuem viáveis, possibilitando com que estes sejam transmitidos no ambiente, o que pode impactar as infecções em humanos (COUCH et al., 2019).

É importante salientar que as bactérias Gram-negativas possuem diversos fatores que possibilitam o compartilhamento de genes de virulência e de resistência. Muitos países não possuem um monitoramento eficaz dos padrões de resistência encontrados ou não reportam esses dados às autoridades de saúde, tornando difícil o acompanhamento da real situação de resistência aos antimicrobianos. Nos Estados Unidos foram registrados 13.100 novos casos de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos em 2019 e 1.100 mortes decorrentes desta infecção (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012; CDC, 2019).

Desde 1998, o Brasil vem implantando políticas públicas com o objetivo de realizar maior controle do uso de antimicrobianos, como o estabelecimento de planos de monitoramento nos serviços de saúde e regras para comercialização desses medicamentos em farmácias (ESTRELA, 2018). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou em 2017 o Plano Nacional para Prevenção e Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde como forma de estabelecer estratégias de controle de resistência aos antimicrobianos (ANVISA, 2017).

O primeiro boletim, lançado em 2018, mostrou que 853 cepas de *E. coli* foram isoladas de infecções hospitalares em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) neonatal, pediátrica e adulta no Brasil. As cepas foram isoladas de infecções primárias da corrente sanguínea associadas à cateter venoso central. O boletim informa que, das cepas resistentes às cefalosporinas de terceira e quarta geração, 77% foram isoladas de UTI neonatal, 8% de UTI pediátrica e 9% de UTI adulta. Neste boletim não houve registro de cepas resistentes aos carbapenêmicos (ANVISA, 2018).

Em infecções do trato urinário associadas ao uso de cateter vesical foram isoladas 3.278 cepas de *E. coli* em UTI adulta, sendo que 7,10% foram resistentes

tanto às cefalosporinas de terceira e quarta geração, quanto aos carbapenêmicos. Já nas UTIs pediátricas, 142 isolados de *E. coli* foram registrados, nos quais 6,13% foram resistentes aos antimicrobianos mencionados (ANVISA, 2018). Estes dados demonstram a iminência de risco a pacientes hospitalizados e reforçam a importância da conscientização do uso de antimicrobianos pelos profissionais de saúde, incluindo médicos veterinários.

Nas granjas produtoras de suínos, além do monitoramento de resistência aos antimicrobianos, o diagnóstico correto dos patógenos envolvidos nas infecções também é importante para o estabelecimento das estratégias de controle. Nos casos de infecções por ETEC, é importante saber a ocorrência das toxinas e associar com o desenvolvimento de quadros clínicos presentes. Neste estudo, as propriedades A e B apresentaram a maior ocorrência de genes de toxinas entre as propriedades pesquisadas. Na propriedade A foram detectados genes para toxinas Sta, Stb, Stx2 e Stx2 $\alpha$ , enquanto que a propriedade B apresentou genes para LT, Sta, Stb e Stx2 $\alpha$ . Além disso, a propriedade A obteve limiares de detecção (Ct – *Cycle threshold*) mais baixos. Na técnica de PCR em tempo real, o Ct representa a quantidade de ciclos necessários para o sinal de fluorescência ultrapassar o limiar de detecção, ou seja, quanto menor a quantidade de ciclos, maior a quantidade de genes alvos na amostra (LUU-THE et al., 2005).

Dentre as 20 amostras analisadas, o gene mais frequentemente encontrado foi o da toxina Sta, em 55% das amostras. Em segundo lugar, os genes das toxinas Stb e Stx2 $\alpha$  foram detectados em 45% das baias testadas. Ao considerar as propriedades, 80% delas possuíam bactérias com genes para as toxinas Sta, Stb e Stx2 $\alpha$ , enquanto que os genes para toxinas LT e Stx2 foram encontrados em apenas 20% das propriedades. Em nenhuma das baias pesquisadas foi detectado gene de toxina Stx1. Em um estudo realizado na União Europeia, com 280 propriedades e 873 animais, o gene de toxina mais prevalente foi STb (59,1%) seguido de STa (38,1%) e LT (31,9%). Do total de propriedades pesquisadas, quase 60% foram positivas para ETEC (LUPPI et al., 2016). Em outro estudo realizado nos Estados Unidos, a toxina STb também foi mais prevalente (72,6%) entre os isolados (ZHANG et al., 2007).

No Brasil, um estudo com 456 isolados de *E. coli* foi encontrado maior frequência de STa (48,8%), seguido de STb (31,4%), LT (28,6%) e Stx2e (7%). Neste estudo foi correlacionado a maior presença de ETEC isoladas em fezes de

consistência líquida, sugerindo que o sucesso de isolamento é maior na presença de quadros clínicos (SATO et al., 2016). Em outro estudo brasileiro, houve maior prevalência de genes de toxina STb (100%), seguido de STa (75%) e LT (37,5%) (MALGARIN et al., 2018).

No presente estudo, a pesquisa de toxinas foi realizada através do *pool* de caldos de enriquecimento de todos os animais da baía com o objetivo de monitorar a presença ou ausência dos genes de toxinas presentes em cada ambiente. Com a possibilidade de transmissão horizontal entre as cepas existentes em cada ambiente, a presença dos genes de toxinas e resistência aos antimicrobianos podem indicar possibilidade iminente de surtos de difícil tratamento, principalmente quando procedimentos de biossegurança e de limpeza e desinfecção não são conduzidos de maneira correta (WELLINGTON et al., 2013).

Não houve isolamento em meio de cultura ou detecção de genes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* através da técnica de PCR em nenhum dos tipos de amostras biológicas utilizadas neste estudo. Isso pode indicar que as granjas pesquisadas não possuíam ocorrência desse agente no plantel no momento das coletas ou os animais não estavam eliminando o agente pelas vias amostradas. Salienta-se que nenhuma das granjas relatou presença de *Salmonella* spp. previamente ao experimento. Assim, é necessário que se realizem mais estudos com o objetivo de testar a viabilidade do uso do fluido oral frente ao isolamento deste agente. Como a via oral é importante na cadeia epidemiológica das *Salmonella* spp., acredita-se que em propriedades nas quais este agente é endêmico, possa ser possível realizar o isolamento através do fluido oral.



## 7. CONCLUSÃO

O fluido oral de suínos pode ser considerado uma amostra biológica eficiente para o monitoramento de *E. coli*, sendo de fácil coleta para os técnicos de campo e preservando o bem-estar animal. É importante que cepas isoladas sejam caracterizadas quanto à presença de genes de fatores de virulência e avaliadas quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, pois o uso indiscriminado destes pode levar ao desenvolvimento de resistência em bactérias importantes tanto para a suinocultura, quanto para a saúde humana, visto que esses agentes podem compartilhar genes de resistência e de toxinas. O médico veterinário tem um papel importante na saúde pública e na garantia das cinco liberdades de bem-estar animal. Portanto, ações que possam diminuir o impacto ao bem-estar animal, garantir a segurança dos alimentos, e o uso consciente de antimicrobianos, podem contribuir para o propósito de Saúde Única.

## REFERÊNCIAS

AABO, S. et al. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, p. 171–178, 1993.

AARESTRUP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 96, p. 271–281, 2005.

ABCS. O consumo de carne suína. In: **Mapeamento da suinocultura brasileira**. Brasília, DF: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE, 2016. p. 57–68.

ABPA. **Relatório Anual 2019**. São Paulo, SP. 2019.

ALMEIDA, M. . et al. **Maximizing herd sensitivity to detect PRRSV in due-to-wean pigs using family oral fluids sampling**. Proc James D. McKean Swine Dis Conf. **Anais...Aimes**, Iowa: 2017.

ANVISA. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Plano+Nacional+para+a+Prevenção+e+o+Controle+da+Resistência+Microbiana+nos+Serviços+de+Saúde/9d9f63f3-592b-4fe1-8ff2-e035fcc0f31d>>. Acesso em: 17 jun. 2020.

ANVISA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde n. 20: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana do ano de 2018**. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/category/boletins-estatisticos>>. Acesso em: 17 jun. 2020.

ARGUELLO, H. et al. Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 5, p. 899–911, 2013.

ATKINSON, B. M. et al. Detection of *Salmonella*-specific antibody in swine oral fluids. **Porcine Health Management**, v. 29, n. 5, p. 1–5, 2019.

BAPTISTA, F. M.; DAHL, J.; NIELSEN, L. R. Factors influencing *Salmonella* carcass prevalence in Danish pig abattoirs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, n. 3–4, p. 231–238, 2010.

BJUSTROM-KRAFT, J. et al. The use of oral fluid diagnostics in swine medicine. **Journal of Swine Health and Production**, v. 26, n. 5, p. 262–269, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROSTAT - Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROSTAT.html>>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 45, de 2016. Proíbe em todo o território nacional a importação e a fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. . **Diário Oficial [da] União**. Brasília/DF. 22 nov. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 41, de 2017. Institui o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos na Agropecuária - Agroprevine. **Diário Oficial [da] União**. Brasília/DF. 09 nov. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária**. 14 Maio. 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/pan-br-agro>>. Acesso em: 03 Set. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 1, de 2020. Proíbe em todo o território nacional a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincosamina e tiamulina. 13 jan. 2020.

BRENNER, G. M.; STEVENS, C. W. Principles of antimicrobial chemotherapy. In: BRENNER, G. M.; STEVENS, C. W. (Eds.). . **Pharmacology**. Fifth edit ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2018. p. 425–435.

BRUNEL, J. Antibiosis from Pasteur to Fleming. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 6, n. 3, p. 287–301, 1951.

CALLENS, B. et al. Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 106, n. 1, p. 53–62, 2012.

CDC. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019**. Atlanta, GA: [s.n.]. 2019.

CHEONG, Y. et al. Survey of porcine respiratory disease complex-associated pathogens among commercial pig farms in Korea via oral fluid method. **Journal of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, p. 283–289, 2017.

COLLIGNON, P. et al. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 2, n. 9, p. 398–405, 2018.

CÔRTEZ, J. A. **Epidemiologia**. São Paulo: Varela, 1993.

COUCH, M. et al. Abundances of tetracycline resistance genes and tetracycline antibiotics during anaerobic digestion of swine waste. **Journal of Environmental Quality**, v. 48, n. 12, p. 171–178, 2019.

CRUZ, M. L. DE et al. Vaccination as a control strategy against *Salmonella* infection

in pigs: A systematic review and meta-analysis of the literature. **Research in Veterinary Science**, v. 114, p. 86–94, 2017.

DUAN, Q. et al. Review of newly identified functions associated with the heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1–11, 2019.

ELSAS, J. D. VAN et al. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. **The ISME Journal**, v. 5, p. 173–183, 2011.

ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. In: **Saúde e política externa: os 20 anos da assessoria de assuntos internacionais de saúde (1998-2018)**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde, 2018. p. 307–327.

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, É. Colibacillosis. In: ZIMMERMAN, J. J. et al. (Eds.). . **Diseases of Swine**. Eleventh ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2019. p. 807–834.

GHOSH, C. et al. Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 323–338, 2019.

GRIFFITH, R. W.; CARLSON, S. A.; KRULL, A. C. Salmonellosis. In: ZIMMERMAN, J. J. et al. (Eds.). . **Diseases of Swine**. Eleventh ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2019. p. 912–925.

GRIMONT, P. P.; WEILL, F. X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**. WHO. Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th edition, 2007.

HAUSER, E. et al. Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4601–4610, 2010.

HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial

resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 1, p. 176–187, 2016.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. February, p. 123–140, 2004.

KARRIKER, L. A. et al. Drug pharmacology, therapy, and prophylaxis. In: ZIMMERMAN, J. J. et al. (Eds.). . **Diseases of Swine**. 11th. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2019. p. 158–170.

KICH, J. D.; MENEGUZZI, M.; REICHEN, C. O aumento da frequência de *Salmonella* clínica no Brasil. In: XVIII Congresso da Abraves 2017, Goiânia, 2017. **Anais**. Concórdia: Embrapa, 2017. p. 138-149, 2017.

LEKAGUL, A.; TANGCHAROENSATHIEN, V.; YEUNG, S. Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. **Veterinary and Animal Science**, v. 7, n. April, p. 100058, 2019.

LUPPI, A. et al. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. **Porcine Health Management**, v. 20, n. 2, p. 1–6, 2016.

LUPPI, A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. **Porcine Health Management**, v. 16, n. 3, p. 1–18, 2017.

LUU-THE, V.; PAQUET, N.; CALVO, E.; CUMPS, J. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. **Biotechniques**, v. 38, n. 2, p. 287-293, 2005.

LYNCH, H. et al. *Salmonella* in breeding pigs: Shedding pattern, transmission of infection and the role of environmental contamination in Irish commercial farrow-to-finish herds. **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 1, p. e196–e206, 2018.

MALGARIN, C. M. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* isolated from nursery piglets and drinking water. **Acta Scientiae**

**Veterinariae**, v. 46, n. January, p. 1–6, 2018.

MARTINS, F. M.; FILHO, J. I. DOS S.; TALAMINI, D. J. D. Embrapa Suínos e Aves. **Anuário 2019 da Suinocultura Industrial**, n. 06, p. 22–27, 2018.

MELKEBEEK, V.; GODDEERIS, B. M.; COX, E. ETEC vaccination in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, p. 37–42, 2013.

MILLER, S. L.; PEGUES, D. A. *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. In: MANDELL, G. L.; BENNET, J. E.; DOLIN, R. (Eds.). . **Principles and practice of infectious diseases**. 5th, vol. ed. New York, NY: Churchill Livingstone, 2000. p. 2344–2363.

MOXLEY, R. *Enterobacteriaceae: Salmonella*. In: MCVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. (Eds.). . **Veterinary Microbiology**. Third Edit ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Incorporated, 2013. p. 75–84.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm ! **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 263–272, 2012.

OECD. **Stemming the Superbug Tide: Just a Few Dollars More**. Paris: OECD Publishing, 2018.

OLSEN, C. et al. Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 158–163, 2013.

PERRON, G. G. et al. Functional characterization of bacteria isolated from ancient Arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–19, 2015.

PILLMAN, D. et al. Detection of *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* in oral fluids and correlation with pig lameness scores. **Veterinary Microbiology**, v. 239, n. 10, p. 108448, 2019.

PLAIL, R. et al. Workshop III: 2006 EU ban on antibiotics as feed additives: consequences and perspectives. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapy**, v. 29, n.1, p. 41–46, 2006.

PRICKETT, J. et al. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 2, p. 156–163, mar. 2008.

PRICKETT, J. R.; ZIMMERMAN, J. J. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. **Animal Health Research Reviews**, v. 11, n. 2, p. 207–216, 2010.

REIS CIACCI ZANELLA, J.; MORÉS, N.; SANTOS NEVES DE BARCELLOS, D. E. Principais ameaças sanitárias endêmicas da cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 443–453, 2016.

REIS, R.; REIS, A. Fundamentos teóricos e aplicações práticas da biossegurança na produção de suínos. In: **Produção de suínos: teoria e prática**. Primeira E ed. Brasília, DF: [s.n.]. p. 847–853.

ROZWANDOWICZ, M. et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 1, p. 1121–1137, 2018.

RYAN, M. P.; DWYER, J. O.; ADLEY, C. C. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. **Biomed Research International**, v. 2017, p. 1–6, 2017.



SATO, J. P. H. et al. Virulence profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea and classification according to fecal consistency. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 253–257, 2016.

SCALLAN, E. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States — Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SCHWARZ, P. et al. *Salmonella enterica*: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 5, p. 1028–1034, 2009.

SEDDON, Y. M.; GUY, J. H.; EDWARDS, S. A. Optimising oral fluid collection from groups of pigs: Effect of housing system and provision of ropes. **Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 180–184, 2012.

SHIM, M. et al. Salmonellosis in swine: Clinical perspectives. **Korean Journal of Agricultural Science**, v. 43, n. 9, p. 320–329, 2016.

SOUMET, C. et al. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 1–6, 1999.

STANFORD, K. et al. Monitoring *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated and naturally colonized feedlot cattle and their environment. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 26–33, 2005.

SUGIMOTO, R. et al. Neck abscess due to *Salmonella* Choleraesuis: case study and literature review. **JMM Case Reports**, v. 4, p. 1–5, 2017.

THOMS, E. et al. Perfil de consumo e percepção da qualidade da carne suína por estudantes de nível médio da cidade de Irati, PR. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 449–459, 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade.** [s.l: s.n.].

USDA. **Market and Trade Data.** Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em: 14 maio. 2020.

VANUCCI, F. A. et al. **Retrospective study and antimicrobial susceptibilities of *S. enterica* serovar Cholerasuis isolated from swine salmonellosis outbreaks during 2013 in Brazil.** Proceedings of the 23th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress. **Anais...**Cancún, México: 2014.

VERBRUGGHE, E. et al. Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* promotes intestinal colonization of *Salmonella enterica*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 43, p. 1–7, 2015.

VITAL ÁLVARES PESSÔA, G.; SANDOVAL PEIXOTO, E. Novobiocin-Selenite broth. A medium of improved selectivity for the isolation of *Salmonella* from faeces. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 31, p. 1–3, 1971.

VUGIA, D. J. et al. Invasive *Salmonella* Infections in the United States, FoodNet, 1996 – 1999: Incidence, S erotype Distribution, and Outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38 (Suppl), p. 149–156, 2004.

WALES, A. D.; COOK, A. J. C.; DAVIES, R. H. Producing *Salmonella*-free pigs: A review focusing on interventions at weaning. **Veterinary Record**, v. 168, n. 10, p. 267–276, 2011.

WANG, H. et al. Heat-stable enterotoxins of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their impact on host immunity. **Toxins**, v. 24, n. 11, p. 1–12, 2019.

WELLINGTON, E. M. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–165, 2013.

WELLS, J. E. et al. Effects of antimicrobials fed as dietary growth promoters on faecal shedding of *Campylobacter*, *Salmonella* and shiga-toxin producing *Escherichia coli* in swine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 318–328, 2012.

WHITE, D. et al. **Pig behavior and the contribution of individual pigs to pen-based oral fluids samples**. 22nd IPVS Proceedings. **Anais...Jeju**: 2012.

WHITE, D. et al. Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. **Journal of Swine Health and Production**, v. 22, n. 3, p. 138–141, 2014.

WHO. **Antimicrobial resistance: Global report on surveillance**. Geneva: World of Health Organization, 2014. p. 1-256.

WHO. **Salmonella (non-typhoidal)**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-(non-typhoidal))>. Acesso em: 15 maio. 2020.

WHO. **Critically important antimicrobials for human medicine**. 6<sup>a</sup> ed. Geneva: World of Health Organization, 2019. p 1-45.

WILKINS, W. et al. Examining heterogeneity in the diagnostic accuracy of culture and PCR for *Salmonella* spp. in swine: A systematic review/meta-regression approach. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. suppl. 1, p. 121–134, 2010.

WINTERSDORFF, C. J. H. VON; PENDERS, J.; NIEKERK, J. M. VAN. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. February, p. 1–10, 2016.

ZHANG, W. et al. Significance of Heat-Stable and Heat-Labile Enterotoxins in Porcine Colibacillosis in an Additive Model for Pathogenicity Studies. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3107–3114, 2006.

ZHANG, W. et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 145–152, 2007.