



# VIII SINSUI

Simpósio Internacional de Suinocultura

**Produção, Reprodução e Sanidade Suína**

De 09 a 12 de julho 2013  
Porto Alegre - RS

ANAIS



Palestras



## NOVAS PROPOSTAS PARA O CONTROLE DE *SALMONELLA* EM SUÍNOS

### *NEW PERSPECTIVES TO CONTROL SALMONELLA IN SWINE*

Jalusa Deon Kich<sup>\*1</sup> & Marisa Cardoso<sup>2</sup>

Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Porto Alegre, RS.

\*Autor para correspondência: jalusa.kich@embrapa.br

#### Resumo

O controle de infecção/contaminação por salmonelas na produção de suínos é um grande desafio por se tratar de um microrganismo ubiqüitário, capaz de permanecer por longo tempo dentro das granjas. Para reduzir a ocorrência de carcaças no final do processamento, medidas de controle devem ser direcionadas para toda a cadeia de produção, passando pela redução das fontes de infecção na granja, minimização da transmissão no pré-abate e de contaminação na linha de abate. Considerando que a prevalência de suínos portadores/excretores no pré-abate e abate impacta nos índices de contaminação das carcaças, o controle na fase de produção dos animais é essencial. O controle da salmonela na granja pode ser dividido em duas estratégias: *i.* prevenção da exposição dos animais ao microrganismo com um amplo programa de biosseguridade e controle de fatores de risco que atinja as fontes de infecção como contaminação residual do lote anterior, ração e água, vetores e origem dos animais; *ii.* aumento da resistência dos animais contra a infecção por *Salmonella* por meio de vacinas, aditivos alimentares, antagonistas naturais e resistência genética, estratégias que exploram a relação patógeno-hospedeiro. O presente trabalho discute algumas novas perspectivas que a ciência está usando para buscar aumentar a resistência dos suínos contra a infecção por salmonela, como novas vacinas, estudos de microbiota intestinal e resistência genética.

#### Introdução

A produção de carne livre de patógenos associados a doenças transmitidas por alimentos (DTAs) tem sido um desafio para os países com produção animal intensiva. Este tema tem gerado muita discussão, mas é consenso que os programas de controle precisam ser constantemente avaliados e ajustados. A tendência é que estes programas melhorem e se ampliem uma vez que as agroindústrias estão interessadas em produzir um alimento inócua à saúde do consumidor e as organizações internacionais, como *Codex Alimentarius*, têm cada vez mais recomendado o estabelecimento sistemas de monitoramento e controle destes patógenos. O desafio é ainda maior tratando-se de um microrganismo ubíquo como a *Salmonella* sp., adaptado as condições ambientais da produção animal e favorecido por práticas agropecuárias correntes.



Estudando sistemas de produção intensiva de suínos no sul do Brasil, Kich et al. (2011) determinaram como fontes de infecção: contaminação residual entre lotes na granja e na espera do abatedouro; leitões excretadores de salmonela no alojamento e presença da bactéria na ração. Além da contaminação nas granjas, o efeito do período pré-abate na amplificação da infecção, e na contaminação superficial de carcaças já foi estudado (HURD et al., 2002; ROSTAGNO et al., 2003; SCHMIDT et al., 2004; ROSTAGNO et al., 2009). Também demonstramos, no sul do Brasil, que isolados de *Salmonella* de superfície de carcaça estão relacionadas com aqueles encontrados na baía de espera do abatedouro (KICH et al., 2011). Na fase pré-abate, podem ocorrer contaminações externas (pele e cavidade oral) ou a infecção via oral, seguida de multiplicação e rápida excreção no conteúdo fecal (HURD et al., 2001). Porém, em nossa opinião, as baias de espera são o local para onde são transportadas e depositadas as cepas de salmonela originadas das diversas exposições que ocorrem durante a vida dos animais, compreendendo todas as fases e fontes de infecção. O transporte e baias de espera no abatedouro se constituem nas principais fontes de infecção de lotes de animais “livres” de *Salmonella* (HOTES & KRIETER, 2011). Esta complexidade faz-nos acreditar que programas de controle integrados têm mais chance de sucesso do que aqueles direcionados a elos isolados da cadeia de produção de suínos.

Na última década, nosso grupo de pesquisa tem contribuído para a compreensão da dinâmica da transmissão, fontes de infecção (BESSA et al., 2004; SILVA et al., 2006; KICH et al., 2011) e fatores de risco para a ocorrência de salmonela em granjas de suínos pertencentes a sistemas intensivos de produção do sul do Brasil (SCHWARZ et al., 2010). Estudamos também pontos críticos para a contaminação durante o abate e evisceração (SILVA et al., 2012) bem como no processo de fabricação de rações (PELLEGRINI, 2012).

Pressupondo que o controle da infecção por *Salmonella* depende de esforços para minimizar a exposição ao “inóculo” e maximizar a resistência dos animais contra a infecção (CARLSON et al., 2012), as medidas de biossegurança, boas práticas de produção, controle de fatores de risco nas granjas somadas a boas práticas de produção e controle de pontos críticos na fabricação da ração constituem a base do programa. Para maximizar a resistência dos animais, a investigação deve investir em estratégias que exploraram a relação patógeno-hospedeiro como: vacinas de espectro ampliado em relação aos sorovares de interesse em segurança dos alimentos; estudos da microbiota intestinal buscando antagonistas ao estabelecimento da infecção; identificação de marcadores genéticos associados com colonização e excreção da *Salmonella* entre outras. Neste sentido, algumas estratégias serão discutidas a seguir.

### Vacinas

A vacinação é um conceito muito bem estabelecido nas práticas veterinárias e tem contribuído sobremaneira no controle de muitas enfermidades. No caso da infecção por salmonela em suínos é preciso destacar duas situações: *i.* a doença nos animais, septicemia e enterocolite, causadas basicamente pelos sorovares *S. choleraesuis* (adaptado ao suíno) e *S. typhimurium*; *ii.* a contaminação de carcaças nos frigoríficos por um vasto espectro de sorovares considerados de risco para a saúde do consumidor. No caso de doença, alguns produtos estão disponíveis no mercado e podem ser indicados em granjas que têm o problema diagnosticado. Esta prática é adotada em países em que ocorre a salmonelose clínica de forma endêmica, porém este diagnóstico é pouco frequente no Brasil. As vacinas vivas que estimulam a imunidade celular são consideradas mais protetivas contra *Salmonella* por ser uma bactéria intracelular facultativa (CARLSON et al., 2012).

A redução de animais portadores de salmonela pela vacinação tem sido demonstrada em alguns trabalhos (ROESLER et al., 2006; SELKE et al., 2007; FARZAN & FRIENDSHIP, 2010; SCHWARZ et al., 2011; LEYMAN et al., 2012). Denagamage et al. (2007) revisaram de forma sistemática artigos sobre vacinação contra *Salmonella* em suínos. Embora a maioria destes estudos reporte associação entre a



vacinação e a redução da prevalência de *Salmonella*, os autores concluíram que esta associação é promissora, mas não definitiva, para suínos em idade de abate.

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

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

Para contornar os problemas da variabilidade antigênica e da diferenciação da infecção natural por salmonela, vários projetos estão em desenvolvimento, lançando mão de engenharia genética e imunoproteômica. Selke et al. (2007) identificaram um antígeno peptídico localizado na membrana externa com característica DIVA. A partir disso construíram um mutante, deletado do gene que codifica o referido peptídeo, capaz de induzir a proteção nos animais e ser à base de uma vacina. A discriminação entre infecção e imunização seria propiciada pela ausência de anticorpos contra o peptídeo que está ausente na cepa vacinal (marcador negativo). Porém, esta vacina, baseada em antígeno proteico, não se adapta à maioria dos programas oficiais de monitoramento sorológico, que pesquisam anticorpos anti-lipopolissacarídeos de membrana externa (ELISA-LPS). Mais recentemente, Leyman et al. (2011) deletaram genes codificadores de LPS, e foram capazes de produzir mutantes que não perdessem a capacidade imunizante contra *S. typhimurium* e que permitissem a diferenciação da infecção natural pelos testes sorológicos adotados nos programas de controle.

Paralelamente, mutantes com alvo em genes de virulência, criando cepas atenuadas para compor vacinas vivas, têm sido estudados. A vacina viva tem um potencial de proteção superior às bacterinas, porque induz resposta celular e produção de IgA de mucosa, importantes na proteção contra um patógeno intracelular facultativo que invade a mucosa intestinal como salmonela. Haneda et al. (2011) atenuaram uma cepa de *S. choleraesuis*, deletando o gene *slyA*, considerado um regulador global de virulência, com o objetivo de proteger os suínos contra salmonelose causada pelo sorovar homólogo e *S. typhimurium*. Hur et al. (2011), deletaram os genes *cpxR* e *lon* e incluíram um plasmídeo que secreta a subunidade B da enterotoxina de *Escherichia coli* como adjuvante de mucosa. Esta candidata à vacina foi considerada segura e eficaz na proteção de leitões desafiados com *S. typhimurium*, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a vacinação de porcas e leitões.

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

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



### Microbiota

A relação entre os componentes da microbiota intestinal baseado em conceitos de exclusão competitiva, probiose e prébiose, tem sido alvo de pesquisa na busca de antagonistas a patógenos de interesse em humanos e animais. Tanto a estrutura das comunidades microbianas, quanto a sua funcionalidade podem desvendar mecanismos de controle de patógenos. No passado, esta área estava limitada á técnicas de cultivo bacteriano, capazes de recuperar uma pequena parcela dos micro-organismos que compõem a microbiota intestinal. Atualmente, por meio de técnicas de sequenciamento de DNA de nova geração em larga escala é possível documentar comunidades microbianas mais complexas e acompanhar sua dinâmica em estudos observacionais e na experimentação animal. Técnicas baseadas no sequenciamento de regiões variáveis do gene conservado 16S rRNA identificam as espécies bacterianas presentes na amostra. A nova ciência, denominada metagenômica, vai adiante e demonstra a funcionalidade destes componentes da microbiota (LAMENDELLA et al., 2011). Estas técnicas têm sido exploradas em estudos do efeito modulador na microbiota de ingredientes alimentares específicos (KOBAYASHI et al., 2011), bem como de promotores de crescimento (RETTEDAL et al., 2009; LOOFT et al., 2012).

A dinâmica entre a microbiota intestinal de suínos e a excreção de salmonela foi recentemente investigada por Bearson et al. (2013). O perfil da microbiota de dois grupos de suínos, alto e baixo excretoras de salmonela, foi determinado pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. A análise da estrutura da comunidade bacteriana revelou diferenças entre a microbiota dos animais do grupo alto e baixo excretoras de salmonela. No segundo dia após a infecção, foi observado decréscimo na quantidade do gênero *Prevotella* nos animais alto excretoras e o aumento de outros gêneros bacterianos como (*Oscillibacter*, *Catenibacterium*, *Xylanibacter*). Os resultados também sugerem que a infecção por *Salmonella* sp. induziu alterações na maturação da microbiota após 21 dias de infecção. Estudos futuros devem esclarecer melhor o papel destas mudanças na microbiota e, quem sabe, indicar algum antagonista natural à colonização intestinal por *Salmonella* sp. em suínos.

### Resistência Genética

A resistência/susceptibilidade genética às doenças é outra área em que as atuais metodologias moleculares têm acelerado a investigação científica e aplicação clínica. Diferenças individuais na resposta aos patógenos são observadas cotidianamente na medicina veterinária. Alguns animais adoececem facilmente e desenvolvem quadros mais severos, outros têm maior capacidade de “se livrar” do patógeno. Embora muitos fatores contribuam para estes cenários, como a dose infectante, imunidade, nível de estresse; a variabilidade genética também tem seu papel. Precisar a variabilidade genética é um grande avanço no melhoramento de características produtivas e também pode ser aplicado em programas de controle de doenças. A classificação fenotípica de infecção/doença é sempre crítica, portanto estes parâmetros devem ser cuidadosamente determinados.

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

As respostas de expressão gênica induzidas pelos sorovares Typhimurium e Choleraesuis foram comparadas por Uthe et al. (2007). Foram observadas diferenças tanto nos genes que são induzidos/reprimidos como no tempo de expressão após a infecção (pi). A resposta contra *S. typhimurium*



foi mais precoce (8-24h pi) do que contra *S. choleraesuis*, que demonstrou os níveis mais altos de expressão gênica tardiamente (48h a 21 dias pi). As diferenças observadas na dinâmica de expressão gênica podem explicar a variação na progressão da doença causada pelos referidos sorovares (UTHE et al., 2007).

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

O *Toll-like receptor 4* (TLR4) é um receptor responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram negativas e também ativador da resposta inflamatória no hospedeiro (NOREEN et al., 2012; YANG, 2012). Mutações na sequência de nucleotídeos do TLR4, que codificam regiões de reconhecimento do patógeno e sinalização da tradução, podem afetar a susceptibilidade do hospedeiro à infecção e/ou doença (SCHOREDER & SCHUMANN, 2005). Polimorfismos no TLR4 têm sido associados com doenças infecciosas em humanos, bovinos, aves e suínos (LEVEQUE et al., 2003; KATARIA et al., 2011; NOREEN et al., 2012; YANG et al., 2012). Desta forma, os polimorfismos de base única (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism*) no TLR4 têm sido propostos como potenciais marcadores genéticos para melhoria na resistência às doenças em suínos (UENISHI et al., 2011).

Em estudos anteriores de variabilidade genética do TLR4 de suínos, 46 SNPs foram identificados sendo 22 deles localizados em região codificadora do gene (THOMAS et al., 2005; SHINKAI et al., 2006; PALERMO et al., 2009; BAO et al., 2011; PAN et al., 2011; SHINKAI et al., 2012). Em trabalho recente (KICH et al., 2013, submetido), a análise das sequências do TLR4 de suínos inoculados com *Salmonella* revelaram 18 SNPs, 12 previamente identificados na literatura e seis desconhecidos. Oito destes SNPs estão localizados na região codificadora do exon 3 e três destes induzem alteração do aminoácido. Sete SNPs foram associados com o padrão de excreção de salmonela ( $p \leq 0.05$ ), revelando o relacionamento entre a excreção e a variação genética no gene TLR4 de suínos.

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

### Referências

- BAO, W. B.; YE L.; PAN, Z. Y.; ZHU, J.; ZHU, G. Q.; HUANG, X. G. & WU, S. L. Analysis of polymorphisms in the porcine TLR4 gene and its expression related to *Escherichia coli* F18 infection. *Czech Journal Animal Science*. 11, 475-482. 2011.
- BEARSON & BEARSON. Serological response of swine to an attenuated *Salmonella* enterica serovar Typhimurium strain that reduces gastrointestinal colonization, fecal shedding and disease due to virulent *Salmonella* typhimurium. Proceedings of the 9th International Conference on the Epidemiology and Control of biological, chemical and physical hazards in pigs and pork. Maastricht, Holanda, p.88. 2011.
- BEARSON, S. M. D.; ALLEN, H. K.; BEARSON, B. L.; LOOFT, T. P.; BRUNELLE, B. W.; KICH, J. D.; CHRISTOPHER, T. K.; BAYLES, D. O.; ALT, D. P. & LEVINE, U. Y. Profiling the Gastrointestinal Microbiota in Response to *Salmonella*: Low Versus High *Salmonella* Shedding in the Natural Porcine Host. In: *Infection, Genetics and Evolution*. Press. 2013.
- BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. *Revista Pesquisa Veterinária Brasileira*. 24, 80-84. 2004.



- CARLSON, S. A.; BARNHILL, A. E. & GRIFFITH, R. W. Salmonellosis. In: Diseases of Swine. Ed. ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. Wiley-Blackwell. 10<sup>th</sup> ed. p. 821-833. 2012.
- DENAGAMAGE, T. N.; O'CONNOR, A. M.; SARGEANT, J. M.; RAJIĆ, A.; MCKEAN, J. D. Efficacy of vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in live and slaughtered swine: a systematic review of literature from 1970 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*. 4 (4), 539-549. 2007.
- FARZAN, A. & FRIENDSHIP, R. M. A clinical field trial to evaluate the efficacy of vaccination in controlling *Salmonella* infection and the association of *Salmonella*-shedding and weight gain in pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 74, 258-263. 2010.
- HANEDA, T.; OKADA, N.; KIKUCHI, Y.; TAKAGI, M.; KUROTAKI, T.; MIKI, T.; ARAI, S. & DANBARA, H. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Choleraesuis *slxA* mutant strains for use in live attenuated oral vaccines. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 34, 399-409. 2011.
- HOTES, S.; TRAUlsen, I.; KRIETER, J. *Salmonella* Control Measures with Special Focus on Vaccination and Logistic Slaughter Procedures *Transboundary and Emerging Diseases*. 58, 434-444, 2011.
- HUANG, T.; UTHE, J. J.; BEARSON, S. M. D. et al. Distinct peripheral blood RNA responses to *Salmonella* in pigs differing in *Salmonella* shedding levels: intersection in IFNG, TLR and miRNA pathways. *PLoS ONE*. 6 (12), 28786. 2011.
- HUR, J.; SONG, S. O.; LIM, J. S.; CHUNG, I. K. & LEE, J. H. Efficacy of a novel virulence gene-deleted *Salmonella typhimurium* vaccine or protection against *Salmonella* infections in growing piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 139, 250-256. 2011.
- HURD, H. S.; GAILEY, J. K.; MCKEAN, J. D.; ROSTAGNO, M. H. Rapid infection in market weight swine following exposure to a *Salmonella typhimurium*-contaminated environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 1194-1197. 2001.
- HURD, H. S.; MCKEAN, J. D.; GRIFFITH, R. W.; WESLEY, I. V.; ROSTAGNO, M. H. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Applied Environment Microbiology*. 68 (5):2376-2381.2002
- KATARIA, R. S.; TAIT, R. G.; J. R.; KUMAR, D.; ORTEGA, M. A.; RODRIGUEZ, J. & REECY, J. M. Association of toll-like receptor four single nucleotide polymorphisms with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in cattle. *Immunogenetics*. 63, 115-119. 2011.
- KICH, J. D.; COLDEBELLA A.; MORÉS N.; NOGUEIRA, M. G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P. M.; CALL, J. E.; FEDORKA-CRAY, P. & LUCHANSKY, J. B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. 151, 307-313. 2011.
- KICH, J. D.; UTHE J. J.; BENAVIDES M. V. *TLR4* single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with *Salmonella* shedding in pigs. Proceedings of the 113th American Society of Microbiology General Meeting. Submetido, 2013.
- KOBAYASHI, Y.; ITOH A.; MIYAWAKI K.; KOIKE, S.; IWABUCH, O.; IIMURA, Y.; KOBASHI, Y.; KAWASHIMA, T.; WAKAMATSU, J.; HATTORI, A.; MURAKAMI, H.; MORIMATSU, F.; NAKAEBISU, T. & HISHINUMA, T. Effect of liquid whey feeding on fecal microbiota of mature and growing pigs. *Animal Science Journal*. 82, 607-615. 2011.
- LAMENDELLA, R.; DOMINGO, J. W. S.; GHOSH, S.; MARTISON, J. & OERTHER, D. B. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiology*. 11/103, 17p. 2011.
- LEVEQUE, G.; FORGETTA, V.; MORROLL S.; SMITH, A. L.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P.; LOREDO-OSTI, J. C.; MORGAN, K. & MALLO, D. Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. *Infection and Immunity*. 71, 1116-1124. 2003.
- LEYMAN, B.; BOYEN, F.; VAN PARYS, A.; VERBRUGGHE, E.; HAESEBROUK, F. & PASMANS, F. *Salmonella typhimurium* LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs. *Vaccine*. 29, 3679-3685. 2011.
- LEYMAN, B.; BOYEN F.; VAN PARYS A.; VERBRUGGHE, E.; HAESEBROUCK, F. & PASMANS, F. Tackling the issue of environmental survival of live *Salmonella typhimurium* vaccines: deletion of the *Ion* gene. *Research in Veterinary Science*. 93, 1168-1172. 2012.
- LOOFT, T.; JOHNSON, T. A.; ALLEN, H. K.; BAYLES, D. O.; ALT, D. P.; STEDTFELD, R. D.; SUL, W. J.; STEDTFELD, T. M.; CHAI, B.; COLE, J. R.; HASHSHAM, S. A.; TIEDJE, J. M. & STANTON, T. B. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. Proceedings National Academy of Sciences of United States of America. PNAS, 109, p. 1691-1696. 2012.
- NOREEN, M.; SHAH, M. A. A.; MALL, S. M. et al. TLR4 polymorphisms and diseases susceptibility. *Inflammation Research*. 61, 177-88. 2012.
- PALERMO, S.; CAPRA E.; TORREMORELL M.; DOLZAN, M.; DAVOLI, R.; HALEY C. S. & GIUFFRA, E. Toll-like receptor 4 genetic diversity among pig populations. *Animal Genetics*. 40, 289-99. 2009.



- CARLSON, S. A.; BARNHILL, A. E. & GRIFFITH, R. W. Salmonellosis. In: Diseases of Swine. Ed. ZIMMERMAN J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. Wiley-Blackwell. 10<sup>th</sup> ed. p. 821-833. 2012.
- DENAGAMAGE, T. N.; O'CONNOR, A. M.; SARGEANT, J. M.; RAJIĆ, A.; MCKEAN, J. D. Efficacy of vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in live and slaughtered swine: a systematic review of literature from 1979 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*. 4 (4), 539-549. 2007.
- FARZAN, A. & FRIENDSHIP, R. M. A clinical field trial to evaluate the efficacy of vaccination in controlling *Salmonella* infection and the association of *Salmonella*-shedding and weight gain in pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 74, 258-263. 2010.
- HANEDA, T.; OKADA, N.; KIKUCHI, Y.; TAKAGI, M.; KUROTAKI, T.; MIKI, T.; ARAI, S. & DANBARA, H. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Choleraesuis *slyA* mutant strains for use in live attenuated oral vaccines. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 34, 399-409. 2011.
- HOTES, S.; TRAUlsen, I.; KRIETER, J. Salmonella Control Measures with Special Focus on Vaccination and Logistic Slaughter Procedures *Transboundary and Emerging Diseases*. 58, 434-444, 2011.
- HUANG, T.; UTHE, J. J.; BEARSON, S. M. D. et al. Distinct peripheral blood RNA responses to *Salmonella* in pigs differing in *Salmonella* shedding levels: intersection in IFNG, TLR and miRNA pathways. *PLoS ONE*. 6 (12), 28786. 2011.
- HUR, J.; SONG, S. O.; LIM, J. S.; CHUNG, I. K. & LEE, J. H. Efficacy of a novel virulence gene-deleted *Salmonella typhimurium* vaccine or protection against *Salmonella* infections in growing piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 139, 250-256. 2011.
- HURD, H. S.; GAILEY, J. K.; MCKEAN, J. D.; ROSTAGNO, M. H. Rapid infection in market weight swine following exposure to a *Salmonella typhimurium*-contaminated environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 1194-1197. 2001.
- HURD, H. S.; MCKEAN, J. D.; GRIFFITH, R. W.; WESLEY, I. V.; ROSTAGNO, M. H. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Applied Environment Microbiology*. 68 (5):2376-2381.2002
- KATARIA, R. S.; TAIT, R. G.; J. R.; KUMAR, D.; ORTEGA, M. A.; RODRIGUEZ, J. & REECY, J. M. Association of toll-like receptor four single nucleotide polymorphisms with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in cattle. *Immunogenetics*. 63, 115-119. 2011.
- KICH, J. D.; COLDEBELLA A.; MORÉS N.; NOGUEIRA, M. G.; CARDOSO, M.; FRATAMICO, P. M.; CALL, J. E.; FEDORKA-CRAY, P. & LUCHANSKY, J. B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. 151, 307-313. 2011.
- KICH, J. D.; UTHE J. J.; BENAVIDES M. V. *TLR4* single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with *Salmonella* shedding in pigs. Proceedings of the 113th American Society of Microbiology General Meeting. Submetido, 2013.
- KOBAYASHI, Y.; ITOH A.; MIYAWAKI K.; KOIKE, S.; IWABUCH, O.; IIMURA, Y.; KOBASHI, Y.; KAWASHIMA, T.; WAKAMATSU, J.; HATTORI, A.; MURAKAMI, H.; MORIMATSU, F.; NAKAEBISU, T. & HISHINUMA, T. Effect of liquid whey feeding on fecal microbiota of mature and growing pigs. *Animal Science Journal*. 82, 607-615. 2011.
- LAMENDELLA, R.; DOMINGO, J. W. S.; GHOSH, S.; MARTISON, J. & OERTHER, D. B. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiology*. 11/103, 17p. 2011.
- LEVEQUE, G.; FORGETTA, V.; MORROLL S.; SMITH, A. L.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P.; LOREDO-OSTI, J. C.; MORGAN, K. & MALLO, D. Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. *Infection and Immunity*. 71, 1116-1124. 2003.
- LEYMAN, B.; BOYEN, F.; VAN PARYS, A.; VERBRUGGHE, E.; HAESEBROUK, F. & PASMANS, F. *Salmonella typhimurium* LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs. *Vaccine*. 29, 3679-3685. 2011.
- LEYMAN, B.; BOYEN F.; VAN PARYS A.; VERBRUGGHE, E.; HAESEBROUCK, F. & PASMANS, F. Tackling the issue of environmental survival of live *Salmonella typhimurium* vaccines: deletion of the *Ion* gene. *Research in Veterinary Science*. 93, 1168-1172. 2012.
- LOOFT, T.; JOHNSON, T. A.; ALLEN, H. K.; BAYLES, D. O.; ALT, D. P.; STEDTFELD, R. D.; SUL, W. J.; STEDTFELD, T. M.; CHAI, B.; COLE, J. R.; HASHSHAM, S. A.; TIEDJE, J. M. & STANTON, T. B. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. Proceedings National Academy of Sciences of United States of America. PNAS, 109, p. 1691-1696. 2012.
- NOREEN, M.; SHAH, M. A. A.; MALL, S. M. et al. TLR4 polymorphisms and diseases susceptibility. *Inflammation Research*. 61, 177-88. 2012.
- PALERMO, S.; CAPRA E.; TORREMORELL M.; DOLZAN, M.; DAVOLI, R.; HALEY C. S. & GIUFFRA, E. Toll-like receptor 4 genetic diversity among pig populations. *Animal Genetics*. 40, 289-99. 2009.



- PAN, Z. Y.; YE, L.; ZHU, J.; DU, Z. D.; HUANG, X. G.; ZHU, G. Q.; BAO, W. B. & WU, S. L. Isolation of new alleles of the swine TLR4 gene and analysis of its genetic variation. *Yi Chuan*. 33 (2), 163-167. 2011.
- PELLEGRINI, D. P. Avaliação de pontos de contaminação por *Salmonella* sp. e enterobactérias durante o preparo de dietas para suínos. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 2012.
- RETTEDAL, E.; VILAIN, S.; LINDBLOM, S.; LEHNERT, K.; SCOFIELD, C.; GEORGE, S.; CLAY, S.; KAUSHIK R. S.; ROSA, A. J. M.; FRANCIS, D. & BRÖZEL, V. S. Alteration of ileal microbiota of weanling piglets growth-promoting antibiotic chlortetracycline. *Applied and Environmental*. 75, 5489-5495. 2009.
- ROESLER, U.; HELLER, P.; WALDMANN, K. H.; TRUYEN, U. & HENSEL, A. Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella typhimurium* infection in offspring. *Journal of Veterinary Medicine*. 53, 224-228. 2006.
- ROSTAGNO, M. H. Vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in pigs. *Veterinary Record*. 169, 551-552. 2011.
- ROSTAGNO, M. H.; HURD, S.; MCKEAN, J.D. Split Marketing as a Risk Factor for *Salmonella enterica* Infection in Swine. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6 (7), 865-869. 2009.
- ROSTAGNO, M. H., HURD, H.S., MCKEAN, J. D., ZIEMER, C. J., GAILEY, J. K., LEITE, R. C. Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*. *Applied Environment Microbiology*. 69 (8), 4489-94. 2003.
- SCHMIDT, P. L.; O'CONNOR, A. M.; MCKEAN, J. D.; HURD, S. H. The association between cleaning and disinfection of lairage pens and the prevalence of *Salmonella enterica* in swine at harvest. *Journal of Food Protection*. 67, 1384-1388. 2004
- SCHOREDER, N. W. & SCHUMANN, R. R. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infectious Disease*. 5, 156-64. 2005.
- SCHWARZ, P.; KICH, J. D.; COLDEBELLA, A. et al. Evaluation of risk factors and proposals for control of infection of *Salmonella* sp. In different production systems of Brazilian swine. Proceedings of the 21<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress. Vancouver, Canada. 2010.
- SCHWARZ, P.; KICH, J. D.; KOLB J. et al. Use of an avirulent live *Salmonella Choleraesuis* vaccine to reduce the prevalence of *Salmonella* carrier pigs at slaughter. *Veterinary Record*. 169, 69- 553. 2011.
- SELKE, M.; MEENS, J.; SPRINGER, S.; FRANK, R. & GERLACH, G. F. Immunization of pigs to prevent disease in humans: constriction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative-marker vaccine. *Infection and Immunity*. 75 (5), 2476-2483. 2007.
- SHINKAI, H.; OKUMURA, N.; SUZUKI, R., MUNETA, Y & UENISHI, H. Toll-like receptor 4 polymorphism impairing lipopolysaccharide signaling in *Sus scrofa*, and its restricted distribution among Japanese wild boar population. *DNA and Cell Biology*. 4, 575-81. 2012.
- SHINKAI, H.; TANAKA, M.; MOROZUMI, T., EGUCHI-OGAWA, T.; OKUMURA, N.; MUNETA, Y.; AWATA, T. & UENISHI, H. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5 and TLR6 genes. *Immunogenetics*. 58, 324-30. 2006.
- SILVA, L. E.; DIAS, V.; FERRONATO A. et al. Longitudinal dissemination of *Salmonella enterica* clonal groups through the slaughter process of *Salmonella*-positive pig batches. *Journal of Food Protection*. 75, 580-1588. 2012.
- SILVA, L. E.; GOTARDI, C.; VIZZOTTO, R.; KICH, J. D.; CARDOSO, M. Infecção por *Salmonella* sp. em um sistema integrado de produção de suínos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58, 455-461. 2006.
- THOMAS, A. V.; BROES, A. D.; VANDEGAART, H. F. et al. Genomic structure, promoter analysis and expression of the porcine (*Sus scrofa*) TLR4 gene. *Molecular Immunology*. 43, 653-59. 2006.
- UENISHI, H.; SHINKAI, H.; MOROZUMI, T. & MUNETA, Y. Genomic survey of polymorphisms in pattern recognition receptors and their possible relationship to infection in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 148 (1-2), 69-73. 2011.
- UTHE J. J.; ROYAE A.; LUNNEY J. K.; STABEL, T. J.; ZHAO, S. H.; TUGGLE, C. K. & BEARSON, S. M. D. Porcine differential gene expression in response to *Salmonella enterica* serovars Choleraesuis an Typhimurium. *Molecular Immunology*. 44, 2900-2914. 2007.
- WALLIS, T. Host-Specificity of *Salmonella* infections in animal species. In: *Salmonella Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects*. Ed. MASTROENI P. & MASKELL, D. Cambridge University Press, New York, USA. 2006.
- WANG, Y.; QU, L.; UTHE, J. J.; BEARSON, S. M.; KUHAR, D.; LUNNEY, J. K.; COUTURE, O. P.; NETTLETON, D.; DEKKERS, J. C. & TUGGLE, C. K. Global transcriptional response of porcine mesenteric lymph nodes to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Genomics*. 90, 72-84. 2007.
- YANG X.Q.; MURANI E.; PONSUKSILI et al. Association of TLR4 polymorphism with cytokine expression level and pulmonary lesion in pigs. *Molecular Biology Reports*. 39, 7003-7009. 2012.