

LUIZ AUGUSTO AGUIAR ALBINO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E USO DE BACTERIÓFAGOS NO
BIOCONTROLE DE *Salmonella* Typhimurium**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

LUIZ AUGUSTO AGUIAR ALBINO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E USO DE BACTERÍOFAGOS NO
BIOCONTROLE DE *Salmonella* Typhimurium**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Viçosa, como parte
das exigências do programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 15 de julho de 2011

Prof. Dr. José Benício Paes Chaves
(Co-orientador)

Prof. Dr. Juarez Lopes Donzele
(Co-orientador)

Prof. Dra. Edimar Aparecida Filomena Fontes

Prof. Dra. Regina Célia Santos Mendonça
(Orientadora)

Agradeço ao Grande Arquiteto do Universo pela oportunidade de meu crescimento pessoal e profissional.

À minha esposa Ana Carolina, grande companheira, pelo apoio, altruísmo e incentivo durante esta trajetória de vida.

À minha filha Ana Luiza, razão do meu viver.

Aos meus pais pela educação e pelos princípios morais.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.
Não na vitória propriamente dita!”

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, pela vida e tudo que foi proporcionado a ela, por estar presente nos momentos felizes e principalmente nos de aflição, pelas oportunidades e por ter me guiado até elas.

À Professora Regina Célia Santos Mendonça pela amizade, carinho, confiança, orientação, oportunidade, atenção e apoio em todos os momentos deste curso.

Ao Professor Marcos Horácio Rostagno, pela contribuição essencial e enriquecimento do projeto de pesquisa e da dissertação.

Ao Professor Juarez Lopes Donzele, pela dedicação e orientação deste trabalho.

Ao Professor Ricardo Junqueira, grande incentivador e parte fundamental na realização desta conquista.

Ao Professor Edenio Detmann, pela disposição, apoio e ensinamentos.

Aos meus pais, Luiz e Vanja, fonte de respeito e admiração, pelo grande amor, carinho, orgulho, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida.

As minhas queridas irmãs, Marina e Maysa, pelo carinho, amizade e companheirismo.

Ao amor da minha vida, Ana Carolina pelo amor, carinho, cumplicidade, incentivo e companheirismo... sem você não conseguiria chegar até aqui, não saberia o que é felicidade, te amo muito.

À minha filha Ana Luiza, agradeço por alegrar minha vida, por me mostrar o verdadeiro amor e por tudo que vivemos e viveremos juntos.

Aos grandes amigos que fiz nesta jornada, Humberto e Arthur pela imensa ajuda, apoio, amizade e pelos bons momentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), Andreza, Márcia, Ariana, Delaine, Nádia, Mayara, Marjorie, Flávia e Isabelle, pela amizade, apoio durante os experimentos, pelos momentos de descontração e por dividirem as preocupações.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos por estarem sempre dispostos a ajudar durante esta caminhada.

Aos meus grandes amigos, Alencar, Felipe, Reinaldo, Pedro, Rajane, Evertom, Tony, Luiz Felipe, Franklin, Flávio, José, Luiz Márcio, Vitor, Renan, e Rafael pelo apoio, amizade, companheirismo e por sempre me desejarem o melhor.

A todos os meus irmãos DeMolays, em especial, José Ignácio, Túlio, Vitor, Caio, Rodrigo, Henrique e Alexandre pelo apoio, paciência e amizade.

A Maçonaria Universal pelos ensinamentos e baluartes que modelaram e estruturaram meu caráter e minha conduta.

Ao Núcleo de Microscopia da Universidade Federal de Viçosa, por possibilitar a visualização microscópica dos bacteriófagos

À Fundação Oswaldo Cruz pela doação dos micro-organismos utilizados neste experimento e realização do teste de detecção da *Salmonella*.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Principalmente a Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização deste curso.

E todos aqueles que de alguma forma contribuíram,

meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	3
Objetivo Geral	3
Objetivos específicos	3
CAPITULO I – REVISÃO DE LITERATURA	4
1.1 Produção e exportação de carne suína	4
1.2 Presença de <i>Salmonella</i> na cadeia produtiva de suínos	6
1.3 Bactérias do gênero <i>Salmonella</i>	8
1.4 Epidemiologia	11
1.5 Patogenia em suínos	14
1.6 Resistência à antimicrobianos	15
1.7 Bacteriófagos	17
1.7.1 Definição e caracterização	17
1.7.2 Utilização de bacteriófagos em biocontrole de patógenos	19
CAPITULO II - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE BACTERIÓFAGOS DE <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM A PARTIR DE FEZES SUÍNAS	22
RESUMO	22
1. Introdução	23
2. Material e métodos	24
2.1. Micro-organismo hospedeiro	24
2.2. Coleta de amostras de fezes suínas	24
2.3. Isolamento de <i>Salmonella</i> em fezes suínas	25
2.4. Isolamento de bacteriófagos em fezes suínas	26
2.5. Seleção, propagação, determinação do título e estoque de bacteriófagos	27
2.6. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados	28
2.7. Análise da morfologia dos bacteriófagos	28
2.8. Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade de bacteriófagos exposta a diferentes valores de pH	29

2.9. Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade de bacteriófagos exposta a diferentes concentrações de sais biliares.....	29
2.10. Avaliação da atividade <i>in vitro</i> do pool de bacteriófagos	29
3. Resultados e discussão	30
3.1. Coleta e Isolamento de <i>Salmonella</i>	30
3.2. Isolamento, purificação e propagação de bacteriófagos	33
3.3. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados.....	35
3.4. Análise da morfologia dos bacteriófagos por microscopia eletrônica de transmissão.....	37
3.5. Viabilidade dos bacteriófagos expostos a diferentes valores de pH	38
3.6. Viabilidade dos bacteriófagos expostos a diferentes concentrações de sais biliares	41
3.7. Avaliação da eficácia “ <i>in vitro</i> ” do pool de bacteriófagos contra a cepa de <i>Salmonella</i> Typhimurium	43
4. Conclusão.....	44
CAPITULO III - BIOCONTROLE DE <i>Salmonella</i> Typhimurium POR BACTERIÓFAGOS EM SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.....	46
RESUMO	46
1. Introdução.....	47
2. Materiais e métodos.....	48
2.1.1. Delineamento experimental	48
2.1.2. Infecção experimental de <i>Salmonella</i> Typhimurium em suínos e biocontrole com bacteriófagos	49
2.1.3. Abate, coleta de amostras do material fecal	49
2.1.4. Coleta de amostras dos órgãos	49
3. Resultados e discussão	50
3.1. Coleta de amostras do material fecal.....	50
3.2 Coleta de amostra dos órgãos	59
4. Conclusões	54
CAPITULO IV - Conclusões Gerais	56
Referências bibliográficas.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Famílias de Bacteriófagos	18
Figura 2	Padrão de referência de placa de lise bem definidas usada como referencial para a seleção dos bacteriófagos	34
Figura 3	Microfotografia dos bacteriófagos isolados em microscopia eletrônica de transmissão. Bacteriófagos apresentando características semelhantes de cauda curta e cabeça icosaédrica, com aumento de 85.000 vezes	38
Figura 4	Viabilidade dos bacteriófagos expostos a diferentes valores de pH	40
Figura 5	Viabilidade dos bacteriófagos expostos a diferentes concentrações de sais biliares	42
Figura 6	Medidas de absorvância do cultivo de <i>Salmonella</i> Typhimurium na presença de diferentes MOIs do pool de bacteriófagos (λ 600 nm)	43
Figura 7	Colônias características de <i>Salmonella</i> em meios de cultura Rambach (A) e XLT4 (B). Placas representando a segunda repetição do tratamento com a maior MOI: 10000 (T42), nas diluições de 10^{-2} e 10^{-3} (A) e 10^{-3} e 10^{-4} (B).	50
Figura 8	Quantificação de <i>Salmonella</i> Typhimurium em diferentes órgãos após a aplicação do tratamento com diferentes MOIs do pool de bacteriófagos.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Detalhamento da coleta de amostras de fezes suínas.	25
Tabela 2	Resultado da sorotipagem das colônias características de <i>Salmonella</i> enviadas à FIOCRUZ	32
Tabela 3	Isolamento de bacteriófagos e avaliação da presença de <i>Salmonella</i> Typhimurium nas propriedades da região de Viçosa	33
Tabela 4	Valores médios (\pm desvio padrão) da titulação final dos bacteriófagos isolados de fezes frescas de suínos após propagação.....	35
Tabela 5	Avaliação da especificidade dos diferentes bacteriófagos isolados em relação a diferentes sorotipos de <i>Salmonella</i> e <i>Escherichia coli</i> usadas como hospedeiro	36
Tabela 6	Efeito dos tratamentos com diferentes MOIs sobre a contagem média de <i>Salmonella</i> Typhimurium a 37 °C, após 6 horas de contato	44

RESUMO

ALBINO, Luiz Augusto Aguiar, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella Typhimurium***. Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Co-orientadores: José Benício Paes Chaves e Juarez Lopes Donzele.

O Brasil é o quarto maior produtor e quinto maior consumidor mundial de carne suína. Sua cadeia produtiva está em constante evolução a fim de fornecer produtos de qualidade tanto para o mercado interno quanto externo. Entretanto a presença de *Salmonella* em praticamente todas as etapas de produção constitui um problema de saúde pública e de grande prejuízo econômico para o setor. O uso indiscriminado de antimicrobianos promoveu diversos mecanismos de resistência à *Salmonella*, dificultando o controle e a eliminação deste patógeno. Desta forma, há uma necessidade de desenvolvimento de práticas terapêuticas e os bacteriófagos ressurgem como uma alternativa de controle. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e testar bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella Typhimurium* em suínos. Foram isolados e selecionados seis bacteriófagos em oito propriedades das regiões de Viçosa, Teixeira e Coimbra no Estado de Minas Gerais. Os bacteriófagos selecionados foram avaliados quanto à especificidade em relação a várias estirpes de micro-organismos, quanto à morfologia e quanto a atividade sobre *Salmonella Typhimurium* foram utilizados em forma de pool “*in vitro*”. Foi possível o isolamento de bacteriófagos em 75 % das propriedades e após propagação eles alcançaram contagem entre 10^{10} e 10^{11} PFU/mL. Os bacteriófagos apresentaram atividade sobre diferentes estirpes de *Salmonella*. Em relação à morfologia, todos apresentaram cabeça icosaédrica e pequenas caudas o que indica serem da ordem *Caudovirales* e da família *Podoviridae*. O efeito dos bacteriófagos sobre a contagem de *Salmonella* em meio de cultura foi dependente da concentração de bacteriófago utilizada. As maiores reduções de células viáveis de *Salmonella* foram de, aproximadamente, 2,5 log UFC/ mL obtidas nos cultivos de bacteriófagos com MOI: 10000. Embora não tenha sido totalmente eliminado, o resultado demonstrou uma considerável redução da

contagem de *Salmonella* Typhimurium, sugerindo o potencial que os bacteriófagos possuem para o biocontrole deste patógeno. Um pool com os seis bacteriófagos isolados foi testado em suínos experimentalmente infectados com *Salmonella* Typhimurium e avaliar sua eficiência na forma de biocontrole. Trinta animais foram infectados experimentalmente com 10^5 UFC/ mL de *Salmonella* Typhimurium e posteriormente tratados com diferentes MOIs: 0,01, 1, 100 e 10000. Estes animais foram abatidos e foram realizadas coletas do material fecal do íleo, ceco e das excretas para quantificar a contagem de *Salmonella*, utilizando os meios de cultura Rambach e XLT4. O baço, rim, fígado e linfonodo mesentérico dos animais do tratamento de MOI: 10000 foram removidos para avaliar a translocação de bacteriófagos. A administração de *Salmonella* Typhimurium gerou quadro de salmonelose em nove animais (30 %). O meio de cultura Rambach foi mais específico e o XLT4 mais sensível. Houve redução na contagem de *Salmonella* do íleo e ceco em MOIs: 100 e 10000, mas não houve redução nas fezes em nenhum dos tratamentos. O quadro clínico de salmonelose não permitiu a translocação do bacteriófago, sugerindo que o tratamento com bacteriófagos deve ser na forma preventiva e não corretiva da infecção por *Salmonella*. Conclui-se que a metodologia aplicada neste trabalho mostrou-se eficaz na redução da contagem de *Salmonella*, em suínos experimentalmente infectados, entretanto deve-se considerar a necessidade de proteger os bacteriófagos contra os efeitos de pH e sais biliares e outros, durante sua passagem pelo sistema digestivo do animal, para aumentar sua viabilidade e eficiência no biocontrole de *Salmonella* Typhimurium.

ABSTRACT

ALBINO, Luiz Augusto Aguiar, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, in July of 2011. **Isolation, characterization and use of bacteriophage in biocontrole of *Salmonella* Typhimurium.** Advisor: Regina Célia Santos Mendonça. Co-advisors: José Benício Paes Chaves e Juarez Lopes Donzele.

Brazil is the fourth producer and fifth consumer of pork meat. Your chain production is evolving to provide quality products to domestic and foreign markets. However, the presence of *Salmonella* in practically all stages of production constitutes a public health problem of great economic loss to the industry sector. The indiscriminate use of antibiotics has promoted several mechanisms of resistance to *Salmonella*, making the control and eradication of this pathogen hard. Thus, there is a need to development of therapeutic practices and bacteriophages reemerge as an alternative control. The objective of this study was isolate, characterize and test phage control of *Salmonella* Typhimurium in pigs. Were isolated and selected bacteriophages of six properties in eight regions of Viçosa, Teixeira and Coimbra in Minas Gerais state. The selected phages were evaluated for specificity against several strains of micro-organisms, the morphology and the activity against were used in the form of pool *Salmonella* Typhimurium “*in vitro*”. It was possible to isolate bacteriophages in 75% of the properties and spread after they reached score between 10^{10} and 10^{11} PFU / mL. Bacteriophages showed activity against different strains of *Salmonella*. Regarding morphology, all had icosahedral heads and small tails indicating that they are of the order *Caudovirales* and family *Podoviridae*. The effect of bacteriophages on the count of *Salmonella* in the culture medium was concentration-dependent bacteriophage used. The largest reductions of viable cells of *Salmonella* were approximately 2.5 log CFU / mL obtained in the cultures of bacteriophages with MOI: 10000. Although not totally eliminated, the result showed a significant reduction in counts of *Salmonella* Typhimurium, suggesting that bacteriophages have potential for biocontrol of the pathogen. A pool with six phage isolates was tested in pigs

experimentally infected with *Salmonella* Typhimurium and evaluate their effectiveness in the form of biocontrol. Thirty animals were experimentally infected with 10^5 CFU / mL of *Salmonella* Typhimurium and subsequently treated with different MOIS: 0.01, 1, 100 and 10000. These animals were slaughtered and samples were collected from the fecal material of the ileum, cecum and feces to quantify the count of *Salmonella* using the culture medium and Rambach XLT4. The spleen, kidney, liver and mesenteric lymph node of the treatment of animals it MOI: 10000 were removed to assess the translocation of bacteriophage. Administration of *Salmonella* Typhimurium generated picture of salmonellosis in nine animals (30%). Rambach culture medium was more specific and XLT4 more sensitive. There was a reduction in *Salmonella* counts of the ileum and cecum in MOIS: 100 and 10000 but no reduction in the feces in any of the treatments. The clinical salmonellosis did not allow the translocation of bacteriophage, suggesting that treatment with bacteriophages should be in the form of preventive rather than corrective *Salmonella* infection. It is concluded that the methodology applied in this study proved effective in reducing *Salmonella* counts in experimentally infected pigs, however one must consider the need to protect against the effects of bacteriophages pH and bile salts and others, during its passage the animal's digestive system to increase its viability and efficiency in the biocontrol of *Salmonella* Typhimurium.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de carne suína, ficando atrás somente dos Estados Unidos da América (EUA), União Européia (UE) e China e o quinto maior consumidor, ficando atrás somente da China, EU, EUA e Rússia. No período entre 2004 e 2010, houve crescimento em praticamente todos os setores da cadeia produtiva de suínos, com aumentos no número de matrizes alojadas, suínos abatidos, produção e exportação da carne suína pelas indústrias.

A globalização incorporou restrições sanitárias, impostas pela UE aos países exportadores de produtos de origem animal, quanto à presença de resíduos e contaminantes. Em consequência a estas restrições sanitárias, países membros da Organização Mundial de Comércio (OMC), devem rever, implantar e implementar os sistemas de controles internos, ou seja, adotar o APPCC – Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (“*Hazard Analysis and Critical Control Points – HACCP*”). Entretanto a ocorrência de casos de infecção alimentar, ligadas a diversos patógenos, principalmente a *Salmonella*, impõe destaque à importância da qualidade sanitária dos estabelecimentos.

Os suínos podem veicular diversos tipos de micro-organismos patogênicos, e estudos mostram que *Salmonella* está entre as principais causas de doenças transmitidas por alimentos relacionados aos suínos. Este patógeno está presentes em toda a cadeia produtiva da carne suína, do nascimento do animal até o produto final. Segundo o *Codex Alimentarius* a presença de qualquer sorotipo desta bactéria em alimentos é motivo para classificá-los como impróprio para consumo. A partir disso, é importante avaliar o perigo que estes produtos representam e implementar estratégias de controle com a finalidade de garantir a segurança dos alimentos.

A utilização de antimicrobianos na dieta animal pode promover a resistência bacteriana cruzada para humanos, quando são consumidos produtos de origem animal submetidos a tais dietas. Isso restringe a

comercialização de carne produzida com a utilização destes, por vários países da OMC. Os surtos causados pela ingestão de alimentos contaminados sugerem a possibilidade de transmissão de eventuais linhagens resistentes pela cadeia alimentar.

Desta forma, há uma necessidade de desenvolvimento de novas práticas terapêuticas e os bacteriófagos ressurgem como uma alternativa. O biocontrole envolvendo bacteriófagos possui diversas características que diferem da utilização de antimicrobianos. Dentre as vantagens de utilização de bacteriófagos destaca-se sua alta especificidade, capacidade de auto reprodução e sua produção rápida e barata. Devido ao aumento crescente de bactérias resistentes e multirresistentes, tais alternativas estão sendo cada vez mais exploradas e estudadas. Estudos, *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que ao contrário da resistência bacteriana aos antimicrobianos, os bacteriófagos estão constantemente evoluindo para contornar a resistência da bactéria à infecção, sugerindo o potencial que os bacteriófagos possuem para o biocontrole deste patógeno.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Isolar, caracterizar e utilizar bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella* Typhimurium em suínos experimentalmente infectados.

Objetivos específicos

- a) Isolar bacteriófagos líticos à *Salmonella* Typhimurium em suinoculturas da Região das cidades Viçosa, Teixeiras e Coimbra do estado de Minas Gerais;
- b) Avaliar a presença de *Salmonella* Typhimurium em suinoculturas da Região das cidades Viçosa, Teixeiras e Coimbra do estado de Minas Gerais;
- c) Caracterizar os bacteriófagos isolados quanto sua morfologia, resistência a diferentes níveis de pH e diferentes concentrações de sais biliares;
- d) Avaliar o pool de bacteriófagos isolados no biocontrole de *Salmonella* Typhimurium “*in vitro*”;
- e) Avaliar o pool de bacteriófagos isolados no biocontrole de *Salmonella* Typhimurium em suínos experimentalmente infectados;
- f) Avaliar a translocação dos bacteriófagos para diferentes órgãos dos suínos abatidos

CAPITULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Produção e exportação de carne suína

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de carne suína, ficando atrás somente dos Estados Unidos da América (EUA), União Européia (UE) e China e o quinto maior consumidor, ficando atrás somente da China, EU, EUA e Rússia. Em 2010 possuía um rebanho superior a 39 milhões de cabeças e produziu mais de três milhões de toneladas de carne (ABIPECS, 2011a). No período entre 2004 e 2010, houve crescimento praticamente em todos os setores da cadeia produtiva de suínos. As matrizes alojadas passaram de 1,37 para 2,45 milhões, aumento de 44 %, o número de suínos abatidos pela indústria, passou de 33,3 para 39,6 mil, aumento de 16 % e a produção de carne passou de 2,6 para 3,2 toneladas, aumento de 19,65 % (ABIPECS, 2011b). O Brasil contribui apenas com 3 % da produção mundial de carne suína, enquanto carne bovina e de frango, chega a 15 %. Por ser um mercado em expansão, há muito espaço para a carne suína conquistar, de modo que a cadeia produtiva de suínos está em constante evolução a fim de fornecer produtos de qualidade tanto para o mercado interno quanto externo.

Entre os principais países importadores da carne suína brasileira estão Rússia, Hong Kong, Argentina e Ucrânia, com 40,72 %, 19,43 %, 7,14 % e 6,71 % do total exportado pelo Brasil, respectivamente, no período de janeiro a junho de 2011. (ABIPECS, 2011c). Apesar da crise financeira que ocorreu no final de 2008, o mercado brasileiro reagiu no início do primeiro semestre de 2009, conseguindo inclusive atingir mercados aos quais não tinha acesso, tais como a China e África do Sul. Tais mercados, não importavam carne suína, devido à falta de habilitação dos frigoríficos e por causa de foco de febre aftosa no Paraná e Mato Grosso do Sul em outubro de 2005 (SI, 2011a; SI, 2011b; SI, 2011c).

Em maio de 2011, a Rússia importou do Brasil 261 toneladas de carne suína, um aumento de 67,8 % quando comparado a janeiro do mesmo ano. Entretanto no dia 15 de junho, o país embargou 85 frigoríficos, devido à falta de habilitação e deficiência na inspeção sanitária dos mesmos, o que causará grande prejuízo aos produtores de carne suína no Brasil (SI, 2011d). Para tentar contornar a situação, o Departamento de Inspeção de Produtos de

Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) pretende criar um marco regulatório de sanidade agropecuária nacional, inicialmente, reformulando instruções normativas junto ao Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA), já que a lei que institui o serviço de inspeção de produtos de origem animal é dos anos 50 e sua regulamentação, feita por decreto, nos anos 60 (SI, 2011d).

A globalização incorporou restrições sanitárias, impostas pela União Europeia aos países exportadores de produtos de origem animal, quanto à presença de resíduos e contaminantes. O Brasil possui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC/Área Animal), que monitora diversos resíduos e contaminantes, como antibióticos, promotores de crescimento, metais pesados, entre outros, totalizando 171 substâncias (BRASIL, 2009a). Em março de 2011, técnicos da delegação europeia estiveram em frigoríficos de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo, principais produtores e exportadores da carne suína brasileira, e constataram que os limites de resíduos e contaminantes recomendados pelo *Codex Alimentarius* eram respeitados nos estabelecimentos (SI, 2011f).

Em consequência a estas restrições sanitárias, países membros da Organização Mundial de Comércio (OMC), devem rever, implantar e implementar os sistemas de controles internos, ou seja, adotar o APPCC – Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (“*Hazard Analysis and Critical Control Points – HACCP*”). Como já é bem estabelecido, e apresenta abordagem científica e sistemática para o processo de produção, o APPCC assegura que os controles serão aplicados em determinadas etapas, no sistema de produção de alimentos, onde possam ocorrer perigos ou situações de risco à saúde humana (FIGUEIREDO e COSTA, 2001). Entretanto a ocorrência de casos de infecção alimentar, ligadas a diversos patógenos, impõe destaque à importância da qualidade sanitária dos estabelecimentos, sob o ponto de vista econômico da suinocultura brasileira (PASSOS et al, 2008; WELKER et al, 2010).

A presença de micro-organismos patogênicos, tais como *Salmonella* ainda constitui um problema de saúde pública e de grande prejuízo econômico tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, representando um entrave para a exportação de produtos cárneos de origem suína. Estes micro-organismos estão presentes em toda a cadeia produtiva da carne suína, desde

o nascimento do animal até o produto final, sendo necessárias a adoção de medidas efetivas para seu controle e eliminação (PASSOS et al, 2008; WELKER et al, 2010).

1.2 Presença de *Salmonella* na cadeia produtiva de suínos

No Brasil, a situação dos rebanhos e dos produtos de origem suína em relação à presença de *Salmonella* é pouco conhecida, pois não existe um programa oficial de monitoria ativa da contaminação de carcaças. Entretanto em relação à presença de patógenos em produtos de origem animal, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) está trabalhando no monitoramento microbiológico e controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal, prontos para o consumo, e *Salmonella* em carcaças de frangos e perus abatidos nos estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF), mas nenhuma destas normas faz referência a produtos de origem suína (BRASIL, 2009b; BRASIL, 2003). Porém, como os lotes vendidos são testados pelos países importadores, os frigoríficos possuem protocolos de monitoria interna e a avaliação da contaminação e o controle da *Salmonella* vem ganhando importância dentro dos programas de boas práticas de produção.

Na produção de suínos, a infecção por *Salmonella* caracteriza-se por dois problemas: a presença de sorotipos patogênicos para os animais que provocam gastroenterites e septicemias, e a presença de sorotipos não patogênicos que são as principais fontes de contaminação das carcaças nos abatedouros e que são patogênicos para humanos (BERSOT, 2005). A prevalência de *Salmonella* em suínos ao abate foi determinada por diversos autores. Em estudos realizados por Weiss et al (2002) e Bessa et al (2004) no Rio Grande do Sul, Teixeira et al (2006) em São Paulo e Silva et al (2008) no Mato Grosso, indicam ocorrência de *Salmonella* de 6,4 %, 55,6 %, 23,9 % e 16,6 % respectivamente.

Avaliando a contaminação em um sistema integrado de produção, Silva et al (2006) relataram que não foi possível isolar *Salmonella* nos animais em fase de creche, porém os animais ao abate apresentavam 76,9 % de ocorrência, mostrando que o ponto crítico da contaminação pode ter ocorrido na fase de terminação, sugerindo a ração como responsável. Resultado semelhante foi

encontrado por Müller et al (2009) ao avaliarem os animais no início da fase de terminação e ao abate, encontrando valores entre 12 e 28 % de ocorrência na fase inicial e 90 % ao abate.

Na Dinamarca, os registros de casos de salmonelose em humanos associados ao consumo de produtos de origem suína determinaram a implementação do programa de monitoramento e controle dos rebanhos, que tem sido modelo para ações semelhantes em outros países produtores e exportadores de carne suína. Para enfrentar o problema da presença de suínos portadores ao abate e o risco de contaminação das carcaças durante o processamento, há necessidade de identificação dos fatores de risco associados à infecção e a implementação de medidas de controle nos rebanhos (MÜLLER et al, 2010)

Além da avaliação sanitária das granjas, o transporte e a espera pré-abate têm sido apontados como pontos críticos de contaminação por *Salmonella* (ROSTAGNO et al, 2003; FUNK et al, 2001). Estudos mostraram que em condições experimentais *Salmonella* Typhimurium pode contaminar suínos no período de pré-abate em menos de 2 horas de exposição a ambientes contaminados (OLIVEIRA et al, 2007). Ao chegarem ao abatedouro, os animais são mantidos em pocilgas por 2 horas no mínimo, período este que pode se estender por até 6 a 8 horas à espera do abate. Em estudos realizados por Rostagno (2001) foram detectadas 83,3 % de amostras positivas em fezes coletadas nos caminhões de transporte e 100 % em amostras oriundas de pocilgas utilizadas no descanso pré-abate.

Suínos sadios podem se tornar infectados, principalmente pela via fecal-oral, mas também, pela via nasal, no ambiente contaminado ou pelo contato direto com animais contaminados (SWANENBURG et al, 2001). A fim de evitar a disseminação da infecção nas etapas de transporte e de permanência nas pocilgas, algumas medidas de controle devem ser tomadas. É importante evitar a mistura de animais de diversas granjas, além de manejá-los com tranquilidade e cuidado para minimizar o estresse e se possível os lotes devem ser distribuídos em caminhões separados (BAHNSON et al, 2006). A limpeza e desinfecção adequada dos veículos de transporte, entre os diversos carregamentos são importantes na prevenção da disseminação do agente e devem ser monitoradas por meio de controles visuais e bacteriológicos (SWANENBURG et al, 2001; ROSTAGNO, 2001).

Para que o controle seja efetivo é indispensável a adoção de medidas de biossegurança no manejo do rebanho, como intensificação da limpeza e desinfecção das instalações, eliminação de animais doentes, controle efetivo de insetos e roedores, práticas restritivas em relação à entrada de funcionários e visitantes, tal como troca de roupas e calçados, uso de pedilúvios e rodolúvios, entre outros (KICH et al, 2007a; FEDORKA-CRAY et al, 2000; FEDORKA-CRAY et al, 1994; ROSTAGNO, 2002b; SCHWARZ et al, 2009). Mannion et al (2007) demonstraram que granjas com alta prevalência tendem a ter mais contaminação residual em cochos e equipamentos após limpeza e desinfecção de baias. Resultado semelhante foi encontrado por Rajic et al (2007) ao verificar que o manejo “todos-dentro-todos-fora” entre lotes, foi capaz de diminuir a contaminação por *Salmonella* nas granjas observadas. Porém, estes autores não indicam a utilização apenas deste tipo de manejo, sugerindo que a utilização de vazios sanitários e de mais correções de fatores de risco também são necessários para a diminuição da presença deste patógeno em granjas produtoras de suínos. Neste sentido, Funk (2008) também relaciona práticas de biossegurança, principalmente com relação à limpeza e desinfecção, que foram relacionadas com a diminuição da prevalência de *Salmonella* em suínos.

Dentro do programa de controle, também é importante o acompanhamento bacteriológico do processo de fabricação das rações fornecidas aos animais. Conforme Lo Fo Wong et al (2002) etapas de descontaminação e o controle do processo, além do uso de tratamento térmico e ácidos orgânicos, diminuem a contaminação de rações. O que também foi relatado pelo estudo de Pellegrini et al (2009) que avaliaram a frequência de isolamento de *Salmonella* em diversas etapas do processo da produção de ração para suínos verificando que áreas como a armazenagem e a recepção eram críticas.

1.3 Bactérias do gênero *Salmonella*

As bactérias do gênero *Salmonella* fazem parte da família *Enterobacteriaceae*. A classificação taxonômica proposta por Popoff e Le Minor (1997) consiste em: gênero, espécie, subespécie e sorotipos. O gênero *Salmonella*, é classificado em 3 espécies: *Salmonella enterica*, *Salmonella*

bongori e *Salmonella subterrânea* (TINDALL et al, 2005; SHELOBOLINA et al, 2004). O gênero possui um total de 2.579 sorotipos, dos quais, 2.557 pertencem à espécie *Salmonella enterica* e 22 à espécie *Salmonella bongori*. Entre os sorotipos presentes na espécie *Salmonella enterica*, 1.531 (59,87 %) são da subespécie *enterica*, na qual estão incluídas os sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium. Cerca de 99,5 % das salmoneloses humanas e animais, são atribuídas à *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (GRIMONT e WEILL, 2007).

Salmonellas são bastonetes gram-negativos, anaeróbios facultativos, com flagelos móveis, exceto os sorotipos Pullorum e Gallinarum. A temperatura ótima de crescimento é 37 °C e multiplicam-se em uma faixa de pH entre 4,5 e 9,5. A atividade de água (aa) necessária para o desenvolvimento é acima de 0,93 (D'AOUST, 2001; BRENNER et al, 2000). O perfil bioquímico caracteriza-se por produção de ácido sulfídrico e gás carbônico a partir da glicose e outros carboidratos, exceto lactose e sacarose. São oxidase e catalase positivas e capazes de se multiplicarem utilizando citrato como única fonte de carbono. Em geral, produzem ácido sulfídrico (H₂S), descarboxilam lisina e ornitina, e não hidrolisam a uréia (BRENNER et al, 2000). Bactérias do gênero *Salmonella* são capazes de resistir por até nove meses em solos úmidos, água e em insumos para alimentação animal. São sensíveis à luz solar e a diversos desinfetantes utilizados nas indústrias, tais como fenóis, clorados e iodados. São capazes de permanecerem viáveis por 13 meses a -21 °C no ambiente. Entretanto, são inativadas a 60 °C por cinco minutos (OLIVEIRA, 2000).

Apesar da diferente gama de hospedeiros, vários destes sorotipos de *Salmonella enterica* tem relação muito próxima, já que apresentam cerca de 90 % de similaridade em seu DNA. Contudo, cada sorotipo apresenta regiões específicas de inserções ou elisões, distribuídas em várias partes do cromossomo, cujos produtos dos genes podem estar envolvidos na habilidade peculiar de cada sorotipo em infectar uma variedade de hospedeiros (EDWARDS et al, 2002).

Em 1896, o médico francês Georges Widal observou que bacilos isolados de pessoas acometidas por febre tifoide eram aglutinados quando em contato com o soro sanguíneo dos doentes, criando assim o teste que ficou conhecido como sorodiagnóstico. Isso permitiu que, em 1926, White organizasse um esquema de identificação de *Salmonella* a partir da análise dos diferentes tipos

de antígeno O, H e Vi que possuem, classificando-as em sorotipos (GRIMONT et al, 2000; LEDERMANN, 2003). Esse esquema foi aperfeiçoado por Kauffmann em 1961, passando a ser conhecido como Kauffmann-White. Tem grande importância epidemiológica, sendo periodicamente atualizado pelo Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa em *Salmonella* da Organização Mundial de Saúde (*WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*) (POPOFF, 2001; GRIMONT et al, 2000; LEDERMANN, 2003).

O antígeno “O” ou somático é a fração polissacarídica do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular das bactérias Gram negativas. A cadeia lateral do antígeno O estende-se para a superfície bacteriana e a sequência específica de carboidratos que a formam variam entre as diferentes espécies bacterianas e mesmo entre os diversos sorotipos, caracterizando-os antigenicamente (GRIMONT et al, 2000).

O antígeno “H” está presentes nos flagelos e são compostos de subunidades protéicas chamadas flagelinas. Diferentemente das outras enterobactérias a maioria das *Salmonella* são bifásicas, ou seja, podem apresentar alternadamente flagelos de fase 1 (específica) e fase 2 (não específica), cuja expressão é controlada por dois genes cromossômicos diferentes. Algumas *Salmonella* só apresentam flagelos de uma fase (monofásicas) e outras não apresentam flagelo (imóveis) (GRIMONT et al, 2000).

O antígeno Vi ou capsular é um polímero polissacarídico sintetizado pela bactéria e depositado sobre a superfície externa da parede celular. Está presente em apenas três sorotipos de *Salmonella*, Typhi, Paratyphi C e Dublin (GRIMONT et al, 2000).

Os fatores antigênicos O são identificados através de números arábicos e caracterizam os sorogrupos, denominados por letras maiúsculas de A a I, onde são reunidos os sorotipos que possuem antígenos somáticos iguais. Os antígenos flagelares (H) de fase 1 e 2 são representados respectivamente por letras minúsculas e números arábicos. Já o antígeno capsular (Vi) apresenta um único tipo imunológico tendo menor importância em termos de classificação. A união desses dados dá origem à fórmula antigênica, específica para cada sorotipo (GRIMONT, 2000). *Salmonella* Typhimurium, por exemplo, pertence ao sorogrupo B e sua fórmula antigênica é 1,4,5,12:i:1,2.

1.4 Epidemiologia

Salmonella é de difícil controle na produção animal, uma vez que os animais podem ser portadores assintomáticos disseminando a bactéria pelas fezes (FEDORKA-CRAY et al, 1995). Esses animais desempenham importante papel na propagação da infecção no rebanho e conseqüentemente servem como fonte de contaminação alimentar e infecção humana (ROSTAGNO et al, 2002a; HEGDE et al, 2005; BAHNSON et al, 2006). Esta bactéria é um importante patógeno envolvido em enfermidades alimentares e suínos e o seu sistema de produção têm sido implicados como importantes fontes de contaminação (HALD et al, 2003; SORENSEN et al, 2004).

O animal infectado pode ou não desenvolver sintomas clínicos da doença, entretanto o portador e conseqüente disseminador de salmonela é a forma mais importante de manutenção do agente nos rebanhos e de sua entrada nos frigoríficos (SCHWARTZ, 2000). O risco de infecção por *Salmonella* em humanos pelo consumo de carne suína está relacionado com a presença de carcaças positivas no frigorífico (HURD et al, 2008). Este risco depende de múltiplos fatores: nível de infecção nas granjas (NOLLET et al, 2005); higiene durante o processamento da carcaça no frigorífico (BORCH et al, 1996); condições de estocagem e distribuição (MANN et al, 2004) e, finalmente, a manipulação, armazenamento e preparo da carne pelo consumidor (HILL et al, 2003). *Salmonella* pode causar grande variedade de doenças em humanos desde febre tifoide, bacteremia e gastroenterite. É um dos principais micro-organismos associados com casos de gastroenterite veiculada por alimentos em todo o mundo e um importante problema de saúde pública (CDC, 2007; PAYMENT e RILEY, 2002).

Crianças, idosos e imunodeprimidos são relacionados como o grupo mais afetado por salmonelose, verificando-se nesse grupo a maioria dos casos de hospitalizações e óbito nos Estados Unidos (CDC, 2010a). Segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2008), os principais alimentos envolvidos em surtos humanos, estão relacionados ao consumo de carnes mal cozidas e ovos crus, associados a quase 40 % dos casos na Europa. Entre os casos de salmonelose em humanos, foi estimado que 24 % estão relacionados ao consumo de carne suína nos Estados Unidos (CDC, 2010a; CDC, 2010b), sendo responsável por 11 % dos surtos na União Européia (ETHELBERG et al,

2008). Nos Estados Unidos, anualmente, são diagnosticados entre 30.000 a 40.000 casos de salmonelose pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC), porém, devido a muitos casos não serem relatados, estima-se que a incidência seja de aproximadamente 1,4 a 4 milhões de infecções e de 500 a 600 casos fatais a cada ano (USDA, 2010; CDC, 2010a).

No Brasil, Greig e Ravel (2009) avaliaram dados epidemiológicos de doenças de origem alimentar reportados internacionalmente durante o período de 1988 a 2007 e encontraram 4.093 surtos causados por alimentos, nos quais se conheciam o agente etiológico e o tipo de alimento envolvido. *Salmonella* foi responsável pela maioria dos surtos, com destaque para o sorotipo Typhimurium envolvido em 270 surtos, sendo ovos, carne suína e produtos lácteos os principais veículos deste micro-organismo.

Na maioria dos casos o isolamento do agente etiológico ou a pesquisa para confirmação do possível alimento incriminado são negligenciados, o que contribui para sub-notificação e sub-estimativa da prevalência de salmonelose em humanos (SANTOS et al, 2002). No Brasil foram notificados 6.062 surtos de doenças de origem alimentar durante 1999 a agosto de 2008, com 117.330 pessoas doentes e 64 mortes. Em 3088 surtos não foi possível identificar o agente etiológico e *Salmonella* foi o principal micro-organismo envolvido nos surtos restantes (SVS, 2009). Devido à característica auto-limitante, na maioria dos casos de salmonelose as pessoas acometidas não procuram atendimento médico aos primeiros sinais da doença.

Em estudo realizado por Chaves, Gonçalves e Franco (2000), no Rio de Janeiro, foram encontradas 10 % das amostras de linguiça frescal de origem suína positivas para *Salmonella*, enquanto Tavechio et al (2002) em São Paulo, relataram 5 % de ocorrência de *Salmonella* em salsicha e Lobo et al (2001) encontraram a mesma percentagem em salames coloniais positivos no Rio Grande do Sul.

Em humanos, *Salmonella* Typhimurium é o sorotipo mais comumente associado ao consumo de produtos de origem suína contaminados, os sintomas iniciais da doença são náuseas e vômitos que geralmente, não persistem após o início da diarreia. Durante a salmonelose aguda, as fezes podem conter um bilhão de células de *Salmonella* por grama (PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002). A enfermidade clínica causada ao homem pela ingestão de alimentos contaminados por *Salmonella* tem um período de

incubação de 8 a 36 horas, com os extremos oscilando entre 5 e 72 horas (SCHAECHTER, 2004). A duração é, usualmente, de 4 a 7 dias e a maioria das pessoas se recuperam. No entanto, em alguns indivíduos a diarreia pode ser tão severa que o paciente precisa ser hospitalizado.

O problema humano se agrava quando o patógeno apresenta resistência às drogas de eleição para o seu tratamento. Há consenso em vários países que o uso indiscriminado de antibiótico na produção animal é uma das causas do aumento da resistência antimicrobiana. Patógenos com genes de resistência podem circular entre humanos, animais e outros ecossistemas, via contato com animais ou através do consumo de alimento ou água contaminada (NOLLET et al, 2006; KICH e CARDOSO, 2004b).

1.5 Patogenia em suínos

As infecções causadas por *Salmonella* apresentam patogenia complexa, sendo o primeiro passo no processo de doença, a transmissão da bactéria para um hospedeiro susceptível. A dose necessária para iniciar a infecção é de 10^5 a 10^{10} bactérias variando conforme a cepa e o estado geral do hospedeiro. Uma quantidade maior de inóculo é necessária para superar a barreira de acidez do estômago e competir com a microbiota do intestino. No entanto, a dose infectante pode ser reduzida quando a bactéria é ingerida com alimentos que passam rapidamente pelo estômago, como líquidos, ou com alimentos que neutralizam a acidez estomacal (MILLER et al, 1999).

Salmonella Choleraesuis é o sorotipo que possui maior capacidade invasiva, não necessitando de grande carga bacteriana para provocar a doença. Este sorotipo possui predileção pelo íleo e cólon enquanto *Salmonella* Typhimurium é menos invasiva e necessita de maior quantidade de células bacterianas para induzir a doença (KICH, 2007a). Segundo Hurd et al (2001), *Salmonella* Typhimurium pode ser encontrada em enterócitos e linfonodos mesentéricos duas horas após a ingestão, ou seja, o trato intestinal é colonizado rapidamente.

O ambiente estomacal de suínos pode apresentar pH 2,5 ou inferior, fazendo com que muitas bactérias em trânsito sejam eliminadas (BOYEN et al, 2008). Alguns fatores, tal como a proteção exercida pela matéria orgânica presente nas rações, permitem que *Salmonella* resista às condições

estomacais (BÜNZEN, 2006). Somado a isto, as bactérias desenvolvem mecanismos de defesa, como a produção de proteínas de resistência ao choque ácido, já identificado em amostras de *Salmonella* (AUDIA, WEBB e FOSTER, 2001).

A bactéria que sobrevive à passagem pelo estômago, chega ao intestino delgado onde encontrará outros fatores antibacterianos, incluindo sais biliares, lisozimas e defensinas. Embora seja sugerido que os sais biliares suprimam a invasão dos enterócitos por *Salmonella* (PROUTY e GUNN, 2000), a resistência *in vitro* a esse fator já foi relatada em cepa do sorotipo Typhimurium (VAN VELKINBURG e GUNN, 1999). Por outro lado, a concentração de sais biliares é maior no duodeno, o que poderia explicar o fato de *Salmonella* ser encontrada preferencialmente colonizando íleo, ceco e cólon (BOYLE et al, 2008).

A aderência à mucosa intestinal é descrita como a primeira etapa da infecção por *Salmonella* em suínos (McGHIE et al, 2009). Mais de 200 fatores de virulência já foram associados à *Salmonella*, porém muitos não estão ainda completamente caracterizados (GRIFFITH, SCHWARTZ e MEYERHOLZ, 2006). Os fatores de virulência estão envolvidos na adesão, invasão, citotoxicidade e persistência intracelular. Estruturas como flagelos, fímbrias, ilhas de patogenicidade, plasmídeos, lipopolissacarídeos da membrana externa, estão sendo caracterizados como importantes fatores de virulência (McGHIE et al, 2009).

Durante a invasão, a bactéria induz uma resposta inflamatória intensa no local (VOLF, 2007). Esta resposta inflamatória resulta em alterações na anatomia histopatológicas, ocorrendo a perda da integridade epitelial e causando diarreia intensa, caracterizada pela perda de água, eletrólitos e proteínas plasmáticas para o lúmen intestinal (VANNUCCI e GUEDES, 2009; VOLF, 2007).

Apesar da diferença na apresentação clínica entre sorotipos adaptados e não adaptados ao hospedeiro, a rota de transmissão é muito similar em ambos os grupos (GRIFFITH, SCHWARTZ e MEYERHOLZ, 2006). Segundo Paulin et al (2007), a maior diferença residiria na capacidade de multiplicação, ou seja, o crescimento rápido da *Salmonella* Typhimurium nos enterócitos levaria à indução de resposta inflamatória mais intensa localizada na sua porta de entrada. Ao contrário, *Salmonella* Choleraesuis consegue ficar protegida do

ataque do sistema imune, permanecendo em macrófagos e células dendríticas, atingindo a corrente sanguínea e infectando órgãos internos (DLABAC et al, 1997).

Um fator discutido na literatura como facilitador da infecção e excreção de *Salmonella* pelo hospedeiro é o estresse. Embora seu mecanismo direto não esteja totalmente esclarecido, existem algumas indicações de que catecolaminas possam ter um papel importante nessa ocorrência (GRIFFITH, SCHWARTZ e MEYERHOLZ, 2006). Segundo Boyle (2008) as catecolaminas são liberadas em decorrência do estresse, levando à redução da produção de ácido gástrico e aumentando a motilidade intestinal. Em consequência do aumento do pH estomacal *Salmonella* poderá chegar mais facilmente ao intestino. Entretanto Rostagno (2009) mostra a dificuldade em determinar mecanismos do estresse, devido à metodologia de pesquisa empregada em animais, uma vez que os parâmetros utilizados para medir estresse apresentam baixa especificidade. Em outras palavras, é difícil determinar se o aumento da ocorrência de infecção e/ou excreção está realmente relacionado ao estresse e não a outros fatores que possam estar presentes.

1.6 Resistência à antimicrobianos

Para autores como, Gebreyes et al (2004), Menten (2001), Yan et al (2003), e Zhao et al (2007) a utilização de antimicrobianos na dieta animal pode promover a resistência bacteriana cruzada para humanos, quando são consumidos produtos de origem animal submetidos a tais dietas. Isso restringe a comercialização de carne produzida com a utilização destes, por vários países da OMC (SI, 2011e). Os surtos causados pela ingestão de alimentos contaminados sugerem a possibilidade de transmissão de eventuais linhagens resistentes pela cadeia alimentar. Como consequência, há aumento de falhas no tratamento de pacientes e aumento da severidade das infecções (ANGULO, NARGUND e CHILLER, 2004).

Durante muito tempo, as classes de antimicrobianos utilizados na prevenção ou no tratamento de infecções bacterianas, em animais de produção, eram as mesmas utilizadas na medicina humana (SCHWARZ, KEHRENBURG e WALSH, 2001). Com isso, seu uso na agricultura e na área veterinária vem sendo discutido e, desde então, algumas medidas vêm sendo

adotadas para reduzir linhagens resistentes (CAPRIOLI et al, 2000). A partir de 2006, a União Europeia passou a banir o seu uso como promotor de crescimento animal. Por outro lado, é possível que a sua retirada possa resultar apenas em uma redução nas falhas de tratamentos dos pacientes (DAVIES, 2006).

Devido à complexidade das vias de transmissão de *Salmonella*, desde os animais aos consumidores, é difícil atribuir o uso de antimicrobianos em animais de produção aos problemas de saúde em humanos (PHILLIPS et al, 2004). Um estudo avaliando a incidência de resistência em *Salmonella* Enteritidis em relação ao uso de antimicrobianos realizado na Inglaterra e País de Gales demonstrou que o aumento do uso veterinário de tetraciclina teve impacto insignificante na ocorrência de resistência a esta droga. Ao mesmo tempo, o declínio registrado no uso de trimetopim não refletiu na redução da ocorrência de resistência a este antibiótico em *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (THRELFALL et al, 2006). Hopkins et al (2010) relataram a prevalência de *Salmonella enterica* sorovar 4,{5},12:i:-, com resistência a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina em vários países europeus. As amostras eram provenientes de humanos, de suínos e de produtos de origem suína entre 2006 e 2008. Os autores argumentaram que este sorotipo pode ser uma variante genética da *Salmonella* Typhimurium DT 104, que teve seus índices de isolamento reduzidos na Europa a partir de 2006 (RIBOT et al, 2002)

Vários países monitoram a resistência aos antimicrobianos de micro-organismos transmitidos pelos alimentos. A resistência aos antimicrobianos em *Salmonella* isolada de carne suína foi relatada em cinco países membros da União Europeia (EFSA, 2006). Os isolados, incluindo os sorotipos Derby, Enteritidis, Infantis, Londres, Saintpaul, Senftenberg, Typhimurium e Virchow e outros não identificados, demonstraram resistência à ampicilina variando de 21 % a 35 %, sulfonamidas (36 % a 52 %) e tetraciclina (38 % a 59 %). A resistência à ciprofloxacina e à enrofloxacina foi observada na Dinamarca e Itália, respectivamente, em taxas de 1 % e 0,6 % (EFSA, 2006).

No Brasil, Weiss et al (2002) analisaram *Salmonella* isoladas de amostras de fezes, linfonodos e conteúdo intestinal de suínos de terminação no Rio Grande do Sul. Os testes de resistência aos antimicrobianos demonstraram 97 % de resistência à sulfonamida, 82,6 % à estreptomicina, 36,9 % à tetraciclina

e 15,2 % ao sulfazotrim. Em Santa Catarina, Menin et al (2008) verificaram que as infecções entéricas em suínos são responsáveis por 30 % das perdas econômicas na suinocultura industrial e 60 % dos gastos com antimicrobianos na produção, sendo a *Salmonella* um dos principais patógenos envolvidos em casos de diarreia em suínos nas diferentes faixas etárias. Nas amostras de *Salmonella* isoladas houve maior resistência aos antimicrobianos oxitetraciclina (77 %) e tetraciclina (42,1 %); e menor resistência a gentamicina (3,5 %) e amoxicilina (4,8 %).

No Brasil, entre os anos de 2004 a 2006 houve a implementação pelo Ministério da Saúde do Programa PREBAF - Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (carcaças congeladas) como parte do conjunto de estratégias de ação definidas pela ANVISA para a área de alimentos. O estudo foi realizado de acordo com recomendações do *Codex Alimentarius* para programas de vigilância e controle sobre a resistência microbiana em microrganismos zoonóticos transmitidos por alimentos (ANVISA, 2008). As informações geradas permitiram a visualização adequada do problema e forneceriam subsídio para as medidas de controle necessárias. Esta pesquisa deve ser ampliada para todos os produtos de origem animal já que é restrita à carne de frango e medidas semelhantes podem ser empregadas na produção de suínos.

1.7 Bacteriófagos

1.7.1 Definição e caracterização

Bacteriófagos são vírus que infectam e replicam-se em bactérias. Em outras palavras, são parasitas intracelulares obrigatórios que utilizam, parcial ou integralmente, a estrutura de bactérias específicas para sua replicação (MAYER, 2005; KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005). Segundo Brussow e Kutter (2005), existem aproximadamente 10^{32} bacteriófagos no planeta, sendo a forma mais abundante de vida na Terra. São ubíquos, podendo ser isolados do solo, água e do organismo de humanos e animais (DABROWSKA et al, 2005; ATTERBURY et al, 2007).

Exibem ampla variedade morfológica, podendo medir de 24 a 200 nanômetros, e apresentar estruturas tais como capsídeo (ou cabeça),

constituente genômico e cauda, os quais são parâmetros utilizados em sua taxonomia. Ao total, os bacteriófagos são subdivididos em treze famílias, sendo *Myoviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae* as mais frequentes (ACKERMANN, 2005).

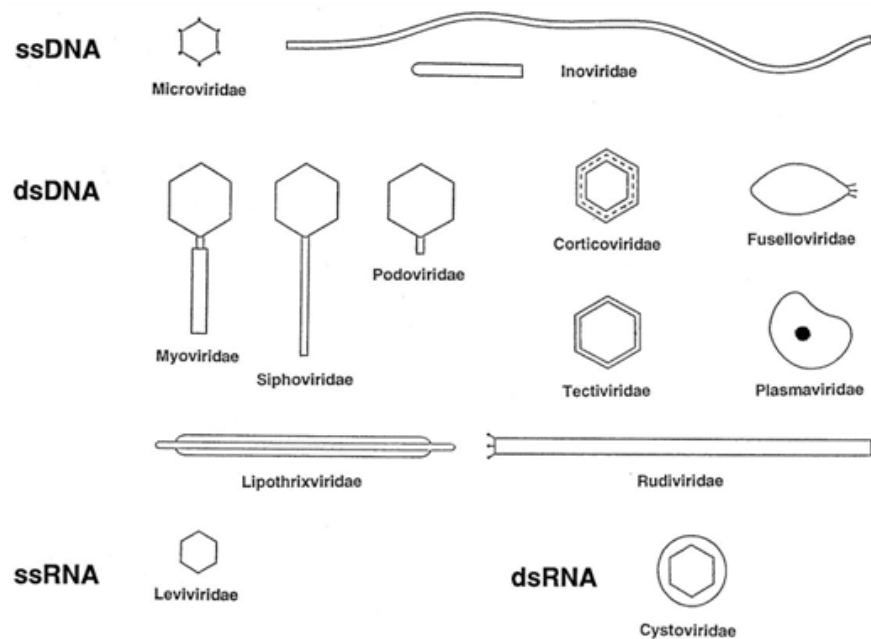


Figura 1. Famílias de Bacteriófagos. Fonte: (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2000).

O capsídeo pode ser de forma icosaédrica, cúbica, filamentosa ou pleomórfica fornecendo proteção ao DNA de fita simples ou dupla, ou RNA no seu interior (ACKERMANN, 2005). Alguns apresentam estrutura em forma de cauda que contém receptores para sítios de ligação na parede bacteriana, onde ocorre a fixação e o transporte do genoma viral para o interior da célula (MAYER, 2005). Em geral, todas as estruturas bacterianas expostas na parede celular constituem receptores de bacteriófagos em bactérias gram-positivas e gram-negativas (SKURNIK e STRAUCH, 2006; GREGORACCI et al, 2006). Dentro da célula bacteriana há duas possibilidades de replicação: o ciclo lítico e o ciclo lisogênico. No ciclo lítico, característico dos fagos virulentos, a replicação viral ocorre dentro da célula hospedeira, e após um ciclo de replicação, causa a lise bacteriana com liberação de novas partículas virais. Já no ciclo lisogênico, característico dos bacteriófagos temperados, o material genético integra-se ao genoma da bactéria hospedeira e permanece integrado replicando-se de forma concomitante à duplicação genômica da bactéria (ALISKY et al, 1998; HAGENS e LOSSNER, 2007; BRUSSOW, CANCHAYA e HARDT, 2004).

Os bacteriófagos que desenvolvem o ciclo lítico são os que apresentam potencial para o uso como controle biológico de bactérias, pois levam à lise bacteriana. O ciclo de infecção dos bacteriófagos inicia-se pela adesão a receptores presentes na superfície bacteriana, que podem ser proteínas, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, flagelos ou fímbrias (ACKERMANN, 2005; HOUSBY e MANN, 2009). Após fixação, o material genético do bacteriófago é injetado no citosol da bactéria, por meio da contração da cauda (LEVY, FRAENKEL-CONRAT e OWENS, 1994). Segue-se então a replicação viral, na qual o genoma do bacteriófago é transcrito dentro da bactéria hospedeira, redirecionando a estrutura sintética da célula para produção e formação de novas partículas virais. Este acúmulo de vírions no citoplasma leva à ruptura da bactéria e à liberação destes devido ao acúmulo de lisozimas e endolisinas que agem formando poros sobre a camada de peptidoglicano (SKURNIK e STRAUCH, 2006; GREGORACCI, SILVEIRA e BRPCCHI, 2006). De acordo com Hanlon (2007), de uma única célula bacteriana são liberados em torno de 100 vírions prontos para infectar novas células.

É neste processo lítico que baseia-se o biocontrole, ou seja, uma vez identificada a bactéria responsável por uma dada infecção, combatê-la naturalmente, usando para isso um bacteriófago específico. Esse interesse é baseado em certas características como a alta capacidade de multiplicação dos bacteriófagos, a aparente ausência de toxicidade, especificidade para hospedeiros bacterianos, sem atuar na microbiota comensal e sua abundância na natureza (GARCÍA e LÓPEZ, 2002; HAGENS e LOESSNER, 2007). A utilização de bacteriófagos no controle biológico de patógenos tem grande potencial para aumentar a segurança microbiológica de alimentos, baseada em sua longa história de uso seguro, relativamente fácil manuseio e sua alta atividade antimicrobiana específica (GARCIA, MARTINEZ e RODRIGUEZ, 2008; SKURNIK, PAJUNEN e KILJUNEN, 2007; STRAUCH, HAMMERL e HERTWIG, 2007).

1.7.2 Utilização de bacteriófagos em biocontrole de patógenos

Uma característica que torna atraente a utilização dos bacteriófagos em alimentos é a sua natureza discriminatória. A maioria dos bacteriófagos conhecidos interagem apenas com um conjunto de bactérias que expressam

um determinado sítio de ligação. Portanto bactérias sem esses receptores não são afetadas. Esta gama restrita de hospedeiros é também um desafio significativo para a fago terapia. O nível de especificidade requer o uso de um pool de bacteriófagos para a profilaxia de infecções bacterianas na maioria dos casos (SKLAR e JOERGER, 2001; LEVIN E BULL, 2004; MATSUZAKI et al, 2005).

O potencial da utilização de bacteriófagos para controlar bactérias de importância para a qualidade e segurança dos alimentos foi discutida em diversas revisões (GORSKI e WEBWE, 2005; GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCHI, 2006; SKURNIK e STRAUCH, 2006; McLAUGHLIN, 2006a; McLAUGHLIN e KING, 2008). Bacteriófagos também são indicados para prevenir ou reduzir a colonização por patógenos e as doenças em animais, para descontaminação de carcaças, para desinfecção de equipamento e superfícies de contato e para estender a vida útil de alimentos perecíveis e como conservantes naturais de alimentos (LEVERENTZ et al, 2001; MARTINEZ et al, 2008; BIGWOOD et al, 2008; GREER, 2005; GARCIA, MARTINEZ e RODRIGUEZ, 2008; HUNGARO, 2010).

Estudos, *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que ao contrário da resistência bacteriana aos antibióticos, os bacteriófagos estão constantemente evoluindo para contornar obstáculos do hospedeiro à infecção. Este fato foi observado por Smith e Huggins (1982) que verificaram que fagos líticos que apresentavam como alvo *Escherichia coli* portadoras do antígeno K1, foram mais eficazes que vários antibióticos tanto, *in vitro* quanto, *in vivo*. Uma dose simples dos fagos anti-K1, via intramuscular (IM), foi capaz de curar camundongos infectados por *Escherichia coli* O18:K1:H7, IM ou intracerebral. Múltiplas doses diárias de tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol ou trimetropim com sulfafurazol, não foram eficientes na prevenção da mortalidade dos animais. Estreptomicina foi a única droga que apresentou resultado semelhante ao dos bacteriófagos, porém, necessitando de vários dias de tratamento. Huff et al (2004) observaram um resultado superior da quinolona enrofloxacina em relação aos bacteriófagos na terapia contra aerossaculite por *E. coli* em frangos. A mortalidade nos grupos tratados com fagos (dose única, IM) ou enrofloxacina (50 partes por milhão na água de consumo, por 7 dias) foi de 15 % e 3 %, respectivamente, enquanto no grupo não tratado foi de 68 %. No grupo de animais que recebeu simultaneamente fagos e enrofloxacina, nenhum dos animais morreu,

demonstrando uma sinergia entre os dois tratamentos. Em experimento semelhante, o benefício do uso de bacterióafagos Esc-A foi superior ao do antimicrobiano cloromicetina no controle de colibacilose em aves. Nos animais tratados com fagos a morbidade e a mortalidade na primeira semana de tratamento (26 % e 1,2 %) foram menores em relação ao grupo tratado com cloromicetina (36 % e 6 %) e o não tratado (51,6 % e 14 %) (XIE et al, 2005).

CAPITULO II

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE BACTERIÓFAGOS DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM A PARTIR DE FEZES SUÍNAS

RESUMO

A carne suína é a mais consumida e produzida no mundo e *Salmonella* está entre as principais causas de doenças transmitidas por estes alimentos. Desta forma, há uma necessidade de desenvolvimento de metodologias de biocontrole deste patógeno e os bacteriófagos ressurgem como uma alternativa. Este trabalho teve como objetivos isolar, caracterizar e avaliar o efeito dos bacteriófagos líticos para o biocontrole de *Salmonella* Typhimurium, *in vitro*. Os bacteriófagos foram utilizados em forma de pool e avaliados no biocontrole de *Salmonella* Typhimurium, *in vitro*. Foi possível o isolamento de bacteriófagos em 75 % das propriedades e após propagação eles alcançaram contagem entre 10^{10} e 10^{11} PFU/ mL. Os bacteriófagos apresentaram atividade sobre diferentes estirpes de *Salmonella*. Em relação à morfologia, todos apresentaram cabeça icosaédrica e pequenas caudas o que indica serem da ordem *Caudovirales* e da família *Podoviridae*. O efeito dos bacteriófagos sobre a contagem de *Salmonella* em meio de cultura foi dependente da concentração de bacteriófago utilizada. As maiores reduções de células viáveis de *Salmonella* foram de, aproximadamente, 2,5 log UFC/ mL obtidas nos cultivos de bacteriófagos com MOI: 10000. Embora não tenha sido totalmente eliminado, o resultado demonstrou uma considerável redução da contagem de *Salmonella* Typhimurium, sugerindo o potencial que os bacteriófagos possuem para o biocontrole deste patógeno. Existe a necessidade de trabalhos futuros para avaliação da atividade do pool de bacteriófagos diretamente aplicados em suínos infectados, a fim de desenvolver uma metodologia que seja efetiva e possa ser utilizada como tecnologia direta ou complementar no biocontrole de *Salmonella* Typhimurium.

Palavra chave: *Salmonella* Typhimurium, biocontrole, bacteriófago.

1. Introdução

A carne suína é uma fonte de proteína animal muito importante no mundo, representando quase metade da produção e do consumo de carnes, com mais de 101 milhões de toneladas (USDA, 2010), das quais aproximadamente 50 % ocorrem na China, 20 % na União Europeia (UE) e 8 % nos Estados Unidos da América (EUA). O Brasil é o quarto maior produtor e o quinto consumidor em termos absolutos, desempenhando na última década, crescimento de 19,65 % na produção e 16,08 % nos volumes exportados, atingindo a cifra de US\$ 1,3 bilhão exportados em 2010 (ABIPECS, 2010).

Estudos mostram que *Salmonella* está entre as principais causas de doenças transmitidas por carne suína (HALD et al, 2003). Animais portadores assintomáticos, além de servirem como disseminadores da bactéria no rebanho possibilitam a veiculação desse micro-organismo nos produtos de origem animal, tornando-o um dos principais agentes envolvidos em infecções alimentares em todo o mundo (FEDORKA-CRAY et al, 2000). O aumento das doenças transmitidas por estes alimentos têm sido motivo de preocupação, por representar um problema de saúde pública e acarretar barreiras a comercialização (HALD et al, 2003).

A detecção deste patógeno nas suinoculturas é importante para que medidas sejam tomadas para controlar ou reduzir esta contaminação, impedindo que chegue aos produtos cárneos, uma vez que a redução das taxas de infecção pré-abate resultam em aumento da segurança destes produtos conforme relatado pelos autores, Hurd et al (2002), Rostagno et al (2003), Oliveira et al (2007) e Muller et al (2009).

A frequência de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos presentes em produtos de origem animal tem levado ao questionamento do uso de antibióticos como promotores de crescimento (FEDORKA-CRAY et al, 2002). O uso indiscriminado promoveu o desenvolvendo de diversos mecanismos de resistência e atualmente já foram reconhecidas linhagens de bactérias resistentes a todos os antibióticos em uso comercial e patógenos multirresistentes tornam-se cada vez mais comuns (GEBREYES et al, 2004); ZHAO et al, 2007). Desta forma, há uma necessidade de desenvolvimento de práticas terapêuticas alternativas e os bacteriófagos ressurgem esta fonte.

O biocontrole envolvendo bacteriófagos possui diversas características positivas em relação ao uso de antibióticos, dentre elas destacam-se, alta especificidade, capacidade de auto reprodução e sua produção rápida e barata por isso tais alternativas estão sendo cada vez mais exploradas e estudadas (GARCIA, MARTINEZ e RODRIGUEZ, 2008). Assim, este trabalho teve como objetivos isolar, caracterizar e avaliar o efeito dos bacteriófagos líticos de fezes na forma de biocontrole de *Salmonella Typhimurium* “*in vitro*”.

2. Material e métodos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Todos os ensaios foram repetidos três vezes e as análises realizadas em triplicatas.

2.1. Micro-organismo hospedeiro

Foi utilizada a cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium (ATCC 14028) proveniente do LAMPOAH do DTA da UFV. Este micro-organismo foi utilizado como hospedeiro no processo de propagação dos bacteriófagos.

2.2. Coleta de amostras de fezes suínas

As amostras para o estudo foram coletadas, a partir de fezes suínas frescas, em suinoculturas na região de Viçosa, Teixeiras e Coimbra no estado de Minas Gerais. Cada amostra era constituída de 25 g de fezes. Foram coletadas um total de 187 amostras de fezes frescas conforme detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1. Detalhamento da coleta de amostras de fezes suínas

Região	Suinocultura	Nº de amostras (% do total da Região)	Total de amostras por Região (% de amostras do total)
Viçosa	A	36 (58,1 %)	62 (33,2 %)
	S	10 (16,1 %)	
Coimbra	B	16 (25,8 %)	35 (18,7 %)
	Dp1	18 (51,4 %)	
	Dp2	17 (48,6 %)	
Teixeiras	T1	14 (15,6 %)	90 (48,1 %)
	T2	31 (34,4 %)	
	T3	45 (50 %)	

As amostras de fezes frescas de suínos, após coleta, foram acondicionadas em embalagem de polietileno de baixa densidade, mantidas em ambiente refrigerado a 15 °C e transportadas ao LAMPOAH para posterior análise.

2.3. Isolamento de *Salmonella* em fezes suínas

As amostras foram submetidas ao pré-enriquecimento, transferindo 25 g das fezes para 225 mL de Solução Salina Peptonada 1 % Tamponada (Difco), homogeneizadas por um minuto em “*stomacher*” (Stomacher ® circulator), ficando em repouso por uma hora, sendo em seguida incubados (Fanem, 002 CB) a 37 °C por 18 horas. Posteriormente procedeu-se o enriquecimento seletivo em caldo Selenito-Cistina (CSC, Himedia) e Caldo Tetrionato (CT, Himedia), inoculando um mL do material pré enriquecido em tubos contendo 9 mL do respectivo caldo e incubando-se a 37 °C por 24 horas. O isolamento foi feito repicando uma alçada de cada tubo e estriando em placas contendo ágar Salmonela-Shigella (SS, Merk) e Rappapor-Vassiliadis (RV, Difco), seguido de incubação invertidos a 37 °C por 24 horas. A seleção foi baseada em testes bioquímicos, estriando cepas características em triplicata de tubos de ágar

inclinados de Tríplice Açúcar Ferro (TSI, BD) e Lisina Ferro (LIA, Sigma) e inoculando em caldo uréia (Himedia) (HÚNGARO, 2010)

Baseado nos testes bioquímicos colônias características de *Salmonella* foram selecionadas e transferidas para micro tubos, tipo eppendorf, contendo ágar nutriente, codificados e enviadas ao Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas (LEB) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro (RJ) para realização dos testes sorológicos e identificação das colônias.

2.4. Isolamento de bacteriófagos em fezes suínas

Para o isolamento e purificação de bacteriófagos específicos para *Salmonella* Typhimurium foi utilizada metodologia proposta por Húngaro, (2010). Dez gramas da mistura de fezes dos suínos, foi diluído 10:100 em tampão SM [$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl [pH 7,5], (Sigma®) $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl (Vetec®), $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Chemco®), 0,01 % gelatina (Difco®)] e ressuspendido por agitação durante 5 min em vortex (Kingstic®). A suspensão foi incubada sob agitação em shaker (Bio Braun Biotech International®) de 150 rpm a 17°C , por 24 horas, para permitir a eluição do fago para o tampão. Após este período, uma alíquota de 10 mL da solução foi transferida para um tubo de centrifuga esterilizado e submetido a centrifugação (Sigma®, 3K30, rotor 12111H) a $13000 \cdot \text{g}$ por 5 min para remover detritos em suspensão. Em seguida, a suspensão foi micro filtrada em membrana de acetato de celulose ($0,22 \mu\text{m}$, Nalgene®), para remover células e restos celulares, o filtrado obtido será avaliado quanto à presença de bacteriófagos, utilizando a técnica de microgotas em superfície proposta por Adams (1959), utilizando *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) como hospedeiro.

Para a purificação dos bacteriófagos um volume de 0,5 mL do filtrado contendo bacteriófagos foi misturado com 0,5 mL do hospedeiro recém inoculado em 10 mL de caldo infuso de cérebro e coração (BHI, Merk®) e incubado a 37°C por 24 horas. O filtrado e a suspensão bacteriana foram reincubados para permitir a propagação do fago por 24 horas, e posteriormente centrifugados a $13000 \cdot \text{g}$ por 5 min e micro filtrados em membrana de acetato de celulose $0,22 \mu\text{L}$. Volumes iguais de 0,5 mL de suspensão de bacteriófagos e de *Salmonella* cultivada por 12 h a 37°C foram misturados com três mL de caldo BHI para sobrecamada, contendo 0,7 % de ágar (Himedia®), e

espalhados sobre a superfície seca de placas de Petri contendo ágar BHI (técnica BHIs). As placas foram incubadas a 37 °C por 12 h. Após a incubação, placas de lise individuais foram selecionadas com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur e colocadas em 10 mL de cultura do hospedeiro ativo. Novamente a suspensão foi centrifugada a 13000• g por 5 min e micro filtrada a repetindo-se o ciclo de lise em ágar sobrecamada. Para cada fago, três ciclos de purificação foram realizados, a fim de garantir a pureza do estoque de bacteriófagos.

2.5. Seleção, propagação, determinação do título e estoque de bacteriófagos

Os bacteriófagos foram selecionados por meio de visualização da formação de lise transparente sobre a cepa de *Salmonella* Typhimurium em superfície usando a técnica BHIs. Para propagação e determinação do título de bacteriófagos foi utilizada metodologia adaptada proposta por Frost et al (1999). Um volume de 1 mL de *Salmonella* suspensão bacteriana foi misturado com 100 µL de suspensão estoque de bacteriófago, adicionado em 10 mL de caldo BHI recém preparado seguido de incubação a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação a suspensão foi centrifugada a 13000• g por 5 min e micro filtrada.

Na determinação da concentração de bacteriófagos na suspensão foi utilizado tampão SM para realizar as diluições decimais necessárias, a fim de obter contagem de Unidades Formadoras de Placas (PFU) entre 10 e 100 placas de lise por mL de suspensão. Foram utilizados 500 µL de *Salmonella* Typhimurium, cultivada em caldo BHI a 37 °C, por 24 h, misturados em 5 mL de BHIs e dispostos sobre a superfície de ágar base BHI. Foram adicionados sobre a superfície das placas de ágar contendo o hospedeiro, em triplicata, 10 µL das diluições seriadas da suspensão de bacteriófagos, sendo as placas de lise analisadas após período de 15 a 18 h de incubação a 37 °C.

A suspensão de armazenamento foi preparada utilizando caldo BHI com 10 % glicerol (v/v). Foram transferidos 900 µL da solução de armazenamento para microtubos esterilizados e adicionados 100 µL da suspensão do bacteriófago e armazenados a - 65 °C.

2.6. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados

Foram utilizadas diferentes bactérias de importância em alimentos e suínos, cedidas pela FIOCRUZ para avaliar a especificidade dos bacteriófagos. Foram realizados testes usando: *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Escherichia coli* k88 (ATCC 25922), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Abony (NCTC 6017), *Salmonella enterica* subsp. *Arizonae* (ATCC 13314), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 10708), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Gallinarium (ATCC 9184), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Pullorum (ATCC 9120), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi (ATCC 6539), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Thyphimurium (ATCC 14028).

A atividade lítica dos bacteriófagos selecionados foi avaliada por técnica de microgotas em superfície proposta por Adams (1959), usando a suspensão de bacteriófagos na concentração de 10^{10} PFU/ mL.

2.7. Análise da morfologia dos bacteriófagos

O exame de morfologia dos bacteriófagos foi realizado conforme metodologia adaptada de Oliveira (2009). Um volume de 1 mL da suspensão de bacteriófagos a 10^{10} PFU/mL foi centrifugado a $9000 \cdot g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com solução de acetato de amônio (Vetec®) $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, e novamente, centrifugado a $9000 \cdot g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de água destilada e microfiltrada. Um volume de 8 μL desta suspensão foi depositado na superfície de uma tela de microscopia eletrônica, revestida com resina *formvar* (Kosh®, 200 mesh, 3 mm). O excesso de amostra foi removido com papel absorvente e adicionou-se uma gota de solução aquosa de acetato de uranila (Sigma®) 2 % (m/v) na superfície da tela, deixando em contato por 15 s. O excesso de acetato de uranila foi removido com papel absorvente, a tela lavada com uma gota de água destilada, e em seguida seca em temperatura ambiente, aproximadamente $24 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 h. Posteriormente, fez-se a observação em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss) em 80 kV e aumento de 85000 vezes.

2.8. Avaliação *in vitro* da viabilidade de bacteriófagos exposta a diferentes valores de pH

Adicionou-se 100 µL da suspensão de bacteriófagos em 900 µL de tampão SM, ajustou-se o pH para 2, 3 e 4 com ácido clorídrico ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (Vetec®). A contagem de bacteriófagos foi realizada por meio da técnica de sobrecamada, utilizando *Salmonella* Typhimurium como hospedeiro. As diluições seriadas foram realizadas em solução tampão fosfato salino [PBS: $137 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl; $2.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl (Grupo Química®); $4.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na₂HPO₄ (Grupo Química®); $1.47 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH₂PO₄ (pH 7.5) (Grupo Química®)] para neutralizar o pH da solução antes do plaqueamento. Os testes foram conduzidos a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e avaliados em intervalos de 30 minutos durante 2 horas.

2.9. Avaliação *in vitro* da viabilidade de bacteriófagos exposta a diferentes concentrações de sais biliares.

As concentrações de sais biliares utilizadas neste trabalho, foram baseadas nas informações de Noriega et al (2004) relatando que suínos em jejum poderiam apresentar concentrações de sais biliares entre 1,5 a 2 % (m/v) entretanto, na fase de terminação em que suínos recebem alimentação constante e em grandes volumes, estes valores podem chegar em torno de 0,3 % (m/v).

Adicionou-se 100 µL da suspensão de bacteriófago em soluções contendo 900 µL de tampão SM em 3 diferentes concentrações de sais biliares (Difco®) 0,1 %, 0,5 % e 1 %. A contagem de bacteriófagos foi realizada por meio da técnica de sobrecamada, utilizando *Salmonella* Typhimurium como hospedeiro. As diluições seriadas foram realizadas em solução tampão fosfato salino [PBS: $137 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl; $2.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl (Grupo Química®); $4.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na₂HPO₄ (Grupo Química®); $1.47 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH₂PO₄ (pH 7.5) (Grupo Química®)] para neutralizar o pH da solução antes do plaqueamento. Os testes foram conduzidos a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e avaliados em intervalos de 30 min durante 2 horas.

2.10. Avaliação da atividade *in vitro* do pool de bacteriófagos

Um tubo contendo 8 mL de caldo BHI foi inoculado com 1 mL da cultura estoque de *Salmonella* Typhimurium a 10^9 UFC/mL, e incubado por 6 horas à

37 °C, em seguida, 1 mL do pool formado pela mistura de 1 mL do estoque de cada bacteriófago foi adicionado ao frasco e incubado a 37 °C por 24 horas. Procedeu-se o processo de propagação e titulação do pool conforme item 2.5.

Suspensões do pool de bacteriófagos, em diferentes Multiplicidades de Infecção (MOIs): 0,01, 1, 100, 10000, que corresponde à relação entre a concentração de bacteriófagos e a concentração de hospedeiro, foram adicionadas em caldo BHI contendo culturas de *Salmonella* Typhimurium assim que a absorbância (600 nm) atingiu 0,5 ou seja, 10^5 UFC/mL. Cultura de *Salmonella* sem adição de bacteriófagos foi utilizada como controle. A atividade dos bacteriófagos foi determinada por medida da absorbância em espectrofotômetro (SP22, Biospectro®) a 600 nm, em intervalos de tempo de 1 h após a adição das suspensões de bacteriófagos, até a leitura permanecer constante, fase estacionária. Neste ponto, foi avaliada a contagem de *Salmonella* ao final do ensaio em todos os tratamentos com bacteriófagos. A contagem de *Salmonella* foi realizada na última determinação de absorbância de cada tratamento, por meio de técnica de microgotas, com 20 µL inoculados na superfície de Ágar Padrão para Contagem (PCA, Difco®). As placas foram incubadas a 37 °C e a contagem de colônias realizada após 24 horas de incubação.

3. Resultados e discussão

3.1. Coleta e Isolamento de *Salmonella*

Baseado nos testes bioquímicos, das 187 amostras de fezes coletadas nas oito diferentes propriedades, Viçosa (S, A, B), Coimbra (Dp1, Dp2) e Teixeiras (T1, T2 e T3), foi possível isolar 27 colônias características de *Salmonella*, sendo estas enviadas à FIOCRUZ, para a realização dos testes sorológicos. Os resultado podem ser observados na Tabela 2.

Das 27 colônias típicas de *Salmonella* pelos resultados dos testes bioquímicos, 13 (48,2 %) foram totalmente confirmadas como sendo da espécie *Salmonella* e 2 não estavam suficientemente purificadas, mas na contaminação também havia a presença de *Salmonella*, o que pode levar este percentual para 55,6 %, se for considerado. Foi possível confirmar a presença de *Salmonella* nas propriedades avaliado sendo o sorotipo Typhimurium de maior prevalência com 93,4 % dentre os sorotipos detectados. Resultados

semelhantes foram encontrados por Bessa et al (2004) e Kich et al (2004a) que também encontraram o sorotipo Typhimurium como o de maior ocorrência na região sul do Brasil.

A metodologia mostrou-se eficaz para o isolamento de *Salmonella* Typhimurium em mistura de fezes frescas de suínos. Foi possível o isolamento em 50 % das suinoculturas testadas, resultado este semelhante ao obtido por Bessa et al (2004) com 55,6 % de detecção e superior ao de Teixeira et al (2006) com 23,91 %.

Tabela 2. Resultado da sorotipagem das colônias características de *Salmonella* enviadas à FIOCRUZ.

Cidade	Suincultura	Codificação	Identificação
Viçosa	S	Lamp 1	<i>Citrobacter freundii</i>
		Lamp 2	<i>Salmonella Typhimurium</i> ou <i>Enterobacter sp.</i>
		Lamp 3	<i>Salmonella Typhimurium</i>
		Lamp 4	<i>Salmonella Typhimurium</i> ou <i>Pseudomonas sp.</i>
		Lamp 5	<i>Salmonella entérica</i> subs. <i>Entérica (O:4,5)*</i>
		Lamp 6	<i>Salmonella Typhimurium</i>
		Lamp 7	<i>Salmonella Typhimurium</i>
		Lamp 8	<i>Salmonella Typhimurium</i>
		Lamp 9	<i>Salmonella Typhimurium</i>
		Lamp 10	<i>Citrobacter freundii</i>
	B	Lamp 11	<i>Pseudomonas sp.</i>
		Lamp 12	<i>Salmonella Typhimurium</i>
Coimbra	Dp1	Lamp 13	<i>Salmonella Typhimurium</i>
		Lamp 14	<i>Proteus mirabilis</i> ou <i>Escherichia coli</i>
	Dp2	Lamp 23	<i>Salmonella Typhimurium</i>
		Lamp 24	<i>Salmonella Typhimurium</i>
		Lamp 25	<i>Salmonella Typhimurium</i>
		Lamp 26	<i>Salmonella Typhimurium</i>
		Lamp 27	<i>Salmonella Typhimurium</i>
Teixeiras	T2	Lamp 15	<i>Proteus mirabilis</i> ou <i>Enterobacter sp.</i>
		Lamp 16	<i>Proteus mirabilis</i> ou <i>Enterobacter sp.</i>
		Lamp 17	<i>Citrobacter freundii</i>
		Lamp 18	<i>Citrobacter freundii</i>
		Lamp 19	<i>Citrobacter freudii</i>
		Lamp 20	<i>Citrobacter freudii</i>
	T3	Lamp 21	<i>Proteus mirabilis</i>
		Lamp 22	<i>Proteus mirabilis</i>

* - estrutura flagelar não detectável.

3.2. Isolamento, purificação e propagação de bacteriófagos

Para o isolamento de bacteriófagos, cada suinocultura constituiu uma unidade amostral, de modo a se ter a possibilidade de isolar bacteriófagos com perfil lítico diferente. Foi possível isolar 6 bacteriófagos para *Salmonella* Typhimurium com a intensidade de lise desejada.

Como pode ser observado na Tabela 3, nas propriedades A e T1, onde não foi possível isolar o hospedeiro, também não foi possível isolar o bacteriófago com as características desejadas de lise, ao contrario das propriedades T2 e T3 onde não foi possível o isolamento do patógeno, mas sim do bacteriófago. Resultados similares foram obtidos por Rezende, (2009) ao isolar bacteriófagos para *Salmonella* Enteritidis em granjas de aves que não apresentavam o patógeno. Indicando que o isolamento do bacteriófago não implica no isolamento simultâneo do hospedeiro. Estes resultados são corroborados pelos estudos realizados por Aziz e Ibrahim (1969) e Rezende (2009), os quais verificaram presença de bacteriófagos em amostras negativas para *Salmonella*, sugerindo que este é um indício de que os bacteriófagos podem estar controlando a bactéria.

Tabela 3. Isolamento de bacteriófagos e avaliação da presença de *Salmonella* Typhimurium nas propriedades da região de Viçosa.

Propriedades	Presença de Bacteriófagos	Codificação	Presença de <i>Salmonella</i> Typhimurium ¹
A	ND	F1	ND
T1	ND	F2	ND
S	+	F3	+
B	+	F4	+
Dp1	+	F5	+
Dp2	+	F6	+
T2	+	F7	ND
T3	+	F8	ND

¹ - Segundo identificação sorológica; (+) Positivo; (ND) Não detectável

Os bacteriófagos foram selecionados a partir de uma avaliação visual de intensidade de lise. A formação de placas de lise bem definidas, conforme pode se observar na Figura 2, serviram de referência para a seleção.

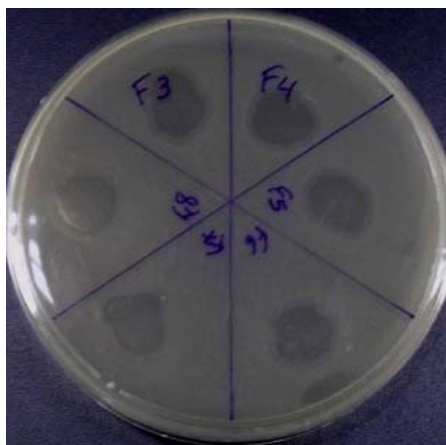


Figura 2. Padrão de referência de placas de lises definidas usada como referencial para a seleção dos bacteriófagos.

Das oito propriedades pesquisadas, foram isolados seis bacteriófagos, o que corresponde a 75 % de isolamento, esse percentual é elevado quando comparado com os resultados encontrados por Callaway et al (2010), que isolaram 44 bacteriófagos em 10 propriedades testadas, mas apenas quatro eram específicos para *Salmonella* Typhimurium. Resultados superiores aos encontrados por O'Flynn et al (2005) que pesquisaram 8 locais diferentes, como fazendas, suinoculturas, abatedouros, açougue, dentre outros, isolaram apenas dois bacteriófagos líticos para *Salmonella*, ou seja, 12,5 % de isolamento no total de amostras testadas. Entretanto outros autores tiveram resultados superiores utilizando locais de coleta diferentes, tais como Bielke et al (2007) e Wall et al (2010), que lograram isolar bacteriófagos para *Salmonella* de 90 % em águas residuárias.

Este resultado torna-se importante devido sua especificidade à bactéria alvo e seu potencial de utilização no biocontrole, prevenindo ou reduzindo a colonização de patógenos em toda cadeia produtiva de alimentos.

Após propagação, os bacteriófagos alcançaram concentrações entre 10 e 11 log PFU/ mL conforme observado na Tabela 4.

Tabela 4. Valores médios (\pm desvio padrão) da titulação final dos bacteriófagos isolados de fezes frescas de suínos após propagação.

Bacteriófago	Titulação (log PFU/ mL)
F3	11,2 \pm 0,3
F4	11,3 \pm 0,2
F5	10,6 \pm 0,5
F6	10,5 \pm 0,5
F7	11,7 \pm 0,2
F8	11,3 \pm 0,4

Estes resultados são semelhantes quando comparados com os encontrados por Eisenstark et al (2009) que propagaram bacteriófagos de *Salmonella* Typhimurium, que atingiu facilmente títulos entre 10^{10} e 10^{11} PFU/mL e também por Bielke et al (2007) que conseguiram atingir títulos de 10^{11} PFU/mL.

Diversos autores relatam que para o bacteriófago ser eficiente, deve ser utilizado em concentrações elevadas com MOIs superiores a 10000, conforme relatado por Sulakvelidze, Alavidze e Morris (2001) recomendaram doses elevadas para terapia utilizando MOIs de 10000, 100000 e 1000000. Também observado por Courchesne et al (2009) recomendando dosagens entre 10000 e 100000000 por Kg/dia.

3.3. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados

Os bacteriófagos selecionados apresentaram atividade lítica contra mais de um sorotipo de *Salmonella*, conforme pode ser observado na Tabela 5. Nenhum dos bacteriófagos selecionados apresentou atividade contra *Escherichia coli* e *Escherichia coli* k88, mostrando especificidade apenas aos sorotipos do gênero *Salmonella* testados.

Tabela 5. Avaliação da especificidade dos diferentes bacteriófagos isolados em relação a diferentes sorotipos de *Salmonella* e *Escherichia coli* usadas como hospedeiro

MICRO-ORGANISMOS	GRUPO	ANTÍGENO SOMÁTICO (O)	ANTÍGENO FLAGELAR (H)		BACTERÍOFAGOS					
			FASE 1	FASE 2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
<i>E. coli</i>					-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> k88					-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Abony	O:4 (B)	1, 4, [5], 12, 27	B	e, n, x	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella arizonae</i>	O:11 (F)	11	Z ₄ , z ₂₃	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	O:7 (C1)	6, 7	C	1, 5	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	O:9 (D1)	1, 9, 12	g, m	-	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Gallinarum	O:9 (D1)	1, 9, 12	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Pullorum	O:9 (D1)	1, 9, 12	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhi	O:9 (D1)	9, 12, [Vi]	D	-	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium	O:4 (B)	1, 4, [5], 12	I	1, 2	+	+	+	+	+	+

(-) Resultado de lise negativo; (+) Resultado de lise positivo.

A similaridade entre estruturas da superfície de bactérias de gêneros da família *Enterobacteriaceae*, representado pelo antígeno somático, pode ter contribuído para a especificidade destes resultados. Segundo Joerger (2003) um bacteriófago de *Salmonella* irá lisar apenas um pequeno espectro de cepas e mesmo assim podem não ser líticos à todos os membros desse sorotipo em particular devido a diversidade de antígenos somáticos e flagelares.

Os bacteriófagos isolados tem espectro de ação baixo, afetando apenas sorotipos de *Salmonella* do grupo B e D1. Isto ocorrer devido à similaridade de estruturas presentes na superfície das bactérias destes gêneros. Os bacteriófagos de *Salmonella* apresentam especificidade de ligação por alguns tipos de lipopolissacarídeo, como por exemplo, O₁₂, encontrado nos sorotipos Enteritidis e Tiphymurium do grupo D1 e Abony e Tiphymurium do grupo B pelo sistema *Kauffman-White* (GOODE, ALLEN e BARROW, 2003). A ligação dos bacteriófagos de *Salmonella* com o lipopolissacarídeo O₁₂ também foi relatado por Lappe et al (2009).

Resultados semelhantes foram encontrados por Silveira et al (2006) que avaliaram a capacidade lítica de três bacteriófagos em diferentes situações, sendo que dois apresentaram atividade de lise sobre seis sorotipos de *Salmonella*, entre 28 testados pertencentes aos grupos B e D1 com predominância do lipopolissacarídeo O₁₂, e um apresentou lise sobre as

culturas de *Salmonella* Dublin (D1) e *Salmonella* Montevideo (C1). Bielke et al (2007) também mostraram a capacidade de 44 bacteriófagos lisarem diferentes sorotipos de *Salmonella*, mas apenas dois foram capazes de lisar sete entre as 10 diferentes sorotipos de *Salmonella*, sugerindo a possibilidade de combinar mais de um bacteriófago (pool) para tratar infecções ou contaminações causada por *Salmonella* sem a utilização de antibióticos.

Os bacteriófagos isolados neste trabalho apresentaram características de especificidade idênticas, podendo pertencer a um mesmo grupo ou linhagem sendo capazes de infectar diferentes sorotipos, apresentando potencial de utilização em biocontrole destes patógenos permitindo a elaboração de um pool de bacteriófagos capazes de atuar em uma ampla variedade de sorotipos, tornando o processo de descontaminação ou biocontrole eficiente, além de reduzir a incidência de resistência do hospedeiro.

3.4. Análise da morfologia dos bacteriófagos por microscopia eletrônica de transmissão

A análise por meio de microscopia eletrônica de transmissão mostrou que os seis bacteriófagos isolados apresentavam morfologia semelhante: cabeça icosaédrica e pequenas caudas conforme mostrado na Figura 3. Pela consistência dos resultados podem ser classificados como pertencentes à ordem *Caudovirales* e à família *Podoviridae*.

Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores como McLaughlin (2006b) que isolaram bacteriófagos de *Salmonella* da família *Podoviridae* de cabeça icosaédrica e cauda curta em amostras de efluente de pocilgas nos EUA e Lappe et al (2009) que também identificaram a morfologia de seis bacteriófagos líticos à *Salmonella* constatando que todos pertenciam à família *Podoviridae*. Porém resultados diferentes foram apresentados por Heringa et al (2010) que isolaram 33 bacteriófagos de *Salmonella*, que apresentavam dois tipos de morfologia, como os da família *Myoviridae* de cauda retrátil e *Siphoviridae* de cauda flexível.

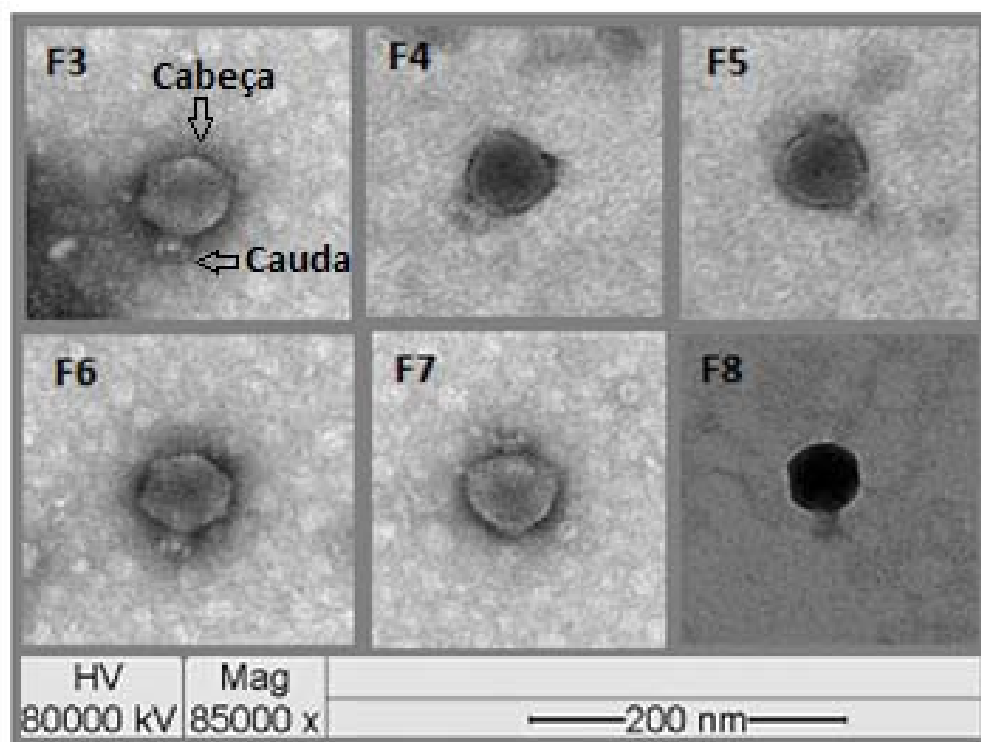


Figura 3. Microfotografia dos bacteriófagos isolados em microscopia eletrônica de transmissão. Bacteriófagos apresentando características semelhantes de cauda curta e cabeça icosaédrica, com aumento de 85.000 vezes.

A identificação da morfologia destes bacteriófagos é importante, segundo Hagens e Loessner, (2007) já que a cauda possui proteínas associadas à especificidade e reconhecimento da superfície de moléculas da bactéria susceptível. Com a obtenção de dados como estes, mostrando a morfologia da família de bacteriófagos que infectam *Salmonella* Typhimurium e sua especificidade, relações entre elas poderão ser geradas facilitando a seleção do pool para o biocontrole.

3.5. Viabilidade dos bacteriófagos expostos a diferentes valores de pH

Observou-se sensibilidade dos seis bacteriófagos no pH 2 em relação aos demais valores de pH a 37 °C. O bacteriófago F6 reduziu 7,15 ciclos log, seguido pelos bacteriófagos F3 com 6,8 log, F4 com 6,23 log, F7 com 6,07 log, F8 com 4,64 log, e o bacteriófago F5 que apresentou maior resistência, reduzindo apenas 4,06 ciclos log do valor inicial como pode ser observado na Figura 4.

Resultados encontrados neste trabalho, em relação à sensibilidade de bacteriófagos de *Salmonella* a diferentes valores de pH, são similares com os

encontrados por Knezevic et al (2011), que testaram valores de pH entre 1,5 e 9 em bacteriófagos de *Salmonella* por 30 minutos de contato. Os bacteriófagos foram inativados em pH 1,5 e tiveram redução considerável até o pH 3, mas em valores superiores mostraram-se estáveis. O'Flynn et al (2005), testando três bacteriófagos de *Salmonella* quanto a sensibilidade em pH 2,5, simulando suco gástrico em suínos, durante 2 horas, observaram valores de 10 e 30 % de sobrevivência para 2 bacteriófagos e inativação do terceiro bacteriófago.

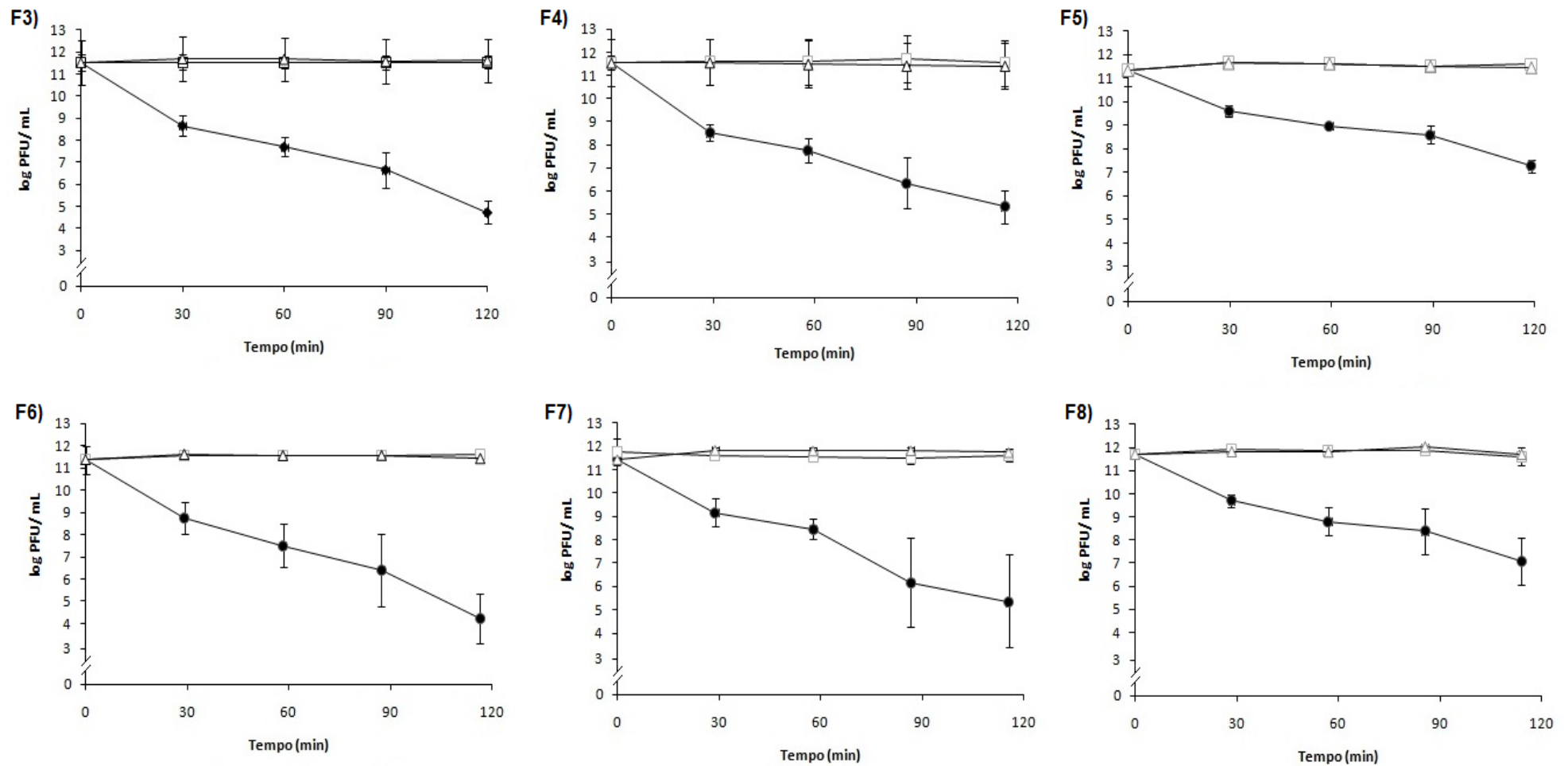


Figura 4. Viabilidade dos bacteriófagos expostos a diferentes valores de pH (● – pH2; □ – pH 3; Δ - pH 4).

3.6. Viabilidade dos bacteriófagos expostos a diferentes concentrações de sais biliares

Observou-se que as diferentes concentrações de sais biliares avaliadas tiveram pouco efeito na redução logarítmica dos bacteriófagos testados em 120 min de contato. Os bacteriófagos F3 e F4 apresentaram, respectivamente, redução de 0,27 e 0,25 log dos na concentração de 1 % de sais biliares. Os demais bacteriófagos não tiveram reduções maiores em relação à concentração de sais biliares testadas conforme se observa na Figura 5.

Estes resultados são similares aos encontrados por Koo, Depaola e Marshall (2000) que demonstraram a resistência de bacteriófagos de *Vibrio vulnificus* em concentrações de 1 e 2 % de sais biliares após 3 horas de contato à 37 °C não reduziu sua viabilidade. Por outro lado Gabig et al (2002) identificaram vários bacteriófagos que eram capazes de infectar *Escherichia coli* autóctone na presença de sais biliares. Já Ma e Lu (2008) testaram o bacteriófago, Felix O1, em concentrações de sais biliares entre 1 e 2 %, obtendo reduções de 1,29 e 1,67 log UFC/ mL respectivamente, após o tratamento.

A viabilidade da administração oral pode ser rapidamente reduzida sobre as condições ácidas do estômago e da presença de enzimas e outros compostos como a bile. Sem proteção o bacteriófago pode não sobreviver à passagem gástrica e não ser efetivo no intestino como observado nos resultados de sensibilidade mais restritivos. Entretanto é importante o desenvolvimento de metodologias eficientes para proteger bacteriófagos administrados por via oral do ambiente gastrointestinal para que chegue no local da infecção no intestino.

Uma possibilidade de proteger o bacteriófago, seria pela sua encapsulação em microesferas ou micropartículas de polímeros resistentes ao pH. Esta metodologia foi utilizada por Ma e Lu (2008) que micro encapsularam o bacteriófagos Felix O1 (família *Myoviridae*) compararam sua efetividade em diferentes valores de pH e sais biliares antes e depois do encapsulamento. Observaram aumento na sobrevivência do bacteriófagos após o micro encapsulamento. O uso desta metodologia pode ser uma alternativa para o aumento da eficácia no biocontrole ou tratamento terapêutico por bacteriófagos administrados por via oral.

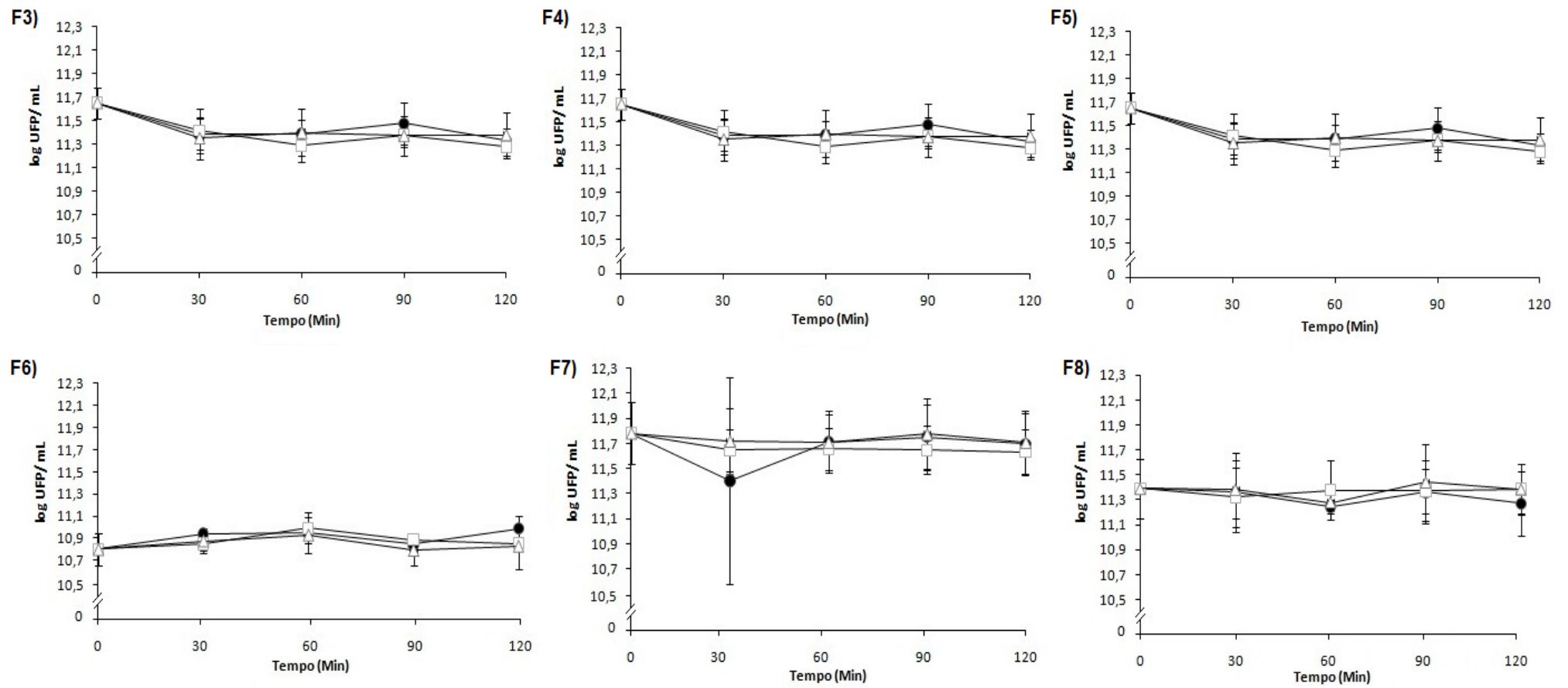


Figura 5. Viabilidade dos bacteriófagos expostos a diferentes concentrações de sais biliares (● – 0,1 %; □ – 0,5 %; △ - 1 %).

3.7. Avaliação da eficácia “*in vitro*” do pool de bacteriófagos contra a cepa de *Salmonella* Typhimurium

Observou-se a redução da absorbância do cultivo de *Salmonella* Typhimurium após a adição de diferentes concentrações do pool de bacteriófagos, após seis horas de desafio, conforme pode observar na Figura 6.

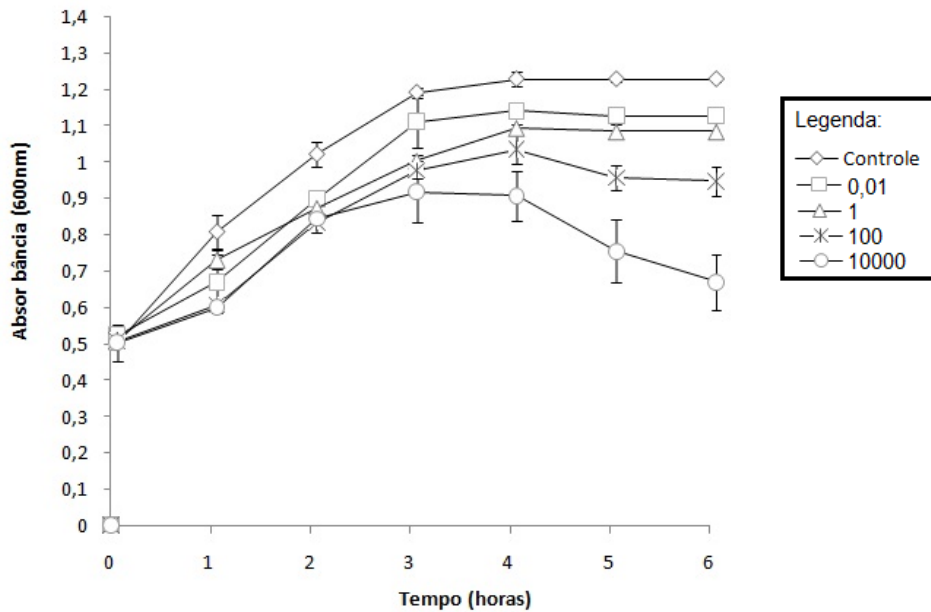


Figura 6. Medidas de absorbância do cultivo de *Salmonella* Typhimurium na presença de diferentes MOIs do pool de bacteriófagos (λ 600 nm).

Maiores valores de MOI foram necessárias para reduzir mais de um ciclo logarítmico, como é o caso dos MOIs: 100 e 10000 que proporcionaram reduções de 1,6 e 2,5 log UFC/ mL. Entretanto estas concentrações de bacteriófagos apenas reduziram, mas não eliminaram o patógeno durante o intervalo de 6 horas de análise, confirmado por contagem em placa como observado na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito dos tratamentos com diferentes MOIs sobre a contagem média de *Salmonella* Typhimurium a 37 °C, após 6 horas de contato.

Pool de Bacteriófagos (MOI)	Média da Contagem (log UFC/ mL)
Controle	10,9 ± 0,1
0,01	10,5 ± 0,1
1	10,0 ± 0,3
100	9,3 ± 0,4
10000	8,4 ± 0,1

A utilização de um pool de bacteriófagos mostra-se eficiente quando comparada com a utilização do bacteriófago individual, conforme relatado por diversos autores (KUDVA et al, 1999; SCHANBEL e JONES, 2001; SKALAR e JOEGER, 2001). O'Flynn et al (2004) realçam a importância de desenvolver pools de bacteriófagos que atinjam um grande espectro de cepas, já que um pool de bacteriófagos usado contra *Escherichia coli* O157:H7 foi capaz de reduzir a valores não detectáveis a contagem do patógeno após 1 hora de desafio. Entretanto o mesmo pool não reduziu o índice de crescimento de *Salmonella* após 10 horas de contato. A grande variabilidade de bacteriófagos existentes na natureza apresentando diferentes morfologias e espectro de ação, realça a necessidade de estudos que elucidem seus mecanismos de adsorção e destruição das células bacterianas e possibilidade de uso na forma de pool para biocontrole.

4. Conclusão

A metodologia de isolamento de bacteriófagos mostrou-se efetiva para o isolamento a partir de fezes de suínos e o isolamento do bacteriófago não implicou na obrigatoriedade da presença de patógenos no local de isolamento.

Foi possível a multiplicação de bacteriófagos e alcançar número elevado de PFU em condições laboratoriais. Os seis bacteriófagos selecionados para utilização em biocontrole apresentaram atividade contra outras estirpes de *Salmonella*. Também apresentaram sensibilidade quando expostos a condição de pH 2 e concentração de 1 % de sais biliares, mostrando a necessidade de adaptar a metodologia na administração oral para protegê-los.

Verificou-se que o tratamento com MOI: 10000 do pool de bacteriófagos, utilizado na redução de *Salmonella* Typhimurium “*in vitro*”, o patógeno teve redução de 2,5 log da contagem inicial.

Contudo, existe a necessidade de trabalhos futuros para avaliação da atividade do pool de bacteriófagos diretamente aplicados em suínos infectados, a fim de desenvolver uma metodologia que seja efetiva e possa ser utilizada como tecnologia direta ou complementar no biocontrole de *Salmonella* Typhimurium.

CAPITULO III

BIOCONTROLE DE *Salmonella Typhimurium* POR BACTERIÓFAGOS EM SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

RESUMO

A múltipla resistência em isolados de *Salmonella*, proveniente de suínos, tem sido observada na maioria dos países produtores. A ampla utilização profilática ou terapêutica de antibióticos em animais de produção é apontada como uma das causas da rápida seleção de bactérias resistentes à diversas drogas. Esse fato leva-nos à reavaliação de metodologias alternativas ao uso de antibióticos. O presente estudo teve como objetivo testar um pool de seis bacteriófagos em suínos experimentalmente infectados com *Salmonella Typhimurium*. Trinta animais foram infectados experimentalmente com 10^5 UFC/ mL de *Salmonella Typhimurium* e posteriormente tratados com diferentes MOIs: 0,01, 1, 100 e 1000. Foram realizadas coletas do material fecal do íleo, ceco e das excretas para quantificar a contagem de *Salmonella*, utilizando os meios de cultura Rambach e XLT4. O baço, rim, fígado e linfonodo mesentérico dos animais do tratamento de MOI: 10000 foram removidos para avaliar a translocação de bacteriófagos. O meio de cultura Rambach foi mais específico e o XLT4 mais sensível. Houve redução na contagem de *Salmonella* do íleo e ceco em MOIs: 100 e 10000 mas não houve redução nas fezes em nenhum dos tratamentos. O quadro clínico de salmonelose não permitiu a translocação do bacteriófago, sugerindo que o tratamento com bacteriófagos deve ser na forma preventiva e não corretiva da infecção por *Salmonella*. Conclui-se que a metodologia aplicada neste trabalho mostrou-se eficaz na redução da contagem de *Salmonella*, em suínos experimentalmente infectados, entretanto deve-se considerar a necessidade de proteger os bacteriófagos contra os efeitos de pH e sais biliares e outros, durante sua passagem pelo sistema digestivo do animal, para aumentar sua viabilidade e eficiência no biocontrole de *Salmonella Typhimurium*.

Palavra chave: *Salmonella Typhimurium*, biocontrole, bacteriófago.

1. Introdução

A múltipla resistência em isolados de *Salmonella*, proveniente de suínos, tem sido observada na maioria dos países produtores (BAGGESEN et al, 1996; GEBREYES et al, 2004; BYWATER et al, 2004). A ampla utilização profilática ou terapêutica de antibióticos em animais de produção é apontada como uma das causas da rápida seleção de bactérias resistentes à diversas drogas, inclusive às de última geração, criando um relevante problema de saúde pública (FEDORKA-CRAY et al, 2002; ANGULO, NARGUND e CHILLER, 2004). Esse fato leva-nos à reavaliação de metodologias alternativas ao uso de antibióticos.

O potencial da utilização de bacteriófagos para controlar bactérias de importância para a qualidade e segurança alimentar foi discutida em diversas revisões (GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCHI, 2006; SKURNIKH e STRAUCH, 2006; HAGENS e LOESSNER, 2007; GARCIA, MARTINEZ e RODRIGUEZ, 2008). Estudos, *in vitro*, demonstraram que as bactérias rapidamente apresentam mutações para se tornarem resistentes aos bacteriófagos, no entanto, ao contrário da resistência bacteriana aos antibióticos, os bacteriófagos estão constantemente evoluindo para contornar obstáculos do hospedeiro à infecção, levando a um equilíbrio evolutivo que permite que os bacteriófagos e os hospedeiros proliferem (CARRILO et al, 2005).

Experimentos utilizando animais infectados experimentalmente com patógenos bacterianos demonstraram a eficiência dos bacteriófagos não só na prevenção da morbidade e mortalidade, mas também no tratamento após o início dos sinais clínicos, sendo tão ou mais eficazes que determinados antibióticos (O'FLYNN et al, 2004; HIGGINS et al, 2005; FIORENTIN et al, 2004; FIORENTIN, VIEIRA e BARIONI, 2005; SILVEIRA et al, 2006; LEE e HARRIS, 2005).

O presente estudo teve como objetivo testar um pool de seis bacteriófagos em suínos experimentalmente infectados com *Salmonella* Typhimurium.

2. Materiais e métodos

Foi utilizada a cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium ATCC 14028 (*Salmonella* Typhimurium) proveniente do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH) do DTA da UFV como hospedeiro no processo de infecção dos animais. O experimento para avaliar a eficácia de diferentes concentrações do pool de bacteriófagos no biocontrole foi realizado no setor de suinocultura do Departamento de Zootecnia (DZO) da UFV.

O protocolo de utilização de animais proposto neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Profissional do Médico Veterinário (CEPMV), nas normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CBEA), e na legislação vigente.

No presente estudo, partiu-se de um pool de bacteriófagos previamente caracterizados quanto a sua estrutura, resistência ao pH gástrico, sais biliares e espectro de ação. A partir da capacidade demonstrada pelos bacteriófagos de resistir a ambientes hostis e replicar-se, bem como de reduzir a concentração de *Salmonella* Typhimurium, “*in vitro*”, foi proposta a avaliação de seu pool no uso em suínos infectados experimentalmente.

Anteriormente ao início do experimento os animais passaram por um período de adaptação de 14 dias nas gaiolas metabólicas, a fim de reduzir o stress e regularizar o consumo de ração. Até o início do tratamento os animais recebiam ração 3 vezes ao dia e o consumo de água era “*ad libitum*”.

2.1.1. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em gaiolas metabólicas, com a utilização de 30 suínos, com pesos similares, entre 90 e 100 Kg, representando a fase de terminação, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com seis suínos por tratamento, sendo cada suíno uma repetição, representando uma unidade experimental. Foram realizados 5 tratamentos, um controle e quatro em diferentes Multiplicidades de Infecção (MOIs), que corresponde à relação entre a concentração de bacteriófagos e a concentração de hospedeiro, 00,1; 1; 100; 10000.

2.1.2. Infecção experimental de *Salmonella* Typhimurium em suínos e biocontrole com bacteriófagos

Os suínos receberam 5 mL de tampão SM contendo 10^5 UFC/ mL da cepa de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) ativa, via oral, em dois dias consecutivos. Após um intervalo de 24 horas da administração do patógeno, os suínos não receberam ração, para simular o jejum alimentar que eles passam antes de serem abatidos na indústria. Os suínos em jejum receberam 10 mL de solução de bicarbonato de sódio (Na_2HCO_3) (4 g/ 100 mL [pH 8,1]), via oral e logo após receberam as diferentes concentrações de bacteriófagos em 10 mL de tampão SM e permaneceram em jejum durante as próximas, 24 horas.

2.1.3. Abate, coleta de amostras do material fecal

Os animais foram então abatidos e coletados 10 g da digesta do íleo e 10 g do material fecal do ceco, foram transferidas para erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de tampão SM [$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl [pH 7,5], (Sigma) $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl (Vetec), $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Chemco), 0,01 % gelatina (Difco)] diluição 10:100. O patógeno foi quantificado em dois tipos de ágar seletivo, XLT4 e Rambach utilizando a metodologia *pour plate*.

2.1.4. Coleta de amostras dos órgãos

Também foram coletadas amostras de órgãos: fígado, rim, baço e linfonodo mesentérico, para avaliar a translocação dos bacteriófagos nestes órgãos. Os órgãos foram removidos dos seis animais que receberam a maior concentração de bacteriófagos, 10^9 PFU/ mL. Para o isolamento do bacteriófago foi utilizada metodologia proposta por Húngaro (2010). Dez gramas dos órgãos, foram triturados, diluídos 10:100 em tampão SM e homogeneizados em stomacher (Stomachers® 80 Biomaster) por 10 min. A suspensão foi incubada sob agitação (Bio Braun Biotech International) de 150 rpm a 17°C , por 24 horas, para permitir a eluição do fago para o tampão. Após este período, uma alíquota de 10 mL da solução foi transferida para um tubo de centrifuga esterilizado e submetido a centrifugação (Sigma, 3K30, rotor 12111H) a $13000 \cdot \text{g}$ por 5 min para remover detritos em suspensão. Em seguida, a suspensão foi micro filtrada em membrana de acetato de celulose ($0,22 \mu\text{m}$, Nalgene), para remover células e restos celulares e o filtrado analisado.

3. Resultados e discussão

3.1. Coleta de amostras do material fecal

A administração de *Salmonella* provocou sinais clínicos de salmonelose em nove animais (30 %), um de cada tratamento e cinco do T5, que apresentaram quadro de diarreia, com fezes líquidas e mal cheirosas amareladas ou esverdeadas, com queda de apetite e enfraquecimento.

Foi possível a visualização de colônias características de *Salmonella* em ambos meios de cultura. O meio de cultura Rambach, apresentou colônias de coloração rosa avermelhado, em 93,36 % das placas 90 analisadas mostrando-se mais específico que o meio XLT4 que apresentou colônias de coloração negra e halo translucido em 76,7 % das 90 placas analisadas conforme pode ser visto na Figura 7.

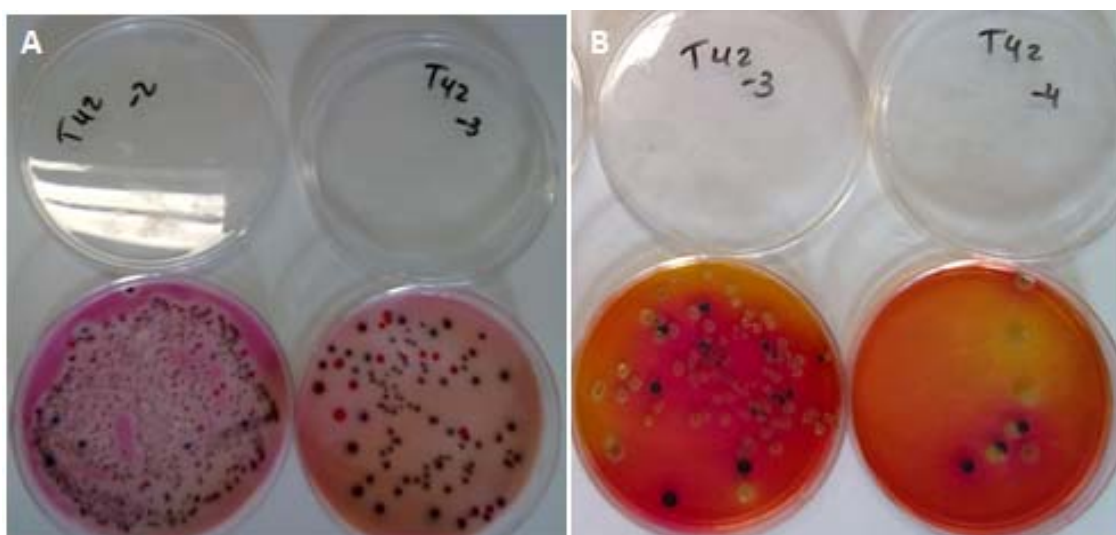


Figura 7. Colônias características de *Salmonella* em meios de cultura Rambach (A) e XLT4 (B). Placas representando a segunda repetição do tratamento com a maior MOI: 10000 (T42), nas diluições de 10^{-2} e 10^{-3} (A) e 10^{-3} e 10^{-4} (B).

Miiller e Unneverhr (2001) sugerem o uso de mais de um meio de cultura seletivo, já que alguns sorotipos de *Salmonella* podem ser sensíveis ao inibidor presente em determinados meios. O XLT4 inibe o crescimento de competidores como *Proteus*, *Pseudomonas* e *Providencia* o que permite melhor isolamento de *Salmonella*, apresentando colônias negras e de halo translucido, enquanto o Rambach diferencia as estirpes pelas características fenotípicas presentes no substrato cromogênico.

Os resultados obtidos são semelhantes aos resultados de Sherrod et al (1995) que compararam a recuperação de *Salmonella* em vários meios seletivos e os melhores resultados foram obtidos com o ágar XLT4 e Rambach entretanto os resultados deste trabalho mostraram uma maior especificidade do meio de cultura Rambach, já que o XLT4 apresentou 76,7 % de detecção de *Salmonella*. Por outro lado, o XLT4 apresentou maior sensibilidade, logrando valores de contagem mais precisos, que resultaram no efeito significativo em dois locais de tratamento, íleo e ceco, enquanto no Rambach foi possível apenas no ceco conforme mostrado na Figura 8. Dusch e Altwegg (1995) encontraram melhores resultados com a utilização do ágar XLT4, em relação ao Rambach. O XLT4 além de ter apresentado maior sensibilidade, foi mais específico, sendo indicado por estes autores para a recuperação de *Salmonella* não tifoide a partir de fezes.

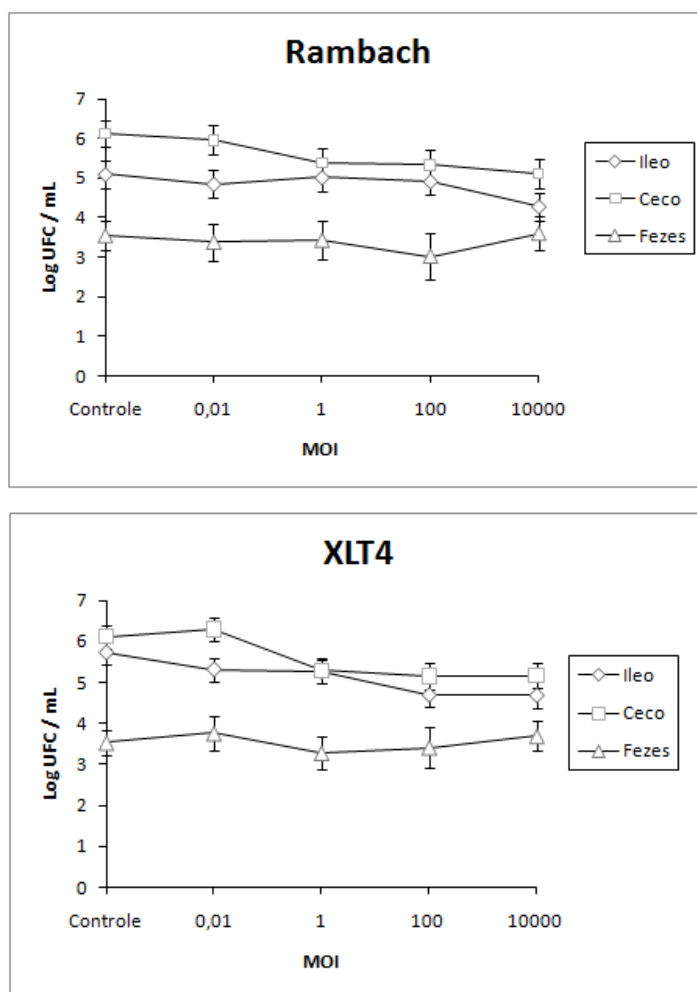


Figura 8. Quantificação de *Salmonella Typhimurium* em diferentes órgãos após a aplicação do tratamento com diferentes MOIs do pool de bacteriófagos.

Em ambos meios de cultura houve redução média de 1 log UFC/ g tanto no íleo quanto no ceco, entretanto não houve redução da excreção nas fezes. As reduções ocorreram nos MOIs de 100 e 10000. Esta redução foi inferior ao esperado, quando comparado aos testes *in vitro*. A solução de bicarbonato de sódio administrada antes do tratamento com pool de bacteriófago no período de jejum, não deve ter sido suficiente para elevar o pH estomacal e protegê-los, o que possibilitaria uma redução da viabilidade do pool de bacteriófagos.

Observou-se que a concentração de *Salmonella*, independentemente do meio de cultura, foi semelhante no ceco, no íleo e nas fezes. Entretanto, quando analisada a contagem bacteriana seguindo o fluxo da digesta pelo sistema digestivo, houve aumento de 1 log UFC/ g do íleo para o ceco e diminuição de 2,6 log UFC/ g do ceco para as fezes do suíno. Provavelmente isto ocorreu devido à concentração de micro-organismos competidores da microbiota, altos níveis de substrato e tipos de fermentação que ocorrem naturalmente no ceco do suíno. A diminuição do ceco para as fezes se deve ao fato de existirem vários mecanismo de defesa ao longo do intestino como sistema imune e a reabsorção de água.

Os resultados deste trabalho foram semelhantes aos encontrados por Wall et al (2010) que obtiveram sucesso ao administrar uma mistura de bacteriófagos em suínos antes da exposição ao ambiente contaminado por *Salmonella*, alcançando redução significativa na concentração da bactéria nas tonsilas e no conteúdo do ceco e íleo dos animais tratados porém não obtiveram o mesmo sucesso nas fezes e nos linfonodos. Da mesma forma Lee e Harris, (2005) inocularam experimentalmente *Salmonella* Typhimurium seguido de administração de MOI de 100 de suspensão de bacteriófagos. Os animais foram necropsiados após 9 horas do desafio, e analisados quanto à presença de *Salmonella* em diferentes órgãos (tonsilas, fígado, baço, pulmão, linfonodos mesentéricos e ceco). Como resultado, observou-se a redução de *Salmonella* no ceco e tonsilas em comparação aos animais testemunhas, entretanto isso não foi observado nas fezes. O que também foi observado neste trabalho.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silveira et al (2006) que testaram a capacidade de ação de bacteriófagos no trato intestinal de suínos infectados experimentalmente com *Salmonella* Typhimurium. Neste experimento, foi administrada oralmente solução de bacteriófagos MOI 1000,

por quatro dias consecutivos após inoculação de *Salmonella* Typhimurium. Esse protocolo de tratamento conseguiu reduzir a excreção de *Salmonella* Typhimurium, entretanto não foi capaz de eliminá-la do trato intestinal e dos tecidos dos suínos. A dinâmica da avaliação dos bacteriófagos por suínos infectados por *Salmonella* Typhimurium estudada por este autor diferiu do adotado no presente estudo. Entretanto, foi observado que os bacteriófagos começavam a ser detectados nas fezes no dia seguinte ao início do tratamento.

Os protocolos adotados por Silveira (2006) e neste estudo diferem no tempo de administração de *Salmonella* e concentração de bacteriófago. Entretanto, observa-se que houve efeito positivo na modificação do protocolo, já que os resultados obtidos foram semelhantes.

3.2. Coleta de amostra dos órgãos

Um animal de cada tratamento (16,7 %), e cinco animais, (83,4 %) do tratamento com MOI: 10000 tiveram sinais clínicos de salmonelose, apresentando quadro de diarreia. Os órgãos dos animais do T5 foram analisados quanto a translocação de bacteriófagos, e apenas no animal que não apresentou quadro de diarreia foi possível a detecção de bacteriófagos em todos os órgãos, mostrando a translocação dos mesmos. Segundo Zlotowski, Driemeir e Barcellos (2008) a diarreia é o excesso de secreção de fluidos que ultrapassa a capacidade de absorção do intestino, resultando na disfunção dos mecanismos secretórios e absorptivos fisiológicos. Isso ocorre devido diversos fatores mas principalmente à produção de toxinas por enterobactérias na mucosa do intestino. A diarreia funciona como um mecanismo de defesa eliminando, bactérias e toxinas através da hipersecreção do material fecal.

Estudo realizados por Górski et al (2006) sugerem que o bacteriófago não só pode residir no lúmen do intestino como passar pela barreira intestinal similar à translocação bacteriana. As condições que permitem este acontecimento ainda são obscuras, mas podem ser determinadas por vários fatores tais como: concentração, interação das proteínas do capsídeo e com os receptores do enterócito.

Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores como Mai et al (2010) que conseguiram isolar bacteriófagos de *Listeria monocytogenes* do baço e fígado de ratos infectados e Lau et al (2010)

também isolou bacteriófagos de *Escherichia coli* dos pulmões, fígado, duodeno e baço de aves infectadas. O sistema de defesa do trato gastro intestinal mostrou-se eficiente em eliminar ou não permitir a translocação dos bacteriófagos que também foi relatado por Duerr, Stephen e Hermann (2003) que isolaram bacteriófagos M13, no baço e conseguiram recuperar-los em baixas concentrações, mostrando que a barreira intestinal é efetiva.

Há uma grande variabilidade nos resultados de pesquisas com bacteriófagos no controle de patógenos em animais. Isso evidencia a necessidade de mais pesquisas para encontrar técnicas que melhor identifiquem o efeito benéfico dos bacteriófagos para depois desenvolver aplicações eficientes, mas de forma geral, o biocontrole de *Salmonella* tem efeito curto e necessita de uma dose de bacteriófago adequada à quantidade de bactérias alvo.

4. Conclusões

Os meios de cultura Rambach e XLT4 foram capazes de detectar *Salmonella*, entretanto o Rambach foi mais específico e o XLT4 foi mais sensível.

Houve redução de 1 ciclo logarítmico na contagem de *Salmonella* tanto no íleo quanto no ceco, e essa redução ocorreu nas maiores MOI_s: 100 e 1000. Mostrando que quanto maior o MOI, maior será a eficiência do tratamento. Não houve mudança na contagem de *Salmonella* nas fezes, tanto no controle e nos diferentes MOIs, em ambos meios de cultura, mostrando que as fezes não são o material ideal para a quantificação do patógeno.

O quadro clínico de diarreia não permitiu a translocação do bacteriófago para outros órgãos, provavelmente, devido a velocidade do fluxo fecal pelo intestino. Isto sugere que o tratamento com bacteriófagos não deve ser usado como medida corretiva de quadro de salmonelose aguda ou crônica, mas sim como preventivo de contaminação.

A metodologia aplicada neste trabalho mostrou-se eficaz na redução da contagem de *Salmonella*, em suínos experimentalmente infectados, entretanto deve-se considerar a necessidade de proteger os bacteriófagos contra os efeitos de pH e sais biliares e outros, durante sua passagem pelo sistema

digestivo do animal, para aumentar sua viabilidade e eficiência no biocontrole de *Salmonella* Typhimurium.

A utilização de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella* Typhimurium empregados na início da fase de terminação do suíno, pode resultar em um menor índice de contaminação por este patógeno em produtos alimentícios de origem suína. Entretanto existe a necessidade de trabalhos futuros para avaliação da atividade do pool de bacteriófagos com diferentes metodologias e em etapas que não foram abordados neste trabalho, como o micro encapsulamento, temperatura e outras barreiras que possam interferir na viabilidade e eficácia dos bacteriófagos.

CAPITULO IV

Conclusões Gerais

Conclui-se que os bacteriófagos reduziram a contaminação de *Salmonella* nas duas etapas deste trabalho, entretanto não foram capazes de eliminar o patógeno. Isto evidencia a aplicabilidade dos bacteriófagos frente aos antimicrobianos, contudo mais estudos são necessários para desenvolver pools de bacteriófagos com a capacidade de atingir elevado espectro de patógenos e resistir às diversas barreiras do sistema gastrointestinal, também são necessários estudos utilizando um número maior de animais e testar em diferentes fases da suinocultura como maternidade e creche para localizar o local exato de maior eficiência neste tipo de tratamento.

Referências bibliográficas

ABIPECS. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Carne Suína. **Estatísticas do Mercado Mundial, Produção**. Disponível em, <http://www.abipecs.org.br>. Acessado em 04 de Jul de 2011a.

ABIPECS. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Carne Suína. Estatísticas do Mercado Interno. **Produção Brasileira entre 2004 e 2010**. Disponível em, <http://www.abipecs.org.br>. Acessado em 04 de Jul de 2011b.

ABIPECS. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Carne Suína. Estatísticas do Mercado Externo. **Principais Destinos**. Disponível em, <http://www.abipecs.org.br>. Acessado em 04 de Jul de 2011c.

ACKERMAN, H.W. Bacteriophage classification. In: KUTTER, E; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: biology and applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 67-90, 2005.

ADAMS, M.H. Bacteriophages. New York: **Interscience**, p. 450-451, 1959.

ANGULO, F.J.; NARGUND, V.N.; CHILLER, T.C. Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p. 374-379, 2004.

ALISKY, J.; ICZKOWSKI, K.; RAPOPORT, A.; TROITSKY, N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. **The Journal Of Infection**. v. 38, n.1, p. 5-15, 1998.

ALMEIDA, F.S.; RIGOBELLO, E.C.; MARIN, J.M.; MALUTA, R.P.; ÁVILA, F.A. Diarréia Suína: Estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-Sp, Brasil. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, SP, v. 23, n. 3, p. 151-157, 2007.

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária – Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). **Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI**, 2008.

ATTEBURY, R.J.; BERGEN, M.A.P.; BERGEN, V.; ORTIZ, F.; LOVELL, M.A.; HARRIS, J.A.; DE BOER, A.; WAGENAAR, J.A.; ALLEN, V.M. & BARROW, P.A. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. **Applied and environmental Microbiology**, v. 73, p. 4543-4549, 2007.

AUDIA, J.P.; WEBB, C.C. & FOSTER, J.W. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enterobacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 97–106, 2001.

- AZIZ, A. & IBRAHIM, E. Bacteriophage typing of *Salmonella*. **Applied Microbiology**, p. 444-447, 1969.
- BAGGESEN, D.L.; WEGENER, H.C.; BAGER, F.; CHRISTENSEN, J.; STEGE, H. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 26, p. 201-213, 1996.
- BAHNSON, P.B.; FEDORKA-CRAY, P.J.; LADELY, S.R.; MATEUS-PINILLA, N.E. Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, p. 249-262, 2006.
- BERSOT, L.S. Disseminação de *Salmonella* na cadeia produtiva de suínos. São Paulo. Tese de doutorado – **Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP**, 2005.
- BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 24, p. 80-84, 2004.
- BIELKE, L.S; HIGGINS, A.M; DONOGHUE, D.J; DONOGH, U.E. & HARGIS, B. *Salmonella* host range of bacteriophages that infect multiple genera. **Journal of Poultry Science**, v. 86, p. 2536-2540, 2007.
- BIGWOOD, T.; HUDSON, J.A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.V. & HEINEMANN, J.A. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. **International Journal of Food Microbiology** v. 25, p. 400–406, 2008.
- BORCH, E.; NESBAKKEN, T. & CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, n. 30, p. 9–25, 1996.
- BOYEN, F.; PASMANS, F.; IMMERSEEL, F.V.; DONNÉ, E.; MORGAN, E.; DUCATELLE, R. & HAESEBROUCK, F. Porcine *in vitro* and *in vivo* models to assess the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for pigs. **Laboratory Animals**, v. 43, p. 46-52, 2008.
- BOYLE, E.C.; BISHOP, J.L.; GRASSL, G.A.E.; FINLAY, B.B. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. **The Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 1489–1495, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. Instrução Normativa 70, de 6 de outubro de 2003. **Diário Oficial da União**. 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. Instrução Normativa nº 9, de 8 de abril de 2009. **Diário Oficial da União**. 2009b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. **Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI**, 2009a.

- BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R. & SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465–2467, 2000.
- BRUSSOW, H. & KUTTER, E. Phage ecology. In: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: biology and applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, p.129-163, 2005.
- BRUSSOW, H.; CANCHAYA, C. & HARDT, W.D. Phages and the lysogenic conversion. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 68, p. 560-602, 2004.
- BÜNZEN, S. Comunicado Técnico: Capacidade Tampão das Rações para Suínos. **Boletim Técnico**. Janeiro, 2006. Disponível em www.serrana.com.br Acesso em 20 de Nov de 2010.
- BYWATER, R.; DELUYKER, H.; DEROOVER, E.; JONG, A.; MARION, H.; MCCONVILLE, M.; ROWAN, T.; SHRYOCK, T.; SHUSTER, D.; THOMAS, V. & WALTERS, J. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.54, n.4, p.744-754, 2004.
- CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; BRABBAN, A.; KUTTER, E.; KARRIKER, L.; STAHL, C.; WAGSTROM, E.; ANDERSON, R.C.; GENOVESE K.; McREYNOLDS, J. Occurrence of *Salmonella*-specific bacteriophages in Swine feces collected from commercial farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 851-856, 2010.
- CAPRIOLI, A; BUSANI, L; MARTEL, J.L; HELMUTH, R. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiology and microbiological methodologies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 295-301, 2000.
- CARRILLO, C.L.; ATTERBURY, R.J.; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P.L.; DILLON, E.; SCOTT A.; CONNERTON, I.F. Bacteriophages Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broilers Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 6554-6563, 2005.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly though food – 10 States, United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 57, n. 14, p. 361-392, 2007.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. Salmonellosis – General information. **Division of Bacterial and Mycotic Diseases**. Disponível em: www.cdc.gov Acessado em: 23 de Nov de 2010b
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. Investigation update: **outbreak of Salmonella Typhimurium Infections, 2008-2009**. Disponível em: <http://www.cdc.gov> Acesso em 14 Dez de 2010a
- CHAVES, G.M.C.; GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M. Avaliação bacteriológica de lingüiça frescal suína comercializada no município do rio de janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, v.14, n.73, p.48-52, 2000.

COURCHESNE, N.M.; PARISIEN, A. & CHRISTOPHER Q. Production and Application of Bacteriophage and Bacteriophage-Encoded Lysins. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 3, p. 37-45, 2009.

DABROWSKA, K.; SWITAŁA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A. Bacteriophage penetration in vertebrates. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, p. 7-13, 2005.

D'AOUST, J.Y. *Salmonella* species. **Hadcover**, New Jersey. 2001.

DAVIES, P.R. The impact of societal issues in pork production on domestic and international market access. In: Simpósio UFRGS Sobre Manejo, Reprodução E Sanidade Suína, 1., 2006, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: Setor de Suínos, p. 1-17, 2006.

DLABAC, V.; TREBICHAŤSKÝ, I.; REHÁKOVÁ, Z.; HOFMANOVÁ, B.; SPLÍČHAL & CUKROWSKA, B. Pathogenicity and protective effect of rough mutants of *Salmonella* species in germ-free piglets. **Infection and Immunity**. v.65, p. 5238–5243, 1997.

DUERR M,D.; STEPHEN J.W. & HERMANN J.S. Identification of peptide sequences that induce the transport of phage across the gastrointestinal mucosal barrier. **Journal of Virological Methods**, v. 116, p. 177. 2003.

DUSCH, H. & ALTWEGG, M. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 802-804, 1995.

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

EFSA. European Food Safety Authority - Report of the task force of zoonoses data collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkeys and pigs and *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broilers. **The Efsa Journal**. Italy, v. 403, p. 1- 16, 2006.

EFSA,. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates, **Journal European Food Safety Authority**, n. 135, p. 111, 2008.

EFSA – European Food Safety Authority. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zootic agents in the European Union in 2007. **The EFSA journal**, 2009.

EISENSTARK, A.; RABSCH, W. & ACKERMANN, H.J. Morphology of *Salmonella* Typhimurium typing phages of the Lilleengen set. **Microbiology**, NRC Research Press, v. 55, p. 1403-1405, 2009.

ETHELBERG, S.; WINGSTRAND, A.; JENSEN, T.; SORENSEN, G.; MULLER, L.; LISBY, M.; NIELSEN, E.; MOLBAK, K. Large outbreaks of *Salmonella* Typhimurium infection, in Denmark, in 2008. **Eurosurveillance**, v. 13, n. 44, 3p., 2008.

FEDORKA-CRAY, P.J.; BAILEY, J.S.; STERN, N. & COX, N. A. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 1376-1380, 2002.

FEDORKA-CRAY, P.J.; WHIPP, S.C.; ISAACSON, R.E.; NORD, N.; LAGER, K. Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. **Veterinary Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 333-344, 1994.

FEDORKA-CRAY, P.J.; GRAY, J.T.; WRAY, C. *Salmonella* infections in pigs. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in domestic animals**, Publishing, c.11, p. 191-207, 2000.

FEDORKA-CRAY, P.J.; KELLEY, L.C.; STABLE, T.J.; LAUFER, J.A. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. **Infection and Immunity**, v.63, p. 2658-2664, 1995.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D.; BARIONI, W.J. & BARROS, S. "In vitro" characterization and "in vivo" properties of *Salmonella* lytic bacteriophages isolated from free-range chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 105-112, 2004.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D. & BARIONI, W.Jr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in fecal contents of broilers. **Avian Pathology**, v. 34, p. 258–263, 2005.

FIGUEIREDO, V.F. e COSTA P.L.O.N. Implantação do HACCP na Indústria de Alimentos **Gestão e Produção**, v. 8, n. 1, p. 100-111, 2001.

FROST, J.A.; KRAMER, J.M.; GILLANDERS, S. A. Phage typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and its use as an adjunct to serotyping. **Epidemiology and Infection**, v. 123, p. 47–55, 1999.

FUNK, J.A. Control of *Salmonella* in the pork production chain. In: London Swine Conference- Facing de New Reality. **Anais**, p.73-78, 2008.

FUNK, J.A.; DAVIES, P.R.; NICHOLS, M.A. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 45 60, 2001.

GABIG, M.; HERMAN, A.A.; KWIATKOWSKA, M.; LOS, M.; THOMAS, S. & GRZEGORZ W. E. The cell surface protein Ag43 facilitates phage infection of *Escherichia coli* in the presence of bile salts and carbohydrates. **Microbiology**, Great Britain, v. 148, p. 1533-1542, 2002.

GARCÍA, E. & LÓPEZ, R. Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. **Revista Española De Quimioterapia**. 15, 4, p. 306-312, 2002.

GARCIA, B.; MARTINEZ, J.M.; RODRIGUEZ, A. Bacteriophages and their application in food safety, **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 479–485, 2008.

GEBREYES, W.A.; THAKUR, S.; DAVIES, P.R.; FUNK, J.A.; ALTIER, C. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs 1997–2000. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 997–1003, 2004.

GOODE, D.; ALLEN, V.M. & BARROW, P.A. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5032–5036, 2003.

GORSKI, A.; WAZNA, B.W.; DABROWSKA, K.; DABROWSKA, K.; SWITAŁA J., & MIEDZYBRODZKI, R. Bacteriophage translocation. **Immunology of Medical Microbiology**, v. 46, p. 313–319, 2006.

GORSKI, A. & WEBER-DABROWSKA B. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. **Cellular Molecule Life Science**, v. 62, p. 511–519, 2005.

GREER, G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1102–1111, 2005.

GREGORACCI, G.B.; SILVEIRA, W.D. & BROCCCHI, M. The biology of bacteriophages. In: WEGRZYN, G; **Modern Bacteriophages Biology and Biotechnology**. Kerala: Research Signpost (in press), p. 36, 2006.

GREIG, J.D. & RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 77–87, 2009.

GRIFFITH, R.W.; SCHWARTZ, K.J. and MEYERHOLZ, D.K. *Salmonella*. In Diseases of Swine ed. STRAW, B.E., ZIMMERMAN, J.J., D'ALLAIR, S. and TAYLOR, D.J. p. 739–754. Ames: **Blackwell Publishing Professional**. 2006

GRIMONT, H.F. & WEILL, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovar, **Institute Pasteur**. 2007.

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella* in domestic animals. Wallingford: **CABI Publishing**, c. 1, p. 1–17. 2000.

HAGENS, S. & LOESSNER, M.J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 76, p. 513–519, 2007.

HALD, T.; WINGSTRAND, A.; SWANENBURG, M.; VON ALTROCK, A.; THORBERG, B.M. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in

- European pig slaughterhouses. **Epidemiology and Infection**, v. 131, p. 1187-1203, 2003.
- HANLON, G.W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International Journal Of Antimicrobial Agents**. n.30, p.118-128, 2007.
- HEGDE, N.V.; COOK, M.L.; WOLFGANG, D.R.; LOVE, B.C.; MADDOX, C.C.; JAYARAO, B.M. Dissemination of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium . Copenhagen clonal types through a contract heifer-raising operation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4208-4211, 2005.
- HERINGA, D.; KIM, J.; JIANG, X.; DOYLE, M.P. & ERICKSON, M.C. Use of a Mixture of Bacteriophages for Biological Control of *Salmonella enterica* Strains in Compost. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5327–5332, 2010.
- HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; GUENTHER, K.L.; HUFF, W.; DONOGHUE, A. M.; DONOGHUE, D.J. & HARGIS, B.M. Use of specific bacteriophages treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. **Journal Poultry Science**, v. 84, p. 1141-1145, 2005.
- HILL, A.A.; ENGLAND, T.J.; SNARY, E.L.; KELLY, L.A.; COOK, A.J.C. A “farm-to-consumption” risk assessment for *Salmonella* Typhimurium in pigs. Department of Risk Research, **Veterinary Laboratories Agency**, Weybridge, 2003.
- HOPKINS, K.L.; KIRCHNER, M.; GUERRA, B.; GRANIER, S.A.; LUCARELLI, C.; PORRERO, M.C.; JAKUBCZAK, A.; THRELFALL, E.J.; MEVIUS, D.J. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in europe: a new pandemic strain? **Eurosurveillance**, Stockholm, v. 15, n. 22, 2010.
- HOUSBY, J.N. & MANN, N.H. Phage Therapy. **Drug Discovery Today**, v.14, p. 536- 540, 2009.
- HUFF, W.E.; HUFF, G.R.; RATH, N.C.; BALOG, J.M.; DONOGHUE, A.M. Therapeutic efficacy of bacteriophage and baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. **Poultry Science**, v. 83, p. 1944-1947, 2004.
- HUNGARO, H.M. Utilização de Bacteriófagos na Redução de *Salmonella Enterica* em pele de frango. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.
- 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 Bacteriology**. v.62, p.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 and Environmental Microbiology**., v. 68, p.2375–2381, 2002.

HURD, H.S.; BRUDVIG, J.; DICKSON, J.; MIRCETA, J.; POLOVINSKI, M.; MATTHEWS, N.; GRIFFITH, R. Swine health impact on carcass contamination and human foodborne risk. **Public Health Reports**, v. 123, p. 343-351, 2008.

JOERGER, R.D. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. **Journal of Poultry Science**, v. 82, p. 640–647, 2003.

KICH, J.D.; SCHWARZ, P.; SILVA, E.L.; COLDEBELLA, A.; PIFFER, I.A.; VIZZOTO, R. & CARDOSO, R.D.I.M. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against prevalent *Salmonella* serovars in swine in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic**, v. 19, p. 510–517, 2007.

KICH, J.D. Salmonelose. In: SOBESTIANSKY, J. & BARCELLOS, D. **Doença dos Suínos**. Goiânia: Cãnone, p. 196-203, 2007.

KICH, J.D.; BORDIN, L.C.; MORÉS, N.; COLDEBELLA, A.; TRICHES, N.; KLEIN, E.; RAMENZONI, M.; SILVA, L.E.. Excreção e soroprevalência de *Salmonella* no alojamento de leitões em granjas de terminação. In: Congresso de Latino Americano de Suinocultura. **Anais**. Foz do Iguaçu, Paraná, v. 3, p. 470- 471, 2004a.

KICH, J.D. & CARDOSO, M. *Salmonella* em suínos: segurança alimentar e situação no sul do Brasil. **Embrapa Suínos e Aves**, 2004b. Disponível em www.cnpsa.embrapa.br. Acessado em: 28 de Set de 2010

KIM K.P.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M.J. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p.195–203, 2007.

KNEZEVIC, P.; OBREHT, D.; CURCIN, S.M.; PETRUSIC, V.; ALEKSIC, R.; KOSTANJSE, K. & PETROVIC, O. Phages of *Pseudomonas aeruginosa*: response to environmental factors and in vitro ability to inhibit bacterial growth and biofilm formation. **The Authors Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 245–254, 2011.

KOO, J.; DEPAOLA, A. & MARSHALL, D.L. Effect of simulated gastric fluid and bile on survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* phage. **Journal of Food Protection**. 63:1665–1669. 2000

KUDVA, I.T.; JELACID, P.I.; TARR, P.; YOUNDERIAN & HODVE, J.D. Biocontrol of *Echerichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3767-3773, 1999.

KUTTER, E. & SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: Biology and applications**. CRC Press, Boca Raton, FL. 2005

LAPPE, N.; DORAN, G.; O'CONNOR, J.; O'HARE, C. & CORMICAN, M. Characterization of bacteriophages used in the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phagetyping scheme. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 86–93, 2009.

- LAU, G.L.; SIEO, C.C.; TAN, W.S.; HAIR-BEJO, M.; JALILA A. & HO, Y.W. Efficacy of a bacteriophage isolated from chickens as a therapeutic agent for colibacillosis in broiler chickens. **Journal of Poultry Science**, v. 89, p. 2589–2596, 2010.
- LEDERMANN, W. Una historia del bacilo de Eberth desde Junker hasta Germanier. **Revista Chilena de Infectología**, v. 20, p. 58-61, 2003.
- LEE, N. & HARRIS, D.L. The effect of bacteriophages treatment to reduce the rapid dissemination of *Salmonella* Typhimurium in pigs. **Iowa State University Press**. p.196-197, 2005.
- LEVERENTZ, B.W.S.; CONWAY, Z.; ALAVIDZE, W.J.; JANISIEWICZ, Y. FUCHS, M.J.; CAMP, E.; CHIGHLADZE, & SULAKVELIDZE, A. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh fruit: a model study. **Journal of Food Protection**. v. 64, p. 1116–1121, 2001.
- LEVIN, B.R. & BULL, J.J. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 166-173, 2004.
- LEVY, J.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. & OWENS, R.A. Bacteriophages. in:(ed.) **Virology**. 3 ed. New Jersey: Prentice Hall, sec. 8.7, p. 206-221, 1994.
- LOBO, M.V.; UGALDE, M.G.; FRIES, L.L.M.; KUBOTA, E.H. Avaliação microbiológica de salames coloniais comercializados no município de Santa Maria-RS. **Higiene Alimentar**, v.15, n.88, p.57-61, 2001.
- LO FO WONG, D.M.A.; HALD, T. & VAN DER WOLF, P.J.; SWANENBURG M. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Production Science**, v. 76, p. 215-222, 2002.
- MA Y.L. & LU C.P. Isolation and identification of a bacteriophage capable of infecting *Streptococcus suis* type 2 strains. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 340-347, 2008.
- MAI, V.; UKHANOVA, M.; LEE, V.; TAMAR, A. & SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage Administration Reduces the Concentration of *Listeria monocytogenes* in the Gastrointestinal Tract and Its Translocation to Spleen and Liver in Experimentally Infected Mice Hindawi. **International Journal of Microbiology**, Article ID 624234, doi:10.1155/2010/624234, 2010.
- MANN, J.E.; SMITH, L. & BRASHEARS, M.M. Validation of time and temperature values as critical limits for salmonella and background flora growth during the production of fresh ground and boneless pork products. **Journal Of Food Protection**, n. 67, p. 1389–1393, 2004.
- MANNION, C.; LEONARD, F.C.; LYNCH, P.B & EGAN, J. Efficacy of cleaning and disinfection on pig farms in Ireland. **Veterinarian Record**. v. 161, p. 443-453, 2007.

- MARTINEZ, B.; OBESO, J.M.; RODRIGUEZ, A. & GARCIA, P. Nisin-bacteriophage crossresistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 253–258, 2008.
- MATSUZAKI, S.; RASHEL, M.; UCHIYAMA, J.; SAKURAI, S.; UJIHARA, T.; KURODA, M.; IKEUCHI, M.; TANI, T.; FUJIEDA, M.; WAKIGUCHI, H. & IMAI, S. Bacteriophages therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious disease. **Journal of Infection Chemotherapy**, v. 11, p. 211-219, 2005.
- MAYER, G. *Bacteriophage*. In: **Microbiology and Immunology On-Line, Bacteriology**, Columbia, University of South Carolina, v. 2, c.7, 2005.
- MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1687-1693, 2008.
- MCGHIE, E.J.; BRAUN, L.C.; HUME, P.J.; HUMPHREYS, D. & KORONAKIS, V. *Salmonella* takes control: Effector-driven manipulation of the host. **Current Opinion on Microbiology**. v.1, n.12, p.117–124, 2009.
- MCLAUGHLIN, M.R. & KING, R.A. Characterization of *Salmonella* bacteriophages isolated from swine lagoon effluent. **Current Opinion on Microbiology**, v. 56, p. 208–213, 2008.
- MCLAUGHLIN, M.R. Phage to control *Salmonella*. **Industrial Bioprocess**, v. 28, p. 6–7, 2006b.
- MCLAUGHLIN, M.R; BALAA, M.F.; SIMS, J. & KING, R. Isolation of *Salmonella* bacteriophages from swine effluent lagoons. **Journal of Environmental Quality**. v.35, p.522–528, 2006a.
- MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na nutrição de aves. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira De Zootecnia, Piracicaba, **Anais SBZ: Piracicaba-SP**,v.38, p.141-157, 2001.
- MILLER, D.N.; BRYANT, J.E.; MADSEN, L.E. & GHIORSE, C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4715-4724, 1999.
- MILLER, G.Y. & UNNEVEHR, L.F. Characteristics of Consumers Demanding and Their Willingness to Pay for Certified Safer Pork. **Journal of Agribusiness** v. 19, p. 101-119, 2001.
- MOUSING, J.; JENSEN, P.T.; HALGAARD, C.; BAGER, F.; FELD, N. & NIELSEN, B. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in danish slaughter swine herds, **Preventive Veterinary Medicine**, v. 53, p. 247-261, 1997.

MÜLLER, M.; SCHWARZ, P.; KICH, J.D. & CARDOSO, M. Perfil Sorológico e Isolamento de *Salmonella* sp. em suínos no início da terminação e ao abate. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 931-937, 2009.

NOLLET, A.N.; DALSGAARD, A.; STOCKMARR, A.; NIELSEN, E.M.; BAGGENSEN, D.L. Variability in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* strains from fattening pigs and sows. **Microbial Drug Resistance**, v. 12, p. 74-81, 2006.

NOLLET, N.; MAES, D.; DUCHATEAU, L.; HAUTEKIET, V.; HOUF, K.; VAN HOOF, J.; DE ZUTTERA, L.; DE KRUIF, A.; GEERS, R. Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. **Veterinary Research**, n. 36, p. 545–555, 2005

NORIEGA, L.; GUEIMONDE, M.; SANCHEZ, B.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVILAN, C.L. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low PH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 79–86, 2004

O'FLYNN, G.; COFFEY, A.; FITZGERALD, G.F. & ROSS, R.P. The newly isolated lytic bacteriophages st104a and st104b are highly virulent against *Salmonella enterica*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 251–259, 2005.

O'FLYNN, G.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COFFEY, A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O158:H7. **Applied Environment Microbiology**, v. 70, p. 3417-3424, 2004.

OLIVEIRA, A.; SERENO, R.; NICOLAU, A. & AZEREDO, J. The influence of the mode of administration in the dissemination of three coliphages in chickens **Journal of Poultry Science**, v. 88, p.728-733, 2009.

OLIVEIRA, F.H.; SANTANA, E.S.; SOBESTIANSKY, J.; CHEDIAK, M. P. Matosfisiopatologia da glândula mamária da fêmea suína em produção. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 7, n. 12; 2011.

OLIVEIRA, J.B.; GARCIA, A.B.; CARVALHO, L.F. & GIVISIEZA, P.E.N. Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 125, p. 355–361, 2007.

OLIVEIRA, S.J. **Guia Bacteriológico Prático**, 2 ed. Ulbra, Canoas. 2000.

PASSOS, E.C.; ALMEIDA, C.S.; ROSA, J.P.; ROZMAN, L.M.; MELLO, A.R.P.; SOUZA, C.V.S.; PASCHOAL, R.C.; TAVARES, M. Surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empreiteira da construção civil no município de Cubatão, SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3, p. 237-240, 2008.

PAULIN, S.M.; JAGANNATHAN, A.; CAMPBELL, J.; WALLIS, J.S.E.; STEVEN M.P. Net replication of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and

Cholerasuis in porcine intestinal mucosa and nodes associated with their differential virulence. **Infection Immunology**. v. 75, p. 3950-3960, 2007.

PAYMENT, P. & RILEY, M.S. Resolving the global burden of gastrointestinal illness: a call to action. **American Academy of Microbiology**. Washington, DC, 2002. Disponível em www.asm.org, Acesso em: 06 jun 2011.

PELLEGRINI, D.C.P.; CARDOSO, M.R.I.; LIMA, G.J.M.M.; KICH, J.D.; COLDEBELLA, J. Frequência de isolamento de *Salmonella sp.* e de enterobactérias em diferentes áreas de fábrica de ração para suínos. 14º Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, **Anais**. Uberlândia, Minas Gerais. p. 311-312, 2009.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? – A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 53, p. 28-52, 2004.

POPOFF, M.Y. & LE MINOR, L.L. Antigenic formulas of *Salmonella* sorovar. In: National *Salmonella* Center by the WHO collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris: **Institute Pasteur**, 1997.

POPOFF, M.Y. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. **WHO, Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**. Kauffmann-White Scheme, p. 19-101, 2001.

PRESCOTT, HARLEY & KLEIN, **Microbiology**, 5 ed, v. 1147, p. 973-974, 2002

PROUTY, A.M. & GUNN, J.S. *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 6763–6769, 2000.

RAJIĆ, A.; WADDELL, L.A.; SARGEANT, J.M.; READ, S.; FARBER, J.; FIRTH M.J. & CHAMBERS, A. An overview of microbial food safety programs in beef, pork, and poultry from farm to processing in Canada. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 1286–1294, 2007.

RIBOT, E.M.; WIERZBA, R.K.; ANGULO, F.J.; BARRET, T. *Salmonella* entérica serotype Typhimurium DT104 isolated from human, United States, 1985, 1990 and 1995. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 387-391, 2002.

REZENDE, A.C.V. Isolamento e Caracterização de Bacteriófagos para Biocontrole de *Salmonella Enterica*. Tese (Mestrado), **Universidade Federal de Viçosa**, Minas Gerais, 2009.

ROSTAGNO, M. Can Stress in farm animals increase food safety risk? **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 6, n. 7, p. 767-776, 2009.

ROSTAGNO, M.H. Epidemiologia e diagnóstico das infecções por *Salmonella sp.* em suínos. Tese (Doutorado) - **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2002b.

ROSTAGNO, M.H. Infecção por *Salmonella* spp em suínos durante o descanso pré abate. In: 10º Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. Porto Alegre. **Anais**, Porto Alegre, ABRAVES, p. 119-120, 2001

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 Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4489-4494, 2003.

ROSTAGNO, M.H.; HURD, H.S.; GALEY, J.K.; MCKEAN, J.D.; LEITE, R.C. Comparative evaluation of *Salmonella* detection assays on swine fecal sample. In: 17 th IPVS CONGRESS, IOWA. **IOWA Proceedings**, p. 311. 2002a.

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; FLORES, M.L. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clinicas de humanos e de alimentos envolvidos em episodio de toxinfecção alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, Brasil, v. 16, p.93-99, 2002 .

SCHNABEL, E.L. & JONES A.L. Isolation and Characterization of Five *Erwinia amylovora* Bacteriophages and Assessment of Phage Resistance in Strains of *Erwinia amylovora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 59-64, 2001.

SCHAECHTER M. **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. Elsevier Ltda, 2004.

SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis. In: STRAW, B.E.; DALLAIRE, S.; MENGELING, W.L. Diseases of Swine. 8 ed, Ames. **Iowa State University Press**, c. 39, p. 535- 551, 2000.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, p. 431-437, 2001.

SCHWARZ, P; CALVEIRA, J; SELLA, M; BESSA, D.E.S.N; BARCELLOS, M. & CARDOSO, M. Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecologia**, v. 61, n. 5, p. 1028-1034, 2009.

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

SHERROD, P.S.; AMAGUANA, R.M.; ANDREWS W.H.; JUNE, G.A.; HAMMACK, T.S. Relative effectiveness of selective plating agars for recovery of *Salmonella* species from selected high-moisture foods. **Journal of AOAC International**, v. 78, p. 67-90, 1995.

SI. Suinocultura Industrial. **Frigoríficos vão exportar carne para China.** 27/05/2011. Disponível em <http://www.suinoculturaindustrial.com.br>. Acessado em 04 de Jul de 2011a.

SI. Suinocultura Industrial. **Aftosa no MT.** 10/06/2011. Disponível em <http://www.suinoculturaindustrial.com.br>. Acessado em 04 de Jul de 2011b.

SI. Suinocultura Industrial. **Carne para África do Sul.** 30/06/2011. Disponível em <http://www.suinoculturaindustrial.com.br>. Acessado em 04 de Jul de 2011c.

SI. Suinocultura Industrial. **Apesar do embargo, exportações de carne suína para a Rússia sobem 64 %.** 04/05/2011. Disponível em <http://www.suinoculturaindustrial.com.br>. Acessado em 04 de Jul de 2011d.

SI. Suinocultura Industrial. **PNCRC 2010.** 01/03/2011. Disponível em <http://www.suinoculturaindustrial.com.br>. Acessado em 04 de Jul de 2011e

SI. Suinocultura Industrial. **Controle sanitário do Brasil apresenta avanços.** 04/03/2011. Disponível em <http://www.suinoculturaindustrial.com.br>. Acessado em 04 de Jul de 2011f.

SILVA, L.E.; GOTARDI, C.P.; VIZZOTTO, R.; KICH J.D. & CARDOSO, M. Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecológica**, v. 58, n. 4, p. 455-461, 2006.

SILVA, M.C.; FARIA, G.S.; PAULA, D.A.J.; MARTINS, R.P.; JUNIOR, J.G.A.; KICH, J.D.; COLODEL, E.M.; NAKAZATO, L. & DUTRA, V. Prevalência de *Salmonella sp.* em suínos abatidos no Estado de Mato Grosso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, 2008.

SILVEIRA, R. H. Capacidade Lítica dos Bacteriófagos CNPSA1, CNPSA3 e CNPSA4 sobre *Salmonella* Thyphimurium in vitro e em suínos experimentalmente infectados. Tese (Mestrado) – **Universidade Federal Fluminense**, Niterói, Rio de Janeiro, 2006.

SKLAR, I.B. & JOERGER, R.D. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. **Journal of Food Safety**, v. 31, p. 15-29, 2001.

SKURNIK, M. & STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and Fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 5-14, 2006.

SKURNIK, M.; PAJUNEN, M. & KILJUNEN, S. Biotechnological challenges of phage therapy. **Biotechnological Letter**, v.29, p.995-1003, 2007.

SMITH, H.W. & HUGGINS, M.B. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotic. **Journal Of General Microbiology**, v. 128, p. 307-318, 1982.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N.; MORAES, N.; CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, S.J.; MORENO, A.M. & ROEHE, P.M. Clínica e Patologia Suína, Goiânia, Artigo 3, **Impressos Especiais**, p. 402, 1999.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. **Doenças dos Suínos**, Goiânia, Cânone Editorial, p. 197-203, 2007.

SORENSE, L.L.; ALBAN, L.; NIELSEN, B. & DAHL, J. The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 131-141, 2004.

STRAUCH, E.; HAMMERL, J.A. & HERTWIG, S. Bacteriophages: new tools for safer food. **Journal of Verbrauch Lebensmittel**, v. 2, 138-143, 2007.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z. & MORRIS JR., J.G. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649-659, 2001.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 243-254, 2001.

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; PERESI, J.T.; FUZIHARA, T.O.; YONAMINE, E.K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v.65, p.1041- 1044, 2002.

TEIXEIRA, R.S. Detecção de *Salmonella* spp. em amostras de fezes, linfonodos e carcaças de suínos no momento do abate. Tese (Mestrado) **Universidade de São Paulo**, SP, 2006.

THRELFALL, E.J.; DAY M.; DE PINNA E.; CHARLETT A. & GOODYEAR K. L. Assessment of factors contributing to changes in the incidence of antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis and Typhimurium from humans in England and Wales in 2000, 2002 and 2004. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 389-395, 2006.

TINDALL, B.J.; GRIMONT, P.A.D.; GARRITY, G.M. & EUZEBY, J.P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Evolution of Microbiology**, v. 55, p. 521-524, 2005.

USDA – United States Department of Agriculture. **Livestock and poultry: World Market and Trade**. 2010.

VAN ALTROCK, A.; SCHUTTE, A. & HIDEBRANT, G. Results of the German investigation in the project “*Salmonella* in pork (salinpork)”- part 1: Investigations in the farm, **Berl Munch Tierarztl Wochenschr journal**, v. 113, p. 191-201, 2000.

VAN VELKINBURG, J.C. & GUNN, J.S. PhoP–PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. **Infection Immunity**, v.67, p. 1614–1622, 1999.

VANNUCCI, F.A. & GUEDES, R.M.C. Fisiopatologia das diarreias em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 2233-2242, 2009.

VOLF, J. Cytokine response of porcine cell lines to *Salmonella* enterica sorotipo Typhimurium and its *hilA* and *ssrA* mutants. **Zoonose Public Health**. v. 54, p. 286–293, 2007.

WALL, S.K.; ZHANG, J.; ROSTAGNO, M.H.; EBNER, P. Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight suine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 48-53, 2010.

WEISS, L.H.N; NONIG, R.B; CARDOSO, M. & COSTA, M. Ocorrência de *Salmonella* sp em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 104-108, 2002.

WELKER, C.A.D.; BOTH, J.M.C.; LONGARAY, S.M; HAAS, S.; SOEIRO, M.L.T.E.; RAMOS, R.C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WEGENER, H.C. & BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosis. **II International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, Copenhagen, p. 3-8, 1997.

XIE, H.; ZHUANG, X.; KONG, J.; MA, G.; ZHANG, H. Bacteriophage esc-a is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens. **The Journal Of General And Applied Microbiology**, v. 51, p. 159-163, 2005.

YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; ABELLAR RIDER, B.; PUNDERSON, J.W; FEDORKO, D.P.; FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 189-204, 2003.

ZHAO, S.; Mc DERMONT, P.F.; WHITE, D.G.; QAIYUMI, S.; FRIEDMAN, S.L.; ABBOTT, J.W.; GLENN, A.; AYERS, S.L.; POST, K.W; FALES, W.H.; WILSON, R.B.; REGGIARDO, C.; WALKER, R.D. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 122-132, 2007.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D. & BARCELLOS, E.S.N. Pathogenesis of diarrhea in pigs: models and examples. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, p. 81-86, 2008.

Prezado (a) Sr.(a);

Após o recebimento do resultado nº 523/10, favor acusar o recebimento através do e-mail:

vianesc@ioc.fiocruz.br.

as Enteroinfecções Bacterianas

Santos Mendonça
junto



Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Lab. de Análise Microbiológica de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica - DTA/UFV

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO - VIÇOSA / MG - CEP 36570-000

FONE: (31) 3899-3801

Data da emissão do laudo: 22 / 11 / 2010

Data de recebimento da cepa: 16 / 08 / 2010

Nº. Do Laudo : 523 / 10

Nº da Folha: 01 / 01

Nº. IOC	Nº. ORIGEM	FONTE	IDENTIFICAÇÃO
11673	LAMP 1	AN	<i>Citrobacter freundii</i>
11674	LAMP 2	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium <i>Enterobacter</i> sp.
11675	LAMP 3	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11676	LAMP 4	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium <i>Pseudomonas</i> sp.
11677	LAMP 5	AN	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5) *
11678	LAMP 6	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11679	LAMP 7	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11680	LAMP 8	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11681	LAMP 9	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11682	LAMP 10	AN	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Pseudomonas</i> sp.
11683	LAMP 11	AN	<i>Pseudomonas</i> sp.
11684	LAMP 12	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11685	LAMP 13	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11686	LAMP 14	AN	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli</i>
11687	LAMP 15	AN	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterobacter</i> sp.
11688	LAMP 16	AN	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterobacter</i> sp.
11689	LAMP 17	AN	<i>Citrobacter freundii</i>
11690	LAMP 18	AN	<i>Citrobacter freundii</i>
11691	LAMP 19	AN	<i>Citrobacter freundii</i>
11692	LAMP 20	AN	<i>Proteus mirabilis</i>
11693	LAMP 21	AN	<i>Proteus mirabilis</i>
11694	LAMP 22	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11695	LAMP 23	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11696	LAMP 24	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11697	LAMP 25	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11698	LAMP 26	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium
11699	LAMP 27	AN	<i>Salmonella</i> Typhimurium

Maiara dos Santos de Franco
Responsável Técnico

Norma Regina de Fátima
p/ Responsável pelo Laboratório
Laborat: 06.01.00010112
APP 6187470-F

Norma Regina de Fátima
Revisor

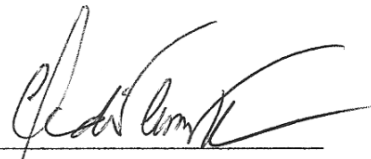
* Estrutura flagelar não detectável.

Viçosa, 9 de junho de 2011

Ilma. Sra.
Profa. Regina Célia Santos Mendonça
Coordenadora do Projeto
DTA / UFV

Sra. Coordenadora,

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa nº 21/2011 e intitulado "Biocontrole de Salmonella sp. em suínos mediante o uso de bacteriófagos", a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, baseado nas Normas para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV, no Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, nas Normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e na legislação vigente.



Prof. Cláudio C Fonseca

Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV

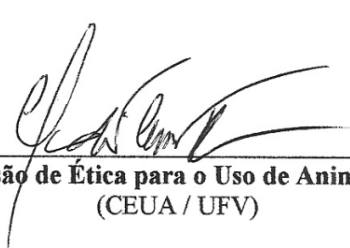
CERTIFICADO

A Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) / UFV certifica que o processo n.º 21 / 2011, intitulado “**Biocontrole de Salmonella sp. em suínos mediante o uso de bacteriófagos**” coordenado pela Profa. **Regina Célia Santos Mendonça** do Departamento de Tecnologia de Alimentos está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 09/06 /2011.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use / UFV certify that the process number 21 / 2011, named “**Biocontrol of Salmonella sp. in swine using bacteriophages**” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on June 9, 2011 approved this process.

Viçosa, 9 de junho de 2011



Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV
(CEUA / UFV)