

ANA CAROLINA VALENTE REZENDE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS PARA
BIOCONTROLE DE *Salmonella enterica***

Dissertação apresentada à
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
2010

ANA CAROLINA VALENTE REZENDE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS PARA
BIOCONTROLE DE *Salmonella enterica***

Dissertação apresentada à
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: 11 de fevereiro de 2010.

Prof.^a Maria Cristina Dantas Vanetti
(Co-orientadora)

Prof. Nélio José de Andrade
(Co-orientador)

Prof.^a Aurélia Dornelas de Oliveira Martins

Prof. Wilmer Edgard Luera Peña

Prof.^a Regina Célia Santos Mendonça
(Orientadora)

*"Quanto mais me elevo, menor fico aos
olhos de quem não sabe voar".*

(Nietzsche)

*À minha mãe,
pelo amor, incentivo e apoio
em todas as fases da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, proteção, paciência e por iluminar meu caminho colocando sempre ao meu lado pessoas especiais que me fazem crescer a cada dia, pessoal e profissionalmente e que me deram força pra chegar até aqui.

À minha orientadora, Prof.^a Regina Célia Santos Mendonça pela confiança, respeito, amizade, oportunidade, compreensão com relação aos meus horários corridos, orientação e pelos preciosos ensinamentos passados a mim ao longo do curso.

À minha co-orientadora, Prof.^a Maria Cristina Dantas Vanetti pelo incentivo, amizade, sugestões, ensinamentos, orientação e pela força.

Ao meu co-orientador, Prof. Nélcio José de Andrade pelas sugestões.

À minha mãe que é meu porto seguro e meu exemplo de vida.

À meus avós, Antônio e Margarida, pelo amor, carinho e orações sempre realizadas por mim.

A minhas tias Cida, Zilda, Cacalmo, Quininha, Leninha e Alessandra; e à meus tios Toninho, Romeu, Renato, Francisco e Carlos pelo carinho, apoio e amor.

À meus primos e primas que, para mim, são irmãos André, Aline, Pedro Victor, Tiago, Vítor, Beatriz e à caçulinha Júlia pela amizade, amor e companheirismo.

À Rita, uma mistura de tia, amiga, mãe, que sempre me deu força e me mostrou vários caminhos ao longo da minha caminhada.

Às minhas amigas-irmãs, Cristiane, Núbia, Lucilene, Cynthia (baianinha!!) e Larissa Oliveira, que são as melhores amigas do mundo, sempre estão a meu lado, cada uma com seu jeitinho, me dando força, carinho, me mostrando o melhor caminho. Sem vocês eu nunca teria chegado até aqui!!!

Às minhas grandes amigas Maria Fernanda (Nanda), Thatá, Fabi Sarracini, Thais Calatroni, que estiveram sempre comigo, torcendo por mim.

Ao Dori, meu namorado, amigo, companheiro, que foi essencial para que eu pudesse concluir este trabalho. Obrigada pelo carinho, amor, pelas

inúmeras ajudas ao longo da pesquisa e por sempre estar mostrando o melhor pra mim. Teria sido muito difícil chegar aqui sem você!!

À todos os meus “velhos” e “novos” amigos que fiz ao longo da vida (muitas pessoas que lembro com muito carinho), ao longo da graduação e do mestrado, que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu pudesse realizar e concluir este trabalho.

À Micaela, estagiária e amiga, que me ajudou em grande parte do trabalho, de dia, de noite e de madrugada!!

À Carol e Débora pela ajuda na execução do experimento e pelos momentos agradáveis no laboratório.

À Patrícia e Élidea, grandes amigas, companheiras de laboratório. Obrigada pelas várias ajudas, conversas e risadas!!

À Mayra, amiga especial que fiz durante o mestrado, companheira de estudos e conversas.

Ao Humberto e Janaína que me ajudaram muito quando eu achei que nada daria certo!!

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia de Alimentos Biologia Molecular (Nádia, Cristiane, Arthur, Luiz Augusto, Daniela, Márcia e Andreza), pelos momentos passados juntos no decorrer deste trabalho.

À todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, que sempre tiveram muita presteza e atenção com os estudantes.

Aos amigos do Colégio Anglo (Sandra, Ernesto, Aninha, Sônia, Héliida, Lúcia Duque, Adil, Fais, Kézia, Girlaine, demais professores e funcionários) que muito me incentivaram e sempre entenderam a minha correria de um lado para o outro.

À Fundação Oswaldo Cruz pela doação das culturas de micro-organismos utilizadas neste experimento.

Ao Núcleo de Microscopia da Universidade Federal de Viçosa, especialmente à Karla, pela ajuda na visualização microscópica dos bacteriófagos.

À todos, que estiveram ao meu lado, mesmo que em pensamento,

meu sincero MUITO OBRIGADA!!!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Panorama Avícola Brasileiro e Mundial	2
2.2. <i>Salmonella</i> spp.	4
2.2.1. Salmonelose em frangos	5
2.2.2. Salmonelose em humanos	7
2.3. Bacteriófagos.....	10
2.3.1. Fagoterapia.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Amostragem	16
3.2. Isolamento de bacteriófagos de <i>Salmonella</i> spp.	16
3.3. Purificação de bacteriófagos e produção de estoque	17
3.3.1. Determinação da concentração de bacteriófagos na solução estoque....	18
3.4. Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.	19
3.5. Identificação sorológica de amostras positivas de <i>Salmonella</i> spp.	19
3.6. Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados.....	20
3.7. Exame da morfologia do bacteriófago de <i>Salmonella</i> spp.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Isolamento, purificação e propagação de bacteriófagos de <i>Salmonella</i> spp.....	22
4.2. Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.	26
4.3. Especificidade dos bacteriófagos isolados	28
4.4. Morfologia dos bacteriófagos de <i>Salmonella</i> spp.....	41
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Placas de lise típicas em culturas de *Salmonella* Enteritidis usando diferentes bacteriófagos isolados..... 25
- Figura 2a. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de bacteriófagos de *Salmonella* Enteritidis corados negativamente com acetato de uranila..... 43
- Figura 2b. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de bacteriófagos de *Salmonella* Typhimurium corados negativamente com acetato de uranila.. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura do gênero <i>Salmonella</i>	5
Tabela 2. Isolamento de bacteriófagos com ação lítica sobre <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>Salmonella</i> Enteritidis e avaliação da presença de <i>Salmonella</i> spp.....	24
Tabela 3. Número de PFU/mL nas soluções estoque dos bacteriófagos de <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST) e <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) após purificação e propagação.....	26
Tabela 4. Relação entre as amostras de fezes coletadas e os isolados de <i>Salmonella</i> spp. confirmados por provas bioquímicas e sorológicas.....	27
Tabela 5. Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro <i>Salmonella</i> Typhimurium em relação a patógenos de interesse em alimentos.....	30
Tabela 6. Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro <i>Salmonella</i> Enteritidis em relação a patógenos de interesse em alimentos.....	31
Tabela 7. Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro <i>Salmonella</i> Typhimurium em relação aos isolados de <i>Salmonella</i> spp. de fezes de aves.....	33
Tabela 8. Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro <i>Salmonella</i> Enteritidis em relação aos isolados de <i>Salmonella</i> spp. de fezes de aves.....	37
Tabela 9. Agrupamento dos bacteriófagos isolados quando <i>Salmonella</i> Typhimurium foi utilizada como hospedeiro de acordo com o perfil de ação lítica sobre diferentes patógenos.....	41
Tabela 10. Agrupamento dos bacteriófagos isolados quando <i>Salmonella</i> Enteritidis foi utilizada como hospedeiro de acordo com o perfil de ação lítica sobre diferentes patógenos.....	41

RESUMO

REZENDE, Ana Carolina Valente. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Isolamento e caracterização de bacteriófagos para biocontrole de *Salmonella enterica*** Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Coorientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Nélcio José de Andrade.

O uso de bacteriófagos como metodologia alternativa aos antibióticos para eliminação de *Salmonella* spp. em aves tem sido muito pesquisado nos dias atuais, uma vez que esse micro-organismo é um grande problema em saúde pública. O presente trabalho teve o objetivo de isolar *Salmonella* spp. e bacteriófagos específicos para *Salmonella enterica* a partir de fezes de frangos de granja e de galinhas caipira da microrregião de Viçosa/MG, avaliar a atividade lítica desses bacteriófagos com diferentes sorovares de *Salmonella* e outros patógenos de origem alimentar e caracterizá-los morfológicamente por microscopia eletrônica de transmissão. De um total de 45 amostras de fezes foram isolados 29 bacteriófagos líticos de *Salmonella* Typhimurium e 24 de *Salmonella* Enteritidis. Em 73,3 % das amostras isolou-se o bacteriófago de *Salmonella enterica* e, no entanto, em apenas 9,1 % das amostras o hospedeiro estava presente. O título da suspensão dos bacteriófagos isolados, após a propagação e purificação variou de 10^6 a 10^{11} unidades formadoras de placa por mililitro. Os bacteriófagos selecionados apresentaram atividade lítica sobre vários sorovares do gênero *Salmonella* e também sobre outros gêneros da família Enterobacteriaceae. Com relação à morfologia, os bacteriófagos apresentaram cabeça icosaédrica com cauda longa ou curta, o que sugere que provavelmente pertencem à ordem *Caudovirales*.

ABSTRACT

REZENDE, Ana Carolina Valente. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Isolation and characterization of bacteriophages for biocontrol of *Salmonella enterica***. Adviser: Regina Célia Santos Mendonça. Advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti and Nélio José de Andrade.

The use of bacteriophages as a method alternative to antibiotics to eliminate *Salmonella* spp. in poultry, has been studied in the present day, since this micro-organism is a major public health problem. This study aimed to isolate *Salmonella* spp. and bacteriophages specific to *Salmonella enterica* from faeces of poultry in the microregion of Viçosa / MG, evaluate the lytic activity of bacteriophages with different serovars of *Salmonella* and other foodborne pathogens and to characterize them morphologically by electron microscopy transmission. Of a total of 45 faecal samples were isolated 29 bacteriophages for use against *Salmonella* Typhimurium and 24 phages for use *Salmonella* Enteritidis. In 73.3% of the samples was isolated bacteriophage of *Salmonella enteric*, but only 9.1% of samples the host was present. The titre of the suspension of bacteriophages isolated, after propagation and purification ranged from 10^6 to 10^{11} PFU / mL. The selected phages were not just selective to *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Enteritidis and showed activity against various *Salmonella* serovars as well as other genera of the family Enterobacteriaceae. With respect to morphology, bacteriophages had icosahedral heads with long or short tail, which suggests that probably belong to the order Caudovirales.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a indústria de alimentos tem passado por numerosas transformações tecnológicas. Paradoxalmente, a despeito das transformações e inovações tecnológicas alcançadas por essas indústrias, os problemas higiênico-sanitários ao longo da cadeia produtiva ainda são grandes e o número de surtos de salmonelose causados pelo consumo de alimentos contaminados por *Salmonella* spp. continua sendo uma preocupação para as autoridades de saúde pública e para esse setor produtivo.

A obtenção de alimentos seguros é uma exigência do mercado atual, principalmente pelo reconhecimento do significativo impacto da salmonelose na saúde humana e nos custos econômicos gerados por ela.

Diante da seleção de bactérias resistentes aos antibióticos, nas últimas décadas vem aumentando o interesse nas pesquisas que envolvem o uso de bacteriófagos na eliminação de micro-organismos patogênicos, como *Salmonella* spp. na cadeia produtiva de alimentos. Assim, o uso de bacteriófagos em granjas tende a reduzir a contaminação por *Salmonella* spp. em carne de aves, diminuindo a contaminação cruzada durante o processamento, exercendo um efeito benéfico na redução de enfermidades causadas por esse patógeno.

O objetivo do presente trabalho foi isolar bacteriófagos específicos para *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, avaliar o perfil lítico, a morfologia e a especificidade desses fagos contra salmonelas isoladas de fezes de aves e contra patógenos de origem alimentar, além de verificar a presença de *Salmonella* spp. no material fecal analisado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Panorama Avícola Brasileiro e Mundial

O sistema produtivo de carne moveu-se rapidamente, nos últimos anos, para uma estrutura consolidada, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, motivado pela economia de escala. Este conceito de organização tende, a longo prazo, ser cada vez mais bem monitorado, de maneira a ter-se um controle da grande maioria das operações envolvidas na produção, visto que o consumidor exige, cada vez mais, produtos mais seguros.

Em 2008 o USDA (2008) estimava um aumento do consumo médio mundial per capita de carne de frango de 5,7 % em relação a 2007; o país com maior consumo seriam os EUA, com 42,6 kg per capita em 2008, seguido pelo Brasil, com 39,4 kg. Na outra ponta estariam os dois países com a maior população do mundo, China (9,1 kg) e Índia (2,2 kg), ambos com um nível de consumo per capita que sugeria um potencial de expansão para a comercialização de carne de frango.

Segundo a ABEF (2009) as exportações de carne de frango no Brasil, de janeiro a junho de 2008, somaram 1,8 milhões de toneladas. Neste período a receita cambial acumulou quase US\$ 3,3 bilhões, o que correspondeu um crescimento de 19 % no volume e 57 % no valor em relação ao mesmo período de 2007.

No entanto, no Brasil, o setor produtivo de frango foi também afetado pela crise financeira mundial em 2009, comprovado pela queda da produção no início do ano de 2009 que culminou com o aumento dos preços. De acordo com dados da Secretaria de Comércio Exterior (Secex), até o mês de novembro/2009 foram embarcadas para o exterior, 2,98 milhões de toneladas do produto, 1,7 % menos que entre janeiro e novembro de 2008. Esta redução deveu-se quase que, exclusivamente, à crise mundial, que dificultou o acesso a crédito de alguns dos principais clientes, dificultando as compras (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2009).

Para que o Brasil mantenha sua participação no mercado externo de proteína animal, é necessário que sustente uma política séria de

rastreabilidade e de segurança alimentar. A questão está diretamente ligada com a demanda de segurança dos alimentos, o que vem preocupando principalmente os consumidores dos países importadores, cujo ideal é consumir um produto que esteja dentro dos mesmos padrões daqueles produzidos em seus países. Complementando este panorama, o Brasil possui um grande mercado consumidor interno, composto por aproximadamente, 180 milhões de habitantes e que representa um elevado consumo per capita.

A legislação internacional, em matéria de segurança dos alimentos, desenvolveu-se graças a atuação de certas organizações internacionais, como: o *Codex Alimentarius* e o Gabinete Internacional das Epizootias (OIE) no escopo do acordo da OMC sobre Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (Acordo SPS), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO). A globalização incorporou as restrições sanitárias impostas pela Comunidade Européia aos países exportadores de produtos de origem animal, notadamente de aves. A ocorrência de casos de infecção alimentar, ligadas a *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium impõe destaque à importância sanitária, sob o ponto de vista social e econômico da avicultura brasileira (SILVA, 1999).

Com a criação da Organização Mundial do Comércio (OMC), as normas guias e o uso das normas do *Codex Alimentarius* foram referendados para as atividades de comércio internacional e para o cumprimento dos acordos MSPS – Medidas Sanitárias e Fitossanitárias e TBT – Barreiras Técnicas ao Comércio. Por estes acordos, os países membros da 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”). Este sistema é uma abordagem científica e sistemática para o controle do processo de produção, elaborado para prevenir ocorrência de problemas, assegurando que os controles sejam aplicados em determinadas etapas no sistema de produção de alimentos, onde possam ocorrer perigos ou situações de risco à saúde humana (BRASIL, 1998).

O sistema APPCC, hoje adotado pelos principais mercados internacionais, basicamente assegura que os produtos alimentícios sejam elaborados sem risco à saúde pública, apresentem padrões uniformes de identidade e qualidade e atendam às legislações nacionais e internacionais, no que tange aos aspectos sanitários e de integridade econômica (BRASIL, 1998).

Apesar do grande avanço da produção avícola no mundo, a área de sanidade ainda possui grandes desafios a serem superados, tanto com relação à saúde das aves como na área de saúde pública. O Brasil tem se tornado líder na exportação de carne de frango devido ao empenho da indústria avícola nacional. Entretanto, há um aumento na imposição de barreiras sanitárias à importação de produtos avícolas brasileiros, uma vez que os países importadores de carne de frango do Brasil exigem uma qualidade microbiológica muito superior, principalmente com relação à presença de salmonelas. Ressalta-se que dentre as enfermidades aviárias, as salmoneloses têm recebido atenção especial por trazerem efeitos deletérios à saúde das aves e por ser uma importante causa de infecção alimentar no homem. (NASCIMENTO et al, 1996).

2.2. *Salmonella* spp.

Salmonella é um gênero da família Enterobacteriaceae, definido como bastonetes gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, lactose, urease e oxidase negativos. A maioria dos sorovares de *Salmonella* é móvel devido à presença de flagelos peritríquios. O pH de crescimento varia entre 4 e 9, tendo um ótimo de 7. A temperatura ótima de crescimento está entre 35 e 37 °C, e a atividade de água mínima para crescimento é de 0,94 (CAMPOS, 2002; JAY, 2005).

A classificação taxonômica proposta por Popoff e Le Minor (1997) consiste em: gênero, espécie, subespécie e sorovares. Conforme mostrado na Tabela 1, o gênero *Salmonella*, é classificado atualmente em três espécies: *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* e *Salmonella subterranea*, que foi reconhecida em 2005 (SHELOBOLINA et al, 2004; TINDALL et al, 2005; SU e CHIU, 2007). A espécie *S. enterica* é dividida em

várias subespécies e sorovares tal como, por exemplo, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (EUZÉBY, 1999).

Tabela 1: Nomenclatura do gênero *Salmonella*.

ESPÉCIES	SUBESPÉCIES	NÚMERO DE SOROVARES
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i> (ou I)	1504
	<i>salamae</i> (ou II)	502
	<i>diarizonae</i> (ou IIIb)	333
	<i>arizonae</i> (ou IIIa)	95
	<i>houtenae</i> (ou IV)	72
	<i>indica</i> (ou VI)	13
<i>S. bongori</i>	(V)	22
<i>S. subterranae</i>		
TOTAL		2541

Fonte: Adaptado de SU e CHIU, (2007).

Segundo Jay (2005), todos os integrantes do gênero *Salmonella* são considerados patogênicos para humanos, sendo considerado um dos mais importantes gêneros envolvidos em doenças causadas pelo consumo de alimentos. É uma bactéria de grande importância em saúde pública, pois além de ser patogênica ao ser humano representa um dos principais parâmetros de determinação dos padrões microbiológicos, de reconhecimento mundial, para alimentos.

Pelo fato de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. apresentarem, aproximadamente, 90 % de homologia do DNA-DNA, já houveram propostas de agrupamento destas duas espécies em um único gênero acreditando-se que ambas as bactérias surgiram de um mesmo ancestral (YAN et al, 2003).

2.2.1. Salmonelose em frangos

Nas granjas, *Salmonella* spp. é introduzida através de rações contaminadas por matérias primas de origem animal, como farinha de carne, ossos, peixe, penas e vísceras. Pode também ser introduzido pela água, pelo contato com aves ou outros animais portadores como insetos e roedores, além do contato com pessoas e equipamentos contaminados (HOFER, SILVA e REIS, 1998).

A ocorrência e a quantidade de salmonelas presente na carne varia de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças (CARVALHO e CORTEZ, 2005).

Durante o abate e processamento dos frangos, a presença de *Salmonella* spp. no intestino, pele, e penas das aves, resulta na contaminação da carne e seus subprodutos (BRYAN e DOYLE, 1995). A contaminação cruzada pode ocorrer principalmente em mercados e cozinhas industriais e a refrigeração imprópria do produto leva a bactéria a multiplicar-se rapidamente (DUGUID e NORTH, 1991).

Levantamentos feitos em diferentes países têm demonstrado que 30 a 50 % das carcaças de frangos congeladas ou refrigeradas estão contaminadas por *Salmonella*. No Brasil, há relatos de contaminação por *Salmonella* em frangos e seus derivados variando de 9,15 a 86,7 % (CARVALHO e CORTEZ, 2005).

As infecções causadas por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são denominadas de infecções paratifóides. São doenças agudas ou crônicas das aves e de mamíferos incluindo o homem (GELLI, 1995). Afeta principalmente aves jovens com até duas semanas de idade, tornando-se em geral, portadoras intestinais assintomáticas, por longo período (SILVA e BOSQUIROLI, 1994). Estes agentes são patogênicos para todas as espécies de mamíferos domésticos e selvagens, que infectados cronicamente, tornam-se portadores assintomáticos o que mantém a contaminação ambiental. Os roedores também são portadores de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, além de insetos, ácaros, lagartos, os quais são veículos de contaminação entre os galpões, perpetuando a infecção (SOLARI, 2000).

As infecções paratifóides das aves são resultantes da contaminação oral e da entrada da bactéria através da casca do ovo. A superfície externa da casca do ovo pode contaminar-se antes e durante a postura e a penetração da bactéria através da casca, é favorecida pela umidade, temperatura, tempo de exposição e qualidade da casca (PADRON, 1990).

As medidas de higiene e o alojamento de aves livre de contaminação por *Salmonella* spp. são imprescindíveis para que qualquer programa de erradicação desse micro-organismo seja bem sucedido. No entanto, um sistema produtivo de frangos, uma vez contaminado com essa bactéria, demandará outras ações complementares para o sucesso de um programa de controle e erradicação.

2.2.2. Salmonelose em humanos

A incidência global de doenças causadas por alimentos é de difícil estimativa. No entanto, no ano de 2000, cerca de 2,1 milhões de pessoas morreram por doenças diarreicas, e em uma alta proporção desses casos a causa é atribuída a alimentos e água contaminados (WHO, 2002).

A vigilância de doenças de origem alimentar é complicada devido a vários fatores. O fator importante é a não notificação de casos, pois o serviço médico muitas vezes não é procurado, embora a doença possa ser severa ou até mesmo serem reportados freqüentemente casos fatais. Todavia são mais comuns os casos com sintomatologia moderada. Outro fator de destaque é que muitos patógenos são transmitidos não só por meio dos alimentos, mas também através da água ou de pessoa para pessoa, e essa variedade de formas de transmissão dificulta o diagnóstico (MEAD et al, 1999).

A prevalência de salmoneloses aumentou durante as décadas de 80 e 90, em todo mundo (KWANG, LITTLEDIKE e KEEN, 1996), e atualmente as salmoneloses ocupam uma das posições mais destacadas no campo da saúde pública em todo o mundo, pois apesar de todo o desenvolvimento tecnológico e da adoção de melhores medidas de higiene, é crescente e relevante o número de casos de salmonelose humana e animal (PENHA et al, 2008).

O perfil epidemiológico de enfermidades causadas pela ingestão de alimentos no Brasil é pouco conhecido, somente alguns estados dispõem de Programas de Vigilância, estatísticas e levantamento de dados epidemiológicos sobre estes surtos (AMSON, HARACEMIV e MASSON, 2006). De acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS do

Ministério da Saúde (MS), *Salmonella* spp. foi responsável por 23,8 % dos 4.716 surtos investigados no Brasil, no período de 1999 a 2005 (GERMANO e GERMANO, 2008). Além disso, foi divulgado no *Global Salmonella Surveillance* no Rio de Janeiro em setembro de 2005 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que entre os sorovares identificados no Brasil, no período de 2001 a agosto de 2005, havia o predomínio de *Salmonella* Enteritidis (TOZETTO, 2006). A maioria dos sorovares tem um espectro de hospedeiros amplo e, tipicamente, provocam gastroenterites sem complicações e sem necessidade de tratamento. Em crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico debilitado ou comprometido, ao contrário, essas infecções podem ser severas. Os sorovares mais importantes dessas salmoneloses em animais e humanos são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (SILVA et al, 2007).

Entre 2003 e 2008, foram registrados 749 surtos de infecção por *Salmonella* no Brasil. Desse total, 277 foram causados especificamente pelo consumo de ovos ou maionese caseira contaminados, principais meios de veiculação da bactéria. Até o presente momento não foi relatado nenhum surto de infecção por *Salmonella* de grande magnitude, como os surtos multi-estaduais, relatados na literatura, mas mesmo assim, é preciso não descuidar do controle da enfermidade. No Brasil, os estados onde mais se detectam surtos por *Salmonella* são Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo (LIMA, 2008).

De acordo com estudos conduzidos por Leon-Velarde et al (2004), *S. enterica* sorovar Typhimurium era uma causa comum de salmoneloses entre humanos e animais em muitos países sendo responsável por 40 a 70 % dos casos de salmoneloses humanas, apresentando como principais sintomas a diarreia, febre, dor de cabeça, náuseas, dor abdominal, vômito e, menos frequentemente, sangue nas fezes.

Porém, em vários países, houve aumento de infecção por *Salmonella* Enteritidis, que responde pelo aumento de casos esporádicos e de surtos de salmonelose humana devido ao consumo de carne de aves, ovos e derivados contaminados (ALCOCER et al, 2006). O aumento de incidentes nacionais e internacionais envolvendo alimentos contaminados é devido à

emergência de *Salmonella* Enteritidis como agente causal de infecções alimentares e à rápida globalização da produção de alimentos (ZHAO et al., 2006).

A contaminação de carne crua de frango com *Salmonella* spp. não é usualmente considerada um risco ao consumidor, uma vez que este alimento é próprio para o consumo após cocção. O verdadeiro problema reside no contato de um alimento pronto para o consumo (cozido) com um alimento cru, levando à contaminação cruzada (CAPITA et al, 2003). Os casos mais frequentes de infecção por *Salmonella* spp. reportados em humanos foram em decorrência do manuseio de carne de frango crua e produtos crus, junto com o consumo de carne de frango mal cozida (PANISELLO et al, 2000).

Salmonella tem capacidade de se ligar a sítios específicos na superfície das células epiteliais ou, ainda, são capazes de entrar na célula epitelial, e viver como parasita intracelular. A entrada e a passagem dessa bactéria para as células epiteliais provocam um processo inflamatório do intestino; há evidências de que uma enterotoxina (substância tóxica para o trato intestinal) seja produzida, causando vômitos e diarreia (LIMA, 2008).

O tratamento da infecção por salmonela é feito com hidratação por meio de soro oral. Em alguns casos, também são utilizados antibióticos específicos. Há necessidade de tratamento quando o doente tem desidratação severa ou quando a infecção é extra-intestinal. Pessoas com diarreia grave precisam de reidratação, às vezes intravenosa. De modo geral as salmoneloses não devem ser tratadas com antibióticos. Em alguns casos, a antibioticoterapia agrava o quadro clínico e pode prolongar o estado de portador (FRANCO E LANDGRAF, 2004). É importante destacar que algumas salmonelas já são resistentes a diversos antibióticos, principalmente porque essas drogas podem ser adicionadas às rações para animais (LIMA, 2008).

O aparecimento de sorovares de *Salmonella* spp. resistentes a uma grande variedade de antibióticos tem se tornado um problema para a saúde pública (CARRAMIÑANA et al, 2004). São conhecidas mais de 15 classes de antimicrobianos que diferem entre si pela estrutura química e pelo mecanismo de ação e, portanto, antibióticos específicos são necessários

para o tratamento de patógenos específicos (WHO, 2002). O uso de antibióticos como promotores de crescimento em frangos de corte e poedeiras de até 16 semanas de idade é usual nos Estados Unidos e no Brasil (NUNES, 1999). A partir do ano de 2006, a União Européia impediu o uso de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento animal. Estas medidas foram adotadas com o intuito de contribuir para a redução do surgimento de cepas bacterianas resistentes (KOTTWITZ, 2009).

2.3. Bacteriófagos

Vírus são partículas infecciosas de, aproximadamente, 20 a 200 nm constituídos de um ácido nucléico (DNA ou RNA) envolvido por uma capa protéica (capsídeo) e em alguns casos um envelope lipídico. Bacteriófagos (fagos) são vírus que infectam e lisam células bacterianas. Os bacteriófagos são parasitas intracelulares obrigatórios, que não possuem metabolismo próprio e requerem a maquinaria metabólica da célula hospedeira para que possam se reproduzir (GOODRIDGE e ABEDON, 2003; WITHEY et al, 2005; HAGENS e OFFERHAUS, 2008).

Os bacteriófagos são as partículas mais abundantes do meio ambiente, e seu número total é estimado em 10^{30} a 10^{32} (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005) por serem mais resistentes que as bactérias hospedeiras a mudanças ambientais e podem persistir na ausência de seu hospedeiro (DURAN et al, 2002). Podem ser altamente específicos quanto ao seu hospedeiro, ou seja, cada bacteriófago pode ser específico para uma determinada bactéria e ser incapaz de infectar outra (HAGENS e OFFERHAUS, 2008; WAGENAAR et al, 2005) ou podem apresentar uma grande variedade de hospedeiros (SKURNIK e STRAUCH, 2006).

Os bacteriófagos são facilmente isolados do solo, água, esgoto e também de ambientes colonizados por bactérias (MARKS e SHARP, 2000) e até onde se sabe, são inofensivos para humanos, animais e plantas. Rotineiramente, o homem está exposto à diferentes bacteriófagos, presentes em quantidades muitas vezes elevadas, nos alimentos, água e no meio ambiente, sem contudo apresentar efeitos adversos. Em certos produtos alimentares, 100 milhões de bacteriófagos.g⁻¹ podem ser encontrados; em

ecossistemas aquáticos, pode existir até 1 bilhão de bacteriófagos.mL⁻¹. Bacteriófagos contribuem com o equilíbrio das populações bacterianas na natureza, mantendo o número de bactérias sob controle. Além disso, não alteram as características sensoriais como a textura, estrutura, cor e cheiro de produtos alimentares (HAGENS e OFFERHAUS, 2008).

A penetração do bacteriófago na célula hospedeira ocorre por difusão passiva. A adsorção e a entrada são mediadas por receptores específicos como carboidratos, proteínas e lipopolissacarídeos na superfície da célula hospedeira. Praticamente, todas as estruturas bacterianas expostas na parede podem ser utilizadas pelos bacteriófagos como receptores, tanto em bactérias gram-positivas como gram-negativas, bem como estruturas acessórias em alguns casos (pili, flagelo e cápsula) (GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCCHI, 2006; SKURNIK e STRAUCH, 2006). O bacteriófago injeta seu material genético dentro da célula hospedeira, e utiliza a maquinaria metabólica do hospedeiro para replicar seu material genético e sintetizar novos capsídeos protéicos e desta forma produzir novas partículas virais. O número de bacteriófagos produzidos durante um ciclo de infecção pode variar de 20 a 100, dentro de 30 a 40 minutos (THIEL, 2004) ou de 50 a 200 novas partículas viáveis (MARKS e SHARP, 2000).

Os bacteriófagos são divididos em dois grupos: virulentos e temperados. Os virulentos induzem a infecção lítica, resultando na lise da célula hospedeira e produção de zonas claras em meios sólidos (placas de lise) nos locais onde as bactérias susceptíveis estão presentes. Bacteriófagos temperados integram seu DNA no genoma da célula hospedeira formando um profago dormente, resultando em uma infecção lisogênica e, no momento que a célula hospedeira se divide, o genoma do bacteriófago vai sendo transmitido para as células filhas (MARKS e SHARP, 2000). Agentes que afetam o DNA, como luz ultravioleta e agentes químicos podem desencadear alterações fisiológicas que culminam com a indução do profago, que passa para o ciclo lítico, replicando-se e lisando o hospedeiro (CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCCHI, 2006; SKURNIK e STRAUCH, 2006).

Existe ainda, um ciclo controverso conhecido como pseudolisogênico que apesar de pouco conhecido, acredita-se que seja o mais difundido na natureza. Neste ciclo o material genético viral não é inserido no genoma do hospedeiro, como no ciclo lisogênico, e não há lise da maior parte da população infectada, como ocorre no ciclo lítico. No entanto, uma parte da população infectada sofre lise liberando novas partículas virais. Existem várias explicações para a existência deste estado, como incapacidade de infecção devido à destruição enzimática, ou pela falta de receptores, ou ainda por alguma imunidade promovida por bacteriófago lisogênico que muta freqüentemente para ciclo lítico (WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCHI, 2006).

A célula hospedeira pode desenvolver alguns mecanismos de resistência aos bacteriófagos por perdas ou mudanças nas moléculas receptoras na superfície de sua célula (MARKS e SHARP, 2000).

2.3.1. Fagoterapia

Fagoterapia (ou bacteriofagoterapia) é o uso de vírus que infectam e lisam bactérias para tratar infecções bacterianas (HIGGINS et al, 2005). Logo após a descoberta dos bacteriófagos, na segunda década do século passado, teve-se um grande interesse no uso desses organismos para combater infecções bacterianas (SCHOOLNIK, SUMMERS e WATSON, 2004; GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCHI, 2006). Entretanto, devido ao desenvolvimento da penicilina e outros antibióticos por volta de 1940, os trabalhos na área de fagoterapia diminuíram (MARKS e SHARP, 2000; GREGORACCI, SILVEIRA e BROCCHI, 2006). No entanto, na Europa oriental, os trabalhos nessa área de pesquisa continuaram e um grande número de estratégias foram desenvolvidas para combater diferentes tipos de bactéria, incluindo estafilococos, pseudomonas, *Proteus* spp. e bactérias entéricas patogênicas (CHANISHVILI et al, 2001). Estudos sobre fagoterapia tiveram um aumento no final da década de 80, em função do aumento da resistência bacteriana aos antibióticos. Os trabalhos mais recentes têm focado em animais como modelos para infecção humana ou para aplicações veterinárias (BISWAS et al, 2002; HUFF et al, 2002; SCHUCH, NELSON e

FISCHETTI, 2002; ATTERBURY et al, 2003; GOODE, ALLEN e BARROW, 2003; ATTERBURY et al, 2005; TORO et al, 2005; ATTERBURY et al, 2007;).

A fagoterapia oferece uma série de vantagens sobre a terapia com antibióticos, pois não atua na seleção de micro-organismos resistentes e pode ser usada como uma terapia alternativa para pacientes com alergia a antibióticos (MARKS e SHARP, 2000). Os bacteriófagos têm sido avaliados para o controle de contaminação bacteriana na indústria de alimentos, no controle de patógenos transmitidos por água contaminada, como o *Vibrio cholerae* e no controle de patógenos transmitidos no ambiente hospitalar (MARKS e SHARP, 2000).

Mcnerney e Traore (2005) estimaram que 10^{25} bacteriófagos iniciem um novo ciclo de infecção a cada segundo do dia. Enquanto as bactérias estão limitadas pela divisão célula a célula, um único bacteriófago usa uma célula hospedeira para fazer cópias de si mesmo em um período curto de tempo, e consegue lançar centenas de gerações viáveis no ambiente externo à célula hospedeira que saem imediatamente à busca de novos hospedeiros.

Lorch (1999) comparou o uso de bacteriófagos e antibióticos químicos no tratamento de infecções, enumerando diversas vantagens da fagoterapia. Uma única bactéria, com um tempo de divisão de 30 minutos, para conseguir 10^5 células levaria oito horas, enquanto um bacteriófago, em duas horas, pode replicar e produzir 10^8 novas partículas virais. Na fagoterapia não é o crescimento bacteriano que é esperado, e sim a replicação do bacteriófago. Os bacteriófagos sendo auto-replicantes e auto-limitantes têm impacto no habitat limitado pela disponibilidade de bactérias hospedeiras (GOODRIDGE e ABEDON, 2003; THIEL, 2004).

As interações de bacteriófagos com hospedeiros não são importantes somente para a manutenção do equilíbrio ecológico, mas também por constituírem o maior componente da rede de transferência lateral de genes entre os micro-organismos. Como os bacteriófagos são os responsáveis pela homeostase bacteriana, eles podem ser utilizados no controle de patógenos de origem alimentar (CARRILLO et al, 2005). Em particular, a criação de

frangos de corte é o alvo principal de uma intervenção com bacteriófagos, dado a escala de colonização das aves e os números relativamente grandes de incidência de patógenos no trato gastrointestinal e nas secreções das aves colonizadas (ATTERBURY et al, 2003).

Bacteriófagos virulentos causam lise da bactéria hospedeira, atuando não apenas como controle da população bacteriana, mas também como indicador de contaminação bacteriana (MILLER, SCHULER e SECKLER, 1998a; TANJI et al, 2003) bem como ferramenta para identificação (fagotipagem) de cepas bacterianas específicas (SINTON, FINLAY e HANNAH, 1998; BRENNER, BRENNER e SCHWARTZ, 1999; LECLERC et al, 2000).

Estudos mostram que bacteriófagos líticos são agentes potenciais de controle de micro-organismos patogênicos para humanos, animais e plantas (ALISKY et al, 1998; KUDVA et al, 1999; BORAH, JINDAL e VERMA, 2000; LEVERENTZ et al, 2001; LORCH, 1999; SCHUCH, NELSON e FISCHETTI, 2002). Dessa forma, estes bacteriófagos podem ser utilizados no controle biológico em alimentos (GREER, 2005; HUDSON et al, 2005) como no controle de contaminação por *Salmonella* em frangos de corte (GOODE, ALLEN e BARROW, 2003; TORO et al, 2005), brotos (PAO et al, 2004) e frutas (LEVERENTZ et al, 2001), na fagoterapia (BRUSSOW, 2005) e no tratamento de efluentes (WITHEY et al, 2005).

Segundo Carlton et al (2005), um ponto de grande interesse para o desenvolvimento de métodos diagnósticos é o fato dos bacteriófagos serem específicos e não ataquem as bactérias de interesse ou benéficas para a obtenção do alimento. Outro atrativo para o emprego desses vírus como indicadores da inocuidade dos alimentos, se deve ao fato de seus eventuais produtos de lise consistirem exclusivamente de aminoácidos e ácidos nucléicos não sendo, desta forma, xenobióticos, o que os diferencia dos antibióticos e dos agentes antissépticos, permitindo que sua introdução e disseminação no ambiente possam ser feitas como um processo de ocorrência natural.

A fagoterapia tem vantagens específicas comparadas com antimicrobianos químicos que podem ser enumeradas como: os

bacteriófagos são partículas que não se modificam e assim não interferem com o metabolismo animal; melhoram a eficácia do tratamento uma vez que há aumento do número de partículas virais ao longo do tratamento, pois replicam-se no interior do micro-organismo hospedeiro; são ubiqüitários e possuem grande diversidade atuando sobre um alvo específico, são ativos contra as bactérias resistentes a antibióticos e além disso, bacteriófagos são seguros, baratos e fáceis de serem produzidos (GOODRIDGE e ABEDON, 2003; MATTEY e SPENCER, 2008).

Apesar das muitas vantagens da fagoterapia sobre antibacterianos químicos, essas não são suficientes para que represente uma alternativa viável para ser usada como padrão. Há algumas desvantagens que limitam o seu uso. A primeira delas é o fato de, ao longo do ciclo lisogênico, bacteriófagos poderem tornar bactérias inócuas em patogênicas (WAGNER e WALDOR, 2002). Além disso, o hospedeiro tem que ser específico. Há também a necessidade de fazer o isolamento, purificação e propagação do bacteriófago de interesse que podem perder a capacidade de infecção. É importante destacar que esses vírus podem carregar fatores de virulência e genes que são codificados para a produção de toxinas (BRUSSOW et al, 2004; McGRATH, FITZGERALD e VAN SINDEREN, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Para o isolamento de bacteriófagos de *Salmonella* spp. foram analisadas 45 amostras de fezes de galinhas caipira coletadas em 15 diferentes propriedades da microrregião de Viçosa/MG. No isolamento de *Salmonella* spp., foram analisadas as 45 amostras de fezes utilizadas para o isolamento dos bacteriófagos e também outras 44 amostras de fezes coletadas em sete propriedades aleatoriamente escolhidas na microrregião de Viçosa/MG. Das 44 amostras de fezes analisadas para o isolamento do patógeno, 12 eram provenientes de galinhas poedeiras, 16 de frangos de corte e 16 de galinhas caipira. As amostras coletadas foram colocadas em sacos plásticos e transportadas em caixas de isopor para o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa para execução das análises.

O critério de seleção dos bacteriófagos foi estabelecido por comparação da intensidade de lise do bacteriófago isolado com a do bacteriófago usado como controle (bacteriófago P22). O bacteriófago P22 foi doado pelo Centro Nacional de Pesquisa e Tecnologia Agroindustrial de Alimentos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) do Rio de Janeiro/RJ e é um vírus caudado, com DNA fita dupla e apresenta atividade lítica contra *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

3.2. Isolamento de bacteriófagos de *Salmonella* spp.

Para o isolamento de bacteriófagos de *Salmonella* spp., foi utilizada a metodologia adaptada de Atterbury et al (2005). Um grama de fezes foi diluído (1:10) em tampão SM (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,1 M NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 0,01 % gelatina) e ressuspenso por agitação durante 5 min. Esta suspensão foi incubada sob condições de aerobiose, a 17 °C, sob agitação de 100 rpm (Agitador Certomat MO II) por 24 h, para permitir a eluição do bacteriófago. Após este período, uma alíquota de 8 mL da solução foi transferida para um tubo de centrífuga esterilizado e submetida a

centrifugação a 13.000 g (Centrífuga Sigma 3K30, rotor Sigma Nr 12111-H) por 5 min para remover detritos em suspensão. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose (Sartorius Biolab Products com poro de 0,22 µm) para remover células e restos celulares e o filtrado foi avaliado para presença de bacteriófagos capazes de lisar *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028).

Para avaliar a presença de bacteriófagos a partir do método de isolamento proposto, foi utilizada técnica de microgota em superfície conforme proposta por Adams (1959).

Os sorovares de *Salmonella* foram cultivados por 24 h a 37 °C em caldo BHI (Mbiolog) suplementado (37 g.L⁻¹ de caldo BHI, 0,1 g.L⁻¹ de CaCl₂, 2,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O). Um volume de 0,5 mL de cada suspensão dos sorovares foi adicionado à 5 mL de agar BHI sobrecamada (caldo BHI suplementado adicionado de 0,7 % de ágar-ágar) à temperatura de, aproximadamente, 45 °C e espalhados sobre a superfície seca de placas de Petri contendo ágar base BHI. Após solidificação, alíquotas de 10 µL de cada suspensão de bacteriófagos foram depositadas sobre esta superfície, sendo dispostos nove bacteriófagos isolados em cada placa. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h, para verificar a formação de placas de lise como observado na placa controle que possuía o bacteriófago P22.

3.3. Purificação de bacteriófagos e produção de estoque

Após a identificação das suspensões de bacteriófagos ativos contra *Salmonella* Enteritidis e de *Salmonella* Typhimurium, realizou-se a propagação e a purificação, segundo metodologia adaptada de Kudva et al (1999). Alíquotas de 500 µL da cultura de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e, ou de *Salmonella* Typhimurium cultivadas em caldo BHI suplementado por 24 h a 37 °C e de 100 µL de suspensão de bacteriófagos pré-selecionados foram colocadas em 5 mL de ágar BHI sobrecamada a um temperatura de 45 °C e posteriormente vertido em placa contendo ágar BHI. Seguiu-se de incubação a 37 °C por 18 h. O local do ágar que apresentou uma unidade formadora de placa (PFU) foi cortado e colocado em um tubo contendo 5 mL de caldo BHI suplementado e 500 µL da cultura de

Salmonella Enteritidis (ATCC 13076) e, ou de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) cultivadas em caldo BHI suplementado por 24 h a 37 °C. Esse tubo foi incubado a 37 °C por 18 h. Em seguida, a cultura foi centrifugada (Centrífuga Sigma 3K30, rotor Sigma Nr 12111-H) a 13.000 g por 5 min. Retirou-se o sobrenadante, que foi diluído até 10⁻⁶ em tampão SM. Posteriormente, 100 µL da suspensão de bacteriófagos na diluição 10⁻⁶, juntamente com 500 µL da cultura de *Salmonella* em caldo BHI suplementado foram colocados em ágar BHI de sobrecamada e vertido em placa contendo ágar BHI, que foi incubada a 37 °C por 18 h. O procedimento de remover o ágar com uma unidade formadora de placa isolada foi repetido por três vezes consecutivas para garantir que as suspensões de bacteriófagos estivessem puras. Na quarta propagação, a placa de ágar BHI foi feita sem diluir o sobrenadante, de maneira a obter uma maior quantidade possível de bacteriófagos para serem estocados. Sobre esta placa, foram colocados 10 mL de solução tampão SM, seguida de incubação a 17 °C, sob agitação de 100 rpm (Agitador Certomat MO II), por 24 h. Após este período, retirou-se uma alíquota de 8 mL de tampão SM dessa placa que foi centrifugada a 13.000 g por 5 min para diminuir células bacterianas em suspensão, filtrou-se o sobrenadante em membrana de acetato de celulose (Sartorius Biolab Products com poro de 0,22 µm), sendo o filtrado guardado sob refrigeração em tubo de ensaio esterilizado, para posterior análise microscópica.

3.3.1. Determinação da concentração de bacteriófagos na solução estoque

Após a propagação, os bacteriófagos foram analisados quando ao potencial de lise e contados para determinação de sua concentração na solução estoque.

Realizaram-se diluições sucessivas da suspensão de bacteriófagos em solução salina 0,1 %. Uma placa de ágar BHI contendo a bactéria hospedeira foi preparada conforme a metodologia descrita no item 3.2. Após solidificação do meio semi-sólido, as placas receberam, cuidadosamente, 10 µL da amostra de bacteriófago a ser titulada, seguidas de incubação a 37 °C por 18 h. Um número de 10 a 100 placas de lise foram contadas e os

resultados expressos em unidades formadoras de placas por mililitro (PFU.mL⁻¹) (CARRILLO et al, 2005).

3.4. Isolamento de *Salmonella* spp.

O isolamento de *Salmonella* spp. foi executado segundo a metodologia preconizada na Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003).

O procedimento para isolamento foi realizado com pré-enriquecimento em água peptonada tamponada 0,1 %, seguido de enriquecimento em caldo seletivo, no qual alíquotas das amostras pré-enriquecidas foram adicionadas a tubos contendo caldo Selenito-cistina (Himedia) e tubos com caldo Rappaport-Vassiliadis (Acumedia), ambos os meios adicionados de novobiocina 4 %; sendo incubados por 24 h a 37 °C e 43 °C, respectivamente. Posteriormente foi realizado o plaqueamento seletivo diferencial em placas contendo ágar Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4) (Difco™) e em placas contendo ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (Merck) sendo incubados por 24 h a 37 °C. A confirmação de colônias suspeitas foi realizada pelas provas bioquímicas (SILVA et al, 2007). As colônias foram semeadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (Difco™) inclinado, ágar lisina ferro (LIA) (Difco™) inclinado e em caldo uréia (Micro Med), seguido de incubação por 24 h a 37 °C. As colônias que apresentaram características bioquímicas compatíveis com o gênero *Salmonella* foram semeadas em meio ágar nutriente, incubadas por 24 h a 37 °C e estocadas sob refrigeração para posterior análise sorológica.

3.5. Identificação sorológica de amostras positivas de *Salmonella* spp.

As colônias com características bioquímicas compatíveis com o gênero *Salmonella* foram submetidas à prova de detecção de antígenos somáticos (O) mediante o uso de soro *Salmonella* O, anti-soro poly A - I (Probac). A prova de detecção de antígenos foi realizada e uma colônia coletada com auxílio de uma alça de platina ressuspendida em 100 µL de solução salina. A suspensão de células foi depositada sobre uma lâmina de vidro, seguida de homogeneização até atingir uma mistura branca leitosa e posteriormente adicionada de uma gota do soro. Após homogeneização, a

prova foi considerada positiva quando foi evidenciada a formação de grumos.

3.6. Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados

A especificidade dos bacteriófagos isolados de fezes foi testada em bactérias autóctonas (isoladas conforme descrito no item 3.4) e também contra *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Cronobacter muytjensii* (ATCC 51329), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella Gallinarum* (ATCC 9184), *Salmonella Abony* (ATCC 6017), *Salmonella Pullorum* (ATCC 9120), *Salmonella Thyphi* (ATCC 6539), *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 10708), *Salmonella Arizonae* (ATCC 13314) cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ).

Cada cultura bacteriana foi plaqueada de acordo com a metodologia proposta por Adams (1959) descrita no item 3.2. Após solidificação do meio semi-sólido inoculado com as bactérias, as placas receberam, cuidadosamente, 10 µL de cada bacteriófago, e após a secagem das gotas, incubadas a 37 °C por 18 h. A observação de diferentes graus de lise bacteriana nos pontos de aplicação das amostras foi avaliada após incubação.

3.7. Exame da morfologia do bacteriófago de *Salmonella* spp.

Para que os bacteriófagos fossem visualizados por microscopia eletrônica, inicialmente foi realizada a remoção de materiais que interferem na visualização, baseado na metodologia adaptada de Oliveira et al (2009). As partículas virais foram sedimentadas em centrífuga (Sigma 3K30, rotor Sigma Nr 12111-H) a 40.000 g por 52 min, lavadas e ressuspensas por duas vezes com acetato de amônia 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0. A ressuspensão final foi realizada com água destilada esterilizada e o conteúdo foi filtrado em membrana de acetato de celulose (Sartorius Biolab Products com poro de 0,22 µm) e estocado à temperatura de 4 °C para posterior análise.

A avaliação da morfologia do bacteriófago foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Atterbury et al (2003) utilizando microscopia

eletrônica. Adicionou-se um volume de 8 μL de uma suspensão de 10^6 a 10^8 PFU.mL⁻¹ do bacteriófago na superfície de um grid de 200 mesh revestido com formvar-carbono (Koch Electron Microscopy). Em cada grid, colocou-se uma gota do contraste acetato de uranila a 2 % (solução aquosa, p/v), que depois de 15 s de contato com o bacteriófago, foi removido com papel absorvente comum. As telas foram submetidas à secagem a temperatura ambiente (23 °C) por 20 min e, posteriormente, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (Microscópio Eletrônico, Zeiss EM109), do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento, purificação e propagação de bacteriófagos de *Salmonella* spp.

Como pode ser observado na Tabela 2, das 45 amostras de fezes de galinhas caipira usadas para verificação da presença de bacteriófagos, 33 amostras, ou seja, 73,3 % apresentaram bacteriófagos com ação lítica sobre *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. Foram isolados 29 bacteriófagos usando *Salmonella* Typhimurium (ST) como hospedeiro e 24 bacteriófagos usando *Salmonella* Enteritidis (SE) como hospedeiro. Em nove (amostras 2, 13, 23, 26, 33, 34, 35, 37 e 38) das 45 amostras analisadas (20 %) isolou-se bacteriófagos que apresentaram atividade lítica somente sobre *Salmonella* Typhimurium; em outras quatro amostras (8,9 %) isolou-se bacteriófagos que apresentaram atividade lítica apenas em *Salmonella* Enteritidis (amostras 15, 18, 22, e 29); em 20 amostras (44,4 %) foram isolados bacteriófagos com ação lítica tanto em *Salmonella* Typhimurium como em *Salmonella* Enteritidis. Em 12 amostras (26,7 %) não foram isolados bacteriófagos. Pode-se observar ainda (Tabela 2) que dos 53 bacteriófagos isolados, nove (17 %) apresentaram atividade lítica somente em *Salmonella* Typhimurium (fST2, fST13, fST23, fST26, fST33, fST34, fST35, fST37 e fST38), quatro (7,5 %) lisaram apenas *Salmonella* Enteritidis (fST15, fST18, fST22, e fST29), enquanto 40 bacteriófagos (75,5 %) apresentaram atividade lítica para os dois sorovares de *Salmonella*.

Os dados obtidos neste estudo estão conforme os dados disponíveis na literatura que mostram o isolamento de bacteriófagos em ambientes de criação e fezes de aves de granja (FIORENTIN et al, 2004; ATTERBURY et al, 2007; FILHO et al, 2007) e de águas residuais (HIGGINS et al, 2005; CAREY-SMITH et al, 2006; MCLAUGHLIN et al, 2006; ATTERBURY et al, 2007).

O percentual de amostras com bacteriófagos de *Salmonella* spp. varia entre os estudos relatados na literatura conforme a origem de isolamento. Resultados elevados como os do presente trabalho foram

encontrados por Carey-Smith et al (2006), que isolaram bacteriófagos de *Salmonella* spp. em 100 % de amostras de esgoto analisadas. Por outro lado, Fiorentin et al (2004) e Filho et al (2007) encontraram um baixo percentual de amostras de fezes de aves de granja contendo bacteriófagos de *Salmonella* spp.. Fiorentin et al (2004) isolaram bacteriófagos de 4,67 % das amostras e Filho et al (2007) em 4,16 % das amostras analisadas.

Nas mesmas amostras onde foram isolados os bacteriófagos para *Salmonella* spp., buscou-se isolar o patógeno (Tabela 2). Das 33 amostras de fezes das quais se isolou os bacteriófagos para *Salmonella* spp., em apenas três (9,1 %) foi possível isolar bactérias positivas para o teste sorológico do gênero *Salmonella* spp. e em 90,9 % não havia presença deste patógeno. Isto indica que obrigatoriamente o isolamento do bacteriófago não implica no isolamento simultâneo do hospedeiro. Estes resultados são corroborados pelos estudos realizados por Aziz e Ibrahim (1969), 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.

Por outro lado, uma outra explicação para esta baixa recuperação do patógeno é suportado por estudo conduzido por Fiorentin et al (2004), que mostram a dificuldade da detecção de *Salmonella* por métodos bacteriológicos convencionais quando o número de contaminantes no ambiente é baixo, e a detecção de bacteriófagos é mais fácil uma vez que eles resistem por um tempo maior no ambiente e são eliminados em grande número.

Em contrapartida, nos estudos obtidos por Higgins et al (2008), a maior parte dos bacteriófagos para *Salmonella* spp. foram isolados de ambientes onde isolou-se, simultaneamente, o patógeno, e sugeriram que no local onde há o patógeno, a quantidade de bacteriófagos para esse micro-organismo será maior e, quando o número do patógeno diminui a proporção de bacteriófagos também diminuirá, visto que estes não possuem o hospedeiro para replicarem.

A presença de bacteriófagos foi detectada pela formação de placas de lise, como mostrado na Figura 1 e, após propagação dos bacteriófagos

Tabela 2: Isolamento de bacteriófagos com ação lítica sobre *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Salmonella* Enteritidis (SE) e avaliação da presença de *Salmonella* spp..

Amostras	Propriedade	Bacteriófagos		Bactérias isoladas de fezes com resultados positivos em prova sorológica para <i>Salmonella</i> spp.
		Hospedeiro ST	Hospedeiro SE	
1	A	-	-	-
2		+ (fST2)*	-	-
3		-	-	-
4	B	-	-	-
5		-	-	-
6	C	+ (fST6)	+ (fSE6)*	-
7		+ (fST7)	+ (fSE7)	-
8		-	-	-
9		+ (fST9)	+ (fSE9)	-
10		+ (fST10)	+ (fSE10)	-
11	D	-	-	-
12		+ (fST12)	+ (fSE12)	-
13		+ (fST13)	-	-
14	E	+ (fST14)	+ (fSE14)	-
15		-	+ (fSE15)	-
16		+ (fST16)	+ (fSE16)	+
17		-	-	-
18	F	-	+ (fSE18)	-
19		+ (fST19)	+ (fSE19)	-
20		+ (fST20)	+ (fSE20)	+
21	G	-	-	-
22		-	+ (fSE22)	-
23	H	+ (fST23)	-	-
24		-	-	-
25		-	-	-
26		+ (fST26)	-	-
27	I	-	-	-
28		-	-	-
29		-	+ (fSE29)	+
30		+	+ (fSE30)	-
31	J	+ (fST31)	+ (fSE31)	-
32		+ (fST32)	+ (fSE32)	-
33		+ (fST33)	-	-
34		+ (fST34)	-	-
35	L	+ (fST35)	-	-
36		+ (fST36)	+ (fSE36)	-
37		+ (fST37)	-	-
38	M	+ (fST38)	-	-
39		+ (fST39)	+ (fSE39)	-
40		+ (fST40)	+ (fSE40)	-
41	N	+ (fST41)	+ (fSE41)	-
42		+	+ (fSE42)	-
43	O	+	+ (fSE43)	-
44		+	+ (fSE44)	-
45	P	+	+ (fSE45)	-
Total	15 propriedades	29	24	3

* Áreas escuras: Bacteriófagos de ST e SE selecionados para o presente estudo.

(+) Presença de bacteriófagos para ST e SE e presença de *Salmonella* spp.; (-) Ausência de bacteriófagos para ST e SE e ausência de *Salmonella* spp..

selecionados pela maior atividade lítica na etapa de purificação, a quantidade de bacteriófagos em cada solução estoque apresentou números variados conforme mostrado na Tabela 3.

Observou-se que a concentração dos bacteriófagos de ST variou de $1,0 \times 10^6$ a $2,9 \times 10^{11}$ PFU/mL e os de SE a concentração da suspensão variou de $3,0 \times 10^7$ a $3,0 \times 10^{11}$ PFU/mL (Tabela 3). Foram selecionados 24 bacteriófagos de ST que apresentaram intensidade de lise maior ao comparar com a lise formada pelo bacteriófago P22 e 24 bacteriófagos de SE, totalizando 48 bacteriófagos para estudos posteriores.

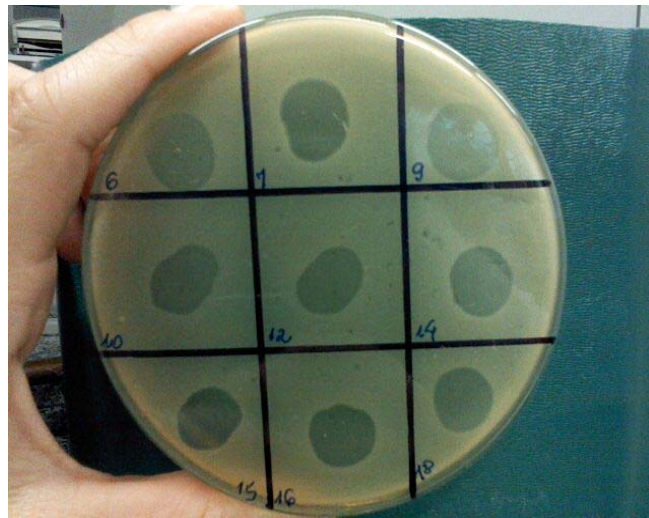


Figura 1: Placas de lise típicas em culturas de *Salmonella* Enteritidis usando diferentes bacteriófagos isolados.

Tabela 3: Número de PFU/mL nas soluções estoque dos bacteriófagos de *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Salmonella* Enteritidis (SE) após purificação e propagação.

BACTERIÓFAGO de ST	PFU/mL	BACTERIÓFAGO de SE	PFU/mL
F2	$7,0 \times 10^6$	F6	$6,5 \times 10^9$
F6	$6,5 \times 10^9$	F7	$2,9 \times 10^{11}$
F7	$2,9 \times 10^{11}$	F9	$9,0 \times 10^9$
F9	$9,0 \times 10^9$	F10	$1,1 \times 10^8$
F10	$1,1 \times 10^8$	F12	$1,2 \times 10^9$
F12	$1,2 \times 10^9$	F14	$1,6 \times 10^8$
F13	$1,9 \times 10^{10}$	F15	$1,4 \times 10^9$
F14	$1,6 \times 10^8$	F16	$1,1 \times 10^{10}$
F16	$1,1 \times 10^{10}$	F18	$3,0 \times 10^8$
F19	$3,0 \times 10^7$	F19	$3,0 \times 10^7$
F20	$8,6 \times 10^{10}$	F20	$8,6 \times 10^{10}$
F23	$1,0 \times 10^6$	F22	$1,3 \times 10^{10}$
F26	$1,0 \times 10^9$	F29	$2,0 \times 10^{11}$
F31	$2,0 \times 10^{11}$	F30	$1,3 \times 10^{10}$
F32	$2,3 \times 10^{11}$	F31	$2,0 \times 10^{11}$
F33	$1,0 \times 10^{10}$	F32	$2,3 \times 10^{11}$
F34	$8,0 \times 10^6$	F36	$2,6 \times 10^{11}$
F35	$2,4 \times 10^8$	F39	$7,8 \times 10^{10}$
F36	$2,6 \times 10^{11}$	F40	$3,9 \times 10^8$
F37	$3,2 \times 10^7$	F41	$4,8 \times 10^9$
F38	$1,8 \times 10^6$	F42	$3,0 \times 10^{11}$
F39	$7,8 \times 10^{10}$	F43	$2,8 \times 10^{11}$
F40	$3,9 \times 10^8$	F44	$5,7 \times 10^9$
F41	$4,8 \times 10^9$	F45	$1,4 \times 10^{11}$

4.2. Isolamento de *Salmonella* spp.

Buscou-se isolar o patógeno em outras amostras de fezes de aves provenientes de diferentes criações (frangos de corte, poedeiras e galinhas caipira) que foram coletadas em diferentes propriedades (Q, R, S, T, U, V, X) para verificar a ação lítica dos bacteriófagos isolados em hospedeiros isolados de outros ambientes.

Dos 64 isolados positivos nas provas bioquímicas nos meios LIA, TSI e Uréia como típicas de *Salmonella* spp. (das 89 amostras de fezes analisadas), 17,2 % foram confirmadas pelo teste sorológico conforme mostrado na Tabela 4.

Este resultado assemelha-se aos dados de isolamento de *Salmonella* spp. a partir de amostras de abatedouro e de vísceras de aves em estudo conduzido por Leon-Velarde et al (2004) onde 5,5 % das amostras foram confirmados por sorologia como *Salmonella* spp.. Ozbey e Ertas (2006) analisaram 1250 amostras provenientes de carcaça, intestino, fígado, vesícula biliar e baço de frangos e isolaram *Salmonella* spp. contaminante em, respectivamente, 12,0 %, 7,2 %, 4,0 %, 2,0 % e 1,6 % das amostras.

Em contrapartida, no estudo realizado por Fiorentin et al (2004), não foi realizado o isolamento de nenhuma bactéria do gênero *Salmonella* em 107 amostras de fezes de aves. Asheg et al (2001) afirmaram que a detecção de *Salmonella* em fezes de aves é dificultada uma vez que as aves eliminam baixas quantidades desse patógeno em suas fezes.

Tabela 4: Relação entre as amostras de fezes coletadas e os isolados de *Salmonella* spp. confirmados por provas bioquímicas e sorológicas.

Propriedade	nº de amostras	Isolados confirmados por provas bioquímicas	Isolados positivos em prova sorológica
A (caipira)	3	0	0
B (caipira)	2	0	0
C (caipira)	5	4	0
D (caipira)	3	0	0
E (caipira)	4	4	1 (25 %)
F (caipira)	3	4	1 (25 %)
G (caipira)	2	0	0
H (caipira)	4	2	0
I (caipira)	4	6	1 (17 %)
J (caipira)	4	0	0
L (caipira)	3	1	0
M (caipira)	3	4	0
N (caipira)	2	2	0
O (caipira)	2	0	0
P (caipira)	1	1	0
Q (caipira)	5	7	0
R (caipira)	4	6	1 (17 %)
S (caipira)	2	12	4 (33 %)
T (poedeira e corte)	10	2	2 (100%)
U (corte)	10	3	1 (33 %)
V (poedeira)	8	2	0
X (caipira)	5	4	0
Total	89	64	11 (17 %)

4.3. Especificidade dos bacteriófagos isolados

Os 48 fagos selecionados (24 para ST e 24 para SE) foram testados para verificação da ocorrência de lise em cultura de diferentes patógenos de origem alimentar e nos isolados de *Salmonella* spp.. Os resultados da interação dos 48 bacteriófagos com bactérias conhecidas são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Salmonella Galinarum foi a única bactéria lisada por todos os 24 bacteriófagos isolados para ST (Tabela 5), enquanto *L. monocytogenes* e *K. pneumoniae* não apresentaram lise por esses bacteriófagos. *Salmonella* Pullorum foi lisada por 95,8 % dos bacteriófagos, *Salmonella* Arizonae por 91,6 %, *Salmonella* Abony por 87,5 %, *Salmonella* Typhi por 79,1 %, *Salmonella* Enteritidis por 62,5 %, *Salmonella* Cholerasuis e *E. coli* por 50,0 % dos bacteriófagos e *P. aeruginosa* e *C. muytensii* foram lisadas por 4,1 % dos bacteriófagos.

Quando o teste foi feito com os 24 bacteriófagos de SE, *Salmonella* Galinarum e *E. coli* foram lisadas por todos, enquanto *L. monocytogenes* não apresentou lise (Tabela 6). *Salmonella* Abony, *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Typhi apresentaram lise por 95,8 % dos bacteriófagos, *Salmonella* Cholerasuis por 75,0 %, *Salmonella* Typhimurium por 62,5 % *Salmonella* Arizonae por 50,0 %, *C. muytensii* por 29,1 %, *P. aeruginosa* por 16,6 % e *K. pneumoniae* apresentou lise por 12,5 % dos bacteriófagos de SE.

De acordo com as Tabelas 5 e 6 observa-se que os bacteriófagos, apesar de isolados mediante lise específica usando SE e ST, não apresentaram especificidade para estes dois patógenos. Ao contrário, mostraram capacidade de lise em diferentes micro-organismos. Falta de especificidade de bacteriófagos também foram encontrados nos estudos de Aziz e Ibrahim (1969), O'Flynn et al (2006), Bielke et al (2007) e Filho et al (2007).

O'Flynn et al (2006) testaram dois bacteriófagos de *Salmonella* spp. isolados de fezes de suínos e um bacteriófago controle (denominado Felix 1) em diferentes sorovares de *S. enterica* e em outras bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. fluorescens*), constatando que *S. enterica* sorovar Branderup foi

Tabela 5: Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro *Salmonella* Typhimurium em relação a patógenos de interesse em alimentos.

BACTERIÓFAGO PATÓGENO	2	6	7	9	10	12	13	14	16	19	20	23	26	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
<i>L. monocytogenes</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>C. mytjensii</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--	--	--	--	--	--	--
<i>P. aeruginosa</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--
<i>K. pneumoniae</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>E. coli</i>	--	--	--	--	+	+	+	--	--	--	--	--	+	+	+	--	+	+	+	+	--	+	+	--
<i>Salmonella Abony</i>	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	+	+
<i>Salmonella Pullorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	+	+
<i>Salmonella Typhi</i>	--	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	+	+
<i>Salmonella Cholerasuis</i>	--	--	--	--	+	+	+	--	--	--	--	--	+	+	+	--	+	+	+	+	--	+	+	--
<i>Salmonella Arizonae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--
<i>Salmonella Galinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella Enteritidis</i>	--	+	+	+	+	+	--	+	+	+	+	--	--	+	+	--	--	--	+	--	--	+	+	+
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Resultado de lise positiva; (--) Resultado de lise negativa.

Tabela 6: Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro *Salmonella* Enteritidis em relação a patógenos de interesse em alimentos.

BACTERIÓFAGO PATÓGENO	6	7	9	10	12	14	15	16	18	19	20	22	29	30	31	32	36	39	40	41	42	43	44	45
<i>L. monocytogenes</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>C. muytjensii</i>	--	--	--	--	--	--	+	--	--	--	+	+	+	+	--	--	--	--	--	+	--	--	+	--
<i>P. aeruginosa</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	--	--	--	--	--	--	+	--	--	--	--	--	+	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Abony	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Pullorum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Cholerasuis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	+	--	+	+	+	--	--	+	--	+
<i>Salmonella</i> Arizonae	+	--	+	+	--	+	--	+	+	+	+	--	--	--	+	--	--	--	--	--	--	+	+	+
<i>Salmonella</i> Galinarum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	+	+	+	+	+	--	+	--	+	+	--	--	--	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--
<i>Salmonella</i> Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Resultado de lise positiva; (--) Resultado de lise negativa.

a única bactéria resistente aos três bacteriófagos, e os dois bacteriófagos isolados das fezes lisaram a maioria dos sorovares de *S. enterica* testados, mostrando uma capacidade lítica elevada quanto a do bacteriófago Felix 1.

Resultados semelhantes foram observados por Aziz e Ibrahim (1969), os quais mostraram que bacteriófagos isolados para *E. coli* apresentaram ação lítica em bactérias do gênero *Salmonella*, indicando a possibilidade de que os bacteriófagos lisem diferentes membros da família Enterobacteriaceae. Dessa forma, demonstraram que um bacteriófago pode possuir hospedeiros de gênero diferente. Em outro estudo, a especificidade de quatro bacteriófagos foi testada em diferentes sorovares de *Salmonella* spp. e os autores observaram a formação de placas de lise em diferentes sorovares e variação do perfil lítico, o que sugere que os bacteriófagos não eram específicos para um único sorovar (FILHO et al, 2007). A não especificidade de bacteriófagos para *Salmonella* também é demonstrada nas pesquisas de Bielke et al (2007) que observaram a ação lítica de 44 bacteriófagos para SE em 10 diferentes sorovares de *S. enterica*.

No entanto, Robeson, Retamales e Borie (2008) ao testarem a capacidade lítica três bacteriófagos para SE, isolados de fezes de aves, contra diferentes sorovares de *Salmonella* spp., constataram que os bacteriófagos apresentaram atividade lítica apenas contra o sorovar Enteritidis, e esses três bacteriófagos não foram líticos também em estirpes de bactérias presentes na microbiota intestinal de frangos de corte e, portanto, a utilização desses bacteriófagos “*in vivo*” não resultaria em disbiose, fato que pode ser causado pelo uso de antibióticos. Concomitantemente, nos estudos de McLaughlin et al (2006), foi constatado, ao testarem a especificidade de 66 bacteriófagos de *Salmonella* com *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Citrobacter youngae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri* e *Serratia marcescens*, a ocorrência de lise apenas em *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium, indicando uma provável especificidade dos bacteriófagos estudados.

A especificidade de bacteriófagos de *Salmonella* também foi demonstrada por Carey-Smith et al (2006), em que os bacteriófagos avaliados foram líticos apenas em sorovares do gênero *Salmonella* e não afetaram *E.coli*. Segundo Hill (1993), as diferenças na susceptibilidade das estirpes bacterianas aos diferentes bacteriófagos podem ser atribuídas a variações nas moléculas receptoras que bloqueiam a adsorção do bacteriófago ou a outros mecanismos de resistência, como infecção abortiva.

As tabelas 7 e 8 mostram a ação lítica dos bacteriófagos sobre os 64 isolados de fezes de aves. Observa-se uma ação lítica diferenciada frente aos isolados com características bioquímicas de *Salmonella* spp.. Com base na observação das Tabelas 7 e 8, percebe-se que os 48 bacteriófagos isolados não são específicos para um único gênero, uma vez que a maioria desses isolados, como foi mostrado no item 4.2, não foi identificada pelo teste sorológico como *Salmonella* spp. e mesmo assim foi lisada por diferentes bacteriófagos de ST e de SE.

Resultados semelhantes são encontrados na literatura, como no estudo de Jensen et al (1998) e Greene e Goldberg (1985). Jensen et al isolaram bacteriófagos com capacidade de lisar tanto *Sphaerotilus natans* e *E. coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*. Já Greene e Goldberg isolaram bacteriófagos capazes de lisar mais de uma espécie de *Streptomyces*. Segundo Bielke et al (2007), os bacteriófagos com vários hospedeiros diferentes são melhores para serem usados no tratamento por contaminação bacteriana, pois uma pequena combinação de fagos poderia tratar uma vasta gama de infecções. No entanto, segundo Ackerman et al, (1978), muitos bacteriófagos são hospedeiro-específicos e muitas vezes, infectam uma única espécie bacteriana ou apenas um sorovar dentro de uma espécie. Essa propriedade dos bacteriófagos é importante para classificação bacteriana, mas é um fator limitante no tratamento terapêutico de infecções bacterianas.

Após análise dos resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6, os 48 bacteriófagos foram divididos em diferentes grupos de acordo com o perfil de lise sobre bactérias patogênicas conhecidas, ou seja, aqueles bacteriófagos que lisaram a mesma bactéria ou o mesmo grupo de bactérias,

Tabela 7: Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro *Salmonella* Typhimurium em relação aos isolados de *Salmonella* spp de fezes de aves.

BACTERIÓFAGO ISOLADOS	2	6	7	9	10	12	13	14	16	19	20	23	26	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
I 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 3	+	--	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+
I 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--	--	+	--	--	+	--	--	--	+	+	+	--	--
I 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 8	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	--	--	--	--	--	--	+	--	--	--	+	+	--	--
I 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 13	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 14	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--
I 15	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Resultado de lise positiva; (--) Resultado de lise negativa.

Continua ...

Continuação...

Tabela 7: Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro *Salmonella* Typhimurium em relação aos isolados de *Salmonella* spp de fezes de aves.

BACTERIÓFAGO ISOLADOS	2	6	7	9	10	12	13	14	16	19	20	23	26	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
I 17	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 19	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 21	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	+	--	+
I 27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	+	+	+	+	+	+	+
I 29	+	+	+	+	+	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--	+	+
I 30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Resultado de lise positiva; (--) Resultado de lise negativa.

Continua ...

Continuação...

Tabela 7: Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro *Salmonella* Typhimurium em relação aos isolados de *Salmonella* spp de fezes.

BACTERIÓFAGO ISOLADOS	2	6	7	9	10	12	13	14	16	19	20	23	26	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
I 32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	+	--	+
I 39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 40	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+
I 41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 43	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+
I 44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 45	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 46	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 47	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

(+) Resultado de lise positiva; (--) Resultado de lise negativa.

Continua ...

Continuação...

Tabela 7: Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro *Salmonella* Typhimurium em relação aos isolados de *Salmonella* spp de fezes.

BACTERIÓFAGO ISOLADOS	2	6	7	9	10	12	13	14	16	19	20	23	26	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
I 48	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 49	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 50	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 51	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 52	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 53	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 54	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 55	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 56	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 57	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 58	--	--	--	--	+	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 59	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 60	--	--	--	--	+	+	+	--	--	--	--	--	+	--	+	--	+	+	--	+	--	--	--	--
I 61	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--	+	--	+	+	--	+	--	--	--	--
I 62	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--	+	--	+	+	--	+	--	--	--	--
I 63	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 64	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

(+) Resultado de lise positiva; (--) Resultado de lise negativa.

Tabela 8: Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro *Salmonella* Enteritidis em relação aos isolados de *Salmonella* spp de fezes de aves.

BACTERIÓFAGO ISOLADOS	6	7	9	10	12	14	15	16	18	19	20	22	29	30	31	32	36	39	40	41	42	43	44	45
I 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	+	+	+
I 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+	--	--	--	+	+	+	+	+	+
I 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 8	--	+	--	+	+	+	+	--	--	--	--	--	+	+	+	--	--	--	--	+	--	--	--	--
I 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 13	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 14	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 15	+	+	+	--	+	--	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--
I 16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 17	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+

(+) Resultado de lise positiva; (--) Resultado de lise negativa.

Continua ...

Continuação...

Tabela 8: Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro *Salmonella* Enteritidis em relação aos isolados de *Salmonella* spp. de fezes de aves.

BACTERÍOFAGO ISOLADOS	6	7	9	10	12	14	15	16	18	19	20	22	29	30	31	32	36	39	40	41	42	43	44	45
I 18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 19	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 20	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 21	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Resultado de lise positiva; (--) Resultado de lise negativa.

Continua ...

Continuação...

Tabela 8: Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro *Salmonella* Enteritidis em relação aos isolados de *Salmonella* spp de fezes de aves.

BACTERIÓFAGO ISOLADOS	6	7	9	10	12	14	15	16	18	19	20	22	29	30	31	32	36	39	40	41	42	43	44	45
I 33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 43	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	+	--	--	--	--
I 44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I 45	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 46	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 47	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 48	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 49	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

(+) Resultado de lise positiva; (--) Resultado de lise negativa.

Continua ...

Continuação...

Tabela 8: Avaliação da especificidade dos bacteriófagos isolados usando como hospedeiro *Salmonella* Enteritidis em relação aos isolados de *Salmonella* spp de fezes.

BACTERIÓFAGO ISOLADOS	6	7	9	10	12	14	15	16	18	19	20	22	29	30	31	32	36	39	40	41	42	43	44	45
I 50	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 51	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 52	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 53	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 54	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 55	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 56	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 57	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	+	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 59	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	+	--	--	--	--
I 61	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--
I 62	--	--	--	--	--	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--	--	--	--	--	+	--	--	--	--
I 63	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
I 64	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

(+) Resultado de lise positiva; (--) Resultado de lise negativa.

provavelmente são idênticos, e foram colocados no mesmo grupo como pode ser observado nas Tabelas 9 e 10. De acordo com o perfil de ação lítica, observou-se a formação de oito grupos diferentes de bacteriófagos para ST e nove grupos de bacteriófagos para SE. Atterbury et al (2007) agruparam os 232 bacteriófagos de *Salmonella* spp. isolados de fezes de aves em mais de 80 perfis de ação lítica, demonstrando a diversidade destes bacteriófagos.

Tabela 9: Agrupamento dos bacteriófagos isolados quando *Salmonella* Typhimurium foi utilizada como hospedeiro de acordo com o perfil de ação lítica sobre diferentes patógenos.

GRUPOS DE BACTERIÓFAGOS DE ST								
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fagos	F2	F6	F10	F13	F19	F33	F38	F40
	F23	F7	F12	F26	F20			
		F9	F31	F34				
		F14	F32	F35				
		F16	F36	F37				
		F41	F39					

Tabela 10: Agrupamento dos bacteriófagos isolados quando *Salmonella* Enteritidis foi utilizada como hospedeiro de acordo com o perfil de ação lítica sobre diferentes patógenos.

GRUPOS DE BACTERIÓFAGOS DE SE									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fagos	F6	F7	F15	F18	F20	F22	F32	F40	F44
	F9	F12	F29	F43			F41		
	F10	F36	F30	F45			F42		
	F14	F39							
	F16								
	F19								
	F31								

4.4. Morfologia dos bacteriófagos de *Salmonella* spp.

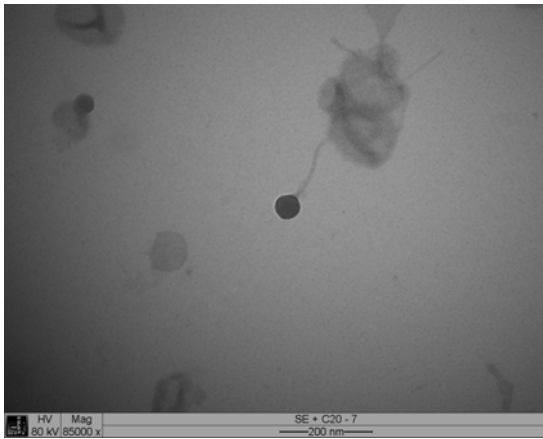
Após o agrupamento dos bacteriófagos de acordo com o perfil de ação lítica sobre diferentes patógenos selecionou-se um representante de

cada grupo (Tabela 9 e 10) para a caracterização morfológica por microscopia eletrônica de transmissão.

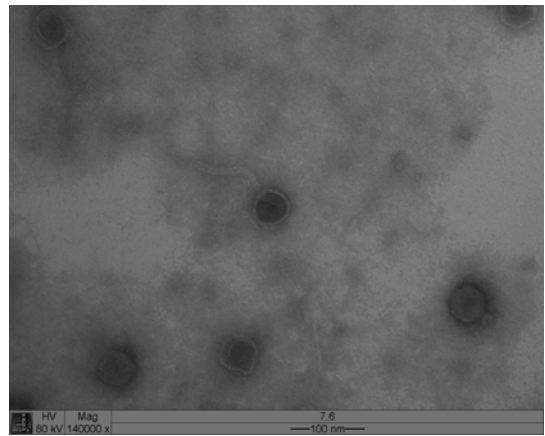
Foram encontradas algumas diferenças morfológicas entre os bacteriófagos isolados, os quais apresentaram cabeça icosaédrica, alguns apresentando cauda, longa ou curta podendo ser ou não contrátil. Dessa forma, e com base em dados relatados na literatura, os bacteriófagos do presente estudo possivelmente deverão ser classificados em uma dessas famílias conhecidas: família *Siphoviridae* (possuem cauda longa não contrátil), família *Myoviridae* (aqueles que possuem cauda longa contrátil), como pode-se verificar na Figura 2a, nas letras A e B e família *Podoviridae* (constituída por representantes de cauda curta) como mostram as Figuras 2a e 2b nas letras C, D, E, F, G e H. Todas as três famílias de bacteriófagos citadas pertencem à ordem Caudovirales.

Os resultados da análise morfológica dos bacteriófagos do presente trabalho são coerentes a dados apresentados na literatura, como nos estudos de Atterbury et al (2007), que observando a morfologia de bacteriófagos de *S. enterica* encontraram representantes pertencentes à família *Myoviridae* e à família *Siphoviridae*. Carey-Smith et al (2006) também observaram a morfologia de bacteriófagos de *Salmonella* encontrando representantes da famílias *Myoviridae*, bacteriófago de cauda contrátil, e *Siphoviridae* bacteriófago de cauda longa não contrátil.

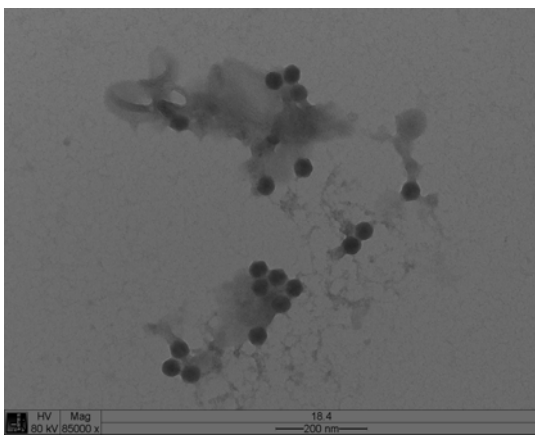
Da mesma maneira, através da micrografia eletrônica, Bigwood et al (2008) caracterizaram bacteriófagos específicos para *Salmonella* Typhimurium isolados de fezes de frango, o qual apresentou características pertencentes à família *Siphoviridae* (com uma cauda longa e não contrátil). Em 2006, nos estudos de O'Flynn et al foram isolados e caracterizados dois bacteriófagos de *Salmonella* spp., os quais apresentaram uma cauda longa e não contrátil e uma cabeça icosaédrica, sendo classificados na família *Siphoviridae* e nos estudos de McLaughlin et al bacteriófagos de *Salmonella* spp. foram classificados como pertencentes à família *Podoviridae*. Robeson, Retamales e Borie (2008) observaram a morfologia de três fagos isolados de SE incluindo-os nas famílias *Siphoviridae* e *Myoviridae*.



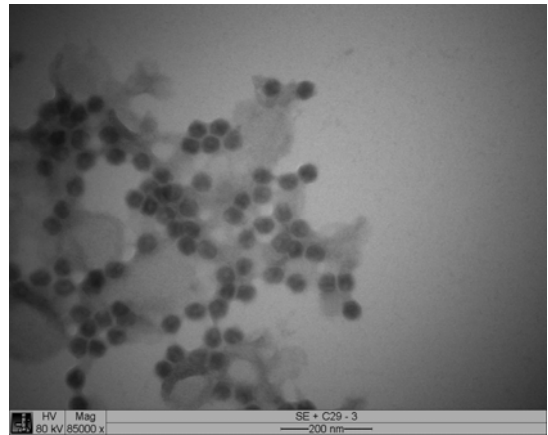
(A) F20 de SE (85.000x)



(B) F7 de SE (140.000x)

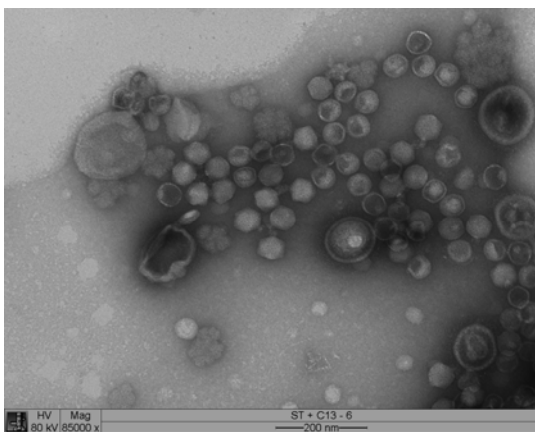


(C) F18 de SE (85.000x)

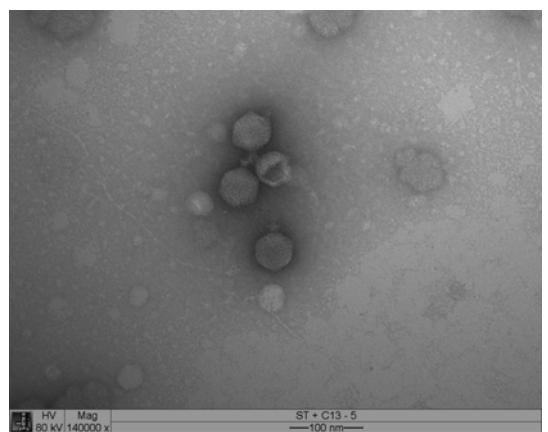


(D) F29 de SE (85.000x)

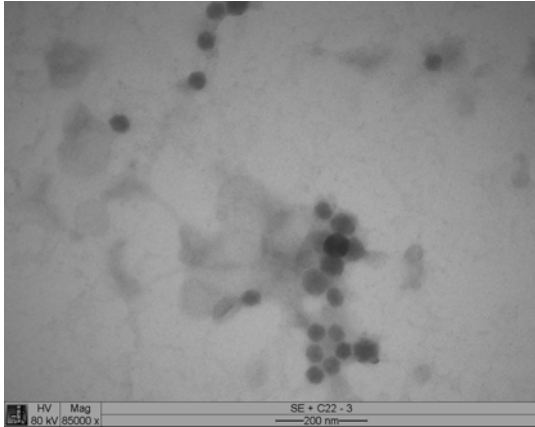
Figura 2a: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de bacteriófagos de *Salmonella* Enteritidis corados negativamente com acetato de uranila.



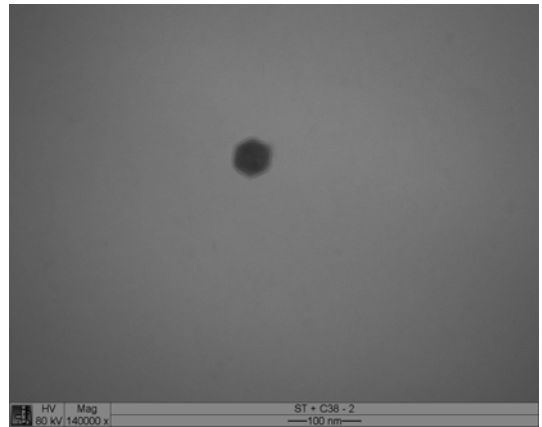
(E) F13 de ST (85.000x)



(F) F13 de ST (140.000x)



(G) F22 de ST (85.000x)



(H) F38 de ST (140.000x)

Figura 2b: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de bacteriófagos de *Salmonella* Typhimurium corados negativamente com acetato de uranila.

5. CONCLUSÃO

- No presente trabalho isolou-se 48 bacteriófagos de *Salmonella* spp. de fezes de aves, sendo 24 isolados mediante o uso de *Salmonella* Enteritidis como hospedeiro e 29 usando *Salmonella* Typhimurium como hospedeiro e após purificação e propagação, conseguiu-se obter uma alta concentração de bacteriófagos na solução estoque.
- Foi observado também que nem sempre, de uma mesma amostra, consegue-se isolar o bacteriófago e o hospedeiro simultaneamente.
- Os bacteriófagos isolados não foram específicos para o gênero *Salmonella*, uma vez que apresentaram atividade lítica não apenas contra *Salmonella* spp., mas também contra outros gêneros da família Enterobacteriaceae. O fato desses bacteriófagos não serem específicos tem uma relevância muito grande, uma vez que poderão ser utilizados para biocontrole de diferentes micro-organismos patogênicos e deterioradores que ainda são um grande problema em saúde pública.
- De acordo com as características morfológicas, observou-se que os bacteriófagos isolados apresentaram cabeça icosaédrica com cauda longa ou curta e provavelmente podem ser classificados como pertencentes às famílias *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae*, todos pertencentes à ordem Caudovirales.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, H.W.; AUDURIER, A.; BERTHIAUME, L.; JONES, L.A.; MAYO, J.A.; VIDAVER, A.K. Guidelines for bacteriophage characterization. **Adv. Virus Res.** v. 23, p. 1–24. 1978.

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

ALCOCER, I.; OLIVEIRA K.M.P.; VIDOTTO, M.C.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango por rep e eric-pcr e fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas. v. 2, n. 26, p. 414-420. 2006.

ALISKY, J.; ICZKOWSKI, K.; RAPOPORT, A.; TROITSKY, N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. **J. Infect.** v. 36, p. 5–15. 1998.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L., Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Rev. Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145. 2006.

ASHEG, A.A.; FEDOROVA, V.; PISTL, J.; LEVKUT, M.; REVAJOVA, V.; KOLODZIEYSKI, L.; SEVCIKOVA, Z.; PILIPCINEC, E. Effect of low and high doses of *Salmonella* Enteritidis PT4 on experimentally infected chicks. **Folia Microbiol.** (Praha). v. 46, n. 5, p. 459-462. 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO – ABEF. **Relatório Anual 2008/2009**. Disponível em: http://www.abef.com.br/portal/clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf. Acesso em 26/11/09.

ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, P.L.; DODD, C.E.R.; REES, C.E.D.; CONNERTON, I.F. Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, p. 4511-4518. 2003.

ATTERBURY, R.J.; DILLON, E.; SWIFT, C.; CONNERTON, P.L.; FROST, J.A.; DODD, C.E.R.; REES, C.E.D.; CONNERTON, I.F. Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, n. 8, p. 4885–4887. 2005.

ATTERBURY, R.J.; VAN BERGEN, M.A.P.; 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. **Appl. Environ. Microbiol.** p. 4543–4549. 2007.

Avicultura industrial. Retrospectiva do mercado de frango em 2009.

Disponível em

http://www.aviculturaindustrial.com.br/PortalGessulli/WebSite/Noticias/retrospectiva-do-mercado-de-frango-em-2009,20091222173147_Q_903,.aspx.

Acesso 18/12/2009.

AZIZ, A.; IBRAHIM, E. Bacteriophage typing of *Salmonella*. **Appl. Microbiol.** p. 444-447. 1969.

BIELKE, L.; HIGGINS, S.; DONOGHUE, A.; DONOGHUE, D.; HARGIS, B.M. *Salmonella* host range of bacteriophages that infect multiple genera. **Poult. Sci.** 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. **Food Microbiol.** n. 25, p. 400–406. 2008.

BISWAS, B.; ADHYA, S.; WASHART, P.; PAUL, B.; TROSTEL, A.N.; POWELL, B; CARLTON, R.; MERRIL, C.R. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistan *Enterococcus faecium*. **Infect Immun.** v. 70, p. 204-210. 2002.

BORAH, P.K.; JINDAL, J.K.; VERMA, J.P. Integrated management of bacterial leaf spot of mungbean with bacteriophages of Xav and chemicals. **J. Mycol. Plant Pathol.** v. 30, p. 19–21. 2000.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 14, 18 set. 2003, Seção 1. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n.46 de 10 de fevereiro de 1998. Manual genérico de procedimentos para APPCC em indústrias de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**. Seção 1. 16 mar. 1998.

BRENNER, F.J.; BRENNER, E.K.; SCHWARTZ, T.E. Use of plaque assay to detect enteric viruses in a rural watershed. **J. Environ. Qual.** v. 28, p. 845–849. 1999.

BRUSSOW, H. Phage therapy: The *Escherichia coli* experience. **Microbiology**. v. 151, p. 2133–2140. 2005.

BRYAN, F.L.; DOYLE, M.P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **J. Food Prot.** v. 58, n. 3, p. 326–344. 1995.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, Atheneu, São Paulo, 3 ed., p. 229 – 234. 2002.

CAPITA, R.; ALVAREZ-ASTORGA, M.; ALONSO-CALLEJA, C.; MORENO, B.; GARCIA-FERNANDEZ, M.C. Occurrence of *Salmonella* in retail chicken carcasses and their products in Spain. **Int. J. Food Microbiol.** v. 81, p. 169–173. 2003.

CAREY-SMITH, G.V., BILLINGTON, C., HUDSON, J.A., HEINEMANN, J.A. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 258, p. 182–186. 2006.

CARLTON, R.M.; NOORDMAN, W.H.; BISWAS, B.; MEESTER, E.D.; LOESSNER, M.J. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes*

in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2005. Disponível em: <<http://www.ebifoodsafety.com/331/images/docs/P100%20Safety%20publication.pdf>>. Acesso em 08/11/2008.

CARRAMIÑANA, J.J.; ROTA, C.; AUGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Vet. Microbiol.** Amsterdam, v. 104, p. 113-139. 2004.

CARRILLO, C.L.; ATTERBURY, R.J.; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P.L.; DILLON, E.; SCOTT, A.; CONNERTON, I.F. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 6554-6563. 2005.

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. **Ciênc. Rural.** v. 35, n. 6, p. 1465-1468. 2005.

CHANISHVILI, N.; CHANISHVILI, T.; TEDIASHVILI, M.; BARROW, P.A. Phages and their application against drug resistant bacteria. **J. Chem Technol Biotechnol.** v. 76, p. 689-699. 2001.

CHIBANI-CHENNOUFI, S.; BRUTTIN, A.; DILLMANN, M.L.; BRUSSOW, H. Phagehost interaction: na ecological perspective. **J. Bacteriol.** v. 186, n. 12, p. 3677-3686. 2004.

DUGUID, J.P.; NORTH, R.A. E. Egg and *Salmonella* food-poisoning: an evaluation. **J. Med. Microbiol.** v. 34, p. 65-72. 1991.

DURAN, A.E.; MUNIESA, M.; MENDEZ, X.; VALERO, F.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. **J. Appl. Microbiol.** v. 92, p. 338-347. 2002.

EUZÉBY, J.P. Revised *Salmonella* nomenclature. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 49, p. 927-930. 1999.

FILHO, R.L.A.; HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; GAONA, G.; WOLFENDEN, A.D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in vitro and In vivo. **Poult. Sci.** v. 86, p. 1904–1909. 2007.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D.; BARIONI, W.J.; BARROS, S. In vitro characterization and in vivo properties of *Salmonellae* lytic bacteriophages isolated from free-range layers. **Rev. Bras. Ciên. Avíc.** v. 6, n.2, p. 121 – 128. 2004.

FRANCO, B.D.G.M. E LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo. Editora Ateneu, 2004, 182p.

GELLI, S.D. Surtos humanos por *Salmonella* em alimentos. **Aves & Ovos.** Junho. 1995.

GERMANO, P.M.L; GERMANO M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 3.ed.rev. e ampl. 986 p. São Paulo: Manole. 2008.

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

GOODRIDGE, L.; ABEDON, S.T. Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: Application of phage therapy to industry. **Feature Article.** v. 53, n. 6. 2003.

GREENE, J.; GOLDBERG, R.B. Isolation and preliminary characterization of lytic and lysogenic phages with wide host range within the *Streptomyces*. **J. Gen. Microbiol.** v. 131, p. 2459–2465. 1985.

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

GRAGORACCI, G.B. **Levantamento de bacteriófagos líticos: isolamento e caracterização de vírus provenientes de esgoto comum com potencial**

aplicação antimicrobiana. Campinas – SP, 2006. 101p. Dissertação [Mestrado em Genética e Biologia Molecular] – Universidade Estadual de Campinas, SP. 2006.

GREGORACCI, G.B.; SILVEIRA, W.D.; BROCCHI, M. The biology of bacteriophages. In: WEGRZYN, G. **Modern bacteriophage biology and biotechnology.** Research Signpost, p. 1-36. 2006.

HAGENS, S.; OFFERHAUS, M.L. Bacteriophages- new weapons for food safety. **Food Technol.** v. 62, n. 4. 2008.

HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; GUENTHER, K.L.; HUFF, W.; DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J.; HARGIS, B.M. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. **Poult. Sci.**, v. 84, p. 1141–1145. 2005.

HIGGINS, J.P.; FILHO, R.L.A.; HIGGINS, S.E.; WOLFENDEN, A.D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. Evaluation of *Salmonella*-lytic properties of bacteriophages isolated from commercial broiler houses. **Avian. Dis.**, v. 52, p. 139–142, 2008.

HILL, C. Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 12, p. 87–108. 1993.

HOFER, E.; SILVA, S.J.F.; REIS, E.M. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** v. 18, n. 1, p. 21-27. 1998.

HUDSON, J.A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. **J. Food Prot.** v. 68, p. 426–437. 2005.

HUFF, W.E.; HUFF, G.R.; RATH, N.C.; BALOG, J.M.; DONOGHUE, A.M. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. **Poult. Sci.** v. 81, p. 1486-1491. 2002.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. Trad. Eduardo Cesar Tonto [et al.] 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 711p. 2005.

JENSEN, E.C.; SCHRADER, H.S.; RIELAND, B.; THOMPSON, T.L.; LEE, K.W.; NICKERSON, K.W.; KOKJOHN, T.A. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 64, p. 575–580. 1998.

KOTTWITZ, L.B.M. **Salmonella spp.: Avaliação epidemiológica de surtos notificados no Paraná e caracterização de isolados epidêmicos e de origem avícola**. Londrina – PR 2009. 127p. Dissertação [Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos] – Universidade Estadual de Londrina, PR. 2009.

KUDVA, I.T; JELACIC, S.; TARR, P.P; YOUDERIAN, P.; HOVNE, C.J. Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p. 3767-3773. 1999.

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

KWANG, J.; LITTLEDIKE, E. T.; KEEN, J. E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 22, p. 46-51. 1996.

LANDERAS, E.; GONZALEZ-HEVIA, M.A.; MENDONZA, M.C. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis relationship between food, water and pathogenic strains. **Int. J. Food Microbiol.** v. 43, p. 81-90. 1998.

LECLERC, H.; EDBERG, S.; PIERZO, V.; DELATTRE, J.M. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. **J. Appl. Microbiol.** v. 88, p. 5–21. 2000.

LEON-VELARDE, C. G.; CAI, H. I.; LARKIN, C.; BELL-ROGERS, P.; STEVENS, R.W. C.; ODUMERU, J.A. Evaluation of methods for the identification of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 from

poultry environmental samples. **J. Microbiol. Methods**. v. 58, p. 79-86. 2004.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S.; ALAVIDZE, Z.; JANISIEWICZ, W.J.; FUCHS, Y.; CAMP, M.J.; CHIGHLADZE, E.; SULAKVELIDZE, A.

Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. **J. Food Prot.** v. 64, p. 1116–1121. 2001.

LIMA, J.L. A proliferação da *Salmonella* no Brasil. **O povo online**. 5 de julho de 2008. Disponível em: www.opovo.com.br.

LORCH, A. Bacteriophages: an alternative to antibiotics? *Biotech. Develop. Monitor*, n. 39, p. 14-17, 1999. Disponível em: <<http://www.biotech-monitor.nl/3905.htm>>.

MARKS, T.; SHARP, R. Bacteriophage and biotechnology: a review. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 75, p. 6-17. 2000.

MATTEY, M., SPENCER, J. Bacteriophage therapy-cooked goose or phoenix rising? **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 19, p. 608–612. 2008.

McGRATH, S.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. The impact of bacteriophage genomics. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 15, p. 94-99. 2004.

MCLAUGHLIN, M.R.; BALAA, M.F.; SIMS, J.; KING, R. Isolation of *Salmonella* bacteriophages from swine effluent lagoons. **J. Environ. Qual.**, v. 35. 2006.

MCNERNEY, R.; TRAORE, H. Mycobacteriophage and their application to disease control. **J. Appl. Microbiol.**, v. 99, p. 223-233. 2005.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.; TAUXE, R. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.** Atlanta. v. 5, p. 607-625. 1999.

MILLER, S.; SCHULER, B.; SECKLER, R. Phage P22 tailspike protein: removal of head-binding domain unmasks effects of folding mutations on native-state thermal stability. **Protein Sci.** 1998a.

NASCIMENTO, V.P.; RIBEIRO, A.R.; SANTOS, L.R.; ROCHA, A.C.G.P.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; CARDOSO, M.O.; ROCHA, S.L.S.; VIEIRA, J.S.; PONTES, A.P.; OLIVEIRA, S.D.; GUAHYBA, A.S. Salmoneloses paratíficas em avicultura: uma revisão e situação atual. In: XV PANVET/ Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias. Campo Grande. **Anais do XV PANVET/ Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**. p. 1-8.1996.

NUNES, I.A. **Salmonella Enteritidis – fagotipos, susceptibilidade a drogas antimicrobianas e epidemiologia molecular baseada na sonda complementar ao rRNA**. [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas – USP. 1999.

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*. **J. Appl. Microbiol.** v. 101, 251–259. 2006.

OLIVEIRA, A.; SILLANKORVA, S.; QUINTA, R.; HENRIQUES, A.; SERENO, R.; AZEREDO, J. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. **J. Appl. Microbiol.** v. 106, p. 1919–1927. 2009.

OZBEY, G.; ERTAS, H.B. *Salmonella* spp. isolation from chicken samples and identification by polymerase chain reaction. **Bulg. J. Veter. Med.** v. 1, p. 67-73. 2006.

PADRON, M.N. *Salmonella* Typhimurium penetration through the eggshell of hatching eggs. **Avian. Dis.** v. 34, p. 463-5. 1990.

PANISELLO, P.J.; ROONEY, R.; QUANTIC, P.C.; STANWELL-SMITH, R. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance os HACCP systems. **Int. J. Food Microbiol.** v. 59, p. 221-234. 2000.

PAO, S.; RANDOLPH, S.P. WESTBROOK, E.W. SHEN, H. Use of bacteriophages to control *Salmonella* in experimentally contaminated sprout seeds. **J. Food Sci.** v. 69, p. 127-130. 2004.

PENHA, G.A.; SUZUKI, E.U.; EUDA, F.S.; PEREIRA, R.E.P. Diagnóstico da salmonelose e sua importância para a avicultura: Revisão de Literatura. **Rev. Cient. Eletrôn. Med. Veterin.** Ano VI, n. 10. 2008.

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

ROBESON, J.; RETAMALES, J.; BORIE, C. Genomic variants of bacteriophages against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with potential application in the poultry industry. **Rev. Bras. Ciên. Avíc.** v. 10, n.3, p. 173 – 178. 2008.

SCHOOLNIK, G.K.; SUMMERS, W.C.; WATSON, J.D. Phage offer a real alternative. **Nat. Biotechnol.** v. 22, n. 5, p. 505-506. 2004.

SCHUCH, R.; NELSON, D.; FISCHETTI, V.A. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. **Nature** (London). v. 418, p. 884– 889. 2002.

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. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, p. 2959-2965. 2004.

SILVA, E.N.; BOSQUIROLI, S.L. Epidemiological occurrence of *Salmonella* in a broiler integrated company. In: **World Poultry Congress**; New Delhi, India. p.385-389. 1994.

SILVA, E.A.J. **Manual de controle higiênico – sanitário em alimentos**. 3a ed. São Paulo : Varela, p. 3-394. 1999.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R. F.S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª ed. 2007.

SINTON, L.W.; FINLAY, R.K.; HANNAH, D.J. Distinguishing human from animal faecal contamination in water: A review. **New Zealand J. Marine and Freshw. Reseach.** v. 32, p. 323–348. 1998.

SKURNIK, M.; STRAUCHB, E. Phage therapy: facts and fiction. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 296, p. 5-14. 2006.

SOLARI, C.A. Pesquisa – Análise da participação de aves e répteis na cadeia epidemiológica de enteropatógenos de importância médica e veterinária. Instituto Oswaldo Cruz. 2000. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/projetos/bacteriologia/010.htm>. Acesso em 20/11/09.

SU, L.H.; CHIU, C.H. Salmonella: Clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung Med. J.**, v. 30, n. 3, p. 210-219. 2007.

TANJI, Y.K.; MIZOGUCHI, M.; YOICHI, M.; MORITA, N.; KIJIMA, H.; KATOR, H.; UNNO. Seasonal change and fate of coliphages infected to *Escherichia coli* O157:H7 in a wastewater treatment plant. **Water Res.** v. 37, p. 1136–1142. 2003.

THIEL, K. Old dogma, new tricks – 21st Century phage therapy. **Nat. Biotechnol.**, v. 22, p. 31-36. 2004.

TINDALL, B.J.; GRIMONT, P.A.D.; GARRITY, G.M.; EUZEBY, J.P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 55, p. 521-524. 2005.

TORO, H.; PRICE, S.B.; MCKEE, S.; HOERR, F.J.; KREHLING, J.; PERDUE, M.; BAUERMEISTER, L. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. **Avian. Dis.** v. 49, p. 118–124. 2005.

TOZETTO, S.M. **Sorotipos e tipagem molecular de isolados de *Salmonella enterica* no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004.** Curitiba. 2006. 83p. Dissertação [Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas] – Universidade Federal do Paraná. PR. 2006.

United States Department of Agriculture – USDA Circular Series, 2008 – Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Disponível em: http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2008/livestock_poultry_04-2008.pdf. Acesso em 18/12/2009.

WAGENAAR, J.; VAN B.M., MELLER M.; WASSENAAR T.; CARTON R. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. **Vet. Microbiol.** v. 109, p. 275-283. 2005.

WAGNER, P.L.; WALDOR, M.K. Bacteriophage control of bacterial virulence. **Infect. Immun.** v. 70, p. 3985-3993. 2002.

WEINBAUER, M.G.; RASSOULZADEGAN, F. Are viruses driving microbial diversification and diversity? **Environ. Microbiol.** v. 6, n. 1, p. 1-11. 2004.

WITHEY, S.; CARTMELL, E.; AVERY, L.M.; STEPHENSON, T. Bacteriophages potencial for application in wastewater treatment processes. **Scien. Total Environ.** v. 339, p. 1-18. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets>. Acesso em: 13 nov.2005.

YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J.W.; FEDORKO, D. P.; FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. **Clin. Appl. Immunol. Reviews.** v. 4: p. 189-204. 2003.

ZHAO, S.; McDERMOTT, P.F.; FRIEDMAN, S.; QAIYUMI, S.; ABBOTT, J.; KIESSLING, C.; AYERS, S.; SINGH, R.; HUBERT, S.; SOFOS, J.; WHITE, D.G. Characterization of antimicrobial-resistant *Salmonella* isolated from imported foods. **J. Food Prot.** v. 69, n. 3, p. 500-507. 2006.