

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LUIZ AUGUSTO AGUIAR ALBINO

UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS NO BIOCONTROLE DE *Salmonella* sp.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A336u  
2016 Albino, Luiz Augusto Aguiar, 1986-  
Utilização de bacteriófagos no biocontrole de  
*Salmonella* sp. / Luiz Augusto Aguiar Albino. - Viçosa, MG,  
2016.  
xvii, 115f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador : Regina Célia Santos Mendonça.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.96-115.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Bacteriófagos.  
3. *Salmonella* - Controle biológico. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.  
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

LUIZ AUGUSTO AGUIAR ALBINO

**UTILIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS NO BIOCONTROLE DE *Salmonella* sp.**

Tese 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 Doctor Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

LUIZ AUGUSTO AGUIAR ALBINO

**UTILIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS NO BIOCONTROLE DE *Salmonella* sp.**

Tese 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 Doctor Scientiae.

APROVADA: 4 de fevereiro de 2016

---

Edimar Aparecida Filomeno Fontes

---

Melissa Izabel Hannas  
(Coorientadora)

---

Humberto Moreira Húngaro

---

Wilmer Edgard Luera Penã

---

Regina Célia Santos Mendonça  
(Orientadora)

A deus, meus pais, minhas irmãs,  
minha esposa, minha filha  
e aos meus amigos

**DEDICO**

*“O único homem que nunca comete erros é aquele que nunca faz coisa alguma. Não tenha medo de errar, pois você aprenderá a não cometer duas vezes o mesmo erro. Se errar, ao menos que erre ousando grandes feitos, de modo que a sua postura não seja nunca a dessas almas frias e tímidas que não conhecem nem a vitória nem a derrota.”* (Theodore Roosevelt)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Vanja, pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida.

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

À minha esposa, Ana Carolina pelo carinho, cumplicidade, incentivo, companheirismo e especialmente pela paciência! Sem você não conseguiria chegar até aqui, obrigado meu amor!

À minha querida filha Ana Luiza, agradeço por alegrar minha vida e por tudo que vivemos e viveremos juntos.

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

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), pela amizade, ajuda, e apoio durante os experimentos.

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

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

À Purdue University, pela oportunidade da realização do curso de doutorado sanduíche.

Aos Professores Marcos Horácio Rostagno e Paul D. Ebner, pela confiança, amizade e orientação durante o doutorado sanduíche.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos os meus amigos pelo apoio, amizade, companheirismo e por sempre me desejarem o melhor.

E todos aqueles que de alguma forma contribuíram,

meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIACES .....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUO GERAL.....	1
2. REVISO DE LITERATURA.....	3
2.1. Salmonella spp.....	3
2.1.1. Caractersticas.....	3
2.1.2. Nomenclatura .....	3
2.1.3. Classificao .....	4
2.1.4. Salmonelose em humanos .....	6
2.1.5. Salmonelose em sunos .....	7
2.1.6. Salmonelose em aves .....	8
2.2. Carne suna .....	8
2.2.1. Produo .....	9
2.2.2. Consumo .....	10
2.3. Ovo.....	12
2.3.1. Composio .....	12
2.3.2. Formao do Ovo.....	14
2.3.3. Produo e consumo.....	16
2.4. Infeces por Salmonella de origem alimentar .....	17
2.4.1. Contaminao por Salmonella em carne suna.....	18
2.4.2. Contaminao de ovos por Salmonella.....	21
2.5. Antibioticos e antimicrobianos .....	24
2.5.1. Resistncia  antibioticos .....	26
2.5.2. Salmonella resistente  antimicrobianos.....	29
2.6. Bacteriofagos.....	31
2.6.1. Descoberta e utilizao .....	31
2.6.2. Caractersticas.....	32
2.6.3. Utilizao dos bacteriofagos na indria de alimentos.....	34
3. OBJETIVOS .....	36
Objetivo Geral .....	36
Objetivo especficos .....	36
4. CAPTULO I.....	37

UTILIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS LIVRES E MICROENCAPULADOS NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO DE <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS EM GALINHAS POEDEIRAS E SEU EFEITO NA TRANSLOCAÇÃO EM OVOS .....	37
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
2.1. Micro-organismos .....	42
2.2. Propagação e titulação do bacteriófago.....	42
2.3. Microencapsulamento.....	43
2.4. Preparo da ração.....	44
2.5. Experimento 1 – Avaliação da utilização de bacteriófagos livres e microencapsulados em ovos de galinhas poedeiras contaminadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis. ....	45
2.5.1. Delineamento experimental .....	45
2.5.2. Análises microbiológicas .....	46
2.6. Experimento 2 – Avaliação dos tratamentos em ovos após a contaminação com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	47
2.6.1. Preparação da suspensão de bacteriófagos.....	47
2.6.2. Preparação dos ovos.....	48
2.6.3. Delineamento experimental .....	48
2.6.4. Análises microbiológicas .....	49
2.7. Análise estatística.....	49
3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	49
3.1. Experimento 1 - Avaliação da utilização de bacteriófagos livres e microencapsulados em ovos de galinhas poedeiras contaminadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis. ....	49
3.2. Experimento 2 - Avaliação dos tratamentos em ovos após a contaminação com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	55
4. CONCLUSÃO .....	64
5. CAPÍTULO II.....	65
CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM E <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS EM ALIMENTOS UTILIZANDO BACTERÍOFAGOS .....	65
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	68
2.1. Micro-organismos hospedeiros.....	68
2.2. Isolamento dos bacteriófagos .....	69
2.3. Seleção e caracterização dos bacteriófagos.....	69
2.4. Avaliação da eficiência de bacteriófagos na redução de <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>Salmonella</i> Enteritidis em carne suína moída e em ovos líquidos .....	70
2.4.1. Coleta e seleção das amostras.....	70
2.4.2. Delineamento experimental .....	71

2.4.3.	Inoculação de bactérias e bacteriófagos em amostras de carne suína moída e em ovos líquidos.....	72
2.4.4.	Análises estatísticas .....	72
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	72
3.1.	Isolamento e caracterização do bacteriófago.....	72
3.2.	Avaliação da eficiência de bacteriófagos na redução de Salmonella Typhimurium e Salmonella Enteritidis em carne suína moída.....	75
4.	CONCLUSÃO .....	80
6.	CAPÍTULO III.....	81
	AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE LEITÕES APÓS A UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS E ANTIBIÓTICOS .....	81
1.	INTRODUÇÃO.....	83
2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	85
2.1.	Micro-organismo.....	85
2.2.	Animais.....	85
2.3.	Delineamento experimental .....	85
2.4.	Extração do DNA.....	86
2.5.	Quantificação do DNA .....	87
2.6.	Amplificação por PCR da região 16S rRNA .....	88
2.7.	Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE) .....	88
2.8.	Análise dos amplicons formados no DGGE .....	89
2.9.	Análises estatísticas .....	89
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	90
3.1.	Quantificação do DNA presente nas amostras .....	90
3.2.	PCR e DGGE .....	91
4.	CONCLUSÃO .....	95
5.	REFERÊNCIAS .....	96

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1.	Classificação do gênero de Salmonella. São listados os sorotipos mais comumente encontrados estão listados, mas outros sorotipos também podem causar bacteremia e infecções focais. ....	6
Figura 2.	Evolução do abate anual de suínos. ....	10
Figura 3.	Estruturas do ovo. (1) Câmara de ar; (2) Chalaza; (3) Gema; (4) Albúmen; (5) Chalaza; (6) Membrana; (7) Casca do ovo.....	13
Figura 4.	Sistema reprodutor feminino de aves.....	15
Figura 5.	Principais fontes de contaminação por Salmonella na fazenda. Contaminação cruzada pelo homem (1); Insetos (2); Fezes (3); Higiene e tipo de piso (4); Oral-fecal (5); Ração e água (6); Roedores (7); Pássaros (8); Ventilação (9) .....	19
Figura 6.	Linha do tempo das descobertas e desenvolvimentos dos antibióticos.....	25
Figura 7.	Possíveis rotas para o desenvolvimento da resistência a antibióticos.....	27
Figura 8.	Ciclos de vida apresentados pelos bacteriófagos nas bactérias hospedeiras.....	33

### CAPÍTULO I

Figura 1.	Percentual de detecção de Salmonella Enteritidis (A) e bacteriófagos (B) nas cascas de ovos durante o período de postura para os diferentes tratamentos. T1 – ACSE, T2 – ACSE + BL, T3 – ACSE + BM, T4 – BL e T5 – BM.....	50
Figura 2.	Percentual de detecção de Salmonella Enteritidis (A) e bacteriófagos (B) nas claras de ovos durante o período de postura para os diferentes tratamentos. T1 – ACSE, T2 – ACSE + BL, T3 – ACSE + BM, T4 – BL e T5 – BM.....	51
Figura 3.	Percentual de detecção de Salmonella Enteritidis (A) e bacteriófagos (B) nas gemas de ovos durante o período de postura para os diferentes tratamentos. T1 – ACSE, T2 – ACSE + BL, T3 – ACSE + BM, T4 – BL e T5 – BM.....	53
Figura 4.	Pasteurização dos ovos.....	55
Figura 5.	Efeito da aplicação (sim) ou não da higienização (a), da pasteurização (b) e de bacteriófagos (c) das amostras de casca dos ovos incubados a 4 °C, em relação ao crescimento médio do patógeno ao longo do tempo.	58
Figura 6.	Efeito da aplicação (sim) ou não da higienização (a), da pasteurização (b) e de bacteriófagos (c) das amostras de clara, de	

	gema e de casca dos ovos incubados a 7 °C, em relação ao crescimento médio do patógeno ao longo do tempo.	60
Figura 7.	Efeito da aplicação (sim) ou não da higienização (a), da pasteurização (b) e de bacteriófagos (c) das amostras de clara, de gema e de casca dos ovos incubados a 24 °C, em relação ao crescimento médio do patógeno ao longo do tempo.	63

## **CAPÍTULO II**

Figura 1.	Resultado do perfil de lises dos bacteriófagos DR e CHI em <i>Salmonella Typhimurium</i> e <i>Salmonella Enteritidis</i> .....	73
Figura 2.	Identificação morfológica dos bacteriófagos DR e CHI por MET.....	75

## **CAPÍTULO III**

Figura 1.	DGGE de amplicons da região V3 do rDNA 16S das amostras microbianas presente no ceco dos animais. Gradientes de desnaturação de (30 – 60) %, separados por seus respectivos tratamentos. M representa o marcador molecular utilizado.....	91
Figura 2.	DGGE de amplicons da região V3 do rDNA 16S das amostras microbianas presente no colón dos animais. Gradientes de desnaturação de (30 – 60) %, separados por seus respectivos tratamentos. M representa o marcador molecular utilizado.....	92
Figura 3.	Dendograma.....	93

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1.	Número de sorotipos de cada espécie e subespécie de Salmonella..	4
Tabela 2.	Exemplo de sorotipos de Salmonella de significância clínica e síndromes de significância clínica de acordo com cada sorogrupo...	5
Tabela 3.	Balanço da produção mundial de carnes.....	9
Tabela 4.	Consumo de carne per capita (kg) nos principais países desenvolvidos e em desenvolvimento.....	11
Tabela 5.	Balanço da produção mundial de ovos de galinha nos últimos 5 anos.....	16
Tabela 6.	Evolução da resistência a antibióticos de uso clínico.....	29
Tabela 7.	Famílias de bacteriófagos definida pelo ICTV.....	32

### CAPÍTULO I

Tabela 1.	Ingredientes e composição nutricional da ração basal.....	44
Tabela 2.	Concentração das médias de Salmonella Enteritidis (log UFC·mL <sup>-1</sup> ) presentes na casca dos ovos incubados a 4 °C .....	56
Tabela 3.	Médias da contagem de Salmonella Enteritidis (log UFC·mL <sup>-1</sup> ) nas amostras de clara, de gema e de casca dos ovos incubados a 7 °C.	59
Tabela 4.	Médias da contagem de Salmonella Enteritidis (log UFC·mL <sup>-1</sup> ) nas amostras de clara, de gema e de casca dos ovos incubados a 24 °C .....	62

### CAPÍTULO II

Quadro 1.	Tratamentos realizados no experimento para cada matriz alimentar.	71
Tabela 1.	Resultado das médias de contagem (log <sub>10</sub> UFC.g <sup>-1</sup> ± desvio padrão) de Salmonella Typhimurium e Salmonella Enteritidis presentes nas amostras de carne suína moída após os tratamentos.....	76
Tabela 2.	Resultado das médias de contagem (log <sub>10</sub> UFC.g <sup>-1</sup> ± desvio padrão) de Salmonella Typhimurium e Salmonella Enteritidis presentes nas amostras de ovos líquidos após os tratamentos.....	78

### CAPÍTULO III

Tabela 1.	Protocolo para a criação da curva padrão.....	87
Quadro 1.	Quantificação (ng/μL) das amostras de DNA presentes nas fezes de cada local do intestino em seu respectivo animal e seu respectivo tratamento.....	90

## LISTA DE ABREVIACES

ABPA – Associao Brasileira de Protena Animal  
ANVISA – Agncia Nacional de Vigilância Sanitária  
BHI – Infusão de Crebro e Corao  
CDC – Center for Disease and Control  
DES – Diarreia Epidmica Suna  
DGGE - Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturao  
ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control  
EFSA – European Food Safety Authority  
EMA – European Medicines Agency  
FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations  
FDA – Food and Drug Administration  
FoodNet – Foodborne Diseases Active Surveillance Network  
HDL – Lipoprotenas de Alta Densidade  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatstica  
ICTV – International Committee on the Taxonomy of Viruses  
IOB – Instituto Ovos Brasil  
LEDS – Laboratory-based Enteric Disease Surveillance  
LDL – Lipoprotenas de Baixa Densidade  
LPS – Lipopolissacardio  
Mt. – Milhes de toneladas  
NARMS – National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria  
OECD – Organization for Economic Co-operation and Development  
PNDS – Projeto Nacional de Desenvolvimento da Suinocultura  
RV – Caldo Rappaport-Vassiliadis  
TB – Caldo Tetracionato  
TSB – Caldo Triptona de Soja  
UFV – Universidade Federal de Viosa  
USDA – United States Department of Agriculture  
UFC – Unidade Formadora de Colonia  
UFP – Unidade Formadora de Placa  
WHO – World Health Organization  
XLT4 - Xilose Lisina Tergitol 4

## RESUMO

ALBINO, Luiz Augusto Aguiar, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Utilização de bacteriófagos no biocontrole de Salmonella sp.** Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Coorientadores: Marcos Horácio Rostagno, José Antônio Marques Pereira e Melissa Izabel Hannas.

A elevação da produção e comercialização de alimentos é acompanhada pelo aumento das infecções, hospitalizações e mortes relacionadas ao consumo de alimentos contaminados. Entre os alimentos relacionados a infecções alimentares, podemos destacar a carne suína e os ovos, como os principais responsáveis pelos casos de infecções alimentares, e o principal patógeno envolvido no consumo destes alimentos no mundo, são *Salmonella Enteritidis* em ovos e *Salmonella Typhimurium* em carne suína. O uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal promoveu diversos mecanismos de resistência em *Salmonella*, dificultando o controle e a eliminação deste patógeno. Desta forma, há uma necessidade de desenvolvimento de novas práticas terapêuticas e os bacteriófagos ressurgem como uma alternativa de controle. O objetivo deste trabalho foi isolar e avaliar a atividade de bacteriófagos contra *Salmonella Typhimurium* e/ou *Salmonella Enteritidis* em poedeiras, ovos, suínos e na carne suína. No primeiro capítulo é apresentada a utilização de bacteriófagos em poedeiras e nas superfícies de ovos para a avaliação de seu efeito como método de controle de *Salmonella Enteritidis*. Foram realizados 2 experimentos distintos. O primeiro experimento avaliou o efeito de bacteriófagos livres e microencapsulados em ovos (clara, gema e casca) de galinhas poedeiras contaminadas com *Salmonella Enteritidis*. Foram utilizadas 50 poedeiras, distribuídas em 5 tratamentos, sendo T1 – Controle positivo – Aves contaminadas com *Salmonella Enteritidis* (ACSE); T2 – ACSE e inoculadas com bacteriófagos livres (BL); T3 – ACSE e inoculadas com bacteriófagos microencapsulados (BM); T4 – Não CSE e inoculadas com BL; T5 – Não CSE e inoculadas com BM. As aves do T1, T2 e T3 foram contaminadas oralmente pela ingestão de 1 mL de *Salmonella Enteritidis* ( $\sim 10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup>) enquanto os tratamentos T4 e T5 receberam apenas 1 mL de solução tampão PBS esterilizado. Seis horas após a inoculação do patógeno, e em todo período experimental, as aves do T2 e T4 receberam 1 mL da suspensão de bacteriófagos ( $\sim 10^9$  UFP·mL<sup>-1</sup>), enquanto as aves dos tratamentos T3 e T5 receberam

1 mL da suspensão de bacteriófagos micro encapsulados ( $\sim 10^6$  UFP $\cdot$ mL $^{-1}$ ). As aves tratadas com bacteriófagos livres apresentaram menor detecção do patógeno na superfície da casca, sugerindo que possa ter ocorrido redução da contaminação pelo patógeno. Foi possível isolar bacteriófagos na casca de todos os tratamentos em que ele foi utilizado. Além disso, também foi possível seu isolamento na clara dos ovos do T2. A utilização de bacteriófagos não eliminou o patógeno, mas reduziu o número de amostras positivas ao longo do tempo. O experimento dois avaliou diferentes metodologias de higienização de ovos em relação à presença de *Salmonella Enteritidis* em diferentes temperaturas e intervalos de tempo. Os ovos (n = 720) foram separados em 8 grupos contendo três diferentes combinações de tratamentos, com 90 ovos cada, sendo os tratamentos: higienizado (H), não higienizado ( $\bar{H}$ ), pasteurizado (P), não pasteurizado ( $\bar{P}$ ), com bacteriófagos (B), e sem bacteriófagos ( $\bar{B}$ ), sendo representados por T1 ( $\bar{H}\bar{P}\bar{B}$ ), T2 ( $\bar{H}\bar{P}B$ ), T3 ( $\bar{H}P\bar{B}$ ), T4 ( $\bar{H}PB$ ), T5 ( $H\bar{P}\bar{B}$ ), T6 ( $H\bar{P}B$ ), T7 ( $HP\bar{B}$ ), T8 ( $HPB$ ). Os tratamentos foram incubados a 4 °C, 7 °C e 24 °C e analisados nos intervalos de 1, 3, 7, 14 e 28 dias. A presença do patógeno foi observada em todas as amostras de casca incubada em todas as temperaturas e intervalos de tempos. Entretanto sua detecção na clara e na gema não foi possível quando os ovos foram incubados a 4 °C. Os tratamentos higienizados (T5 ( $H\bar{P}\bar{B}$ ), T6 ( $H\bar{P}B$ ), T7 ( $HP\bar{B}$ ) e T8 ( $HPB$ )) apresentaram os maiores valores ( $p < 0,05$ ) em relação aos outros tratamentos ao longo do tempo nas diferentes temperaturas. Além disso, o tratamento T2 ( $\bar{H}\bar{P}B$ ) obteve, os menores valores médios de crescimentos ( $\log$  UFC $\cdot$ mL $^{-1}$ ) do patógeno em todas as temperaturas e amostras analisadas ( $p < 0,05$ ). Estes resultados sugerem que a higienização e a pasteurização dos ovos podem contribuir para a contaminação e penetração do patógeno ao longo do tempo, mesmo em baixas temperaturas. Além disso, a utilização de bacteriófagos resultou em uma contagem média ( $\log$  UFC $\cdot$ mL $^{-1}$ ) do patógeno inferior na maioria dos tratamentos em que foi utilizado. O capítulo dois apresenta o isolamento de bacteriófagos específicos para as duas principais estirpes de *Salmonella* e sua utilização no controle do patógeno em ovos líquidos e em carne suína moída. Os ovos líquidos e a carne moída suína foram contaminados com os patógenos, incubados a 4 °C e a 24 °C e as amostras analisadas quanto a redução do patógeno em diferentes intervalos de tempos (1 dia, 7 dias e 14 dias. A Multiplicidade de Infecção (MOI) utilizada em todos os tratamentos foi de  $1 \times 10^1$  UFP/UFC. Foi possível observar redução significativa ( $p < 0,05$ ) da

concentração dos patógenos em todos os tratamentos realizados a 24 °C. A 4 °C o bacteriófago foi capaz de reduzir ( $p < 0,05$ ) a concentração de *Salmonella* Typhimurium em um dia e uma semana de incubação na carne suína moída e no ovo líquidos. Entretanto, só foi possível observar a redução ( $p < 0,05$ ) de *Salmonella* Enteritidis nas amostras de carne suína moída incubadas por 1 dia e 1 semana a 4 °C. Após duas semanas de inoculação a 4 °C não houve redução significativa ( $p > 0,05$ ) dos patógenos em nenhum dos alimentos avaliados. Os maiores índices de redução ocorreram a 4 °C quando *Salmonella* Typhimurium foi o hospedeiro, sendo de  $1,65 \log_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  em carne suína moída e  $3,14 \log_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$  em ovos líquidos. Concluiu-se que o bacteriófago foi capaz de reduzir a contaminação de *Salmonella* Typhimurium em ambos alimentos, entretanto seu efeito foi não significativo para o controle de *Salmonella* Enteritidis em ovos líquidos. O terceiro capítulo teve como objetivo avaliar o efeito causado pelos bacteriófagos no trato gastrointestinal de suínos em relação ao efeito causado pelos antibióticos utilizados como melhoradores de desempenho. Dezoito suínos utilizados para o experimento foram divididos em três tratamentos: Tratamento controle (TC), tratamento com antibióticos (TA) e tratamento com bacteriófagos (TB). A ração dos suínos do TA foi suplementada com AUREO S-P 250®. Os animais do TB receberam diariamente, via oral, 5 mL do coquetel contendo  $1,0 \times 10^{10} \text{UFP}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bacteriófagos e os suínos do TC receberam apenas a ração basal. Após os 21 dias de tratamento os animais foram novamente pesados e abatidos, e o conteúdo fecal do íleo, ceco e colón foram coletados para a realização das análises. Para avaliar a diversidade de bactérias no colón, íleo e ceco, a região V3 do gene 16S rRNA do DNA metagenômico foi amplificada pela reação da polimerase em cadeia (PCR), usando os primers 338F e 518R e analisada pela DGGE. Analisando o dendograma foi possível observar que a maioria das amostras do ceco e do cólon se agruparam de forma heterogênea. Estes agrupamentos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,01$ ) na composição microbiana presentes em cada amostra. Mesmo os efeitos dos tratamentos não terem se agrupado de forma homogênea no dendograma, os padrões de amplicons das amostras mostrou efeito significativo ( $p < 0,10$ ) somente na comparação entre o TA e o TC, enquanto para as outras comparações (TB x TC e TB x TA) os efeitos não foram significativos ( $p > 0,05$ ). Este resultado sugere uma pequena mudança na composição da microbiota dos animais do TB, apesar do resultado não ter sido estatisticamente significativo.

## ABSTRACT

ALBINO, Luiz Augusto Aguiar, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Utilization of bacteriophages on biocontrol of Salmonella sp.** Adviser: Regina Célia Santos Mendonça. Co-Advisers: Marcos Horácio Rostagno, José Antônio Marques Pereira e Melissa Izabel Hannas.

The increase in production and marketing of food is accompanied by an increase in infections, hospitalizations, and deaths related to the consumption of contaminated food. Among the foods related to food infections, we can highlight the pork and eggs as the main responsible for cases of foodborne illness, and the main pathogen involved in the consumption of these foods in the world, are Salmonella Enteritidis in eggs and Salmonella Typhimurium in pork. The indiscriminate use of antimicrobials in animal production promoted several mechanisms of resistance in Salmonella, making it difficult to control and elimination of this pathogen. Thus, there is a need to develop new therapeutic approaches and bacteriophages reappeared as a control alternative. The objective of this study was to isolate and evaluate the bacteriophage activity against Salmonella Typhimurium and / or Salmonella Enteritidis in laying, eggs, pigs and pork. In the first chapter is presented the use of bacteriophages in layers and the surfaces of eggs for the evaluation of its effect as Salmonella Enteritidis control method. Two separate experiments were performed. The first experiment assessed the effect of free and microencapsulated bacteriophage eggs (clear, yolk and shell) laying hens infected with Salmonella Enteritidis. 50 laying hens were distributed in five treatments: T1 - Positive Control - Poultry contaminated with Salmonella Enteritidis (ACSE); T2 - ACSE and inoculated with free bacteriophages (BL); T3 - ACSE and inoculated with microencapsulated bacteriophage (BM); T4 - Not CSE and inoculated with BL; T5 - Not CSE and inoculated with BM. The birds T1, T2 and T3 were infected orally by ingestion of Salmonella enteritidis 1 mL ( $\sim 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>) while T4 and T5 treatments only received 1 ml of PBS sterile buffer. Six hours after inoculation of the pathogen, and throughout the experimental period the birds T2 and T4 received 1 ml of suspension of bacteriophages ( $\sim 10^9$  PFU·mL<sup>-1</sup>), while birds T3 and T5 treatments received 1 ml of suspension micro encapsulated bacteriophages ( $\sim 10^6$  PFU·mL<sup>-1</sup>). The birds treated with free bacteriophages showed lower detection of the pathogen in the shell surface, suggesting that may have occurred reduction of contamination by the

pathogen. It was possible to isolate bacteriophage hulls of all treatments in which it was used. Furthermore, it was also possible in isolation of clear eggs T2. The use of bacteriophages did not eliminate the pathogen, but reduced the number of positive samples over time. The second experiment evaluated different eggs sanitization methods for the presence of Salmonella Enteritidis at different temperatures and time intervals. The eggs (n = 720) were separated into 8 groups containing three different combinations of treatments with 90 eggs each, the treatments being: sanitized (H) not sanitized ( $\bar{H}$ ), pasteurized (P), non-pasteurized ( $\bar{P}$ ), with bacteriophage (B) and without bacteriophages ( $\bar{B}$ ), being represented by T1 ( $H\bar{P}\bar{B}$ ), T2 ( $H\bar{P}B$ ), T3 ( $H\bar{P}\bar{B}$ ), T4 ( $H\bar{P}B$ ), T5 ( $H\bar{P}\bar{B}$ ), T6 ( $H\bar{P}B$ ), T7 ( $H\bar{P}\bar{B}$ ) and T8 ( $H\bar{P}B$ ). The treatments were incubated at 4 °C, 7 °C and 24 °C and analyzed at intervals of 1, 3, 7, 14 and 28 days. The pathogen was observed in all the samples incubated peel at all temperatures and time intervals. But its detection in the clear and the yolk was not possible when the eggs were incubated at 4 °C. The sanitized treatments (T5 ( $H\bar{P}\bar{B}$ ), T6 ( $H\bar{P}B$ ), T7 ( $H\bar{P}\bar{B}$ ), and T8 ( $H\bar{P}B$ )) showed the highest values ( $p < 0.05$ ) compared to other treatments over time at different temperatures. Furthermore, the treatment T2 ( $H\bar{P}B$ ), gave the smallest average values of growth ( $\log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) pathogen at all temperatures and the samples analyzed ( $p < 0.05$ ). These results suggest that the cleaning and pasteurization of eggs can contribute to contamination and pathogen penetration over time, even at low temperatures. Furthermore, the use of bacteriophages resulted in an average count ( $\log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) pathogen in the lower most treatments that was used. The chapter two presents the isolation of bacteriophages specific to the two main strains of Salmonella and their use in pathogen control in liquid egg and ground pork. Liquid egg and pork ground beef were contaminated with pathogens, incubated at 4 °C and 24 °C and the samples analyzed for the reduction of the pathogen in different time intervals (1 day, 7 days and 14 days. Multiplicity of Infection (MOI) used in all treatments was  $1 \times 10^1$  PFU/CFU. it was observed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) the concentration of pathogens in all treatments carried out at 24 °C. the bacteriophage 4 °C was able to reduce ( $p < 0.05$ ) the concentration of Salmonella typhimurium in a day and a week of incubation in the ground pork and egg liquids. However, it was only possible to observe a reduction ( $p < 0.05$ ) in Salmonella Enteritidis samples minced pork incubated for 1 day and 1 week at 4 °C. After two weeks of inoculation at 4 °C showed no significant reduction ( $p > 0.05$ ) of the pathogens in any of the evaluated food. the largest reduction

ratios occurred at 4 °C when Salmonella Typhimurium has been the host, and  $1.65 \log^{10} \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$  in ground pork and  $3.14 \log^{10} \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$  for liquid eggs. It was concluded that the bacteriophage is capable of reducing contamination of Salmonella Typhimurium in both foods, though its effect was not significant to control Salmonella Enteritidis in liquid eggs. The third chapter aimed to evaluate the effect caused by the bacteriophages in the gastrointestinal tract of pigs in relation to the effect caused by the antibiotics used as performance enhancers. Eighteen pigs used for the experiment were divided into three treatments: control treatment (TC) treatment with antibiotics (TA) and treated with bacteriophage (TB). The ration of the TA pigs was supplemented with AUREO S-P 250®. The animals received daily TB orally 5 ml cocktail containing  $1.0 \times 10^{10} \text{PFU}\cdot\text{ml}^{-1}$  bacteriophages and TC pigs received only the basal ration. After 21 days of treatment the animals were weighed again and killed, and the faecal contents of the ileum, cecum and colon were collected for the analyzes. To evaluate the diversity of bacteria in the colon, ileum and cecum, the gene 16S rRNA V3 region of metagenomic DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers 338F and 518R and analyzed by DGGE. Analyzing the dendrogram was observed that most of the samples of the cecum and colon were grouped heterogeneously. These groups showed significant differences ( $p < 0.01$ ) in the microbial composition present in each sample. Even the effects of treatments have not been grouped homogeneously in the dendrogram, amplicon patterns of the samples showed significant effect ( $p < 0.10$ ) only in the comparison between TA and TC, while other comparisons (TB x CT x TA and TB) the effects were not significant ( $p > 0.05$ ). This result suggests a slight change in the composition of the microbiota of animals of TB, despite the result was not statistically significant.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento econômico dos países emergentes, somados ao crescimento da população mundial, resultaram em uma demanda elevada da produção de alimentos. Com o aumento da renda, a população tem a opção de diversificar a dieta, sendo a proteína animal o principal item escolhido (HEINRICH BÖLL FOUNDATION, 2014; FAO,2015). Dentre os alimentos de origem animal mais consumidos no mundo, podemos destacar a carne suína e os ovos (KAYSER, NITZKO e SPILLER, 2013). A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo, sendo praticamente o dobro da carne bovina (McGLONE, 2013; ABPA, 2014; FAOSTAT, 2015). Já o ovo é considerado o alimento mais completo que existe, compostos por proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, resultado de uma eficiente transformação biológica feita pela poedeira (BERTECHINI e MAZZUCO, 2013).

A elevação da produção, consumo e da comercialização de alimentos tem sido acompanhada pelo aumento das infecções, hospitalizações e mortes relacionadas ao consumo de alimentos contaminados. Entre os alimentos relacionados a infecções alimentares, podemos destacar a carne suína e os ovos como os principais responsáveis por casos de infecções alimentares e os principais patógenos associados ao consumo destes alimentos no mundo, são Salmonella Enteritidis em ovos e Salmonella Typhimurium em carne suína (EFSA, 2015; CDC, 2015a). Estes patógenos pertencem ao grupo de patógenos resistentes a antimicrobianos que mais preocupam os setores de saúde pública (CDC, 2013).

Para reduzir a incidência clínica de patógenos resistentes a antibióticos, diversos países estão proibindo a utilização de antibióticos nos sistemas de criação de animais e estimulando a redução de sua prescrição para humanos (ANDERSSON e HUGHES, 2010; MATHER et al., 2013; WHO, 2015). Além disto, outro fator que estimula a remoção dos antibióticos da cadeia de produção de animais, é o crescente aumento do interesse do consumidor por alimentos produzidos de forma orgânica e livres de resíduos químicos, entre eles os antibióticos (LI et al., 2011; BAJPAI et al., 2012; RICKE et al., 2012; VAN LOO et al., 2012). Esta nova tendência alimentar vem estimulando o desenvolvimento de novas metodologias de controle biológico de patógenos, visando aumentar a segurança e a qualidade dos alimentos.

Com isto, os bacteriófagos ressurgem como uma importante estratégia no controle de patógenos, já que podem ser utilizados em todos os estágios da linha de produção de alimentos sem, contudo, afetar as propriedades sensoriais do alimento. Diversas outras características favorecem sua utilização na indústria de alimentos como destaque pode-se citar, a capacidade dos bacteriófagos, ao contrário dos antibióticos, de evoluir para contornar os mecanismos de resistência da bactéria hospedeira (LABRIE et al., 2010). Como sua propagação depende da presença do hospedeiro, os bacteriófagos são auto limitantes, ou seja, permanecem estáveis em sua ausência e se replicam na presença do mesmo. Possuem natureza discriminatória, ou seja, a maioria dos bacteriófagos interagem apenas com um conjunto de bactérias que expressam determinados sítios de ligação e as bactérias sem esses receptores não são afetadas (VANDAMME e MIEDZYBRODZKI, 2013; PHOENIX et al., 2014). A ingestão de bacteriófagos poder ativar o sistema imune de humanos e de animais caso não seja purificado e livre de partículas bacterianas, apesar disso, nenhum estudo relatou complicações imunológicas ou efeitos colaterais com o consumo de elevadas quantidades de bacteriófagos até a presente data (SARKER et al., 2012; McCALLIN et al., 2013; ENDERESSEN et al., 2014). Apesar de não terem sido relatados efeitos colaterais, pouco se sabe sobre o efeito dos bacteriófagos no interior do trato gastrointestinal.

A necessidade de produzir alimentos seguros em um cenário global onde as infecções alimentares crescem ao longo dos anos, somado a proibição da utilização de antibióticos na produção animal, é um desafio para a indústria de alimentos. Assim, os bacteriófagos ressurgem como uma potencial alternativa de controle e redução de patógenos, que apesar de apresentarem efeitos satisfatório, pouco se sabe sobre seu efeito na alimentação de poedeiras, em ovos, em carne suína e no interior do trato gastrointestinal de suínos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Salmonella spp.**

#### **2.1.1. Características**

Salmonella é principalmente encontrada no trato gastrointestinal de animais de sangue quente, incluindo o homem. O micro-organismo é excretado nas fezes, ocasionando a contaminação do ambiente. Alguns sorotipos podem ser encontrados em répteis e ocasionalmente em alguns insetos (ANDINO e HANNING, 2015). A bactéria pode permanecer viável por longos períodos no solo úmido ou na água, mas este mecanismo de sobrevivência, todavia não foi completamente elucidado (WALDNER et al., 2012).

São bastonetes gram negativos, móveis, possuem flagelo peritríquio (exceto os sorotipos Pullorum e Gallinarum), não formam esporos e são anaeróbios facultativos (LI et al., 2013). O perfil bioquímico caracteriza-se pela produção de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>) a partir da glicose e outros carboidratos, exceto a lactose. São oxidase negativa e catalase positivas e capazes de se multiplicarem utilizando citrato como única fonte de carbono. Também são capazes de descarboxilar lisina e ornitina, mas não são capazes de hidrolisar uréia. O pH ótimo para crescimento está entre 6,5 e 7,5 e a atividade de água entre 0,84 e 0,94 (ABULREESH, 2012; BEUCHAT et al., 2013). Diversos sorotipos podem crescer em temperaturas entre 5 °C e 47 °C com temperatura ótima de crescimento de 37 °C, mas em alguns casos também podem crescer em temperaturas baixas entre 2 °C e 4 °C e elevadas como 54 °C, por exemplo (PUI et al., 2011).

#### **2.1.2. Nomenclatura**

A nomenclatura de Salmonella adotada atualmente é baseada nas recomendações do World Health Organization (WHO), com colaboração do Centro de Pesquisa e Referência do Instituto Pasteur de Paris, na França, e novos sorotipos são listados anualmente pelo esquema White-Kauffmann-Le Minor scheme (GRIMONT e WEILL, 2007), que estabelecem adequadamente os requisitos necessários para sua utilização nas áreas clínica e de saúde pública por microbiologistas (DEB e KAPOOR, 2005). A classificação científica de Salmonella segue a seguinte ordem: Domínio: Bacteria; Filo: Protobacteria; Classe: Gamma Protobacteria; Ordem: Enterobacteriales; Família: Enterobacteriaceae.

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies (I – VI); *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (I); *Salmonella enterica* subespécie *salamae* (II); *Salmonella enterica* subespécie *arizonae* (IIIa); *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb); *Salmonella enterica* subespécie *houtenae* (IV); *Salmonella enterica* subespécie *indica* (VI), enquanto a *Salmonella bongori* possui os membros da subespécie V. A abreviação do nome da espécie de *Salmonella* é permitida, inicialmente é escrito o nome completo da espécie, por exemplo, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium e quando for escrever novamente use-se o primeiro nome da espécie e o último nome do sorotipo, *Salmonella* Typhimurium (GRIMONT e WEILL, 2007; BRENNER et al., 2000).

### 2.1.3. Classificação

O esquema White-Kaufmann-Le Minor scheme, inicialmente publicado em 1929, classificou *Salmonella* em mais de 2600 sorotipos baseado nas reações sorológicas apresentadas pelos antígenos de superfície lipopolissacarídica (O), flagelar (H) e capsular (Vi), conforme pode ser observado na Tabela 1 (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

Tabela 1. Número de sorotipos de cada espécie e subespécie de *Salmonella*

<b>Espécie</b>	<b>Subespécie</b>	<b>Número de sorotipos</b>
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	1586
	<i>salamae</i> (II)	522
	<i>arizonae</i> (IIIa)	102
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	338
	<i>houtenae</i> (IV)	76
	<i>indica</i> (VI)	13
<i>Salmonella bongori</i> (V)	-	22
<b>Total</b>		<b>2659</b>

Fonte: ISSENHUTH-JEANJEAN et al., (2014)

O antígeno “O” ou somático é a fração polissacarídica do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular das bactérias gram negativas. A cadeia lateral do antígeno “O” estende-se para a superfície bacteriana e a sequência específica de carboidratos que a formam variam entre as diferentes espécies bacterianas e mesmo entre os diversos sorotipos, caracterizando-os antigenicamente. O antígeno “H” está presentes nos flagelos e são compostos de subunidades proteicas chamadas flagelinas.

Diferentemente das outras enterobactérias a maioria das espécies de Salmonella são bifásicas, ou seja, podem apresentar alternadamente flagelos de fase 1 (específica) e fase 2 (não específica), cuja expressão é controlada por dois genes cromossômicos diferentes. Alguns sorotipos de Salmonella só apresentam flagelos de uma fase (monofásicas) e outras não apresentam flagelo (imóveis). O antígeno “Vi” ou capsular é um polímero polissacarídico sintetizado pela bactéria e depositado sobre a superfície externa da parede celular. Está presente em apenas três sorotipos: Salmonella Typhi, Salmonella Paratyphi C e Salmonella Dublin (SANDERSON e NAIR, 2013).

Reações de aglutinação baseadas no antígeno “O” são usadas pela maioria dos laboratórios de análises clínicas para separar Salmonella em sorogrupos, que incluem A, B, C1, C2, D e E. Estirpes destes seis grupos são as principais responsáveis pela maioria das salmoneloses em humanos e animais, podendo ser classificadas em dois grupos: febre enterica (tifóide) e salmonelose não tifoidal (SNT) (CURTIS e HAEUSLER, 2013) (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplo de sorotipos de Salmonella de significância clínica e síndromes de significância clínica de acordo com cada sorogrupo.

<b>Sorogrupo</b>	<b>Exemplo de Sorotipo*</b>	<b>Síndrome Clínica</b>
A	Paratyphi A	Febre entérica
B	Paratyphi B	Febre entérica
	Typhimurium	SNT
	Heidelberg	SNT
C1	Paratyphi C	Febre entérica
	Choleraesuis	SNT
	Virchow	SNT
C2	Newport	SNT
D1	Typhi	Febre entérica
	Enteritidis	SNT
	Dublin	SNT

Fonte: CURTIS e HAEUSLER (2013). SNT: Salmonelose não tifoidal. \* Todos os exemplos dos sorotipos são membros da subespécie de Salmonella enterica subespécie enterica

Os sorotipos de Salmonella também podem ser subdivididos em três tipos de hospedeiros que também influenciam na manifestação clínica (Figura 1): (1) Hospedeiro geral (sorotipos ubiqüitários), inclui Salmonella Typhimurium e Salmonella Enteritidis, responsáveis pelas infecções em humanos e em animais hospedeiros; produzem diversos sintomas clínicos, mas principalmente gastroenterite aguda e

auto limitante; (2) Hospedeiro adaptado (contido em um pequeno número de hospedeiros) como a *Salmonella* Dublin em bovinos e *Salmonella* Cholerasuis em suínos, que são os principais responsáveis pelas infecções sistêmicas nestes animais. Entretanto, estes sorotipos também são capazes de infectar humanos e um limitado número de outras espécies; (3) Hospedeiro restrito, são associados com as infecções sistêmicas severas causadas em um único hospedeiro. *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi causam febre entérica exclusivamente em humanos enquanto *Salmonella* Typhisuis causa febre paratifóide em suínos, *Salmonella* Gallinarum causa febre entérica em aves e *Salmonella* Abortusovis causa aborto em ovelhas (PUI et al., 2011; LI et al., 2013; SANDERSON e NAIR, 2013).

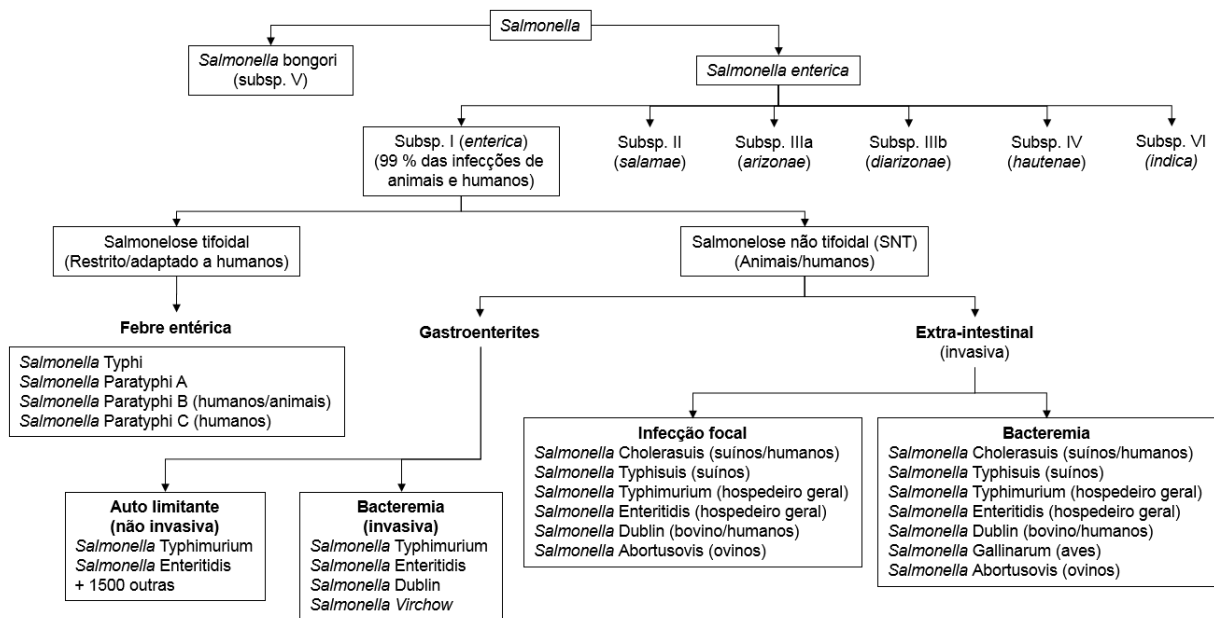


Figura 1. Classificação do gênero de *Salmonella*. Sorotipos comumente encontrados em bacteremias e infecções focais. Fonte: Adaptado de Sanderson e Nair (2013).

#### 2.1.4. Salmonelose em humanos

As doenças causadas por *Salmonella* podem ser divididas em dois grupos: a febre entérica ou tifóide, que tem como agentes etiológicos a *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi (A, B e C) e a SNT ou síndromes gastroentéricas, que são ocasionadas pelos demais sorotipos de *Salmonella* (MADIGAN et al., 2015). A síndrome gastroentérica é causada pela ingestão de alimentos que contenham quantidade suficiente de patógenos viáveis para infectar o hospedeiro e levar ao desenvolvimento da enfermidade. Os sintomas surgem entre 8 e 48 horas depois da

ingestão do alimento e tão logo haja a colonização do epitélio intestinal pelo patógeno e incluem o aparecimento súbito de cefaleia, calafrios, vômitos e diarreia, seguidos de febre que persiste por poucos dias. Os sintomas são, geralmente, acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, febre moderada, nervosismo e sonolência, os quais persistem por dois a três dias (JAY, LOESSNER e GOLDEN, 2005; HAMMACK, 2012; FOLEY et al., 2013). A doença, normalmente, desaparece sem qualquer intervenção clínica entre dois e cinco dias. Contudo, mesmo após a recuperação, os pacientes assintomáticos podem eliminar *Salmonella* em suas fezes por até seis meses. Até  $10^9$  UFC · g<sup>-1</sup> de *Salmonella* podem ser encontradas nas fezes de uma pessoa infectada durante a fase aguda da doença (TORTORA, FUNKE e CASE, 2013). O tratamento consiste em terapia de reposição de fluídos e eletrólitos via oral. Em casos severos a administração de antimicrobianos é indicada para crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (GREENWOOD et al., 2012).

#### **2.1.5. Salmonelose em suínos**

No caso de suínos a infecção por *Salmonella* ocorre principalmente pela via oral-fecal. A ração animal pode ser contaminada por meio de suplementos como farinha de carne, farinha de ossos, farinha de peixe e proteína de soja previamente contaminados ou veiculada pelas fezes de roedores, pássaros ou moscas presentes nas granjas (STEVENS e GRAY, 2013).

A salmonelose em suínos reflete comportamentos distintos dependendo do sorotipo de *Salmonella* que infectou o animal (Figura 1). Quando um suíno jovem é infectado por *Salmonella* Cholerasuis, sorotipo adaptado ao hospedeiro, desenvolve-se uma doença sistêmica sob a forma de septicemia causando uma alta taxa de mortalidade. Por outro lado, quando o animal é infectado pelos outros sorotipos de *Salmonella* ocorre uma enterite momentânea e o animal pode se torna portador assintomático do patógeno (ANDINO e HANNING, 2015). *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Derby são os sorotipos de maior prevalência encontrados na cadeia produtiva de suínos, além disso, 79,6 % dos isolados são resistentes a pelo menos um antibiótico (USDA/FIS, 2012).

### **2.1.6. Salmonelose em aves**

A infecção de aves por *Salmonella* ocorre praticamente da mesma maneira em que ocorre nos suínos, entretanto após colonizar o trato gastrointestinal, o patógeno pode penetrar na corrente circulatória e infectar diversos órgãos, como o aparelho reprodutor e a cloaca, por exemplo. A colonização destes órgãos pode gerar ovos contaminados, o que implica na transmissão vertical para os ovos. A incubação de ovos infectados pode resultar em decréscimo na curva de nascimento, além de provocar o paratifo aviário entre os pintinhos recém-nascidos e por intermédio dos animais contaminados, ocorre a disseminação do patógeno no ambiente (WHILEY e ROSS, 2015).

As quatro principais doenças causados por *Salmonella* em aves são: (1) Pulorose, causada por *Salmonella Pullorum*, ocorre principalmente em aves jovens, é caracterizada por diarreia branca e alta mortalidade. Como a transmissão é vertical (transovariana) pode causar a morte de até 100 % dos pintinhos; (2) Febre entérica ou tifo aviária, causada por *Salmonella Gallinarum*, doença com elevado índice de letalidade para aves de qualquer idade. A transmissão geralmente é vertical (transovariana), mas também pode ocorrer de forma horizontal, por diversas vias (SHIVAPRASAD, METHNER e BARROW, 2013); (3) Arizonose causada por *Salmonella enterica* subespécie *arizonae*, atinge principalmente perus e apresenta os mesmos sinais clínicos que a enfermidade provocada pelos sorotipos *Gallinarum* e *Pullorum*. Outros sorotipos também podem infectar perus, mas o sorotipo *arizonae* apresenta maior prevalência nestes animais (HAFEZ, 2013); (4) os sorotipos *Enteritidis*, *Typhimurium* e *Heidelberg*, por exemplo, causam febre paratifóide ou paratifo aviária, comumente confundida com a pulorose. Estes sorotipos se adaptam bem ao trato gastrointestinal das aves tornando-as portadoras assintomáticas do patógeno (ANDINO e HANNING, 2015).

## **2.2. Carne suína**

A carne suína possui grande importância na economia global por ser a fonte de proteína animal mais consumida no mundo. Possui sabor e maciez característico, além de ser fonte de proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos monoinsaturados, vitaminas do complexo B e diversos minerais (McGLONE, 2013).

A carne é um item alimentar frequentemente usado para a determinação da qualidade de vida de uma população. O crescimento da população mundial e o crescimento econômico de diversos países, tem aumentado a demanda mundial por proteína animal, exigindo aumentos na produção, principalmente a de carne suína (KAYSER, NITZKO e SPILLER, 2013).

### 2.2.1. Produção

A produção mundial de carne aumentou 1,3 % em 2015, correspondendo a 318,7 milhões de toneladas, sendo a carne suína o principal commodity responsável por este aumento, seguida pela carne de aves. As carnes bovina e ovina não apresentaram crescimentos significativos nos últimos 3 anos (Tabela 3) (FAO, 2015). Os principais países que contribuem significativamente para o aumento da produção de carne são: China com 15,3 milhões de toneladas (Mt), seguido pelos Estados Unidos com 6 Mt e pelo Brasil com 4,5 Mt. Segundo a Organization for Economic Cooperation and Development e o Food and Agriculture Organization of the United Nations (OECD-FAO), a produção mundial de carne aumentará cerca de 19 % até o ano de 2023, o que corresponde ao acréscimo de 57,7 Mt, ao total de carne produzida. Deste montante, a carne de aves representa 28,3 Mt, carne suína 16,7 Mt, carne bovina 9 Mt e carne ovina 3,8 Mt (OECD-FAO, 2014).

Tabela 3. Balanço da produção mundial de carnes

	2013	2014	2015 Estimativa*	Mudança em 2015 em relação a 2014
	Milhões de toneladas (Mt)			%
Carne bovina	67,8	67,8	67,9	0,2
Carne de aves	108,6	110,2	111,8	1,4
Carne suína	115,0	117,2	119,4	1,9
Carne ovina	13,9	13,9	14,0	0,8
<b>Produção Total</b>	<b>311,1</b>	<b>314,7</b>	<b>318,7</b>	<b>1,3</b>

Fonte: Adaptado de FAO (2015). \* Dados finais ainda não disponibilizados

A estimativa da produção mundial de carne suína poderia ter sido maior, não ocorrendo devido ao surto de epidêmica diarreia suína (DES) que ocorreu em 2014. Vários países tiveram considerável redução na produção devida à alta mortalidade de leitões contaminados pela doença (OECD-FAO, 2014). Este surto que atingiu os principais produtores mundiais de carne suína não chegou ao Brasil, colocando a carne suína brasileira em destaque no mercado internacional (BRASIL, 2015a).

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de carne suína, ficando atrás apenas da China, dos Estados Unidos e da União Europeia. As projeções da produção de carnes no Brasil mostram que esse setor deve apresentar intenso crescimento nos próximos anos. A produção total de carnes deve passar de 26 Mt em 2014 para 33,8 Mt em 2024, um acréscimo de 30 %. Entre as carnes, a de frango deve crescer 3,1 % anualmente, enquanto a carne suína 2,8 % e carne bovina 1,9 % (BRASIL, 2014a). Em 2014 foram abatidos 37.118 milhões de suínos, aumento de 2,3 % em relação a 2013. A evolução anual mostra um crescimento ininterrupto desta atividade desde os últimos 10 anos (Figura 2) (IBGE, 2015).

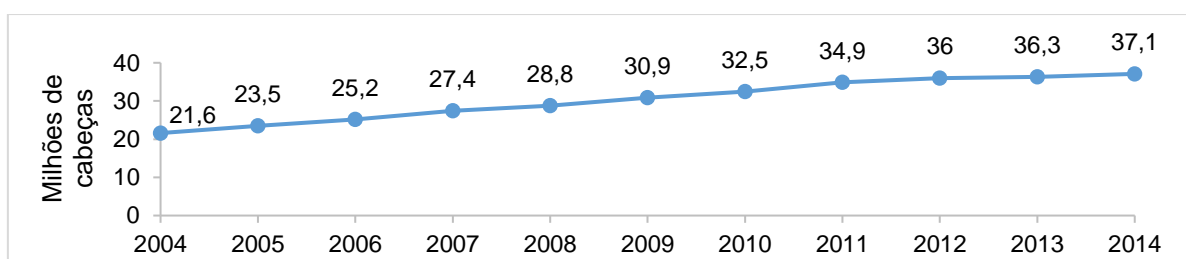


Figura 2. Evolução do abate anual de suínos. Adaptado de IBGE (2015)

O Brasil produziu 3,47 milhões de toneladas de carne suína em 2014, o que representa um crescimento de 1,75 % em relação a 3,41 milhões de toneladas produzidas em 2013. Esta produção contribui apenas com 3,1 % da produção mundial de carne suína, enquanto a carne bovina e de aves, contribui com 16,6 % e 14 %, respectivamente (USDA, 2015a). Com a redução da produção dos principais países produtores de carne suína, a suinocultura brasileira possui condições de expandir a produção e atender uma maior demanda.

### 2.2.2. Consumo

O crescimento do consumo (Tabela 4) é impulsionado pelos países em desenvolvimento, já que com o aumento da renda a população tem a opção de diversificar a dieta, sendo a carne o principal e primeiro item a ser escolhido (HEINRICH BÖLL FOUNDATION, 2014; FAO, 2015). O consumo de carne bovina permaneceu estável nos últimos 40 anos, mas o de carne de aves e carne suína obtiveram aumento considerável nos últimos 20 anos. O consumo de aves triplicou e o de carne suína teve aumento de 80 %, enquanto o consumo de carne bovina permaneceu praticamente inalterado (FAO, 2015; HEINRICH BÖLL FOUNDATION, 2014; USDA, 2015b).

Tabela 4. Consumo de carne per capita (kg) nos principais países desenvolvidos e em desenvolvimento

		2010-2012 valor estimado					2022 previsão					Mudança: 2010-2012 em relação a 2022
		Bovina	Suína	Aves	Ovina	Total	Bovina	Suína	Aves	Ovina	Total	%
<b>Desenvolvimento</b>	África do Sul	12,6	5,4	32,2	3,2	53,4	14,4	5,8	45,2	3,4	68,8	28,84
	Rússia	13,6	19,7	22,5	1,2	57	14,2	24,2	29,2	1,5	69,1	21,23
	China	3,4	29,2	11,1	2,7	46,4	3,8	34,1	13,6	2,7	54,2	16,81
	Brasil	29,3	11,1	41,5	0,4	82,3	30,4	12,3	47	0,4	90,1	9,48
	Índia	1	6,2	2	0,6	9,8	1,2	6,2	2,6	0,7	10,7	9,18
<b>Desenvolvidos</b>	Japão	6,8	14,9	12,8	0,2	34,7	7,3	15,3	12,7	0,2	35,5	2,31
	Austrália	22,9	20	38,8	8,4	90,1	22,1	21,5	39,6	8,6	91,8	1,89
	Nova Zelândia	19,1	15,5	31,6	8,8	75	16,8	15,7	32,5	10,2	75,2	0,27
	União Europeia	11,1	32,3	20,8	2	66,2	11	31,7	21,2	1,7	65,6	-0,91
	Estados Unidos	26,5	21,1	44,4	0,4	92,4	24,7	20,8	45,6	0,3	91,4	-1,08
	Canada	20,2	16,7	32,6	0,9	70,4	18,2	15,8	33,7	0,8	68,5	-2,70

Fonte: Adaptado de HEINRI.C.H BÖLL FOUNDATION (2014).

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo, sendo praticamente o dobro da carne bovina. Dentre os principais países consumidores de carne suína, a China vem em primeiro lugar, com 57,1 Mt consumidas em 2014. Em seguida, está o consumo da União Europeia, de 20,2 Mt, e o dos Estados Unidos, de 8,6 Mt. Em quarto lugar, aparece a Rússia que no ano passado consumiu 3,0 Mt de carne suína. O Brasil fica na quinta posição com o consumo de 2,7 Mt (USDA, 2015c).

No Brasil, diferente do panorama mundial, a carne bovina é a fonte de proteína animal mais consumida pelos brasileiros, seguida pela carne de frango e por último, em terceiro lugar, a carne suína. No entanto, o consumo de carne suína no Brasil cresce de forma gradativa. Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), cada brasileiro consumiu, em média, 15,1 kg de carne suína. Essa quantidade é inferior aos 41,8 kg de carne de frango e 41 kg de carne bovina consumidos por habitante em 2013 (ABPA, 2014). Muitas pessoas ainda acreditam que a carne suína é aquela produzida em condições de pouca higiene, contendo alto teor de gorduras e colesterol, que estão fortemente relacionadas aos problemas de saúde da modernidade. Porém, a carne de suínos é fruto da evolução tecnológica da indústria alimentícia, apresentando reduzido teor de gorduras, calorias e colesterol em relação a algumas décadas atrás (ABCS, 2011).

Por ser um mercado em expansão, o setor produtivo se esforça para difundir o aumento do consumo interno de carne suína, através do Projeto Nacional de Desenvolvimento da Suinocultura (PNDS), cujo objetivos são: a modernização da comercialização da carne suína e a generalização de boas práticas de produção da granja à mesa, que contribuem para consolidá-la como um produto saudável e nutritivo, produzido de forma tecnicamente correta, socialmente justa e ambientalmente responsável (ABCS, 2015; CONAB, 2014).

## **2.3. Ovo**

O ovo, assim denominado, entende-se por ovo de galinha em casca, sendo os demais acompanhados da indicação de espécie (BRAZIL, 1990).

### **2.3.1. Composição**

O ovo é um dos alimentos mais completos que existe, sendo composto por proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, resultado de uma eficiente transformação

biológica feita pela galinha poedeira. A ave transforma recursos alimentares de menor valor biológico em um produto com alta qualidade nutricional para o consumo humano. A transformação depende de fatores biológicos relacionados à fisiologia da ave e é influenciada pelo aporte nutricional e práticas de manejo e ambiente adequados para a sua criação (BERTECHINI e MAZZUCO, 2013).

Devido a sua composição nutricional e principalmente proteica, o consumo matinal de ovos é recomendando desde 1957 pelo o British Egg Marketing Board (Conselho Britânico de Comercialização de Ovos) como a principal fonte de proteína ingerida pela manhã (RUXTON, DERBYSHIRE e GIBSON, 2010). O Dietary Guidelines Advisory Committee (Comitê Consultivo de Orientações Dietéticas) e a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) recomendam a ingestão de no máximo um ovo por dia devido sua elevada composição lipídica, principalmente o colesterol. Entretanto outras pesquisas estão revisando esta recomendação (BERTECHINI e MAZZUCO, 2013; SANTOS et al., 2013; SHIN et al., 2013; USDA, 2015c).

O ovo é constituído por quatro partes principais, a casca, a membrana da casca, a clara (albúmen) e a gema (Figura 3). A casca representa cerca de 10 % do peso do ovo, enquanto a gema representa 30 % e o albúmen 60 %. A casca é constituída por carbonato de cálcio (94 %), carbonato de magnésio (1,4 %), glicoproteínas (3 %), mucoproteínas, colágeno e mucopolissacarídeos (MEDEIROS e ALVES, 2014). A parte mineral é composta por 98,2 % de carbonato de cálcio; 0,9 % de carbonato de magnésio e 0,9 % de fosfato de cálcio. A casca externa do ovo possui pequenos poros para a troca de gases, ou seja, entrada de oxigênio e saída do gás carbônico e umidade (KINGORI, 2011).

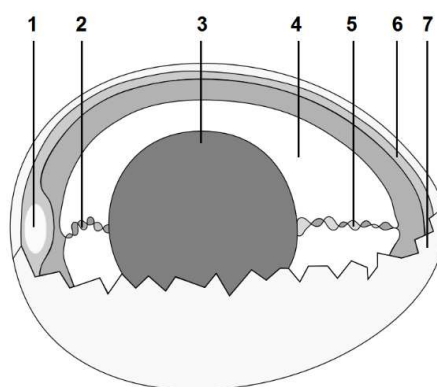


Figura 3. Estrutura do ovo. (1) Câmara de ar; (2) Chalaza; (3) Gema; (4) Albúmen; (5) Chalaza; (6) Membrana; (7) Casca do ovo.

O albúmen fica ao redor da gema e sua função é absorver impacto e servir como fonte de nutrientes para o embrião em desenvolvimento. Esta fonte de nutrientes é formada por uma solução composta por mais de 40 tipos de proteínas (ABDOU, KIM e SATO, 2013). A ovoalbumina representa mais de 50 % dos constituintes totais desta solução proteica, seguida pela ovotransferrina (12 %), ovomucóide (11 %), ovomucina (3,5 %) e lisozima (3,4 %) (SPADA et al., 2012).

A composição da gema pode variar bastante de acordo com o tipo de alimentação oferecida às aves. A gema é composta principalmente por 68 % de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), 16 % de lipoproteínas de alta densidade (HDL), 10 % de lipovitelinas e 4 % de fosvitinas. Enquanto as HDLs possuem 80 % de proteínas na sua constituição e 20 % de lipídeos, as LDLs são compostas por cerca de 11 – 17 % de proteínas e 89 % de lipídeos, sendo estes divididos em triacilglicerol (69 %), fosfolipídeos (27 %), colesterol e ésteres de colesterol (4 %) (NEVES e HENRY, 2012). A coloração amarelada da gema é devida, principalmente, à presença de carotenoides, xantofilas e riboflavina.

### **2.3.2. Formação do Ovo**

A galinha poedeira durante sua fase de produção bota um ovo entre 24 e 26 horas. A produção anual de uma galinha poedeira gira em torno de 265 ovos. A formação do ovo inicia-se no ovário (Figura 4) esquerdo e em seu respectivo oviduto, já que o ovário direito não é funcional na maioria das aves (MORAES, 2011). O ovário é considerado uma glândula secretora de óvulos, os óvulos possuem tamanhos diferentes dependendo do seu estágio de maturação. Cada óvulo é envolto por uma capsula membranosa (foliculo) que se rompe após a formação da gema permitindo a ovulação (ZHENG et al., 2013).

Após se desprender do ovário, o óvulo maduro é conduzido para o oviduto. O oviduto apresenta 5 regiões funcionais responsáveis pela formação do ovo, são elas: o infundíbulo, o magno, o istmo, o útero e a vagina (FURLAN, 2009). No infundíbulo o óvulo permanece por aproximadamente 10 a 20 minutos. Nesta região ocorre a fertilização do ovo e a incorporação da primeira camada do albúmen. Além disso, ocorre a formação da membrana vitelínica que possui a função de proteger a gema, e a incorporação das chalazas, que são proteínas que auxiliam na centralização da gema no ovo (Figura 3) (NEVES e HENRY, 2012).

Na região do magno o ovo permanece aproximadamente por três horas. Durante sua passagem ocorre a incorporação de diversas camadas de albúmen ao redor da gema (SPADA et al., 2012; ABDU, KIM e SATO, 2013). Após passar pelo magno, a gema é captada pelo istmo, onde permanece por um período entre uma hora e uma hora e meia. Nesta região também ocorre incorporação de albúmen, além das membranas internas e externas da casca (SANTOS, 2009). Posteriormente, o ovo segue para o útero onde permanece por 20 a 23 horas. Nesta região é finalizada a deposição do albúmen e ocorre a formação da casca. O processo de formação da casca se inicia lentamente, e é neste período que o ovo absorve água e sais minerais, aumentando de tamanho, até atingir o tamanho que terá no momento da postura (COLVILLE e BASSERT, 2010; MEDEIROS e ALVES, 2014).

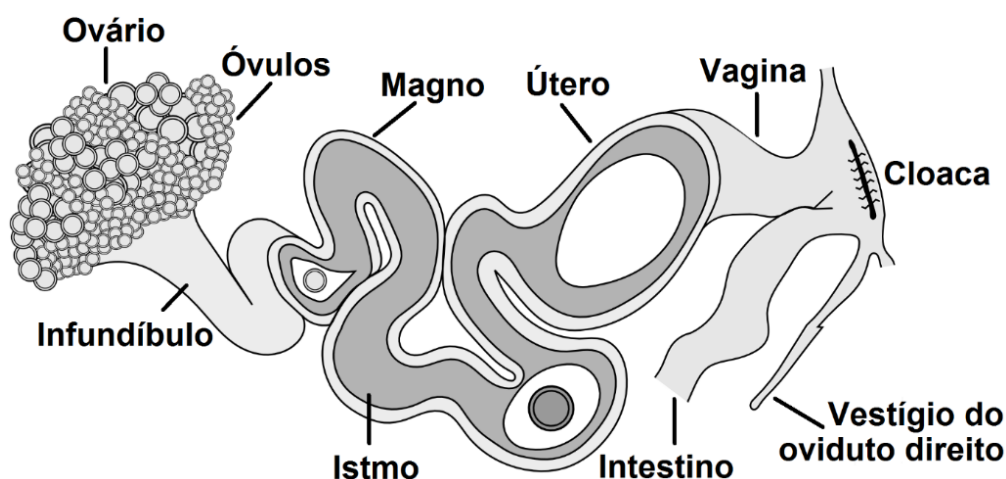


Figura 4. Sistema reprodutor feminino de aves.

O último estágio de formação do ovo é na vagina, onde o ovo permanece entre 5 a 10 minutos. É nesta região que há formação da cutícula, uma camada proteica hidrossolúvel que possui importante função de barreira contra micro-organismos. Esta camada permanece por aproximadamente 4 dias, e após esse período, seu efeito protetor diminui, devido ao ressecamento da casca e o aparecimento de rachaduras na cutícula (RODRIGUEZ-NAVARRO et al., 2013). O processo de postura dos ovos, ou oviposição, é extremamente importante para a qualidade microbiológica do ovo. A temperatura interna da ave é de aproximadamente 40 °C e a temperatura ambiente 24 °C. Esse resfriamento provoca a formação de uma câmara de ar no interior do ovo. Esta câmara de ar permite a troca de umidade e ar (entrada de oxigênio e saída de gás carbônico) do ambiente com o embrião no interior do ovo (SCHULTE-DRÜGGELTE e SVENSSON, 2011).

### 2.3.3. Produção e consumo

A produção mundial de ovo, em 2014, foi de 69,77 Mt, correspondendo a aproximadamente a 1200 bilhões de ovos produzidos. Conforme pode-se observar na Tabela 5, a China foi o principal produtor mundial de ovos, sua produção representou 36,2 % da produção mundial com 24,7 Mt de ovos. Em segundo lugar está a União Europeia com 7 Mt, seguida pelos Estados Unidos com 5,6 Mt, Índia com 3,8 Mt, Japão com 2,52 Mt, México com 2,51 Mt e o Brasil com 2,1 Mt (FAOSTAT, 2015).

Tabela 5. Balanço da produção mundial de ovos de galinha nos últimos 5 anos.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015 Estimativa*	Crescimento médio ao ano
	Milhões de toneladas (Mt)						%
China	23,8	24,2	24,5	24,7	25,19	25,69	1,52
União Europeia	6,82	6,84	6,68	7,01	7,05	7,09	0,75
Estados Unidos	5,41	5,43	5,22	5,63	5,67	5,70	0,98
Índia	3,37	3,46	3,65	3,83	4,02	4,21	4,36
Japão	2,51	2,48	2,5	2,52	2,52	2,53	0,15
México	2,38	2,45	2,31	2,51	2,57	2,64	1,95
Brasil	1,94	2,03	2,08	2,17	2,24	2,31	3,44
Outros	17,87	18,41	19,26	19,83	20,53	21,26	3,41
<b>Total</b>	<b>64,1</b>	<b>65,3</b>	<b>66,2</b>	<b>68,2</b>	<b>69,77</b>	<b>71,37</b>	<b>2,12</b>

Fonte: FAOSTAT (2015). \* Dados finais ainda não disponibilizados

A produção mundial de ovos cresceu em média 2,2 % ao ano, nos últimos 5 anos e as projeções indicam que a produção atingira cerca de 71,3 Mt no final do ano de 2015 (FAOSTAT, 2015). Entretanto, o futuro da produção mundial de ovos é incerto. Enquanto alguns países estão buscando alternativas de redução de custo, outros enfrentam sérios desafios em relação às mudanças impostas no sistema produtivo e do bem-estar animal, como por exemplo, a proibição do uso de gaiolas em alguns países da Europa (HORNE, 2014).

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de ovos e sua produção representa 3 % do total de ovos produzidos. Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Brasil produziu 37 bilhões de ovos em 2014, um aumento de 9,2 % em relação ao ano anterior (ABPA, 2014). A produção brasileira de ovos é comercializada e consumida praticamente na sua totalidade pelo mercado interno. O consumo per

capita de ovos no Brasil passou de 148,8 unidades em 2010, para 182 unidades em 2014, representando um aumento de 18,2 %, no consumo de ovos pela população brasileira (AVISITE, 2015). Apesar do consumo brasileiro de ovos ter aumentado nos últimos anos, o valor apresentado é relativamente baixo quando comparado com o consumo em outros países. No México, o consumo per capita de ovos é de 365, no Japão 355, na China 350 e nos Estados Unidos 255 unidades (TPS, 2015).

Para reverter este cenário, a ABPA e o Instituto Ovos Brasil (IOB) buscam incentivar a expansão e investimento na produção brasileira de ovos processados, já que o consumo brasileiro de ovos é praticamente todo in natura (ABPA, 2014). O consumo mundial de ovos processados, ou ovoprodutos, representa um terço do total de ovos consumidos (CARDINAELS et al., 2013). Em países como o Japão, o consumo de ovoprodutos chega a 49 % dos ovos consumidos no país. Na Espanha são 46 %; na Itália, 34 %; na Suíça, 33 %; nos Estados Unidos e Canadá, 30 %; Dinamarca, 29% e Nova Zelândia 15 %. O Brasil consome apenas 6 % dos ovos na forma de ovoprodutos (TPS, 2015).

Ovoprodutos são produzidos a partir do ovo integral, do albúmen ou da gema. Estas frações são separados da casca e preservados por pasteurização seguido ou não pelo congelamento ou secagem; ou pela adição de sal ou açúcar, dando origem a uma grande variedade de produtos (ROSSI et al., 2013). Como são pasteurizados, seu consumo é considerado mais seguros do que o consumo de ovos in natura. Além disso, podem ser armazenados por um tempo maior em uma embalagem mais conveniente. Devido as diversas propriedades funcionais do ovo, como a capacidade de formar espuma (albúmen); emulsificar (gema) ou estabilizar (ovo integral) uma suspensão, os ovoprodutos são amplamente usados na indústria de alimentos (MIRANDA et al., 2015).

#### **2.4. Infecções por Salmonella de origem alimentar**

Salmonella ao longo dos anos permanece como a principal zoonose em todo o mundo sendo responsável por 93,8 milhões dos casos e 155.000 mortes ao ano. Destes casos, 80,3 milhões são de infecções de origem alimentar, sendo Salmonella Enteritidis e Salmonella Typhimurium os principais sorotipos envolvidos (MAJOWICZ et al., 2010; AO et al., 2015).

O Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) monitora a incidência de infecções, confirmadas laboratorialmente, de nove patógenos comumente veiculados por alimentos em 10 áreas geográficas dos Estados Unidos. Em 2014 foram reportados 19.542 infecções, 4.445 hospitalizações e 71 mortes relacionados ao consumo de alimentos contaminados. *Salmonella* foi o principal patógeno responsável pelos casos de infecção (38 %), hospitalização (48 %) e mortes (42 %) dos casos reportados (CDC, 2015b). Os resultados laboratoriais positivos da infecção por *Salmonella* em humanos são coletados pelo Laboratory-based Enteric Disease Surveillance (LEDS) para avaliar a prevalência dos sorotipos isolados e os possíveis alimentos envolvidos. Dentre os 20 principais sorotipos, *Salmonella* Enteritidis (14,5 %) e *Salmonella* Typhimurium (11,6 %) foram os de maior prevalência em 2012. Além disso, o sorotipo Enteritidis foi relacionado ao consumo de carne de aves e ovos (74,6 %) e o sorotipo Typhimurium ao consumo de carne suína e derivados (50,6 %) (CDC, 2014).

A prevalência dos sorotipos e sua fonte de contaminação são os mesmos em diversos países. Na União Europeia os principais sorotipos responsáveis por infecções em humanos são *Salmonella* Enteritidis (41,3 %) e *Salmonella* Typhimurium (22,1 %) (HUGAS e BELOEIL, 2014; MAKI et al., 2014). Na África, *Salmonella* apresentou 2 milhões de casos da doença associados ao consumo de alimentos, em 2010 (AO et al., 2015). No Brasil houve 800 surtos relacionadas ao consumo de alimentos contaminados por patógenos, em 2013, sendo *Salmonella* spp. responsável por 18,1 % dos casos. Dentre os principais alimentos envolvidos nos surtos, o ovo e seus derivados, carne de aves e carne suína foram as principais fontes de contaminação (BRASIL, 2014b).

#### **2.4.1. Contaminação por *Salmonella* em carne suína**

A carne suína pode ser contaminada por *Salmonella* em diversos pontos da sua cadeia de produção. Diversos estudos conduzidos têm investigado os principais fatores de risco associados à contaminação pelo patógeno, tanto na fazenda quanto na indústria que processa a carne (ROSTAGNO e CALLAWAY, 2012; BAER et al., 2013; EVANGELOPOULOU et al., 2015).

Na fazenda o animal pode ser contaminado por diversas formas, como pode ser visto na Figura 5. A principal rota de transmissão é a oral-fecal. Nesta rota a

contaminação pode ocorrer pelo consumo de ração e água ou contato com outro animal ou fezes contaminadas. Diversos fatores relacionados ao ambiente também contribuem com o aumento da contaminação, como o tamanho do rebanho, número de animais por baia, tipo de piso, tipo de sistema de ventilação e a higiene e sanitização do ambiente (BAER et al., 2013; EVANGELOPOULOU et al., 2015). Além disso, a presença de vetores como roedores, insetos e pássaros podem auxiliar na transmissão do patógeno para os animais (ROSTAGNO e CALLAWAY, 2012; EVANGELOPOULOU et al., 2015).

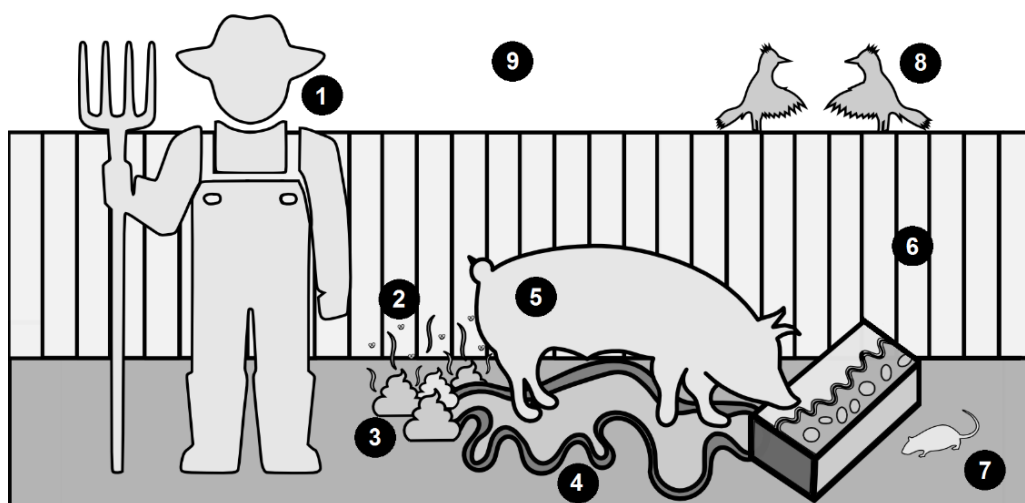


Figura 5. Principais fontes de contaminação por Salmonella na fazenda. (1) Contaminação cruzada pelo homem; (2) Insetos; (3) Fezes; (4) Higiene e tipo de piso; (5) Oral-fecal; (6) Ração e água; (7) Roedores; (8) Pássaros; (9) Ventilação.

Após contaminado, o animal pode desenvolver a doença entérica ou permanecer assintomático. Em alguns casos Salmonella pode ser considerada um micro-organismo comensal do trato gastrointestinal de suínos, fazendo com que a diferenciação entre infecção e portador seja difícil. Desta forma, o animal contaminado pode excretar o patógeno por várias semanas e contaminar outros animais (BEARSON et al., 2014). Animais portadores são as principais fontes de contaminação durante o transporte para o abatedouro. Estudos demonstram que a contaminação dos suínos por Salmonella é maior após o transporte em relação ao período de engorda na fazenda (ARGUELLO et al., 2012; ROSTAGNO e CALLAWAY, 2012). O jejum alimentar a que os animais são submetidos antes do transporte, pode não ser suficiente para esvaziar o conteúdo intestinal e as fezes restantes podem contaminar outros animais. Além disso, o estresse que o animal sofre neste período

também é associado ao aumento da contaminação por Salmonella. Ao chegar ao abatedouro os animais são encaminhados para o pátio de descanso pré-abate. Neste pátio vários animais entram em contato uns com os outros favorecendo a contaminação pelo patógeno (ROSTAGNO et al., 2011; GARRIDO et al., 2014).

Animais portadores podem aumentar o risco de contaminação durante o abate e o processamento da carne. Como o processamento da carne é praticamente todo manual, a higiene dos manipuladores, dos instrumentos de corte e da sanitização das superfícies de trabalho são pontos importantes de contaminação por Salmonella (WILHELM et al., 2011; WHEATLEY et al., 2014). A evisceração da carcaça é a etapa de maior risco de contaminação, já que o intestino contaminado pode se romper e contaminar toda a carcaça com o patógeno. Desta forma todos os produtos derivados da carne suína podem ficar comprometidos (SMID et al., 2014). Durante o processamento da carne partes de diferentes animais entram em contato umas com as outras antes de serem embalados e encaminhados para o armazenamento (CARRASCO et al., 2012). Este armazenamento deve ser feito em baixas temperaturas. A FAO recomenda que a carne permaneça a 12 °C até sua expedição para o mercado. Já a legislação brasileira determina que a carne deve ser transportada e armazenada em temperaturas inferiores a 10 °C. Falhas no controle da temperatura podem acelerar a multiplicação do micro-organismo e a contaminação da carne (FAO 1991; BRASIL, 2003; CARRASCO et al., 2012).

A contaminação da carne suína também pode ocorrer durante sua a manipulação e seu preparo. Os surtos da contaminação por Salmonella são frequentemente relacionados ao consumo de carnes contaminadas proveniente de estabelecimentos comerciais, como bares, restaurantes e supermercados (CARRASCO et al., 2012; PAINTER et al., 2013). A falta de higiene na cozinha, na geladeira, nos utensílios domésticos e principalmente do cozinheiro são os grandes responsáveis pela contaminação cruzada de Salmonella com a carne (GORMLEY et al., 2010; NORTON et al., 2012). Os supermercados também estão entre os principais responsáveis por esta contaminação (USDA, 2009; ISMAIL et al., 2013). Muitos estabelecimentos armazenam a carne em temperaturas inadequadas o que pode permitir o crescimento de bactérias patogênicas. Além disso, o projeto de lei (699/15) que proíbe a pré-moagem da carne ainda está em tramitação no congresso nacional, o que permite que estabelecimentos comerciais ainda realizam este procedimento

(BRASIL, 2015b). Após a moagem a superfície de contato da carne aumenta, elevando também a chance de contaminação. A presença do patógeno no equipamento, devido a higienização inadequada ou falta de sanitização, ou na própria peça de carne, pode acarretar na contaminação das próximas peças de carne que passarão pelo equipamento. Além disso, o tempo que a carne moída aguarda pelo consumidor pode ser outro fator determinante para o crescimento do patógeno na carne (MOLLER et al., 2011; FDA). Alguns estados brasileiros como São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Pernambuco, proibiram a comercialização de carne pré-moída, dessa forma a carne deve ser moída apenas na presença do consumidor.

#### **2.4.2. Contaminação de ovos por Salmonella**

O ovo pode ser contaminado por Salmonella antes ou após a postura, e em praticamente todas as etapas da cadeia produtiva, desde a granja até o consumidor final. A principal fonte de contaminação dos ovos são as próprias galinhas poedeiras. A contaminação das galinhas geralmente inicia-se nas granjas praticamente pelos mesmos mecanismos que o suíno: pela via oral-fecal, pela ração, por vetores, por fezes, pelo tipo de criação (gaiola ou ar livre) e por contato com outras galinhas contaminadas (ARNOLD et al., 2014; WHILEY e ROSS, 2015).

Após a colonização do trato gastrointestinal por Salmonella Enteritidis, o patógeno migra para os órgãos reprodutivos e contamina o ovo antes mesmo da postura. A composição nutricional do albúmen e da membrana vitelina permitem a sobrevivência e a reprodução de Salmonella no interior do ovo. A contaminação pelo patógeno pode ocorrer na gema (infundíbulo), no albúmen (magno), nas membranas da casca (istmo), ou na casca do ovo, antes da formação da cutícula (vagina e cloaca). Além disso, a casca se contamina com o patógeno proveniente do intestino colonizado ou pelas fezes contaminadas antes ou após a postura dos ovos (GANTOIS et al., 2009; GROSS et al., 2015).

O tipo do sistema de criação de galinhas poedeiras também é muito importante para a qualidade e segurança microbiológica do ovo. Atualmente o sistema de criação em gaiolas está em debate em todo o mundo, onde de um lado ficam os produtores favoráveis ao sistema convencional (em gaiolas) e do outro os interessados no bem-estar dos animais (LUKANOV e ALEXIEVA, 2013; BESTMAN e WAGENAAR, 2014).

Desde 2012, países da União Europeia alteraram o sistema de criação convencional para o sistema de criação livre, onde as aves não ficam em gaiolas (JANCZAK e RIBER, 2015).

O sistema de criação livre é um desafio tanto para a produção, quanto para a qualidade e segurança microbiológica dos ovos. No sistema livre há menor produção de ovos e maior incidência de mortes que o sistema convencional. Além disso, os ovos ficam expostos a fatores externos por maior tempo, aumentando assim a possibilidade de contaminação por Salmonella (JONES e ANDERSON, 2013; WHILEY e ROSS, 2015). Outro fator agravante é o que ocorre após a postura dos ovos, que saem da cloaca a uma temperatura elevada (~40 °C) e a diferença de temperatura com o ambiente provoca a formação da câmara de ar no seu interior, resultando na sucção de partículas, sujidades e possíveis micro-organismos para a superfície do ovo (SCHULTE-DRÜGGELTE AND SVENSSON, 2011; JONES et al., 2014; WHILEY e ROSS, 2015).

No sistema de produção convencional, logo após a postura, o ovo é lavado, escovado e higienizado. Tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos a recomendação da temperatura de lavagem dos ovos varia de 32 °C a 49 °C, entretanto na União Europeia esta prática é proibida (BRASIL, 1990; SOK e CHEIDELER, 2007; EFSA, 2014a). Estes procedimentos removem possíveis resquícios de fezes e sujidades que possam estar presentes na casca. Entretanto, podem também favorecer a ocorrência de danos à casca do ovo, permitindo assim a entrada de micro-organismos. Além disso, estas etapas do processamento removem a cutícula do ovo, que é o primeiro mecanismo de defesa contra patógenos, deixando-o exposto e vulnerável a contaminações (LELEU et al., 2011; GOLE et al., 2014).

Para garantir a segurança alimentar dos ovoprodutos, a indústria de alimentos utiliza diversas barreiras durante o processamento dos ovos para reduzir ou impedir o crescimento de micro-organismos. Uma das barreiras utilizadas é a adição de condimentos, como sal e açúcar, para reduzir a atividade de água e conseqüentemente, impedir o crescimento de bactérias. Entretanto, a adição destes ingredientes aumenta a resistência térmica de Salmonella, permitindo que o micro-organismo sobreviva e se desenvolva em diversos ovoprodutos mesmo após a pasteurização (COTTERILL e GLAUERT, 1971; GAST e GURAYA, 2013; EFSA,

2014; WHILEY e ROSS, 2015). A legislação brasileira determina que o ovo integral líquido deve ser pasteurizado a 60 °C por 3,5 min. A pasteurização pode ser feita até 72 horas após a quebra dos ovos, desde que mantidos em temperaturas entre 2 °C a 5 °C (BRASIL, 1990).

As normas e as regulações das temperaturas de estocagem e de transporte dos ovos variam entre os países. Nos Estados Unidos, ovos comerciais devem ser transportados e distribuídos sob refrigeração, em temperaturas abaixo de 7,2 °C (USDA, 2011). Por outro lado, na União Europeia a recomendação é que os ovos sejam mantidos em temperatura ambiente e o resfriamento máximo permitido é de 18 °C (EFSA, 2014). No Brasil a temperatura recomendada para armazenamento dos ovos é de 8 °C a 15 °C (BRASIL, 1990). Mas como não há fiscalização, os ovos são transportados das granjas em caminhões-baú sem o controle de temperatura, chegando aos pontos de venda à temperatura ambiente, permanecendo nesta condição durante todo o período de comercialização (BARBOSA et al., 2008; BORGES et al., 2009). A exposição dos ovos a diferentes temperaturas durante o transporte e o armazenamento, juntamente com a ausência do controle de temperatura favorecem o crescimento de *Salmonella* presente na casca e/ou no interior do ovo facilitando assim sua contaminação (GROSS et al., 2015).

Da mesma forma que a carne suína, os surtos de *Salmonella* também são relacionados ao consumo de ovos contaminados proveniente de estabelecimentos comerciais (CARRASCO et al., 2012; PAINTER et al., 2013). A contaminação do ovo pode ocorrer durante seu armazenamento, manipulação ou preparo do alimento. Após a aquisição, geralmente, os ovos são mantidos na porta da geladeira até a hora do preparo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Food and Drug Administration (FDA) sugerem que a temperatura ideal da geladeira deve ser inferior a 5 °C (PAS 2007; FDA, 2014). A temperatura da porta é o local mais afetado quando a geladeira é aberta, podendo variar de 5 °C a 20 °C de diferença, dependendo do tempo que a geladeira permanece aberta. Submeter os ovos a esta oscilação de temperatura pode auxiliar na aceleração do crescimento de *Salmonella*, já que o patógeno pode crescer em temperaturas entre 5 °C e 50 °C (CARRASCO et al., 2012; GAST e GURAYA, 2013; GROSS et al., 2015). Além da temperatura, a higiene é outro ponto fundamental para a contaminação dos ovos, já que o patógeno pode permanecer viável por longos períodos a uma baixa temperatura. A superfície de

preparo dos alimentos, a geladeira e diversos utensílios domésticos, podem ser responsáveis pela contaminação cruzada de Salmonella em ovos (GORMLEY et al., 2010; WHILEY e ROSS, 2015).

## **2.5. Antibióticos e antimicrobianos**

Por definição, antibióticos são drogas produzidas por micro-organismos que possuem a capacidade, em soluções diluídas, de inibir o crescimento ou inativar outros micro-organismos. Compostos antimicrobianos são quaisquer substâncias capazes de inativar bactérias ou impedir sua multiplicação ou crescimento, que incluem antibióticos e agentes sintéticos (CDC, 2010).

A primeira substância antimicrobiana utilizada para tratamento de infecções bacterianas foram as sulfanamidas (todas derivadas da sulfanilamida). A sulfanilamida foi sintetizada pela primeira vez em 1908 por Paul Gelmo e patenteada em 1909, mas seu reconhecimento como agente antimicrobiano só ocorreu em 1935. Em 1932 Gerhard Domagk descobriu uma substância que era capaz de combater infecções de estreptococos, o corante vermelho prontossil. Em 1934, o Prontosil foi patenteado e sua comercialização foi iniciada. Porém, em 1935 uma equipe de pesquisa do Instituto Pasteur de Paris, descobriu que o prontossil era convertido em sulfanilamida pelas enzimas intestinais, sendo este o princípio ativo responsável pela morte dos micro-organismos. Apesar da penicilina ter sido descoberta em 1928 por Alexander Fleming, sua comercialização como agente terapêutico só aconteceu em 1943 (GUIMARÃES et al., 2010).

As principais classes de antibióticos foram descobertas entre 1940 e 1960, período que foi considerado a era de ouro das descobertas, sendo eles: os  $\beta$ -lactâmicos (cefalosporina, penicilina), os aminoglicosídeos (estreptomicina), as tetraciclinas (clortetraciclina), os macrolídeos (eritromicina), os peptídeos (vancomicina), o cloranfenicol e alguns outros. A partir de 1960, inicia-se a era de ouro do desenvolvimento de antibióticos sintéticos. Estes antimicrobianos eram obtidos a partir de modificações químicas nos antibióticos naturais. Estas modificações foram realizadas na tentativa de se contornarem as resistências adquiridas pelos micro-organismos. Antibióticos como as cefalosporinas e as quinolonas já estão na quinta geração de modificações enquanto os macrolídeos e as tetraciclinas estão na quarta geração (Figura 6) (WALSH e WENCEWIZ 2014).

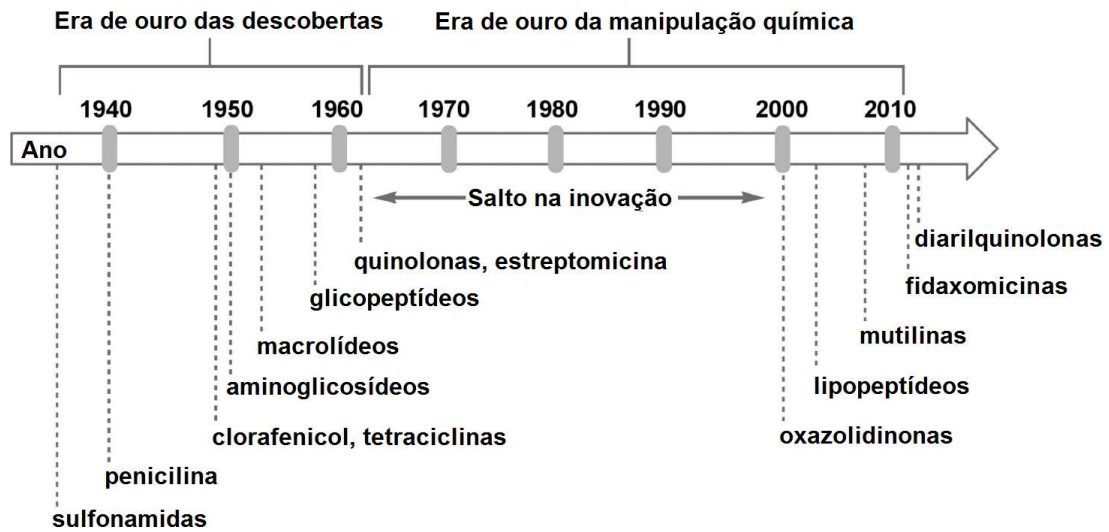


Figura 6. Linha do tempo das descobertas e desenvolvimentos dos antibióticos.  
Fonte: Adaptado de WALSH e WENCEWIZ (2014)

Entre 1980 e 2000 nenhuma classe nova de antibiótico foi apresentado ao mercado. Entretanto ocorrem, a introdução das fluoroquinolonas sintéticas, desenvolvidas a partir do ácido nalidíxico, e alguns antimicrobianos modificados quimicamente a partir de antibióticos naturais, como imipenem (derivado b-lactâmico) e análogos da eritromicina (derivado macrolídeo) (GUIMARÃES et al., 2010). Este período é marcado pelo início da redução progressiva no desenvolvimento e comercialização de novos antimicrobianos. Entre os anos de 1983 e 1987, o FDA aprovou 16 novos antimicrobianos, entre 1988 e 1992 quatorze, entre 1993 e 1997 dez, entre 1998 e 2002 sete, entre 2003 e 2007 cinco e entre 2008 e 2011 apenas quatro foram apresentados ao mercado (SPELLBERG et al., 2008; BUTTLER e COOPER, 2011). Atualmente, 36 antimicrobianos estão em fase de testes clínicos em humanos, sendo que 11 destes, possuem potencial para tratar infecções causadas por patógenos gram negativos resistentes a outros antimicrobianos (TPCT, 2015).

Vários fatores, ao longo dos anos, contribuíram para a diminuição do número e do desenvolvimento de novos antimicrobianos pelas indústrias farmacêuticas. O período entre a descoberta e a comercialização de um novo antimicrobiano, é de aproximadamente 12 anos e a cada cinco antimicrobianos que chegam à fase de testes clínicos em humanos, apenas um chega à fase de comercialização. Além disso, o custo deste processo de desenvolvimento e comercialização gira em torno de 1,3 bilhões de dólares e o lucro para a empresa só ocorre após 23 anos de comercialização, aproximadamente (WALSH e WENCEWIZ 2014; SERKAYA et al.,

2014; O'NEILL, 2014). Outro fator que também colabora para a diminuição do interesse em pesquisar e desenvolver novos antibióticos é o constante aparecimento de patógenos resistentes.

### **2.5.1. Resistência à antibióticos**

A resistência de micro-organismo a antibióticos é o maior desafio enfrentado pela saúde pública para o século XXI. Matérias primas contaminadas com micro-organismos resistentes entram na linha de produção, contaminam superfícies e alimentos, infectam o consumidor e resultam em milhares de mortes todos os anos. A prevalência de micro-organismos resistentes em humanos e em animais são monitorados por órgãos governamentais como o National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS) nos Estados Unidos, o European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) na União Europeia e a ANVISA no Brasil (BRASIL, 2015c; NARMS, 2013).

Quando os patógenos tornam-se resistentes a antibióticos colocam em risco a saúde humana, resultando em falhas nos tratamentos e piora no quadro dos pacientes podendo resultar em morte. Os principais grupos de risco são recém-nascidos, crianças, idosos e imunocomprometidos (MAJOWICZ et al., 2010, KARIUKI et al., 2015). Nos Estados Unidos pelo menos 2 milhões de pessoas são infectadas por patógenos resistentes a um ou mais antibióticos, resultando em 23.000 mortes anualmente (CDC, 2013). Na União Europeia 400.000 pessoas são infectadas por patógenos resistentes, que são responsáveis por 25.000 mortes todos os anos (BUTAYE et al., 2015). Dados sobre a contaminação e morte por bactérias resistentes no Brasil não foram encontrados.

Durante muitos anos os antibióticos foram utilizados de forma indiscriminada pelos seres humanos e em animais de produção. A prescrição de antibióticos por médicos para tratar infecções bacterianas ou infecções virais, somado com a facilidade da aquisição em alguns países e falta de controle do consumo pela população, colaboraram para o desenvolvimento de bactérias resistentes (CDC, 2013; WHO, 2015). Além do utilização humano indiscriminado, os antibióticos foram utilizados de forma sub-terapêutica em animais de produção, com o intuito de melhorar a conversão alimentar, o ganho de peso e a redução de doenças e a mortalidade (Figura 7). Sua constante utilização também contribuiu para o desenvolvimento de

micro-organismos resistentes a diversos antimicrobianos, segundo alguns grupos de pesquisadores (HUR et al., 2012; WHEATLEY et al., 2014; SMID et al., 2014; PANDE et al., 2015).

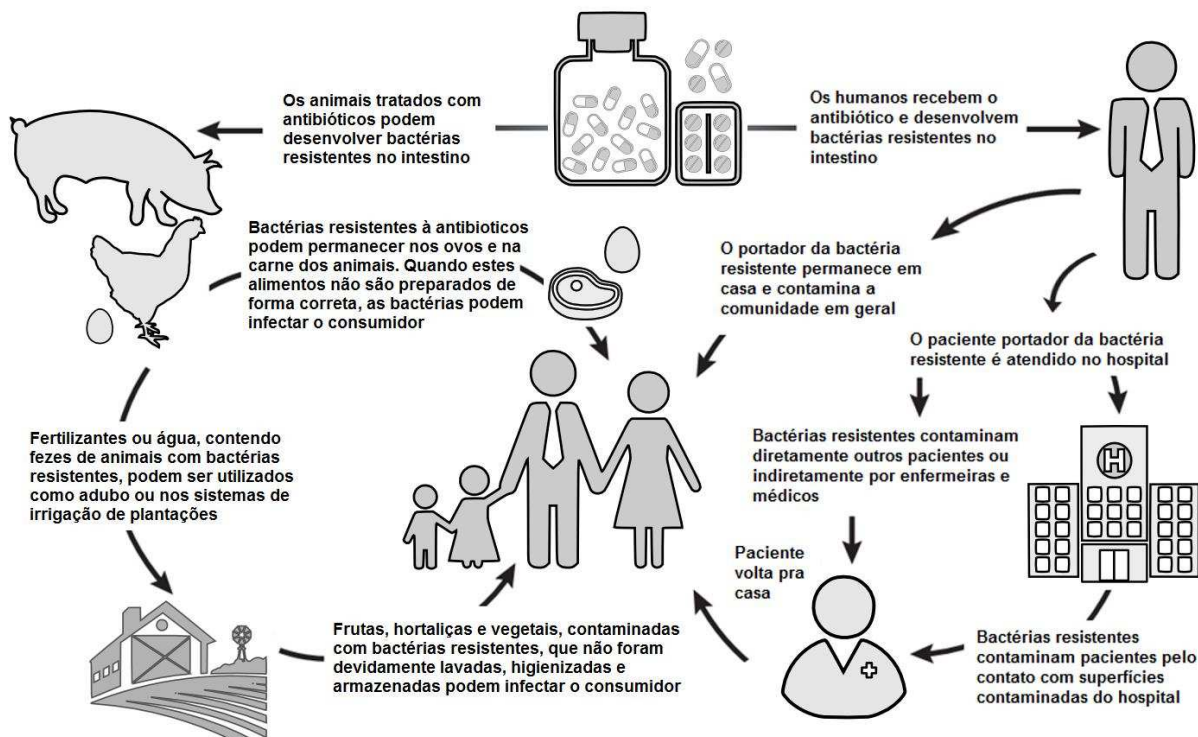


Figura 7. Possíveis rotas para a disseminação de micro-organismos resistentes a antibióticos.

Alguns micro-organismos são naturalmente resistentes a determinados antibióticos, devido a vários fatores, como por exemplo: (i) ser desprovido da estrutura inibida pelo antimicrobiano, como micoplasmas, que não possuem parede celular, deste modo são resistentes à penicilina que possuem a função de inibir a síntese da parede celular; (ii) ser capaz de modificar o antibiótico para uma forma inativa; (iv) ser capaz de modificar o alvo do antimicrobiano; (v) ser capaz de modificar sua via metabólica para contornar o efeito do antimicrobiano, como no caso das sulfas, que inibem a síntese do ácido fólico forçando as bactérias a captarem o ácido fólico do meio (BLAIR et al., 2015; MADIGAN et al., 2015). Além disso, a resistência também pode ser adquirida pela transmissão horizontal de genes de resistência em plasmídeos ou transposons de outros micro-organismos e por mutações genéticas espontâneas. Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossômicas, que possuem genes capazes de sintetizar enzimas que modificam e inativam antimicrobianos. A transferência horizontal pode ocorrer: durante a replicação da

bactéria, da célula mãe para a célula filha, por conjugação, que envolve o contato de uma célula com outra para transferir o material genético e também pode ser mediado por bacteriófagos. Muitos plasmídeos possuem vários genes de resistência, podendo conferir múltiplas resistências a um determinado micro-organismo (CARATTOLI, 2009; SVARA e RANKIN, 2011; MADIGAN et al., 2015).

Para reduzir a incidência clínica de patógenos resistentes aos antibióticos, diversos países estão proibindo a utilização de antimicrobianos nos sistemas de criação de animais e estimulando a redução da prescrição médica para humanos (ANDERSSON e HUGHES, 2010; MATHER et al., 2013; WHO, 2015). Países como a Dinamarca, Suécia, Alemanha, Holanda, Taiwan e União Europeia baniram completamente a utilização de antibióticos como melhoradores de desempenho para animais, enquanto países como os Estados Unidos, China, Austrália e a Ucrânia continuam utilizando (MARON et al., 2013). O Brasil também faz parte do grupo de países que ainda utilizam antibióticos na produção animal, já que o projeto de lei nº 1847/2011 que dispunha sobre a restrição de antimicrobianos em animais de produção foi arquivado (BRASIL, 2016a). Além disso, a Coordenação de Produtos de Alimentação Animal (CPAA) e o Departamento de Fiscalização de Insumos Pecuários (DFIP) mantêm uma lista de antimicrobianos permitidos para uso em animais de produção (BRASIL, 2016b). Nenhum país impediu a prescrição ou comercialização de antibióticos para os seres humanos. Entretanto a OMS, em 2011, iniciou uma campanha para estimular a redução da prescrição de antimicrobianos para a população (WHO, 2011). Desde o início da campanha o governo brasileiro tem adotado uma rígida conduta para a prescrição e comercialização de antibióticos para humanos (BRASIL, 2013). Outro fator que estimula a remoção dos antimicrobianos da cadeia de produção de animais é o crescente aumento da comercialização e consumo de produtos produzidos em sistemas de criação livre de antibióticos e sistema de criação orgânicos (LI et al., 2011; BAJPAI et al., 2012; RICKE et al., 2012; VAN LOO et al., 2012).

Estudos realizados por Walsh e Wencewiz (2014) e pelo CDC (2013), mostram que o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos pelos patógenos é inevitável. Já não é mais uma questão se o patógeno ficará resistente, mas sim, quando ficará resistente a determinado antimicrobiano. Pela Tabela 6 pode se observar a evolução

do desenvolvimento de antibióticos e quando a resistência pelo antibiótico foi observada em micro-organismos.

Tabela 6. Evolução da resistência a antibióticos de uso clínico

Antibiótico	Desenvolvido	Resistência observada	Antibiótico	Desenvolvido	Resistência observada
Sulfanamida	1935	1940	Gentamicina	1967	1979
Penicilina	1942	1946	Fluoroquinolonas	1980	1980
Estreptomicina	1943	1959	Imipenem	1985	1998
Clorafenicol	1947	1959	Ceftazidima	1985	1987
Tetraciclina	1948	1953	Levofloxacina	1996	1996
Eritromicina	1952	1968	Linezolida	1999	1999
Vancomicina	1956	1988	Daptomicina	2003	2003
Meticilina	1960	1961	Retapamulina	2007	2007
Ampicilina	1961	1973	Ceftarolina	2010	2011
Cefalosporina	1961	1961	Fidaxomicina	2011	2011
Ácido Nalidíxico	1962	1962	Bedaquilina	2013	?

Fonte: Adaptado de CDC (2013) e WASH e WENCEWICZ (2014)

### 2.5.2. Salmonella resistente à antimicrobianos

O aparecimento e a disseminação de Salmonella resistente e multirresistente a antimicrobianos é uma preocupação global para a saúde pública, já que este patógeno é o principal micro-organismo isolado em alimentos em todo mundo. Poucas células de Salmonella são necessárias para causar infecção, 500 ou menos, enquanto outros patógenos requerem 100.000 ou mais para causar infecção, dependendo da virulência do micro-organismo (FINSTAD et al., 2012). Como o tratamento com antimicrobianos só é indicado para pacientes com generalização do processo, crianças, idosos e indivíduos imuno comprometidos, a resistência do patógeno interfere no tratamento e pode aumentar a severidade da doença (GREENWOOD et al., 2012).

O principal antimicrobiano que Salmonella apresenta resistência é o ácido nalidíxico (quinolona de 1ª geração), podendo chegar a mais de 80 % dos isolados (ALVAREZ-FERNANDES et al., 2012; CAMPIONI et al., 2012; MAKI et al., 2014). Entre 2011 e 2012, o European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), o European Food Safety Authority (EFSA) e o European Medicines Agency (EMA) se juntaram para avaliar o consumo de antimicrobianos utilizados em humanos e animais e a ocorrência de micro-organismos resistentes na União Europeia. Dos casos de

salmonelose confirmados em laboratório, 26 % o patógeno era resistente a pelo menos um antimicrobiano: ampicilina (derivado da penicilina), cefotaxima (cefalosporina de 3ª geração), clorafenicol, ciprofloxacina (quinolona de 2ª geração), gentamicina (derivado do aminoglicosídeo), ácido nalidíxico, sulfonamida, tetraciclina, trimetoprima (derivado da sulfanamida) (ECDC, EFSA e EMA, 2015). Nos Estados Unidos, *Salmonella* resistente a antimicrobianos é responsável por 100.000 casos de infecção anualmente. Das estirpes isoladas pelo CDC, 3 % foram resistentes a ceftriaxona (cefalosporina de 3ª geração), 3 % foram resistentes a ciprofloxacina (quinolona de 2ª geração), e 5 % foram resistentes a cinco ou mais antimicrobianos (CDC, 2013).

*Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis além de serem os sorotipos mais isolados de *Salmonella* spp., e os mais isolados em alimentos, também pertencem ao grupo de patógenos resistentes a antimicrobianos que mais preocupam a saúde pública (CDC, 2013). Apesar de *Salmonella* Enteritidis ser o sorotipo mais prevalente, estirpes multirresistentes são raramente isoladas. Geralmente, as estirpes apresentam resistência a antimicrobianos específicos, como sulfametoxazol, ácido nalidíxico, ampicilina, piperacilina e ticarcilina, mas algumas estirpes também podem apresentar resistência a cefalosporinas de 1ª geração como, a cefazolina e a cefalotina (HUR et al., 2012; CLEMENTE et al., 2014). Em alguns casos também podem apresentar resistência as fluoroquinolonas (ECDC, EFSA e EMA, 2015).

*Salmonella* Typhimurium isolada de suínos apresentaram multirresistência a ampicilina, clorafenicol, estreptomina, sulfametoxazol e tetraciclina. Em alguns isolados também foram encontrados resistência contra a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, ceftiofur, imipenem e à fluoroquinolona (HUR et al., 2012; SU et al., 2012; ECDC, EFSA e EMA, 2015). A multirresistência de *Salmonella* Typhimurium apresenta dois padrões: (I) resistência a ampicilina, kanamicina, estreptomina, sulfametoxazol, e tetraciclina ou (II) resistência a ampicilina, clorafenicol, estreptomina, sulfametoxazol e tetraciclina (ALCAINE et al., 2007; SNOW et al., 2007), sendo o segundo perfil o mais isolado na Europa, América do Norte e Ásia (HUR et al., 2012)

O aumento do aparecimento de patógenos resistentes e multirresistentes é preocupante, mas o desenvolvimento da resistência a fluoroquinolonas, a imipenem e

as cefalosporinas são mais preocupantes ainda. Estes antimicrobianos são as principais escolhas para o tratamento de infecções causadas por Salmonella (HUR et al., 2012; EFSA, 2015). Como na maioria das vezes estes pacientes são do grupo de risco (pacientes em estado grave, crianças, idosos e imuno comprometidos), a falha no tratamento pode resultar em morte (CHEN et a., 2013).

## **2.6. Bacteriófagos**

### **2.6.1. Descoberta e utilização**

Os bacteriófagos foram descritos pela primeira vez, há um século atrás, por Frederick Twort. Em 1915, Twort relatou a ocorrência de lises nas bordas das colônias de Staphylococcus aureus em que estava trabalhando. Entretanto o cientista não foi capaz de explicar o que causava as lises, apenas descreveu o que havia acontecido com as colônias. Por volta de 1917, durante a primeira guerra mundial, Felix d'Herelle também observou a formação de lises nas placas cultivadas com Shigella. Os “agentes” causadores da lise bacteriana foram filtrados, testados e nomeados bacteriófagos. O nome bacteriófagos vem do grego, que significa “comedor de bactéria” (ACKERMANN, 2012; TAYLOR, 2014).

Pouco tempo depois da descoberta, em 1919, os bacteriófagos foram usados para tratar pacientes hospitalizados com disenteria. Com o sucesso do tratamento, D'Herelle e seus colaboradores fizeram várias expedições pela China, Índia e África para tratar cólera usando bacteriófagos. Vários produtos à base de bacteriófagos foram desenvolvidos entre 1930 e 1940 para combater doenças bacterianas em humanos. Em 1930, o primeiro produto comercial feito com bacteriófagos foi desenvolvido pelo Institute of Vaccine and Sera, de Tbilisi na Geórgia. Em 1931, duas indústrias foram fundadas na Índia para produzir bacteriófagos contra a cólera. No Brasil, em 1924, o Instituto Oswaldo Cruz produziu e distribuiu soluções à base de bacteriófagos para combater a disenteria em países da América Latina. Nos Estados Unidos, em 1940, os produtos à base de bacteriófagos eram destinados ao tratamento de várias infecções incluindo, abscessos, vaginites, ferimentos de pele e infecções crônicas do trato respiratório (CHANISHVILI, 2012; VERBEKEN et al., 2014).

Apesar da rápida expansão e dos resultados promissores, o aparecimento dos antibióticos em 1940 reduziu drasticamente o interesse pelos bacteriófagos. Apenas alguns países do leste Europeu, como a Geórgia, a Ucrânia, a Polônia e a Rússia

continuaram as pesquisas com bacteriófagos no controle de infecções bacterianas (HÚNGARO et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2010; TAYLOR, 2014). Durante várias décadas o antibiótico prosperou, sendo o principal agente usado no controle de infecções bacterianas. Seu uso indiscriminado colaborou com o desenvolvimento de bactérias multirresistentes responsáveis por milhares de mortes, anualmente, pelo mundo. A atual estagnada na descoberta e desenvolvimentos de novos antibióticos e antimicrobianos pela indústria farmacêutica gerou uma crise mundial na saúde pública, forçando a busca e a pesquisa por novos mecanismos e agentes de controle microbiano. Deste modo as pesquisas com bacteriófagos foram reiniciadas em diversas áreas da saúde e segurança alimentar (GOLKAR et al., 2014; VERBEKEN et al., 2014; SERWER et al., 2014).

### 2.6.2. Características

A população de bacteriófagos em meio aquático foi estimada entre  $10^4$  e  $10^8$  virions por mL, e  $10^9$  por g de solo, o valor total estimado da população de bacteriófagos no planeta chega a  $10^{32}$ . Mais de 6000 bacteriófagos diferentes já foram descobertos e catalogados (WITTEBOLE, 2014). O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (Committee on the Taxonomy of Viruses - ICTV) dividiu os bacteriófagos em 10 famílias conforme a Tabela 7 (ACKERMANN, 2012; HENDRIX, 2013).

Tabela 7. Famílias de bacteriófagos definidas pelo ICTV.

Família	Características	Exemplo	Morfologia
Siphoviridae (a)	DNA dupla fita, longo, cauda não contrátil	$\lambda$	
Myoviridae (b)	DNA dupla fita, cauda contrátil	T4	
Podoviridae (c)	DNA dupla fita, curto, cauda não contrátil	T7	
Tectiviridae (d)	DNA dupla fita, proteína 5'linear, membrana interna	PRD1	
Microviridae (e)	DNA fita simples, circular, icosaedro	$\Phi$ X174	
Inoviridae (f)	DNA fita simples, filamentosos	M13	
Leviviridae (g)	RNA fita simples, pequeno icosaedro	MS2	
Cystoviridae (h)	RNA dupla fita, segmentado, envelopado	$\Phi$ 6	
Corticoviridae (i)	DNA dupla fita, circular, membrana interna	PM2	
Plasmaviridae (j)	DNA dupla fita, circular, envelopado	L2	

Bacteriófagos são capazes de infectar apenas espécies específicas de bactéria, ou até mesmo subespécies dentro de uma mesma espécie (HYMAN e ABEDON, 2012). A especificidade destes bacteriófagos é, em parte, mediada por proteínas associadas à cauda, que reconhecem e aderem em determinadas moléculas identificadas na superfície bacteriana. Após a adesão, o bacteriófago infecta a bactéria com seu material genético. No interior da célula hospedeira, o bacteriófago pode apresentar diferentes ciclos de vida, conforme ilustrado na Figura 8, ciclo lítico; ciclo lisogênico; ciclo pseudo-lisogênico; ou infecção crônica (WITTEBOLE, 2014).

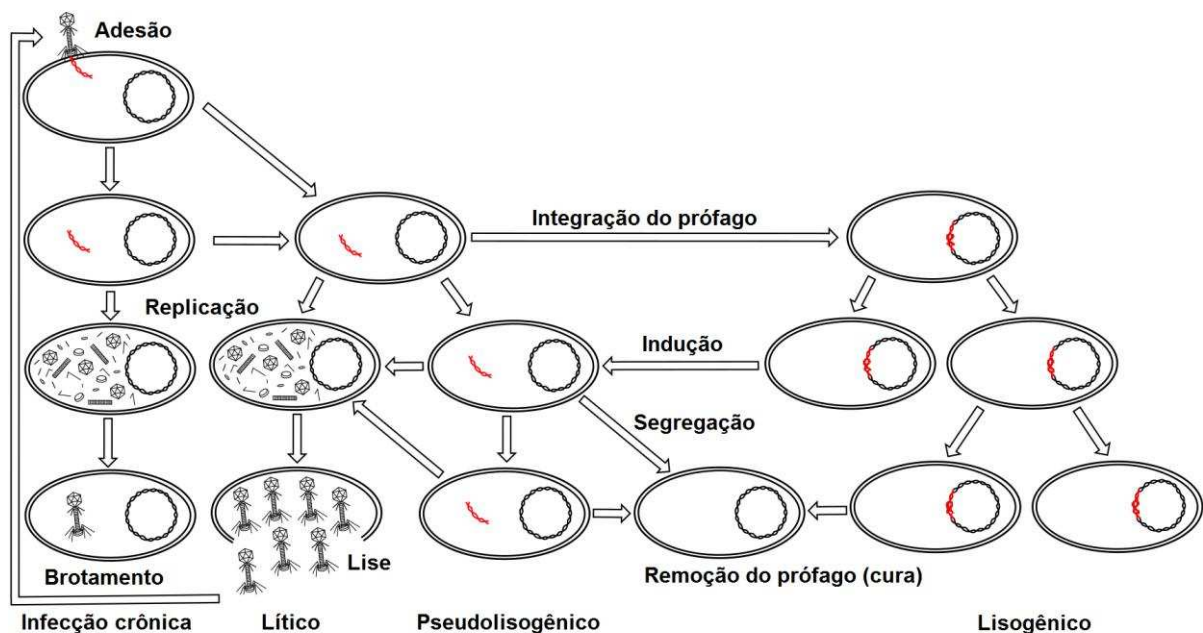


Figura 8. Ciclos de vida apresentados pelos bacteriófagos nas bactérias hospedeiras. Adaptado de Weinbauer (2004).

No ciclo lítico, o bacteriófago redireciona o metabolismo do hospedeiro para a produção de novos bacteriófagos, que são liberados após a lise da célula bacteriana. No ciclo lisogênico, o genoma do bacteriófago é incorporado ao genoma do hospedeiro e permanece em um “estado de dormência” (prófago), e se replica juntamente com o hospedeiro até o ciclo lítico ser induzido. A infecção crônica ocorre quando a célula infectada libera bacteriófagos por brotamento ou extrusão sem causar a lise bacteriana (ACKERMANN, 2012; HYMAN e ABEDON, 2012). No ciclo pseudolisogênico não há inserção do material genético no genoma bacteriano como no ciclo lisogênico e não há lise do hospedeiro como no ciclo lítico. Os mecanismos que levam ao ciclo pseudolisogênico incluem a incapacidade de infecção por

inativação enzimática, ou por falta de receptores, ou imunidade promovida por bacteriófagos que passam do ciclo lisogênico para o ciclo lítico. A incerteza que envolve este ciclo de reprodução sugere que há outros ciclos biológicos ainda não reconhecidos (ACKERMANN, 2012; HYMAN e ABEDON, 2012).

### **2.6.3. Utilização dos bacteriófagos na indústria de alimentos**

Os bacteriófagos que desenvolvem o ciclo lítico são os que apresentam potencial para o controle biológico de patógenos na indústria de alimentos, pois levam à lise e morte bacteriana, e conseqüentemente, ao aumento da qualidade e segurança microbiológica dos alimentos (ENDERSEN et al., 2014). Além disso, podem ser utilizados em todos os estágios da linha de produção de alimentos, do campo a mesa, sendo utilizados por exemplo: para controlar ou reduzir a colonização por patógenos em animais; para descontaminar carcaças, equipamentos e superfícies de contato na indústria de alimentos e para estender a vida de prateleira de alimentos perecíveis como conservantes naturais de alimentos (GARCIA et al., 2008; COFFEY et al., 2010; SPRICIGO et al., 2013; ENDERSEN et al., 2014; NOBREGA et al., 2015).

A potencial utilização de bacteriófagos na indústria de alimentos foi discutida em recentes revisões (MONK et al., 2010; GOODRIDGE e BISHA et al., 2011; ENDERSEN et al., 2014; TSONOS et al., 2014) e exemplos destas aplicações para o controle de *Salmonella* já foram testadas em diferentes tipos de alimentos e superfícies como: suínos antes do abate (CALLAWAY et al., 2011; ALBINO et al., 2014); aves antes do abate (WONG et al., 2014); carne de frango, casca de ovo e alface (SPRICIGO, 2013); pele de porco (HOOTON et al., 2011); salsicha tipo hot-dog, peito de peru fatiado, frutos do mar e leite achocolatado (GUENTHER et al., 2012); pele e carcaça de frango (HUNGARO et al., 2013; BENLI et al., 2015); leite integral, suco de maçã e bebida energética (ZINNO et al., 2014); salmão cru e defumado (GALARCE et al., 2014); superfícies de vidro e aço inoxidável (WOOLSTON et al., 2013) e em embalagens de alimentos (GOUVEIA et al., 2015).

Diversas características favorecem a utilização de bacteriófagos na indústria de alimentos. Dentre elas, podemos citar a capacidade dos bacteriófagos, ao contrário dos antimicrobianos, de evoluir para contornar os mecanismos de resistência da bactéria hospedeira (LABRIE et al., 2010). Sua utilização não gera resistência cruzada à antibióticos e não afeta a cor, sabor ou textura dos alimentos (NOBREGA et al.,

2015). Como sua propagação depende da presença do hospedeiro, são auto limitantes, permanecendo estáveis na ausência do micro-organismo e se replicam na presença dele. Possuem natureza discriminatória, ou seja, a maioria dos bacteriófagos interagem apenas com um conjunto de bactérias que expressam determinados sítios de ligação e bactérias sem esses receptores não são afetadas (VANDAMME e MIEDZYBRODZKI, 2013; PHOENIX et al., 2014). O consumo de bacteriófagos pode ativar o sistema imune caso não esteja purificado e livre de toxinas, apesar disso, nenhum estudo relatou complicações imunológicas ou efeitos colaterais com o consumo de elevadas quantidades de bacteriófagos até a presente data (SARKER et al., 2012; McCALLIN et al., 2013; ENDERSEN et al., 2014).

Mais de 25 empresas pelo mundo exploram as aplicações clínicas e de segurança alimentar dos bacteriófagos. Diversos produtos para o controle de patógenos já foram aprovados pelo FDA, como por exemplo o ListShield™, EcoShield™ e SalmFres™, da Intralix Inc., que são utilizados para reduzir a contaminação de *Listeria*, *Escherichia coli* e *Salmonella* respectivamente, na cadeia produtiva de alimentos. Além disso, o processo de isolamento, desenvolvimento e aplicação dos bacteriófagos é relativamente fácil, rápido e mais barato que o desenvolvimento de um novo antibiótico (ENDERSEN et al., 2014).

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de bacteriófagos no controle de *Salmonella* sp. em poedeiras, ovos com casca, ovos líquidos, carne suína moída e o efeito na microbiota intestinal de suínos.

#### Objetivo específicos

---

Capítulo I	<ul style="list-style-type: none"><li>• Avaliar o efeito da aplicação dos bacteriófagos livres e microencapsulados em ovos de galinhas poedeiras contaminadas ou não com <i>Salmonella</i> Enteritidis</li><li>• Avaliar a possível translocação de bacteriófagos para o interior dos ovos.</li><li>• Avaliar o efeito da aplicação de bacteriófagos em ovos higienizados e pasteurizados após a contaminação com <i>Salmonella</i> Enteritidis em diferentes temperaturas e intervalos de tempo.</li></ul>
Capítulo II	<ul style="list-style-type: none"><li>• Isolar bacteriófagos com a capacidade de lisar simultaneamente <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>Salmonella</i> Enteritidis</li><li>• Caracterizar morfologicamente os bacteriófagos isolados</li><li>• Avaliar o efeito da aplicação dos bacteriófagos na redução de <i>Salmonella</i> spp. em carne moída suína e em ovos em diferentes temperaturas e intervalos de tempo.</li></ul>
Capítulo III	<ul style="list-style-type: none"><li>• Avaliar o efeito da utilização dos bacteriófagos na microbiota de suínos em comparação à utilização de antimicrobianos utilizados como melhoradores de desempenho</li></ul>

---

## 4. CAPÍTULO I

### UTILIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS LIVRES E MICROENCAPULADOS NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO DE *Salmonella* ENTERITIDIS EM GALINHAS POEDEIRAS E SEU EFEITO NA TRANSLOCAÇÃO EM OVOS

#### RESUMO

Em granjas produtoras de ovos, geralmente, o ovo é lavado, escovado e higienizado antes de ser embalado. Estas etapas removem a cutícula do ovo, que é o primeiro mecanismo de defesa contra patógenos, deixando-o exposto e vulnerável a contaminações. A elevação da produção e da comercialização ao longo dos anos foi acompanhada pelo aumento das infecções, hospitalizações e mortes relacionadas ao consumo de ovos contaminados sendo *Salmonella* Enteritidis o principal patógeno envolvido. Este patógeno apresenta mecanismos intrínsecos que lhe permite interação particular com o trato reprodutor de aves e de alguns componentes do ovo. Em vista do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de bacteriófagos no controle de *Salmonella* Enteritidis em poedeiras e em ovos comerciais. Foram realizados 2 experimentos distintos. O primeiro experimento avaliou o efeito de bacteriófagos livres e microencapsulados em ovos (clara, gema e casca) de galinhas poedeiras contaminadas com *Salmonella* Enteritidis. Foram utilizadas 50 poedeiras, distribuídas em 5 tratamentos, sendo as aves do primeiro (T1), do segundo (T2) e do terceiro (T3) tratamentos contaminados oralmente pela ingestão de 1 mL de *Salmonella* Enteritidis ( $\sim 10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup>) enquanto os outros tratamentos (T4 e T5) receberam apenas 1 mL de solução tampão PBS esterilizado. Seis horas após a inoculação do patógeno, e em todo período experimental por volta das 8 horas da manhã, as aves dos tratamentos T2 e T4 receberam 1 mL da suspensão de bacteriófagos ( $\sim 10^9$  UFP·mL<sup>-1</sup>), enquanto as aves dos tratamentos T3 e T5 receberam 1 mL da suspensão de bacteriófagos micro encapsulados ( $\sim 10^6$  UFP·mL<sup>-1</sup>). Seis ovos foram considerados as unidades experimentais de cada tratamento e as análises de presença e ausência do patógeno e dos bacteriófagos foram realizadas nos intervalos de 1, 3, 7, 14 e 28 dias. Das 30 amostras de casca analisados dos tratamentos T1, T2 e T3, durante o período experimental, o patógeno foi detectado em 28 no tratamento T1, 12 no tratamento T2 e 23 no tratamento T3. *Salmonella* Enteritidis não foi isolada nos tratamentos T4 e T5. Foi possível identificar bacteriófagos em 100% das amostras

de casca dos tratamentos T2, T3 e T4. As aves do tratamento T1 não receberam bacteriófagos. Foi possível isolar bacteriófagos microencapsulados em 63,3 % das amostras de casca do T5. Nas amostras da clara, foi possível identificar a presença de Salmonella do dia 14, nos tratamentos T1 (n = 2) e no T3 (n = 1), e do dia 28, nos tratamentos T1 (n = 4), T2 (n = 1) e no T3 (n = 2). Foi possível isolar bacteriófagos nas amostras da clara, no dia 7 dos tratamentos T2 (n = 1) e T4 (n = 1), no dia 14 dos tratamentos T2 (n = 2) e T4 (n = 1) e no dia 28 dos tratamentos T2 (n = 2) e T4 (n = 1). Nas amostras da gema, foi possível identificar a presença de Salmonella no dia 7, dos tratamentos T1 (n = 4), T2 (n = 1) e no T3 (n = 2), no dia 14, dos tratamentos T1 (n = 6), T2 (n = 2) e no T3 (n = 4) e no dia 28, dos tratamentos T1 (n = 5), T2 (n = 3) e no T3 (n = 5). Não foi possível isolar bacteriófagos nas amostras da gema em nenhum dos dias analisados de nenhum tratamento. A utilização de bacteriófagos livres e microencapsulados em poedeiras resultaram na redução do isolamento de Salmonella Enteritidis nos ovos analisados. O experimento dois avaliou diferentes metodologias de higienização de ovos em relação à presença de Salmonella Enteritidis em diferentes temperaturas ao longo do tempo. Os ovos (n = 720) foram separados em 8 grupos contendo três diferentes combinações de tratamentos, com 90 ovos cada, sendo os tratamentos: higienizado (H), não higienizado ( $\bar{H}$ ), pasteurizado (P), não pasteurizado ( $\bar{P}$ ), com bacteriófagos (B), e sem bacteriófagos ( $\bar{B}$ ), sendo representados por T1 (H $\bar{P}\bar{B}$ ), T2 (H $\bar{P}B$ ), T3 (H $\bar{P}\bar{B}$ ), T4 (H $\bar{P}B$ ), T5 (H $\bar{P}\bar{B}$ ), T6 (H $\bar{P}B$ ), T7 (H $\bar{P}\bar{B}$ ), T8 (H $\bar{P}B$ ). Os tratamentos foram incubados a 4 °C, 7 °C e 24 °C e analisados nos intervalos de 1, 3, 7, 14 e 28 dias. A presença do patógeno foi observada em todas as amostras de casca incubada em todas as temperaturas e intervalos de tempos. Entretanto sua detecção na clara e na gema não foi possível quando os ovos foram incubados a 4 °C. Os tratamentos higienizados (T5 (H $\bar{P}\bar{B}$ ), T6 (H $\bar{P}B$ ), T7 (H $\bar{P}\bar{B}$ ) e T8 (H $\bar{P}B$ )) apresentaram os maiores valores (p < 0,05) em relação aos outros tratamentos ao longo do tempo nas diferentes temperaturas. Além disso, o tratamento T2 (H $\bar{P}B$ ) obteve, os menores valores médios de crescimentos (log UFC·mL<sup>-1</sup>) do patógeno em todas as temperaturas e amostras analisadas (p < 0,05). Estes resultados sugerem que a higienização e a pasteurização dos ovos podem contribuir para a contaminação e penetração do patógeno ao longo do tempo, mesmo em baixas temperaturas. Além disso, a utilização de bacteriófagos resultou em uma contagem média (log UFC·mL<sup>-1</sup>) do patógeno inferior na maioria dos tratamentos em que foi

utilizado. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos comparando as etapas de higienização, pasteurização e utilização de bacteriófagos em relação a contaminação, concentração e penetração de patógenos em ovos, sendo assim, mais estudos são necessários para melhor caracterizar discutir estes resultados encontrados. Mesmo assim é possível recomendar a aplicação de bacteriófagos durante o processamento de ovos realizado pela indústria de alimentos, podendo reduzir a contaminação de patógenos e deixando-os seguros por mais tempo.

## 1. INTRODUÇÃO

O ovo é um dos alimentos mais completos que existe, sendo composto por proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, resultado de uma eficiente transformação biológica feita pela galinha poedeira. A ave transforma recursos alimentares de menor valor biológico em um produto com alta qualidade nutricional para o consumo humano. A transformação depende de fatores biológicos relacionados à fisiologia da ave e é influenciada pelo aporte nutricional, práticas de manejo e ambiente adequados para a sua criação (BERTECHINI e MAZZUCO, 2013).

A elevação da produção e da comercialização ao longo dos anos foi acompanhada pelo aumento das infecções, hospitalizações e mortes relacionadas ao consumo de ovos contaminados com *Salmonella Enteritidis* como o principal patógeno envolvido (EFSA, 2015; CDC, 2015). Este patógeno apresenta mecanismos intrínsecos que lhe permite interação particular com o trato reprodutor de aves e alguns componentes do ovo. Por não possuir um hospedeiro específico, a infecção por *Salmonella Enteritidis* geralmente é assintomática, sem sinais de morbidade e mortalidade. Dessa maneira, pode permanecer no ambiente de produção avícola sem que seja possível observar qualquer indicação externa de infecção das aves ou contaminação dos ovos por elas produzidos (GANTOIS et al., 2009; LORENZONI, 2010).

A infecção por *Salmonella* ocorre principalmente pela via oral-fecal. A ração pode ser contaminada por suplementos como farinha de carne, farinha de ossos, farinha de peixe e proteína de soja contaminados ou transmitidos pelas fezes de roedores, pássaros ou moscas presentes nas granjas (STEVENS e GRAY, 2013). Após a contaminação, o patógeno coloniza o trato gastrointestinal das aves e migra para os órgãos reprodutivos. A contaminação do ovo pode ocorrer no infundíbulo, no magno, no istmo, no útero e na vagina. A composição nutricional do albúmen e da membrana vitelina permitem a sobrevivência e a reprodução de *Salmonella* no interior do ovo (GANTOIS et al., 2009; GROSS et al., 2015; WHILEY e ROSS, 2015). Durante a passagem do ovo pela cloaca também pode ocorrer a contaminação da casca pelo contato com fezes contaminadas. Além disso, após a postura, como o ovo está a uma temperatura (~40 °C) superior ao ambiente ocorre a formação de uma diferença de pressão no seu interior, resultando na sucção de partículas, sujidades e possíveis

micro-organismo para a superfície do ovo (SCHULTE-DRÜGGELTE e SVENSSON, 2011; JONES et al., 2014; WHILEY e ROSS, 2015).

Logo após a postura, geralmente, o ovo é lavado, escovado e higienizado. Estas etapas do processamento removem a cutícula do ovo, que é o primeiro mecanismo de defesa contra patógenos, deixando-o exposto e vulnerável a contaminações (LELEU et al., 2011; GOLE et al., 2014). No Brasil a temperatura recomendada para armazenamento dos ovos é de 8 °C a 15 °C (BRASIL, 1990). Mas como não há fiscalização, os ovos são transportados das granjas em caminhões-baú sem o controle de temperatura, chegando aos pontos de venda à temperatura ambiente, permanecendo nesta condição durante todo o período de comercialização (BARBOSA et al., 2008; BORGES et al., 2009). A exposição dos ovos a diferentes temperaturas durante o transporte e o armazenamento, juntamente com a ausência do controle de temperatura, facilitam a sua contaminação por micro-organismos e favorecem o crescimento de *Salmonella* presente na casca e/ou no interior do ovo (GROSS et al., 2015).

Para reduzir a incidência clínica de patógenos, vários países proibiram a utilização de antibióticos nos sistemas de criação de animais e estimulando a redução de sua prescrição para humanos (ANDERSSON e HUGHES, 2010; MATHER et al., 2013; WHO, 2015). Além disso, outro fator que estimula a remoção dos antibióticos da cadeia de produção de animais, é o crescente aumento do interesse do consumidor por alimentos produzidos de forma orgânica e livres de resíduos químicos, entre eles os antimicrobianos (LI et al., 2011; BAJPAI et al., 2012; RICKE et al., 2012; VAN LOO et al., 2012). Esta tendência alimentar tem estimulado o desenvolvimento de novas metodologias de controle biológico de patógenos, visando aumentar a segurança e a qualidade dos alimentos.

Com isto, o uso de bacteriófagos ressurgiu como uma importante metodologia de controle de patógenos, já que podem ser utilizados em todos os estágios da linha de produção de alimentos sem, contudo, afetar as propriedades sensoriais do alimento. Diversas outras características favorecem sua utilização na indústria de alimentos e como destaque, podemos citar: a capacidade dos bacteriófagos, ao contrário dos antibióticos, de mutar para contornar os mecanismos de resistência da bactéria hospedeira; o fato de serem auto limitantes, ou seja, permanecem estáveis na

ausência do patógeno e se replicar na presença do mesmo; por possuírem natureza discriminatória, ou seja, a maioria dos bacteriófagos interagem apenas com um conjunto de bactérias que expressam determinados sítios de ligação e bactérias sem esses receptores não são afetadas (LABRIE et al., 2010; VANDAMME e MIEDZYBRODZKI, 2013; PHOENIX et al., 2014).

Em vista do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência de bacteriófagos livres e microencapsulados no controle de *Salmonella Enteritidis* em poedeiras e em ovos comerciais. Além disso avaliou-se a possível translocação dos bacteriófagos para o interior dos ovos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

O protocolo de utilização de animais proposto neste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP-UFV). O experimento com os animais foi conduzido no setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia e as análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH) do Departamento de Tecnologia de Alimentos, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa.

### **2.1. Micro-organismos**

Foram utilizadas estirpes de *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076) resistentes ao ácido nalidíxico e o bacteriófago (BFSE18) específico para este patógeno, provenientes do banco de culturas do LAMPOAH.

### **2.2. Propagação e titulação do bacteriófago**

Inicialmente uma alçada da cultura de *Salmonella Enteritidis* foi ativada em 5 mL de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI; HIMEDIA, Curitiba – PR) e incubada a 37 °C por 18 horas. Quinhentos microlitros da cultura ativa foram inoculadas em 100 mL de caldo BHI (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) e incubada em shaker (SL 221, SOLAB, Piracicaba - SP) sob agitação de 100 rpm a 37 °C durante 3 horas. Após este período foi adicionado 100 µL do BFSE18 mantendo a agitação e temperatura durante 18 horas. A suspensão foi centrifugada a 10.000 g (BECKMAN J2-MC, Brea – CA, EUA) por 10 minutos a 4 °C e filtrada em membrana de acetado de celulose de 0,2 µm (Corning Incorporated, Kaiserslautern - RP, Alemanha). Para avaliar a concentração dos bacteriófagos livres em suspensão, foram realizadas diluições seriadas de 100 µL da

suspensão de bacteriófagos em 900  $\mu\text{L}$  de tampão SM (50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-Hcl (pH 7,5), 0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 8  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 % gelatina). Dez microlitros de cada diluição foram gotejadas sobre uma sobrecamada de BHI (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) com 0,7 % de agar (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) adicionada de 500  $\mu\text{L}$  do patógeno ativo, disposto sobre uma superfície de agar base BHI. A concentração do bacteriófago livres em suspensão foi determinada após a visualização das placas incubadas por 18 horas a 37  $^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3. Microencapsulamento**

Para microencapsular o bacteriófago, foi utilizada a metodologia proposta por Wall et al., (2010) com algumas modificações. Foram utilizados 3,5 mL da suspensão de bacteriófago ( $\sim 10^{10}$  UFP $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) misturados em 14 mL de alginato de sódio 1,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, EUA), preparada em tampão fosfato salina (PBS; NaCl 137  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , KCl 2,7  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Após misturar as soluções, 1,58 mL de Span-85 (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, EUA) foi adicionado, seguido pela adição de 70 mL de óleo de canola (Salada, São Paulo - SP). A mistura foi emulsificada utilizando um mixer (Servodyne, Vernon Hills – IL, EUA) a 5.500 rpm durante um minuto. Após este período o mixer permaneceu ligado e 17,5 mL de uma solução de 0,5 %  $\text{CaCl}_2$  (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, EUA) e 0,05 % de  $\text{ZnCl}_2$  (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, EUA) foi adicionada por gotejamento, mantendo o mixer ligado por mais dois minutos. As microcápsulas foram peletizadas por centrifugação a 1.000 g (BECKMAN J2-MC, Brea – CA, EUA) durante 15 minutos e todo sobrenadante foi desprezado. O pellet foi lavado em três volumes (30 mL) de água destilada e peletizado novamente. O pellet foi resuspendido em um volume de água adicionado de dois volumes de uma solução de 2 % de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, EUA), peletizadas novamente e resuspendidas em PBS para serem estocadas sob refrigeração até o momento do uso. A concentração dos bacteriófagos nas microcápsulas foi determinada da mesma forma que os bacteriófagos livres. Foram realizadas diluições seriadas de 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de bacteriófagos micro encapsulados em 900  $\mu\text{L}$  de tampão SM (50 mM Tris-Hcl (pH 7,5), 0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 8  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 % gelatina). Dez microlitros de cada diluição foram gotejadas sobre uma sobrecamada de BHI (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) com 0,7 % de agar (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) adicionada de 500  $\mu\text{L}$  do patógeno ativo, disposto sobre uma superfície de agar base BHI. A concentração dos

bacteriófagos livres em suspensão foi determinada após a visualização das placas incubadas por 18 horas a 37 °C.

## 2.4. Preparo da ração

A dieta basal foi formulada a base de milho e de farelo de soja no intuito de atender ou exceder as exigências propostas pelo manual da linhagem da poedeira Hy-line W-36 (Hy-line, 2015) e as informações nutricionais dos alimentos estavam de acordo com Rostagno et al. (2011). Todos os tratamentos receberam o mesmo tipo de ração (Tabela 1).

Tabela 1 – Ingredientes e composição nutricional da ração basal

Ingredientes	Ração basal
Milho	61,640
Farelo de Soja, 45% PB	29,970
Óleo de Soja	4,251
Calcário	0,966
Fosfato Bicálcico	1,517
Sal comum	0,385
Premix mineral e vitamínico <sup>1</sup>	0,300
DL-Metionina, 99%	0.169
<b>Total</b>	<b>100.00</b>
Composição Nutricional Calculada	(%) <sup>2</sup>
EM, kcal/kg	3.150
PB	18,69
Cálcio (Ca)	0,835
Fósforo Disponível (Pd)	0,387
Lisina Digestível	0,830
Metionina + Cistina digestível	0,600
Metionina Digestível	0,360
Treonina Digestível	0,600

<sup>1</sup>Premix mineral e vitamínico (fornecimento por kg do produto): Vitamina A (mín.) 699999 U.I.; Vitamina D3 (mín.) 200001 U.I.; Vitamina E (mín.) 500,001 U.I.; Vitamina K3 (mín.); 159,999 mg; Vitamina B2 (mín.) 300 mg; Vitamina B12 (mín.) 0,800001 g; Niacina (mín.) 2000,001 mg; Colina (mín.) 23,436 g; Ácido Pantatênico (mín.) 350,001 mg; Cobre (mín.) 800,01 mg; Ferro (mín.) 5,001 g; Manganês (mín.) 6,999 g; Zinco (mín.) 5,001 g; Iodo (mín.) 120 mg; Selênio 20,001 mg; Bacitracina de Zinco 2000,001 mg. <sup>2</sup>As dietas foram formuladas de acordo com as exigências propostas pelo manual da linhagem, guia de manejo Lohmann LSL (2011) e informações nutricionais dos alimentos de acordo com Rostagno et al. (2011).

## **2.5. Experimento 1 – Avaliação da utilização de bacteriófagos livres e microencapsulados em ovos de galinhas poedeiras contaminadas com Salmonella Enteritidis.**

### **2.5.1. Delineamento experimental**

As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizados, composto por cinco tratamentos. Cada tratamento foi constituído por 10 aves, sendo cada ovo considerado uma unidade experimental. Para cada tratamento foram coletados seis ovos aleatoriamente, considerando seis repetições por tratamento.

Foram utilizadas 50 poedeiras da linhagem Hy-Line W-36, com 50 semanas de idade. As aves foram alojadas em galpão de alvenaria com cobertura de telhas de barro, telado, com pé-direito de 2,0 m e composto internamente por gaiolas de arame galvanizado com compartimentos de 25 cm de largura x 45 cm de profundidade x 40 cm de altura. O comedouro utilizado foi do tipo calha galvanizada percorrendo toda a extensão frontal das gaiolas e os bebedouros individuais, do tipo nipple, no interior de cada gaiola. Antes do início do experimento, um ovo de cada ave e suas respectivas fezes foram analisadas quanto a presença de Salmonella e as aves que apresentaram resultados positivos foram substituídas.

Os tratamentos foram separados dentro do mesmo galpão a uma distância mínima de 1 metro, entre cada tratamento, no intuito de minimizar possíveis contaminações do patógeno entre as aves e os ovos. As aves do tratamento T1, T2 e T3 foram contaminadas oralmente (dose única) pela ingestão de 1 mL de Salmonella Enteritidis ( $\sim 10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup>) enquanto os outros tratamentos (T4 e T5) receberam apenas 1 mL de solução tampão PBS esterilizado. Seis horas após a inoculação do patógeno, e em todo período experimental no período da manhã, as aves dos tratamentos T2 e T4 receberam 1 mL da solução de bacteriófagos ( $\sim 10^9$  UFP·mL<sup>-1</sup>), enquanto as aves dos tratamentos T3 e T5 receberam 1 mL da suspensão de bacteriófagos microencapsulados ( $\sim 10^6$  UFP·mL<sup>-1</sup>).

T1 – Controle positivo – Aves contaminadas com Salmonella Enteritidis (ACSE)

T2 – ACSE e inoculadas com bacteriófagos livres (BL)

T3 – ACSE e inoculadas com bacteriófagos microencapsulados (BM)

T4 – Não CSE e inoculadas com BL

T5 – Não CSE e inoculadas com BM

Os ovos foram coletados aleatoriamente, no período da manhã, em cinco diferentes intervalos de tempo, sendo eles um dia, três dias, sete dias, 14 dias e 28 dias, totalizando 150 ovos analisados durante o período experimental. Ao final da tarde (entre 17 e 18 horas), os restantes dos ovos não coletados foram descartados no biotério do setor de Avicultura da UFV e a frequência de postura anotada em ficha apropriada. A temperatura no interior do galpão foi monitorada diariamente. As aves receberam ração e água ad libitum e 17 horas de luz/dia durante todo o período experimental, respeitando as recomendações de manejo do manual da linhagem. Ao término do período experimental, todas as aves foram insensibilizadas por eletronarcolese (com corrente elétrica de 60 V), abatidas e incineradas. Para a esterilização dos galpões foram utilizados dois procedimentos, no primeiro o chão e as paredes foram lavados com solução de hipoclorito de sódio 1,0 % e no segundo procedimento, as gaiolas e comedouros foram esterilizados utilizando vassoura de fogo.

### **2.5.2. Análises microbiológicas**

Foram analisadas a clara, a gema e a casca de todos os ovos coletados nos dias um, três, sete, 14 e 28 quanto a presença de *Salmonella* e bacteriófagos no interior dos ovos. Para a avaliação da presença de *Salmonella* foi utilizado o protocolo MLG 4.08 do USDA (2014), com modificações. Os ovos foram quebrados de forma asséptica e suas frações, clara, gema e casca, separadas em frascos esterilizados. Após romper a gema com uma ponteira esterilizada e quebrar assepticamente a casca do ovo manualmente em pedaços menores, adicionou-se em cada frasco 30 mL de água peptonada tamponada (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) para facilitar a proliferação das possíveis estirpes de *Salmonella*. Após isto, as amostras foram então incubadas por 24 horas, sob agitação em shaker (SL 221, SOLAB, Piracicaba - SP), a 37 °C. Aliquotas de 500 µL e 100 µL das amostras foram transferidas para tubos de 10 mL de Caldo Tetracionato (TB; Becton Dickison Company, Franklin Lakes – NJ, EUA) e caldo Rappaport-Vassiliadis (RV; Becton Dickison Company, Franklin Lakes – NJ, EUA), respectivamente, e incubados a 42 °C por 18 horas. De cada tubo foi retirada uma alçada de 10 µL, estriada em placas de Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4; Becton Dickison Company, Franklin Lakes – NJ, EUA) suplementadas com ácido nalidíxico (50 µg·mL<sup>-1</sup>) e incubadas a 37 °C por 18 horas.

A avaliação da presença dos bacteriófagos foi realizada após a análise da presença de Salmonella, no restante da amostra. Uma alíquota de 10 mL de uma nova cultura ativa de Salmonella foi adicionada a cada frasco contendo clara, gema e casca dos ovos e novamente incubadas por 18 horas, sob agitação no shaker (SL 221, SOLAB, Piracicaba - SP), a 37 °C. Uma alíquota de 1 mL de cada frasco foi transferida para microtubos esterilizados. As amostras foram centrifugadas a 13.000 g (Hettich Mikro 200R, Tuttlingen - BW, Alemanha), a 4 °C e o sobrenadante transferido para novos microtubos esterilizados. Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram gotejadas sobre uma sobrecamada de BHI (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) com 0,7 % de agar (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) adicionada de 500 µL de cultura ativada de Salmonella, disposta sobre uma superfície de agar base BHI (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia). A presença ou ausência de bacteriófagos foi determinada após incubação da placa de BHI (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) por 18 horas a 37 °C mediante observação e contagem das placas de lise.

## **2.6. Experimento 2 – Avaliação dos tratamentos em ovos após a contaminação com Salmonella Enteritidis.**

### **2.6.1. Preparação da suspensão de bacteriófagos**

Após a propagação do bacteriófago conforme descrito no item 2.2, o título do bacteriófago foi aumentado utilizando a metodologia proposta por Colombet et al., (2007). Uma suspensão de polietileno glicol (PEG; Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, EUA) 40 % e 2,5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, foi adicionada na proporção 1:4 em caldo BHI (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) contendo bacteriófagos a 10<sup>9</sup> UFP·mL<sup>-1</sup>, o meio foi agitado vigorosamente e incubado por 18 horas a 4 °C. O sobrenadante foi removido com cuidado, e o restante transferido para tubos de centrifuga. A suspensão foi centrifugada a 13.000 g (Hettich Mikro 200R, Tuttlingen - BW, Alemanha) durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet resuspendido em água Milli-Q esterilizada. Nos tubos foi adicionado 1 mol·L<sup>-1</sup> de KCl e centrifugado a 13.000 g (Hettich Mikro 200R, Tuttlingen - BW, Alemanha) durante 15 minutos a 4 °C novamente. O sobrenadante foi recolhido e a concentração foi avaliada para permitir a padronização da suspensão de bacteriófago durante o experimento. Para avaliar a concentração dos bacteriófagos livres em suspensão, foram realizadas diluições seriadas de 100 µL da suspensão de bacteriófagos em 900 µL de tampão SM (50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-Hcl (pH 7,5), 0,1 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 8 mmol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 %

gelatina). Dez microlitros de cada diluição foram gotejadas sobre uma sobrecamada de BHI (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) com 0,7 % de agar (HIMEDIA, Mumbai – MA, Índia) adicionada de 500 µL do patógeno ativo, disposto sobre uma superfície de agar base BHI. A concentração dos bacteriófagos em suspensão foi determinada após a visualização das placas incubadas por 18 horas a 37 °C e uma suspensão de bacteriófagos a  $10^9$  UFP·mL<sup>-1</sup> foi elaborada em tampão PBS.

### **2.6.2. Preparação dos ovos**

Foram coletados, no setor de Avicultura da UFV, um total de 720 ovos frescos, aleatoriamente. Estes ovos foram separados em grupos que consistiam em oito combinações de tratamentos, com 90 ovos cada. Os tratamentos foram: higienização (H), não higienização ( $\bar{H}$ ), pasteurização (P), não pasteurização ( $\bar{P}$ ), utilização de bacteriófagos (B), e não utilização de bacteriófagos ( $\bar{B}$ ).

A higienização (H) dos ovos foi feita da seguinte maneira: os ovos foram lavados, escovados vigorosamente e secos a temperatura ambiente ( $\pm 24$  °C). A pasteurização (P) dos ovos foi realizada em banho maria a 60 °C por 3,5 minutos, conforme descrito pela Portaria nº 01, de 21 de fevereiro de 1990 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA; Brasil, 1990). Após o processo de pasteurização os ovos foram secos em temperatura ambiente ( $\pm 24$  °C). Os ovos tratados com bacteriófagos (B) foram imersos em suspensão tampão contendo bacteriófagos a  $10^9$  UFP·mL<sup>-1</sup> (item 2.6.1) por 30 segundos. Após imersão os ovos foram deixados à temperatura ambiente até sua completa secagem. Após secagem, todos os ovos foram contaminados com *Salmonella Enteritidis*. Os ovos foram submersos em uma solução tampão SM, com aproximadamente  $10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup> de *Salmonella Enteritidis*, durante 30 segundos e transferidos para um suporte onde foram secos em temperatura ambiente.

### **2.6.3. Delineamento experimental**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo 8 tratamentos representados pela combinações das condições descritas anteriormente, T1 ( $\bar{H}\bar{P}\bar{B}$ ), T2 ( $\bar{H}\bar{P}B$ ), T3 ( $\bar{H}P\bar{B}$ ), T4 ( $\bar{H}PB$ ), T5 ( $H\bar{P}\bar{B}$ ), T6 ( $H\bar{P}B$ ), T7 ( $HP\bar{B}$ ), T8 ( $HPB$ ), por cinco dias de amostragem (1, 3, 7, 14 e 28) em três temperaturas (4, 7 e 24 °C), com 6 repetições para cada tratamento.

#### **2.6.4. Análises microbiológicas**

Foram analisadas a clara, a gema e a casca de todos os tratamentos coletados quanto a presença e concentração de *Salmonella* presente nas amostras. Para a quantificação de *Salmonella* foi utilizada a metodologia de espalhamento de superfície direta em XLT4 (Becton Dickison Company, Franklin Lakes – NJ, EUA). Para isso, os ovos foram quebrados de forma asséptica e suas frações, clara, gema e casca, separadas em três recipientes esterilizados. Todas as frações foram separadas para evitar possíveis contaminações cruzadas entre as amostras. Usando uma luva esterilizada para cada ovo, a clara foi separada da gema cuidadosamente, evitando que a membrana envolta na gema se rompesse. A casca foi quebrada em pedaços menores usando um pilão esterilizado. Para permitir a coleta de material da casca, 10 mL de uma solução tampão PBS foi acrescentada para permitir a eluição do patógeno para o meio. Após 10 minutos de contato (solução - casca), foram coletados 100 µL e espalhados em superfície do ágar XLT4, em duplicata, e incubadas a 37 °C por 24 horas. Placas que não apresentaram crescimento do patógeno foram re-incubadas a 37 °C por mais 24 horas para confirmação do resultado. A concentração bacteriana (UFC·mL<sup>-1</sup>) foi convertida em escala logarítmica (log<sub>10</sub> UFC·mL<sup>-1</sup>) para a análise estatística.

#### **2.7. Análise estatística**

Todos os dados gerados passíveis de análises estatística foram analisados usando o software R, versão 3.2.3 (The R Foundation, Vienna, Austria). As diferenças das médias entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste de Tukey-Kramer e a diferença significativa foi determinada usando  $p < 0,05$ .

### **3. RESULTADO E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Experimento 1 - Avaliação da utilização de bacteriófagos livres e microencapsulados em ovos de galinhas poedeiras contaminadas com *Salmonella Enteritidis*.**

Nos primeiros dias após a contaminação por *Salmonella Enteritidis*, as aves do controle positivo (T1), apresentaram um quadro clínico de apatia e quatro aves apresentaram diarreia no dia seguinte à inoculação do patógeno. Durante o período experimental houve redução ( $P < 0,05$ ) na postura de ovos das aves do T1, que obteve 78,75 % do percentual de produção de ovos, enquanto o percentual dos outros

tratamentos variou entre 85 e 89 % (T2, 86,6 %; T3, 85,5 %; T4 88,75, %; T5, 87,1 %), considerado ótimo para aves entre 48 e 61 semanas de idade (Hy-line, 2015).

Um total de 150 ovos foram quebrados e suas frações analisadas quanto a presença de Salmonella e bacteriófagos na sua composição. A Figura 1 ilustra o número de foram detectados a presença de Salmonella Enteritidis e bacteriófagos para os diferentes tratamentos.

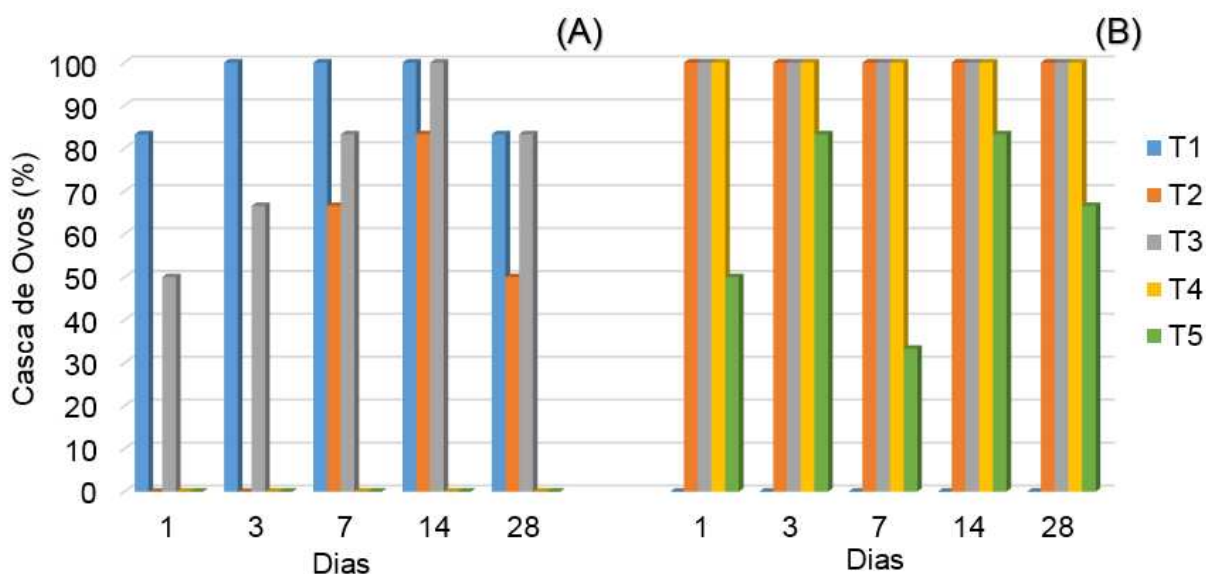


Figura 1. Percentual de detecção de Salmonella Enteritidis (A) e bacteriófagos (B) nas cascas de ovos durante o período de postura para os diferentes tratamentos. T1 – ACSE, T2 – ACSE + BL, T3 – ACSE + BM, T4 – BL e T5 – BM.

Durante o período experimental o patógeno foi detectado em 70 % (n = 63) das 90 amostras de casca (Figura 1), sendo 28 no tratamento T1, doze no tratamento T2 e 23 no tratamento T3. Aves tratadas com bacteriófagos livres apresentaram menor detecção do patógeno na superfície da casca, sugerindo que possa ter ocorrido redução da contaminação pelo patógeno.

Apesar das proteínas (lisozima e N-acetilglicosaminidase) presentes na membrana da casca possuírem atividade antimicrobiana, estas não conseguiram impedir a sobrevivência de Salmonella na casca dos ovos (ADHAM et al., 2013). Além disso, como o patógeno coloniza o ovário e o trato gastrointestinal, existem duas formas de infectar os ovos, uma com o contato da casca com fezes contaminadas na cloaca e outra pela contaminação interna dos ovos dentro do oviduto, justificando

assim, a elevada presença do patógeno na casca dos ovos em relação à clara e a gema.

A utilização de bacteriófagos livres (T2) reduziu a presença do patógeno na primeira semana e ao longo das semanas seguintes em relação aos tratamentos T1 e T3. Assim como ocorreu na clara e na gema a utilização dos bacteriófagos não eliminou completamente o patógeno, mas sua utilização foi capaz de reduzir a presença do patógeno ao longo do tempo. Como a aplicação dos bacteriófagos ocorreu diariamente é justificável que a maior concentração de bacteriófagos esteja na casca, já que o ovo passa pela cloaca sendo o mesmo caminho utilizado pelas fezes que poderiam ter bacteriófagos. A menor presença de bacteriófagos nos ovos do tratamento T5 é justificável pela provável ausência do patógeno no interior do trato gastrointestinal limitando sua replicação e menor concentração nas fezes (OLIVEIRA et al., 2009).

O número de amostras onde foi possível verificar a presença de Salmonella e de bacteriófagos na clara dos ovos é ilustrada na Figura 2.

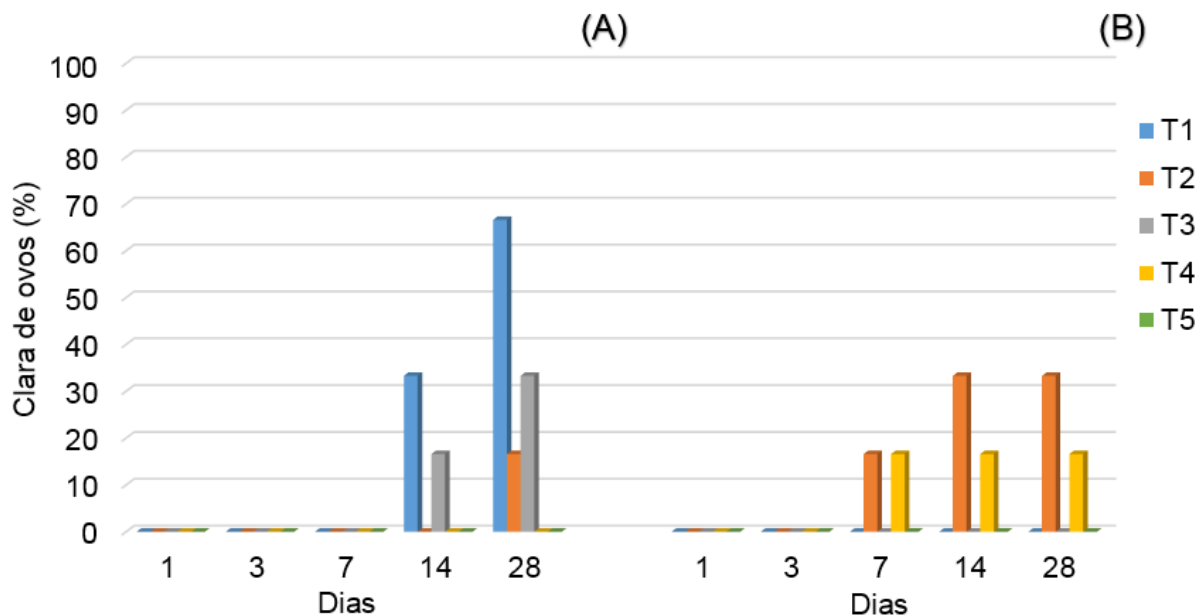


Figura 2. Percentual de detecção de Salmonella Enteritidis (A) e bacteriófagos (B) nas claras de ovos durante o período de postura para os diferentes tratamentos. T1 – ACSE, T2 – ACSE + BL, T3 – ACSE + BM, T4 – BL e T5 – BM.

Foi possível detectar *Salmonella* em dois ovos do T1 e em apenas um ovo do T3 nas análises do dia 14. Nas análises do dia 28 o patógeno foi detectado em quatro, uma e duas amostras da clara para os T1, T2 e T3 respectivamente. Diversos fatores contribuem para essa baixa detecção, uma delas são as diversas proteínas presentes no albúmen que apresentam atividades antimicrobianas, impedindo assim o crescimento e a propagação de micro-organismos na clara (WELLMAN-LABADIE et al., 2008; HOWARD et al., 2012; ADHAM et al., 2013). Além deste, fatores como a dose infectante (GAST et al., 2011), estirpe do micro-organismo (GOLE et al., 2014a; PASQUALI et al., 2016), idade da ave, viscosidade e pH do albúmen (SAMLÍ et al., 2005), velocidade de contaminação do ovário e oviduto (MADDADI et al., 2010), e as limitações da técnica de isolamento (GOLE et al., 2014b), contribuem para a justificativa da detecção de apenas 11,1 % (n = 10) do patógeno em relação as 90 amostras de clara analisadas.

Diversas proteínas e peptídeos presentes no albúmen possuem efeitos antimicrobianos, como a ovoalbumina, a ovotransferrina, ovoflavoproteína e a lisozima, por exemplo. Apesar da ovoalbumina representar 54 % do conteúdo total da clara, sua atividade antimicrobiana ocorre apenas em bactérias gram positivas. Entretanto, estudos com a proteína X relacionada à ovoalbumina mostrou atividade antimicrobiana em bactérias gram negativas (REHAULT-GODBERT et al., 2013). A ovotransferrina e a ovoflavoproteína agem reduzindo a disponibilidade de ferro e riboflavina, respectivamente, no meio enquanto a lisozima age degradando a parede celular das bactérias (REHAULT-GODBERT et al., 2011; ADHAM et al., 2013). Estas proteínas, dentre outras com atividade antimicrobiana, podem ter contribuído para impedir o crescimento e desenvolvimento de *Salmonella* na clara. Além disso, o patógeno foi detectado em apenas uma das amostras do tratamento com bacteriófagos livres.

Foi possível detectar a presença de bacteriófagos livres (T2 e T4) no interior da clara a partir de uma semana de tratamento (Figura 2), contudo, não foi possível isolá-lo no interior da gema. Os bacteriófagos mostraram ser um potencial suplemento para a alimentação de poedeiras no controle de *Salmonella* já que foi possível isolá-lo tanto na clara quanto na casca. A detecção de bacteriófagos ocorreu com maior frequência no tratamento em que as aves haviam sido contaminadas com *Salmonella*. Entretanto,

não foi possível detectar a presença de bacteriófagos em nenhuma das amostras de clara e de gema de aves tratadas com bacteriófagos microencapsulados. O método de microencapsulamento, o local onde os bacteriófagos foram liberados no intestino, assim como a concentração final dos bacteriófagos no interior das microcápsulas, podem ter interferido na presença do bacteriófago no interior da clara.

Se bactérias e vírus podem se translocar através das barreiras intestinais, é de se esperar que os bacteriófagos também consigam passar através da parede intestinal, alcançando a corrente sanguínea (GORSKI et al., 2006). Apesar de não ter encontrado estudos relacionando a translocação de bacteriófagos para o ovário ou ovos de galinhas poedeiras, o estudo realizado por Oliveira et al., (2009) foi capaz de isolar bacteriófagos no fígado, no baço e no duodeno de aves, justificando que a administração oral de elevadas concentrações de bacteriófagos pode resultar na circulação sistêmica e consequentemente translocação de bacteriófagos para órgãos.

O número de gemas onde foi possível verificar a presença de Salmonella e de bacteriófagos na gema dos ovos é ilustrada na Figura 3.

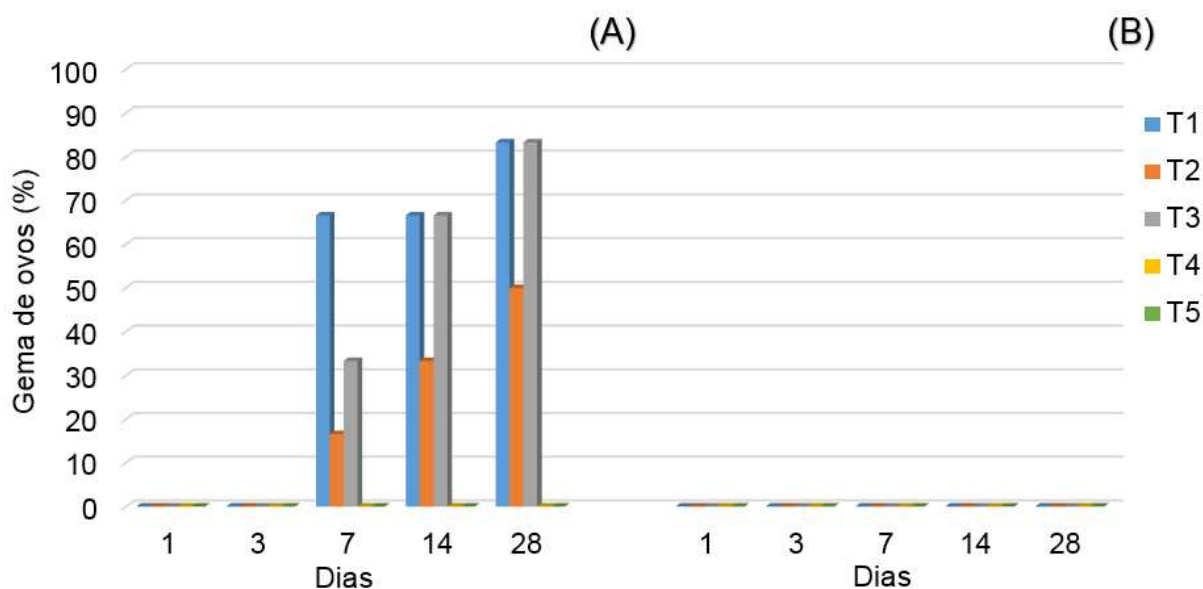


Figura 3. Percentual de detecção de Salmonella Enteritidis (A) e bacteriófagos (B) nas gemas de ovos durante o período de postura para os diferentes tratamentos. T1 – ACSE, T2 – ACSE + BL, T3 – ACSE + BM, T4 – BL e T5 – BM.

Em relação à gema (Figura 3), o patógeno só foi detectado a partir de uma semana de contaminação em 33,3 % das amostras analisadas. Assim como neste

trabalho, Gast et al., (1995) observou um pico de detecção de Salmonella Enteritidis no interior da gema entre 11 e doze dias após a infecção inicial. A detecção do patógeno na gema ocorreu uma semana antes da detecção na clara, indicando que a contaminação pode ter iniciado na gema e posteriormente contaminado a clara.

Após a colonização do intestino delgado, o patógeno invade as células M das placas de Peyer. Neste local estão concentrados linfócitos e macrófagos que capturam o patógeno e o transportam para o linfonodo, baço ou fígado do animal. Como Salmonella possui diversos fatores de virulência, o patógeno consegue sobreviver e se disseminar nestes órgãos (HAGARA et al., 2009; REIS e HORN, 2010). Como a síntese dos precursores da gema ocorrem no fígado das galinhas poedeiras, sendo estes secretados no plasma e transferidos via corrente sanguínea para o oócito, provavelmente o patógeno utiliza a mesma via para alcançar o ovário (SCHNEIDER, 2009). Segundo Maddadi et al., (2010), após a necropsia de poedeiras contaminadas com Salmonella Enteritidis, foi possível observar a presença do patógeno no intestino, no fígado, no ovário e no oviduto dos animais. Este resultado indica que para infectar o ovário, o patógeno necessita primeiramente alcançar a corrente sanguínea, causando uma infecção sistêmica.

O patógeno presente no ovário entra em contato com o folículo pré-ovulatório sendo incorporado à gema (HOWARD et al., 2005). Assim que a gema chega ao infundíbulo ocorre a formação da membrana vitelina que possui a função de proteger a gema, e conseqüentemente acaba protegendo a Salmonella contra as proteínas antimicrobianas presentes na clara (NEVES e HENRY, 2012). As lipoproteínas presentes na gema também possuem atividade antimicrobiana. Entretanto, estas proteínas não causam danos em estirpes de Salmonella. Além disso, a composição nutricional da gema permite o crescimento do patógeno em seu interior (GANTOIS et al., 2009; GROSS et al., 2015; WHILEY e ROSS, 2015).

Em relação à análise feita na gema podemos perceber que a presença de Salmonella Enteritidis foi menor em todos os tratamentos que utilizaram bacteriófagos. Em relação ao tratamento T2, o patógeno foi detectado em apenas uma amostra após uma semana, duas amostras após duas semanas e em três amostras após a quarta semana de tratamento, enquanto no tratamento T3, o patógeno foi detectado em

apenas duas amostras após uma semana, quatro amostras após duas semanas e em cinco amostras após a quarta semana de tratamento.

Mesmo não tendo sido detectado no interior da gema (Figura 3), os bacteriófagos podem ter contribuído para a redução da presença do patógeno ao longo do período experimental. Mais estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos de translocação dos bacteriófagos para o interior dos ovos e os motivos que resultaram na presença de bacteriófagos livres na clara e não na gema.

### **3.2. Experimento 2 - Avaliação dos tratamentos em ovos após a contaminação com *Salmonella* Enteritidis.**

O processo de pasteurização dos ovos, tem por objetivo reduzir a possível carga bacteriana presente na casca a níveis seguros para o consumidor. Segundo Michalski et al., (1999), o processo de pasteurização pode reduzir até 9D de *Salmonella* Enteritidis em ovos com casca dependendo do binômio tempo/temperatura utilizado. Durante o processo de pasteurização utilizado neste experimento foi observado comportamento diferenciado entre os ovos higienizados e não higienizados conforme ilustrado na Figura 4.

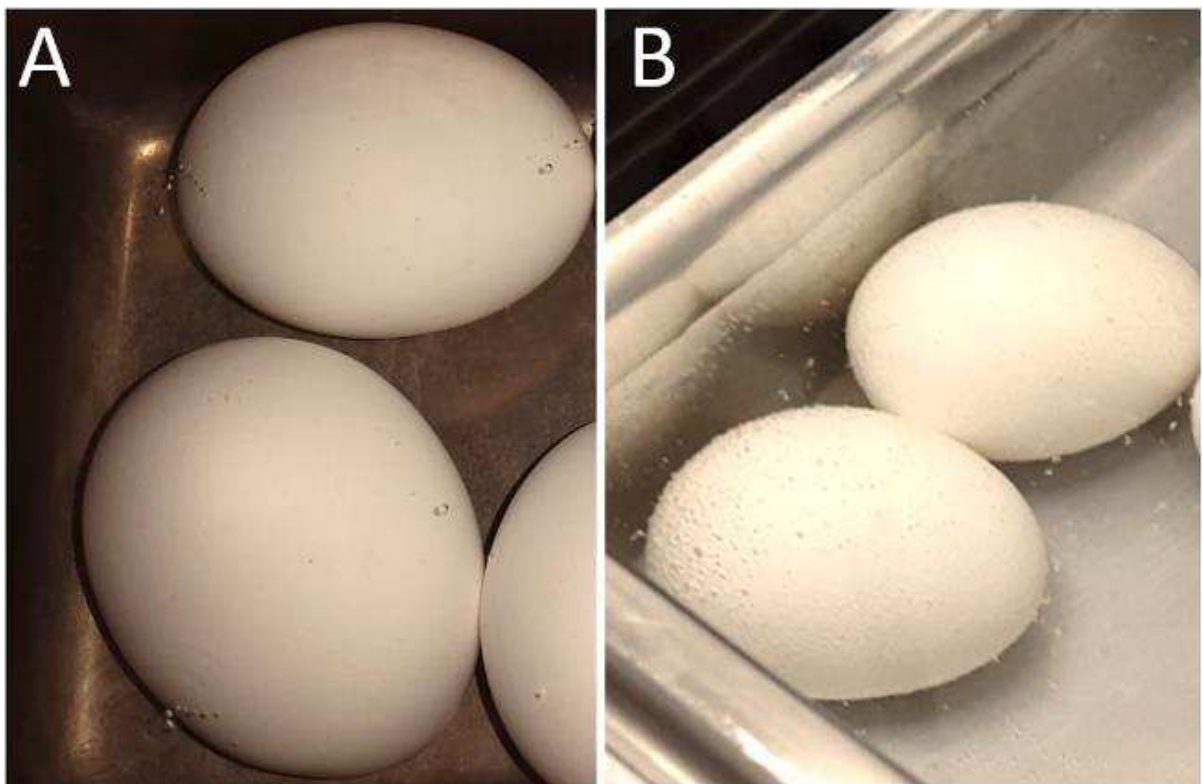


Figura 4. Pasteurização dos ovos. (A – Ovos higienizados, B – ovos não higienizados)

Durante a pasteurização foi observado a formação de pequenas bolhas ao redor de toda a casca dos ovos não higienizados. Já nos ovos higienizados observou-se uma coluna de bolhas “escapando” dos ovos conforme destacado na Figura 4. A remoção da cutícula durante a higienização resultou na exposição dos poros da casca. Os poros assim expostos permitem a entrada de água, ar, micropartículas e microorganismos para o interior da câmara de ar. Desta forma, a higienização de ovos contribui para a aceleração da penetração do patógeno em seu interior uma vez que a umidade presente na câmara de ar poderia contribuir para a locomoção do patógeno no seu interior, acelerando assim, sua passagem pela membrana interna, penetração e contaminação da clara e da gema (GOLE et al. 2014).

A presença do patógeno foi observada em todas as cascas dos ovos incubados. Entretanto sua detecção na clara e na gema não foi possível quando incubados a 4 °C. A Tabela 2 apresenta os valores médios de crescimento do patógeno na casca dos ovos incubados a 4 °C.

Tabela 2. Concentrações médias de Salmonella Enteritidis (log UFC·mL<sup>-1</sup>) presentes na casca dos ovos incubados a 4 °C.

Tratamentos	Dias				
	1	3	7	14	28
T1	1,95 ± 0,19 <sup>ab</sup>	N/D	1,81 ± 0,09 <sup>ab</sup>	2,10 ± 0,06 <sup>cd</sup>	2,20 ± 0,09 <sup>bcd</sup>
T2	1,17 ± 0,07 <sup>c</sup>	N/D	N/D	1,78 ± 0,08 <sup>e</sup>	2,09 ± 0,13 <sup>d</sup>
T3	2,04 ± 0,13 <sup>ab</sup>	1,32 ± 0,21 <sup>a</sup>	2,10 ± 0,15 <sup>ab</sup>	2,16 ± 0,09 <sup>bc</sup>	2,24 ± 0,14 <sup>bcd</sup>
T4	1,84 ± 0,08 <sup>b</sup>	N/D	1,70 ± 0,13 <sup>b</sup>	1,95 ± 0,10 <sup>de</sup>	2,18 ± 0,17 <sup>cd</sup>
T5	2,27 ± 0,05 <sup>a</sup>	N/D	2,23 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,34 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,09 <sup>ab</sup>
T6	2,15 ± 0,15 <sup>a</sup>	N/D	2,26 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,30 ± 0,09 <sup>ab</sup>	2,39 ± 0,11 <sup>ab</sup>
T7	2,30 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,30 <sup>a</sup>	2,28 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,07 <sup>a</sup>
T8	2,17 ± 0,10 <sup>a</sup>	N/D	2,25 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,52 ± 0,04 <sup>a</sup>

Médias das contagens acompanhadas pela mesma de letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5 %. N/D - Não detectável; T1 (HPB); T2 (HPB); T3 (HPB); T4 (HPB); T5 (HPB); T6 (HPB); T7 (HPB); T8 (HPB);

É possível observar que em todos os intervalos de tempo (1, 3, 7, 14 e 28) o tratamento T2 (HPB) apresentou a menor ( $p < 0,05$ ) contagem do patógeno em relação a todos os outros tratamentos. Além disso, os valores das análises do tratamento T2 (HPB) no terceiro dia e na primeira semana foram tão baixos que não foi possível detectá-los pela técnica de contagem utilizada.

No terceiro dia foi possível detectar o patógeno apenas nas amostras dos tratamentos T3 (HPB) e T7 (HPB). Como a temperatura de crescimento do patógeno (5 °C a 47 °C) é superior à temperatura de incubação (4 °C), *Salmonella* necessita sintetizar proteínas de resposta ao choque térmico e alterar sua fisiologia de membrana para conseguir sobreviver (PUI et al., 2011). Estas proteínas permitem a sobrevivência do patógeno em baixas temperaturas, mas diminuem sua eficiência durante a replicação (MANDIGAN et al., 2015) o que explica a baixa concentração do patógeno à 4 °C em relação às outras temperaturas de incubação e sua não detecção nas amostras do terceiro dia.

Dependendo da intensidade do stress *Salmonella* pode entrar em um estado fisiológico de dormência denominado viável não cultivado (VNC). Em experimento realizado por ASAKURA et al., (2002) foi observado que *Salmonella* Oranienburg entrou no estado VNC após ser incubada a 4 °C por 24 horas. Para que o patógeno deixe o estado VNC e retome o crescimento é necessário, em alguns casos, apenas a retirada do fator de indução, mas em outros casos pode ser um evento muito mais complexo (TORTORA et al., 2013). Como o patógeno cresceu ao longo dos dias, provavelmente ele não entrou no estado VNC, além disso, existe outro fator que pode justificar a ausência do patógeno no terceiro dia e nas amostras de clara e gema, que é a limitação de detecção da técnica utilizada. No caso, *Salmonella* pode estar presente em concentrações tão baixas que o plaqueamento direto não conseguiu detectá-la.

Observando os valores médios das contagens do patógeno, na segunda e na quarta semana das análises, é possível afirmar que os tratamentos higienizados (T5 (HPB), T6 (HPB), T7 (HPB) e T8 (HPB)) apresentaram os maiores valores ( $p < 0,05$ ) em relação aos outros tratamentos ao longo do tempo (Figura 5a). Em relação ao tempo de incubação é possível observar que os tratamentos submetidos à pasteurização (Figura 5b), ou não, e submergidos em bacteriófagos (Figura 5c), ou não, apresentaram valores de contagens médias do patógenos similares ( $p > 0,05$ ). Também é possível observar que a partir da primeira semana os ovos higienizados apresentaram valores médios de contagens superiores aos que não foram higienizados ( $p < 0,05$ ).

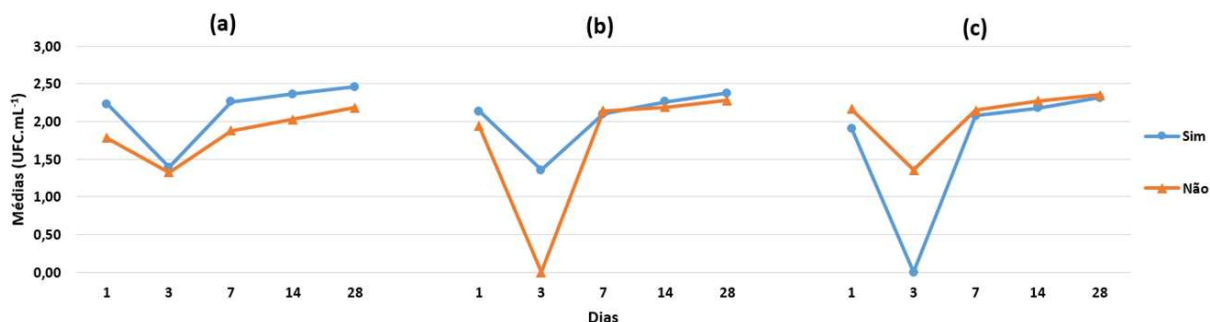


Figura 5. Efeito da aplicação (sim) ou não da higienização (a), da pasteurização (b) e de bacteriófagos (c) das amostras de casca dos ovos incubados a 4 °C, em relação ao crescimento médio do patógeno ao longo do tempo.

O processo de higienização, conforme citado anteriormente, remove a cutícula da casca. A cutícula pode penetrar até 50 µm de profundidade nos poros. A casca possui entre 7.000 e 17.000 poros e a espessura do poro pode variar entre 10 e 60 µm (ROSE-MARTEL E HINCKE, 2013). Como *Salmonella* mede entre 0,7 e 1,5 por 2,0 e 5,0 µm, a remoção da cutícula facilita sua adesão e multiplicação nos poros da casca, justificando a maior contagem média do patógeno apresentada pelas amostras dos tratamentos que foram higienizados em relação aos que não foram. O efeito da higienização também foi observado por Gole et al., (2014a), que relataram maior contaminação da casca de ovos lavados e higienizados em relação ao grupo controle, que não havia sido submetido a nenhum tratamento, sugerindo que a limpeza do ovo realizada pela indústria pode ser eficaz para remover sujidades da casca, entretanto deixa o ovo susceptível a contaminações futura pelo patógeno.

Ao contrário do que ocorreu a 4 °C, foi possível detectar a presença do patógeno na clara e na gema dos os ovos incubados a 7 °C (Tabela 3). Entretanto, essa detecção ocorreu a partir da primeira semana na clara (T7 (HPB)), e na última semana de análise das amostras de gema (T3 (HPB) e T8 (HPB)). Apesar do patógeno ter sido detectado na clara, não foi possível a realização dos testes estatísticos entre estes tratamentos da primeira semana devido ao baixo número de amostras onde o patógeno havia sido detectado. As amostras de gema e clara do T2 (HPB) não apresentaram detecção do patógeno. Este resultado está possivelmente relacionado à primeira barreira de proteção da casca, a cutícula, associada a proteção promovida pela aplicação do bacteriófago, que em conjunto podem ter contribuído para a redução da contaminação e penetração do patógeno na clara e na gema.

Tabela 3. Médias da contagem de Salmonella Enteritidis (log UFC·mL<sup>-1</sup>) nas amostras de clara, de gema e de casca dos ovos incubados a 7 °C.

Clara					
Tratamentos	Dias				
	1	3	7	14	28
T1	N/D	N/D	N/D	N/D	1,45 ± 0,07 <sup>b</sup>
T2	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
T3	N/D	N/D	N/D	1,38 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,52 ± 0,18 <sup>ab</sup>
T4	N/D	N/D	N/D	N/D	1,47 ± 0,10 <sup>b</sup>
T5	N/D	N/D	N/D	1,47 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,81 ± 0,04 <sup>ab</sup>
T6	N/D	N/D	N/D	N/D	1,75 ± 0,29 <sup>b</sup>
T7	N/D	N/D	1,69 ± 0,12	1,94 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,23 <sup>a</sup>
T8	N/D	N/D	N/D	1,83 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,17 <sup>ab</sup>

Gema					
Tratamentos	Dias				
	1	3	7	14	28
T1	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
T2	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
T3	N/D	N/D	N/D	N/D	1,32 ± 0,15 <sup>b</sup>
T4	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
T5	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
T6	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
T7	N/D	N/D	N/D	N/D	1,97 ± 0,03 <sup>a</sup>
T8	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

Casca					
Tratamentos	Dias				
	1	3	7	14	28
T1	2,09 ± 0,15 <sup>ab</sup>	2,20 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,48 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,91 ± 0,29 <sup>ab</sup>	3,44 ± 0,16 <sup>ab</sup>
T2	2,06 ± 0,15 <sup>b</sup>	2,17 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,19 ± 0,13 <sup>b</sup>	2,28 ± 0,50 <sup>b</sup>	2,33 ± 0,59 <sup>c</sup>
T3	2,27 ± 0,07 <sup>ab</sup>	2,30 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,52 ± 0,17 <sup>b</sup>	2,97 ± 0,42 <sup>ab</sup>	3,41 ± 0,29 <sup>ab</sup>
T4	2,12 ± 0,37 <sup>ab</sup>	2,24 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,19 <sup>b</sup>	2,66 ± 0,37 <sup>b</sup>	3,15 ± 0,32 <sup>b</sup>
T5	2,30 ± 0,10 <sup>ab</sup>	2,48 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,64 ± 0,36 <sup>ab</sup>	3,11 ± 0,43 <sup>ab</sup>	3,56 ± 0,21 <sup>ab</sup>
T6	2,22 ± 0,20 <sup>b</sup>	2,29 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,45 <sup>ab</sup>	3,12 ± 0,21 <sup>ab</sup>	3,56 ± 0,30 <sup>ab</sup>
T7	2,42 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,50 ± 0,35 <sup>a</sup>	3,12 ± 0,50 <sup>a</sup>	3,40 ± 0,49 <sup>a</sup>	3,70 ± 0,42 <sup>a</sup>
T8	2,22 ± 0,09 <sup>ab</sup>	2,52 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,19 ± 0,35 <sup>a</sup>	3,41 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,68 ± 0,45 <sup>a</sup>

Médias das contagens acompanhadas pela mesma de letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5 %. N/D - Não detectável; T1 (HPB); T2 (HPB); T3 (HPB); T4 (HPB); T5 (HPB); T6 (HPB); T7 (HPB); T8 (HPB).

O patógeno foi detectado em todas as amostras das cascas dos ovos incubados a 7 °C. As quatro maiores médias de crescimento (log UFC·mL<sup>-1</sup>) do patógeno, foram encontradas nas amostras de cascas incubadas a 7 °C dos tratamentos T5 (HPB), T6 (HPB), T7 (HPB) e T8 (HPB), sendo estes os mesmos tratamentos que apresentaram os maiores valores médios de crescimentos (log UFC·mL<sup>-1</sup>) do patógeno quando incubadas a 4 °C.

A higienização (Figura 6a), a pasteurização (Figura 6b) e a utilização de bacteriófagos (Figura 6c) apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na contagem média do patógeno nas amostras da clara e da casca, ao longo do tempo. Não foi possível a realização de teste estatístico para as amostras de gema devido ao baixo número de amostras onde o patógeno havia sido detectado. A 7 °C é possível inferir que houve penetração do patógeno no interior dos ovos. Segundo Howard et al., (2012), a cutícula perde seu efeito protetor após 4 dias, justificando a penetração do patógeno a partir das análises da primeira semana.

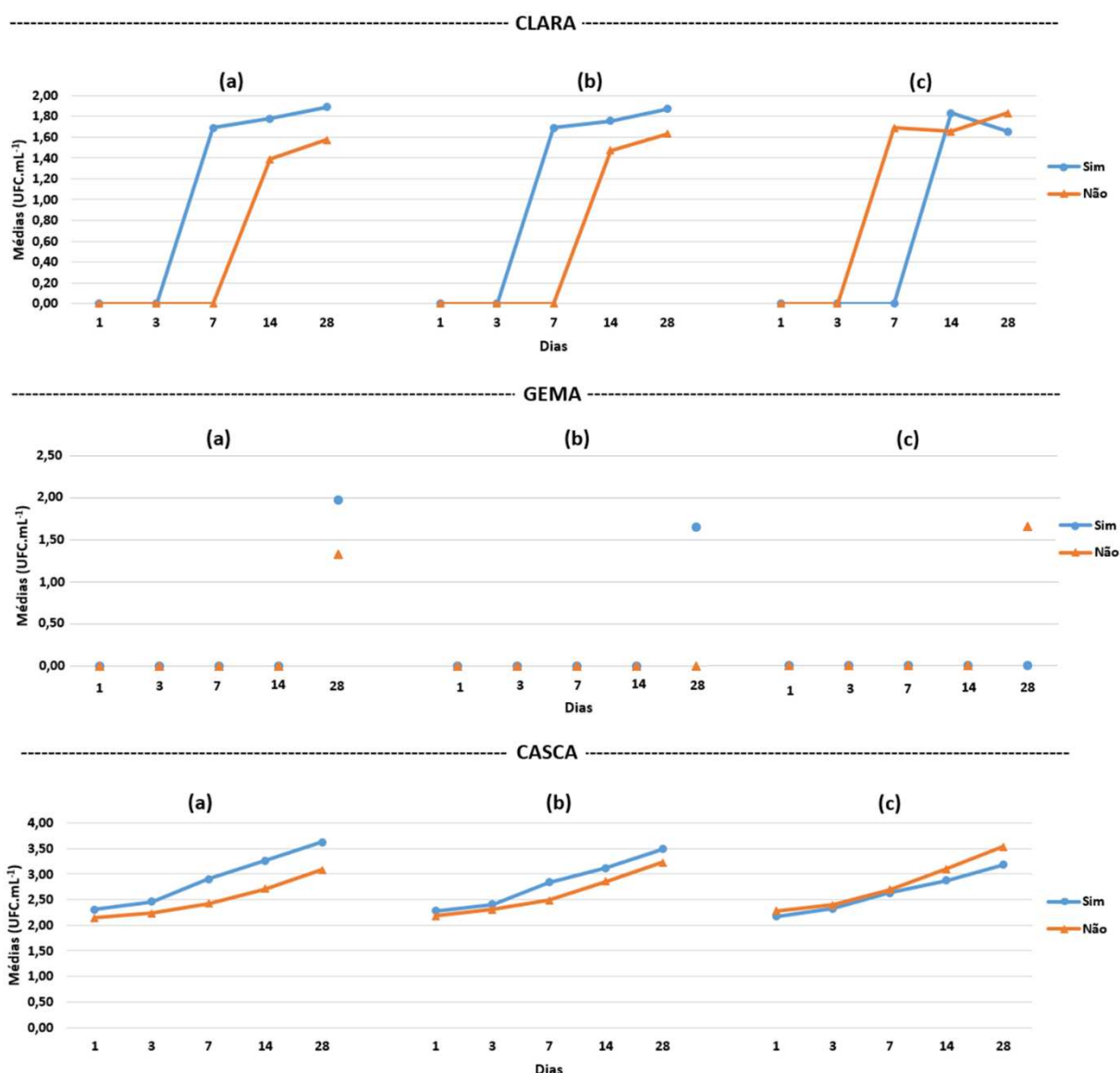


Figura 6. Efeito da aplicação (sim) ou não da higienização (a), da pasteurização (b) e de bacteriófagos (c) das amostras de clara, de gema e de casca dos ovos incubados a 7 °C, em relação ao crescimento médio do patógeno ao longo do tempo.

Vários fatores contribuem para a baixa detecção do patógeno. Para colonizar a clara o patógeno precisa ultrapassar as barreiras físicas da casca, como a cutícula, os poros e as membranas, por exemplo. Após a penetração, o patógeno precisa superar as barreiras químicas presentes na clara, como o pH e as proteínas antimicrobianas, por exemplo. Estas barreiras físicas e químicas, somadas com a necessidade de se adaptar ao crescimento em baixas temperaturas, justificam o baixo crescimento do patógeno na clara.

Além dos fatores citados a cima, para colonizar a gema o patógeno também precisa ultrapassar a membrana vitelina que também possui agentes antimicrobianos. Segundo DeWinter et al., (2011), o crescimento de *Salmonella* na clara é lento e ocorre em porções limitadas, fazendo com que a contaminação da gema seja rara, mas possível. Para que o patógeno alcance a gema é necessário que a viscosidade do albúmen diminua e que o pH aumente, resultando no aumento da permeabilidade da membrana vitelina, permitindo assim a penetração de *Salmonella* no interior da gema. A viscosidade e o pH são diretamente influenciadas pelo tempo e pela temperatura de incubação (RAGHIANTE et al., 2010; HOWARD et al., (2012). Além disso, a utilização de bacteriófagos também pode ter contribuído para a não detecção do patógeno nas amostras.

A 24 °C o patógeno foi detectado precocemente na clara e na gema em relação às outras temperaturas (Tabela 4). Conforme a temperatura aumenta, o crescimento e a contagem do patógeno aumentam na superfície da casca, aumentando assim sua penetração no interior do ovo (Gole et al., 2014). Tanto na clara, quanto na gema e na casca os tratamentos T5 ( $\overline{HP\overline{B}}$ ), T6 ( $\overline{HPB}$ ), T7 ( $\overline{HP\overline{B}}$ ) e T8 ( $\overline{HPB}$ ) apresentaram os maiores valores médios de contaminação em relação às outras temperaturas de incubação ( $p < 0,05$ ). Além disso, o tratamento T2 ( $\overline{HP\overline{B}}$ ) obteve, novamente, os menores valores médios de crescimentos ( $\log \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do patógeno em todas as temperaturas e amostras analisadas ( $p < 0,05$ ).

Tabela 4. Médias da contagem de Salmonella Enteritidis (log UFC·mL<sup>-1</sup>) nas amostras de clara, de gema e de casca dos ovos incubados a 24 °C.

Clara					
Tratamentos	Dias				
	1	3	7	14	28
T1	N/D	N/D	N/D	1,97 ± 0,24 <sup>b</sup>	2,10 ± 0,23 <sup>cd</sup>
T2	N/D	N/D	N/D	1,89 ± 0,33 <sup>b</sup>	1,72 ± 0,37 <sup>d</sup>
T3	N/D	N/D	1,98 ± 0,14 <sup>ab</sup>	2,35 ± 0,31 <sup>ab</sup>	2,92 ± 0,69 <sup>b</sup>
T4	N/D	N/D	1,38 ± 0,15 <sup>c</sup>	1,91 ± 0,26 <sup>b</sup>	2,41 ± 0,57 <sup>bc</sup>
T5	N/D	N/D	1,69 ± 0,15 <sup>ab</sup>	2,00 ± 0,15 <sup>b</sup>	2,40 ± 0,51 <sup>bc</sup>
T6	N/D	N/D	1,58 ± 0,16 <sup>bc</sup>	1,99 ± 0,04 <sup>b</sup>	2,24 ± 0,53 <sup>c</sup>
T7	N/D	1,89 ± 0,15	2,44 ± 0,55 <sup>a</sup>	2,76 ± 0,63 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,45 <sup>a</sup>
T8	N/D	N/D	2,25 ± 0,48 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,13 <sup>b</sup>	3,25 ± 0,14 <sup>ab</sup>

Gema					
Tratamentos	Dias				
	1	3	7	14	28
T1	N/D	N/D	N/D	N/D	1,28 ± 0,05 <sup>d</sup>
T2	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
T3	N/D	N/D	N/D	1,66 ± 0,10 <sup>b</sup>	2,09 ± 0,18 <sup>b</sup>
T4	N/D	N/D	N/D	N/D	1,90 ± 0,10 <sup>bc</sup>
T5	N/D	N/D	N/D	N/D	1,77 ± 0,26 <sup>bc</sup>
T6	N/D	N/D	N/D	N/D	1,62 ± 0,55 <sup>bc</sup>
T7	N/D	N/D	1,59 ± 0,07	2,02 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,58 ± 0,47 <sup>a</sup>
T8	N/D	N/D	N/D	1,75 ± 0,14 <sup>ab</sup>	2,08 ± 0,10 <sup>b</sup>

Casca					
Tratamentos	Dias				
	1	3	7	14	28
T1	2,36 ± 0,09 <sup>ab</sup>	2,54 ± 0,07 <sup>bc</sup>	2,87 ± 0,40 <sup>ab</sup>	3,19 ± 0,40 <sup>b</sup>	3,68 ± 0,66 <sup>c</sup>
T2	2,08 ± 0,18 <sup>b</sup>	2,29 ± 0,22 <sup>d</sup>	2,37 ± 0,65 <sup>c</sup>	2,40 ± 0,29 <sup>c</sup>	2,47 ± 0,71 <sup>d</sup>
T3	2,44 ± 0,28 <sup>ab</sup>	2,62 ± 0,25 <sup>b</sup>	3,33 ± 0,16 <sup>ab</sup>	3,34 ± 0,39 <sup>ab</sup>	3,72 ± 0,84 <sup>ab</sup>
T4	2,34 ± 0,15 <sup>ab</sup>	2,44 ± 0,55 <sup>bc</sup>	3,11 ± 0,37 <sup>b</sup>	3,44 ± 0,19 <sup>ab</sup>	3,77 ± 0,50 <sup>bc</sup>
T5	2,31 ± 0,12 <sup>ab</sup>	2,55 ± 0,41 <sup>bc</sup>	2,27 ± 0,43 <sup>ab</sup>	3,75 ± 0,54 <sup>ab</sup>	4,39 ± 0,56 <sup>bc</sup>
T6	2,21 ± 0,14 <sup>ab</sup>	2,37 ± 0,31 <sup>cd</sup>	2,74 ± 0,51 <sup>ab</sup>	3,44 ± 0,62 <sup>ab</sup>	4,07 ± 0,50 <sup>c</sup>
T7	2,49 ± 0,16 <sup>a</sup>	3,13 ± 0,29 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,08 <sup>a</sup>	4,13 ± 0,62 <sup>a</sup>	4,92 ± 0,36 <sup>a</sup>
T8	2,23 ± 0,16 <sup>ab</sup>	2,65 ± 0,62 <sup>b</sup>	3,35 ± 0,19 <sup>ab</sup>	3,75 ± 0,79 <sup>ab</sup>	4,45 ± 0,14 <sup>ab</sup>

Médias das contagens acompanhadas pela mesma de letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de significância de 5 %. N/D - Não detectável; T1 (HPB); T2 (HPB); T3 (HPB); T4 (HPB); T5 (HPB); T6 (HPB); T7 (HPB); T8 (HPB).

A Figura 7 ilustra o efeito da utilização, ou não, dos tratamentos nos ovos incubados a 24 °C, em relação ao tempo e a contagem média dos patógenos, nas amostras de clara, de gema e de casca.

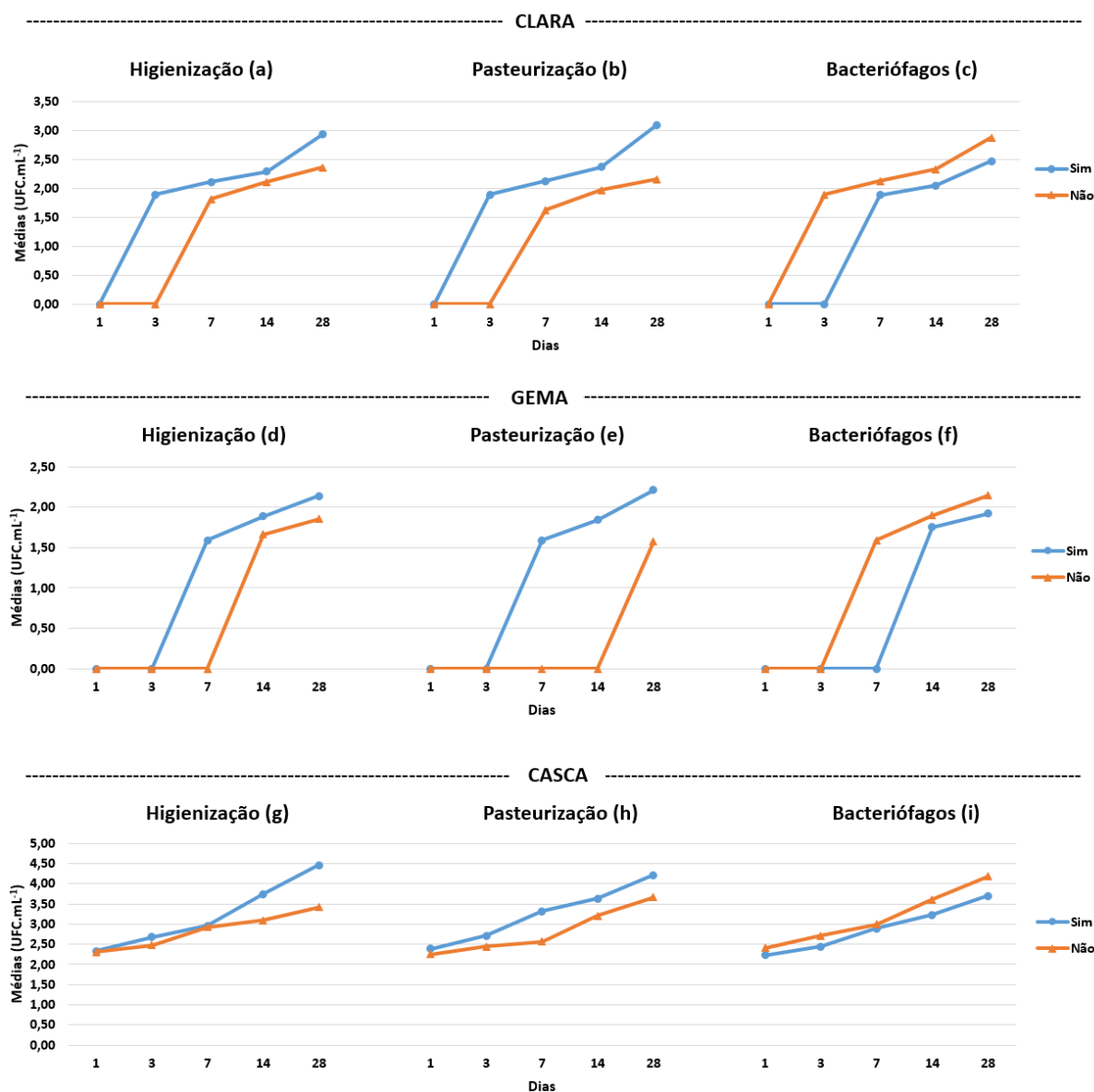


Figura 7. Efeito da aplicação (sim) ou não da higienização (a), da pasteurização (b) e de bacteriófagos (c) das amostras de clara, de gema e de casca dos ovos incubados a 24 °C, em relação ao crescimento médio do patógeno ao longo do tempo.

Estes resultados enfatizam que a higienização (Figura 7a) e a pasteurização (Figura 7b) dos ovos podem contribuir para a contaminação e penetração do patógeno ao longo do tempo, mesmo em baixas temperaturas. Além disso, a utilização de bacteriófagos resultou em uma contagem média (log UFC.mL<sup>-1</sup>) do patógeno inferior

na maioria dos tratamentos em que foi utilizado. Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos comparando as etapas de higienização, pasteurização e utilização de bacteriófagos em relação a contaminação, concentração e penetração de patógenos em ovos, sendo assim, mais estudos são necessários para melhor caracterizar discutir estes resultados encontrados. Mesmo assim é possível recomendar a aplicação de bacteriófagos durante o processamento de ovos realizado pela indústria de alimentos, podendo reduzir a contaminação de patógenos e deixando-os seguros por mais tempo.

#### **4. CONCLUSÃO**

Foi possível detectar bacteriófagos na casca e na clara de ovos, após a inoculação oral de suspensão contendo o vírus em galinhas poedeiras. Galinhas poedeiras tratadas com bacteriófagos apresentaram redução da detecção do patógeno na casca e no interior dos ovos. Os tratamentos com bacteriófagos reduziram a contaminação e detecção do patógeno na casca, na gema e na clara de ovos experimentalmente infectados. Ovos que foram higienizados, pasteurizados e não tratados com bacteriófagos obtiveram maior médias de contaminação de *Salmonella Enteritidis* na clara, na gema e na casca em relação aos ovos não higienizados, não pasteurizados e tratados com bacteriófagos.

## 5. CAPÍTULO II

### CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO DE SALMONELLA TYPHIMURIUM E SALMONELLA ENTERITIDIS EM ALIMENTOS UTILIZANDO BACTERIÓFAGOS

#### RESUMO

A carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida no mundo, enquanto o ovo é considerado o alimento mais completo que existe, devido a sua rica composição nutricional. Estes alimentos são frequentemente relacionados a infecções alimentares, sendo *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis* os principais patógenos envolvidos. Diversas tecnologias são utilizadas na indústria de alimentos para reduzir a contaminação por estes patógenos, mas mesmo assim vem ocorrendo um número relevante de mortes todos os anos relacionadas ao consumo de alimentos contaminados. Com isso, o objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a utilização de bacteriófagos capazes de lisar, simultaneamente, *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis*, e reduzir a contaminação destes patógenos em carne suína moída e em ovos líquidos. Apenas um bacteriófago com as características desejadas foi isolado e caracterizado. Os ovos líquidos e a carne moída suína foram contaminados com os patógenos, incubados a 4 °C e a 24 °C e as amostras analisadas quanto a redução do patógeno em diferentes intervalos de tempos (1 dia, 7 dias e 14 dias). A Multiplicidade de Infecção (MOI) utilizada em todos os tratamentos foi de  $1 \times 10^1$  UFP/UFC. Foi possível observar redução significativa ( $p < 0,05$ ) da concentração dos patógenos em todos os tratamentos realizados a 24 °C. A 4 °C o bacteriófago foi capaz de reduzir ( $p < 0,05$ ) a concentração de *Salmonella Typhimurium* em um dia e uma semana de incubação na carne suína moída e no ovo líquidos. Entretanto, só foi possível observar a redução ( $p < 0,05$ ) de *Salmonella Enteritidis* nas amostras de carne suína moída incubadas por 1 dia e 1 semana a 4 °C. Após duas semanas de inoculação a 4 °C não houve redução significativa ( $p > 0,05$ ) dos patógenos em nenhum dos alimentos avaliados. Os maiores índices de redução ocorreram a 4 °C quando *Salmonella Typhimurium* foi o hospedeiro, sendo de  $1,65 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  em carne suína moída e  $3,14 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$  em ovos líquidos. Concluiu-se que o bacteriófago foi capaz de reduzir a contaminação de *Salmonella Typhimurium* em ambos alimentos, entretanto seu efeito foi não significativo para o controle de *Salmonella Enteritidis* em ovos líquidos.

## 1. INTRODUÇÃO

Conforme a população mundial cresce, também cresce a demanda por alimentos, principalmente por alimentos seguros. O aumento da produção e da comercialização de alimentos tem sido acompanhada pelo aumento das infecções, hospitalizações e mortes relacionadas ao consumo de alimentos contaminados. Segundo o Foodnet, em 2014 nos Estados Unidos, houve um aumento de 50 % no número de infecções (19.542) e quatro vezes mais hospitalizações (4.445) e mortes (71), em relação ao ano anterior (CDC, 2015). A elevação dos números de infecções também pode estar relacionada com a melhoria das técnicas de isolamento, detecção e identificação de patógenos, aumentando assim, o número de notificações. O estudo mais recente que avaliou o número de casos de infecções alimentares pelo mundo foi realizado em 2010 pela World Health Organization (WHO), que relatou 518 milhões de casos e 351000 mortes relacionadas ao consumo de alimentos contaminados (WHO, 2013).

Dentre os alimentos comumente relacionados com infecções alimentares, podemos destacar a carne suína e os ovos, como os principais responsáveis pelos casos de infecções alimentares (EFSA, 2015). Estes alimentos são as principais fontes de proteína animal consumida no mundo, e como sua produção e consumo vem aumentando ao longo dos anos, tornam-se de grande importância para a saúde pública (HEINRICH BÖLL FOUNDATION, 2014; USDA, 2015; FAOSTAT, 2015). O principal patógeno associado ao desenvolvimento de enfermidades devido ao consumo de carne suína e ovos contaminados, em todo mundo, continua sendo *Salmonella* (MAJOWICZ et al., 2010; AO et al., 2015). Diversas estirpes do patógeno estão relacionadas com a contaminação dos alimentos, mas duas estirpes se destacam como as principais responsáveis pelas infecções alimentares, *Salmonella* Enteritidis em ovos e *Salmonella* Typhimurium em carne suína (EFSA, 2015, CDC, 2015).

A contaminação da carne suína pode ocorrer em praticamente todos os pontos da cadeia de produção, processamento e preparo da carne antes do consumo (ROSTAGNO e CALLAWAY, 2012). Na fazenda, a principal rota de transmissão é a oral-fecal, pelo consumo de ração contaminada e contato com fezes contaminadas de outros animais. Além disso, a presença de vetores como roedores, insetos e pássaros

podem auxiliar na transmissão do patógeno para os animais (EVANGELOPOULOU et al., 2015). Ao deixar a fazenda o animal pode ser contaminado por *Salmonella* durante o transporte (ARGUELLO et al., 2012) e no pátio de descanso pre-abate no abatedouro (GARRIDO et al., 2014). A evisceração da carcaça é a etapa de maior risco de contaminação durante o processamento da carne, já que o intestino do animal contaminado pode se romper e contaminar outras carcaças com o patógeno (SMID, et al., 2014). Além disso, como o processamento é praticamente todo manual, práticas de higiene inadequadas dos manipuladores e sanitização ineficiente dos instrumentos de corte e das superfícies podem contribuir com a contaminação da carne pelo patógeno (WHEATLEY et al., 2014).

No caso dos ovos a contaminação pode ocorrer antes ou após sua postura e em praticamente todas as etapas da cadeia produtiva. Para contaminar os ovos antes da postura, *Salmonella* deve primeiramente infectar a galinha poedeira. A contaminação das aves ocorre, geralmente, pela mesma rota de contaminação dos suínos (oral-fecal), somando ao fato de que o tipo de criação (gaiola ou ar livre) das galinhas poedeiras, também pode contribuir para a contaminação (ARNOLD et al, 2014; WHILEY e ROSS, 2015). Para garantir a segurança alimentar e serem utilizados como base para outros alimentos, os ovos passam por várias etapas de processamento, como a pasteurização, secagem e congelamento. Entretanto, falhas nestas etapas podem resultar na contaminação em outros produtos como sorvetes, misturas para bolos, maionese e vários outros (GAST e GURAYA, 2013; EFSA, 2014; WHILEY e ROSS, 2015).

Diversas técnicas, etapas e processos são utilizados pela indústria de alimentos para eliminar ou reduzir a contaminação por *Salmonella* nos alimentos. Entretanto, o aparecimento de estirpes resistentes e multirresistentes reduzem a efetividade destas intervenções. *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis além de serem os sorotipos mais isolados em alimentos, também pertencem ao grupo de patógenos resistentes a antimicrobianos que mais preocupam a saúde pública (CDC, 2013). A busca por tecnologias alternativas de controle de patógenos trouxe os bacteriófagos como um possível agente de controle microbiológico. Os bacteriófagos podem ser utilizados em todos os estágios da linha de produção de alimentos. Podem ser utilizados do campo a mesa, como por exemplo: para controlar ou reduzir a contaminação de patógenos em animais; para a descontaminação de carcaças, de

equipamentos e de superfícies de contato na indústria de alimentos e para estender a vida útil de alimentos perecíveis como conservantes naturais de alimentos (GARCIA et al., 2008; COFFEY et al., 2010; SPRICIGO et al., 2013; ENDERSEN et al., 2014; NOBREGA et al., 2015).

Diversas características favorecem a utilização de bacteriófagos na indústria de alimentos. Dentre elas, podemos citar a capacidade dos bacteriófagos de não gerar resistência cruzada a antibióticos e não afeta a cor, sabor ou textura dos alimentos (NOBREGA et al., 2015). Além disso, são auto limitantes e específicos a determinadas gêneros ou espécies de bactérias (LABRIE et al., 2010; VANDAMME e MIEDZYBRODZKI, 2013; PHOENIX et al., 2014).

O objetivo do presente estudo foi isolar, caracterizar e avaliar a utilização de bacteriófagos capazes de lisar simultaneamente *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis* tanto em carne moída de suíno e em ovos líquidos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de microbiologia do Dr. Paul D. Ebner (Departamento de Zootecnia da Universidade de Purdue, West Lafayette – IN, EUA). Todos os ensaios foram repetidos três vezes e as análises foram feitas em duplicata.

### **2.1. Micro-organismos hospedeiros**

Foram utilizadas estirpes de *Salmonella Typhimurium* ( $\gamma$  4232) resistentes ao ácido nalidíxico previamente isoladas conforme descrito por Wall et al., (2010). As estirpes de *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076) foram gentilmente cedidas pelo laboratório do Dr. Arun Bhunia (Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade de Purdue, West Lafayette – IN, EUA).

Para adquirir resistência ao ácido nalidíxico, as estirpes de *Salmonella Enteritidis* foram incubadas sucessivamente em caldo contendo concentrações subletais progressivas do antibiótico (CALLAWAY et al., 2011). As estirpes foram inicialmente incubadas em Caldo Triptona de Soja (TSB, Becton Dickison Company, Franklin Lakes – NJ, EUA), contendo  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido nalidíxico (Alfa Aesar, Ward Hill – MA, EUA) durante 18 a 24 horas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . A cada novo dia uma alçada era coletada e inoculada em um novo tubo contendo uma concentração superior do antibiótico. As

concentrações utilizadas foram  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

## **2.2. Isolamento dos bacteriófagos**

Quatorze amostras (20 mL) de águas residuárias foram coletadas do sistema de tratamento de esgoto, do Município de West Lafayette – IN, EUA. As amostras coletadas permaneceram armazenadas à temperatura de  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  até o início das análises. O método de isolamento foi previamente descrito por Wall et al (2010).

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas e centrifugadas ( $5.000 \times g$  por 10 minutos). O sobrenadante foi filtrado ( $0,22 \mu\text{m}$ , Nalgene, Rochester – NY, EUA) e tratado com clorofórmio (1:100, EMD Millipore Chemicals, Billerica – MA, EUA). Amostras filtradas foram adicionadas (1:1), em tubos de 2x TSB (concentração dobrada) com  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido nalidíxico (Alfa Aesar, Ward Hill – MA, EUA), e *Salmonella Typhimurium* em fase de crescimento logarítmico e incubadas sob agitação por 24 horas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após este período, as amostras foram centrifugadas ( $5.000 \times g$  por 10 minutos) e filtradas ( $0,22 \mu\text{m}$ , Nalgene, Rochester – NY, EUA). Diluições seriadas das amostras ( $100 \mu\text{L}$ ) foram combinadas com  $100 \mu\text{L}$  de *Salmonella Typhimurium* em fase de crescimento logarítmico,  $67,5 \mu\text{L mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e 3 mL de sobrecamada de TSB ágar (5 %). A solução de sobrecamada foi vertida sobre placas de ágar TSB e incubada por 24 horas à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após a incubação, placas de lise individuais foram selecionadas com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur e colocadas em 10 mL de cultura do hospedeiro ativo. Novamente a suspensão foi centrifugada  $5.000 \times g$  por 10 minutos (BECKMAN J2-MC, Brea – CA, EUA) e filtrada ( $0,22 \mu\text{m}$ , Nalgene, Rochester – NY, EUA), repetindo-se o ciclo de lise em sobrecamada. Para cada bacteriófago, três ciclos de purificação foram realizados, a fim de garantir a pureza do estoque. A amostra purificada foi suspensa em tampão SM ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl [pH 7,5], 0,01 % gelatina) com 10 % de glicerol e estocada a temperatura de  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## **2.3. Seleção e caracterização dos bacteriófagos**

Os bacteriófagos foram selecionados por meio da visualização da lise em *Salmonella Typhimurium* na sobrecamada. Ao mesmo tempo foram selecionados

bacteriófagos que apresentaram lise para *Salmonella Typhimurium* e para *Salmonella Enteritidis* simultaneamente.

A morfologia dos bacteriófagos foi determinada pela visualização em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). Para a visualização no MET, uma gota da amostra do bacteriófago foi depositada na superfície de uma tela de microscopia eletrônica, revestida com resina Formvar (Kosh®, 200 mesh, 3 mm) e então fixada com uma solução de acetado de uralina 2 %. Imagens (15.500x e 28.500x ampliadas) foram coletadas usando o MET Philips CM<sup>100</sup> operando a 80 kv, ponto 3, abertura de 200 µm do condensador e 50 µm da lente objetiva.

## **2.4. Avaliação da eficiência de bacteriófagos na redução de *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis* em carne suína moída e em ovos líquidos**

### **2.4.1. Coleta e seleção das amostras**

Amostras frescas de carne suína moída e ovos pasteurizados com casca foram compradas em estabelecimentos comerciais da cidade de West Lafayette – IN, Estados Unidos. As amostras foram transportadas em isopor contendo gelo-gel e armazenadas em geladeira até o início das análises, por um período não superior a 6 horas. As unidades experimentais foram constituídas por 25 g de carne e dois ovos grandes (120 mL, aproximadamente) quebrados de forma asséptica e homogeneizados com mixer (Servodyne, Vernon Hills – IL, EUA), até a completa mistura dos ovos.

As amostras foram analisadas quanto a presença de *Salmonella* utilizando a metodologia sugerida pelo USDA (USDA, 2014) adaptada. Vinte e cinco gramas de amostra foram colocados em sacos esterelizados identificados e 75 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB; Becton Dickison Company, Franklin Lakes – NJ, EUA) foi adicionado. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 42 °C por 24 horas. Após o período de incubação, 0,5 mL e 0,1 mL da amostra, foram transferidos respectivamente para 10 mL de Caldo Tetrionato (TB; Becton Dickison Company, Franklin Lakes – NJ, EUA) e 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV; Becton Dickison Company, Franklin Lakes – NJ, EUA) e novamente incubados a 42 °C por 24 horas. No dia seguinte, as amostras foram homogeneizadas cuidadosamente em vortex e uma alçada de cada tubo contendo aproximadamente 10 µL foi estriada em

placas contendo agar XLT4 (Becton Dickison Company, Franklin Lakes – NJ, EUA) e incubadas a 35 °C por 24 horas. Apenas as amostras negativas para Salmonella foram utilizadas no experimento, amostras positivas foram desprezadas.

#### 2.4.2. Delineamento experimental

Foram realizados dois experimentos independentes, um com carne moída suína e outro com ovos líquidos. Cada experimento foi dividido em duas partes, uma usando Salmonella Typhimurium como alvo dos bacteriófagos e outra usando Salmonella Enteritidis. As amostras foram incubadas por um dia, uma semana e duas semanas a 4 °C e um dia e dois dias a 24 °C. Foram realizados 40 tratamentos no total, 20 para carne suína moída e 20 para ovos líquidos. Foram realizadas 10 repetições em duplicata de cada tratamento. A distribuição dos tratamentos pode ser melhor visualizada no Quadro 1.

Quadro 1. Tratamentos realizados para cada matriz alimentar

Patógeno	Temperatura	Tempo	Bacteriófago
Salmonella Typhimurium	4 °C	1 dia	Negativo Positivo
		7 dias	Negativo Positivo
		14 dias	Negativo Positivo
	24 °C	1 dia	Negativo Positivo
		2 dias	Negativo Positivo
		1 dia	Negativo Positivo
Salmonella Enteritidis	4 °C	7 dias	Negativo Positivo
		14 dias	Negativo Positivo
		1 dia	Negativo Positivo
	24 °C	1 dia	Negativo Positivo
		2 dias	Negativo Positivo
		1 dia	Negativo Positivo

### **2.4.3. Inoculação de bactérias e bacteriófagos em amostras de carne suína moída e em ovos líquidos**

As amostras foram inoculadas com 100 µL de Salmonella (~10<sup>7</sup> UFC) aproximadamente e homogeneizadas vigorosamente em todos os tratamentos. Em seguida, as amostras foram inoculadas com 100 µL do bacteriófago (~10<sup>8</sup> UFP) em Tampão Fosfato Salina (PBS, 1x), enquanto as amostras controles foram inoculadas com 100 µL de PBS sem bacteriófagos. As amostras foram homogeneizadas vigorosamente, e incubadas nas temperaturas e tempos previamente determinados (Quadro 1). A Multiplicidade de Infecção (MOI) foi de 1x 10<sup>1</sup> UFP/UFC.

Após o período de incubação, as amostras foram ressuspensas em 75 mL de água peptonada (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) e homogeneizada. Diluições seriadas das amostras foram realizadas em tampão PBS 1X (900 µL) e com o auxílio da alça de Drigalsky foram espalhadas em placas contendo ágar XLT4, suplementado com 50 µL·mL<sup>-1</sup> de ácido nalidíxico (Alfa Aesar, Ward Hill – MA, EUA), seguido por incubação a 37 °C durante 24 horas. Após a incubação, as colônias de Salmonella presentes foram quantificadas.

### **2.4.4. Análises estatísticas**

A concentração bacteriana (UFC·mL<sup>-1</sup>) foram convertidas em escala logarítmica para a análise estatística. As concentrações bacterianas foram analisadas utilizando o procedimento de modelos mistos do SAS (SAS Institute Inc., Cary – NC, EUA). As inferências estatísticas foram baseadas no teste de Tukey com nível de p < 0.05.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Isolamento e caracterização do bacteriófago**

Das 14 amostras de água residuárias coletadas foram isolados 10 bacteriófagos. Entretanto, oito não foram selecionados devido a sua inabilidade de lisar Salmonella Enteritidis ou formar placas transparentes na cultura do hospedeiro bacteriano. Apenas dois bacteriófagos, nomeados DR e CHI, foram capazes de formar placas transparentes nas culturas de Salmonella Typhimurium e Salmonella Enteritidis simultaneamente, conforme ilustrado na Figura 1.

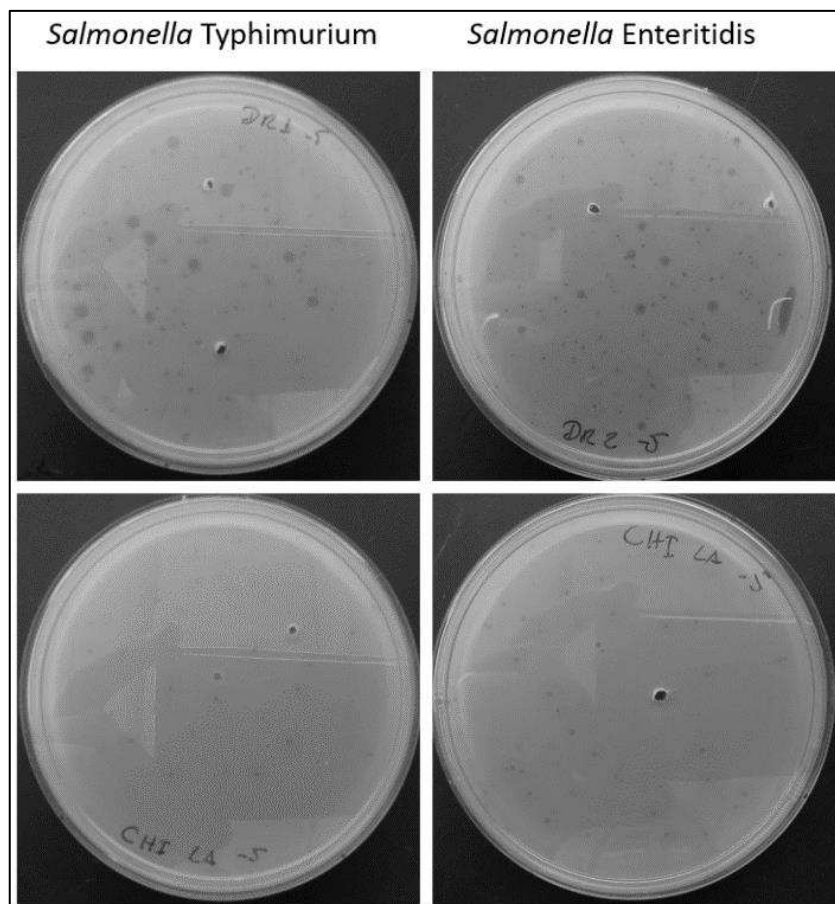


Figura 1. Resultado do perfil de lises dos bacteriófagos DR e CHI em *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis.

Apesar de *Salmonella* Thyphimurium e *Salmonella* Enteritidis pertencerem à mesma espécie, a diferença entre os antígenos de superfície destes patógenos os separam em dois diferentes grupos: *Salmonella* Thyphimurium pertence ao grupo B, e *Salmonella* Enteritidis pertence ao grupo D1 (SWITT et al., 2015). Para infectar a célula hospedeira o bacteriófago precisa superar diversas barreiras de defesa desenvolvidas pelas bactérias, que impedem sua adesão à superfície bacteriana (HARGREAVES et al., 2014). A adesão do bacteriófago ocorre nos antígenos presentes na superfície lipopolissacarídica (O), flagelar (H) e capsular (Vi), do hospedeiro. Segundo Refardt (2011) e Akhtar et al. (2014) a capacidade de infectar e lisar uma ou mais subespécies de patógenos da mesma espécie pode estar ligada direta ou indiretamente ao local de isolamento do bacteriófago. Bacteriófagos isolados em fezes humanas ou provenientes de animais de produção, geralmente, possuem espectro lítico inferior aos isolados em estações de tratamento de esgoto (CALLAWAY et al., 2010). Como a sobrevivência dos bacteriófagos depende da presença do hospedeiro específico, a colonização da mucosa intestinal pode ser limitada pelo

próprio patógeno, impedindo a interação do bacteriófago com outras subespécies da espécie contaminante (LABRIE et al., 2010; SWITT et al., 2015).

No experimento realizado por Callaway et al. (2010) foi relatado que apenas 1 % (600/6) das amostras de fezes suínas continham bacteriófagos com atividade lítica contra *Salmonella Typhimurium*, além disso, nenhum bacteriófago foi capaz de lisar *Salmonella Enteritidis*. Entretanto, Húngaro et al., (2013) e Albino et al., (2014) conseguiram isolar bacteriófagos líticos contra *Salmonella Thyphimurium* e *Salmonella Enteritidis* em 6 % (45/3) e 3 % (187/6) das amostras de fezes humanas, respectivamente. Estes resultados ficaram abaixo quando comparados com o percentual de isolamento encontrado por outros autores em amostras de águas residuárias provenientes de estações de tratamento de esgoto humano (CAREY-SMITH et al., 2006; BIELKE et al., 2007; HERINGA et al., 2010; WALL et al., 2010; HOOTON et al., 2011; TURKI et al., 2012; AKHTAR et al., 2014). Akhtar et al. (2014) sugerem que o isolamento de bacteriófagos deve ser realizado em águas residuárias, provenientes de estação de tratamento de esgoto humano, pois os bacteriófagos podem infectar um amplo espectro de hospedeiros, ao contrário dos bacteriófagos isolados diretamente de fezes humanas e de animais de produção. A capacidade de lisar uma grande diversidade de hospedeiros, é reflexo da elevada taxa de evolução resultante da pressão seletiva criada pelas barreiras anti-fágicas dos hospedeiros bacterianos (LABRIE et al., 2010).

O resultado do MET mostrou diferenças entre a morfologia dos dois bacteriófagos isolados (Figura 2). O bacteriófago CHI pertencente à família Siphoviridae, possui cabeça icosaédrica medindo 50 nm e cauda, não contrátil, medindo 210 nm, enquanto o bacteriófago DR pertencente à família Myoviridae, possui cabeça icosaédrica medindo 80 nm e cauda, contrátil, medindo 120 nm. Os dois bacteriófagos isolados pertencem a ordem dos Caudovirales (HENDRIX, 2013).

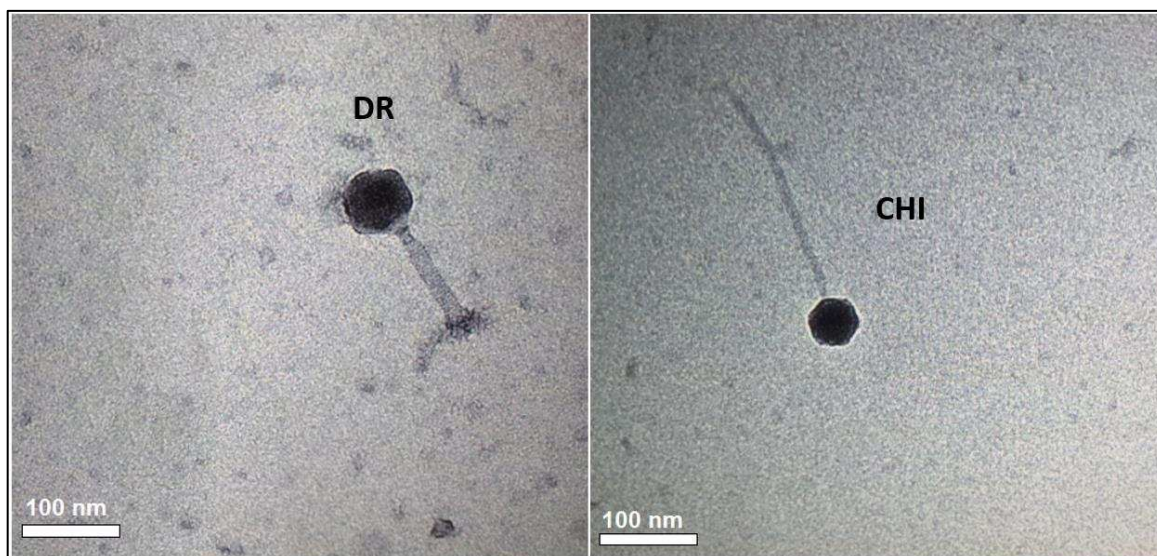


Figura 2. Fotomicrografia dos bacteriófagos DR e CHI por MET

Os bacteriófagos isolados em amostras de fezes por Hungaro et al., (2013) e Albino et al., (2014), pertenciam à família Podoviridae, enquanto os bacteriófagos isolados em estações de tratamento de esgoto por Carey-Smith et al., (2006), Heringa et al., (2010), Wall et al., (2010), Hooton et al., (2011) e Akhtar et al., (2014) pertenciam à família Myoviridae e Siphoviridae. Apesar da aparente relação entre a morfologia e o local de isolamento, não há informações suficientes na literatura que permitem afirmar tal suposição. Além disso, Arckermann (2012) revisou 5.532 bacteriófagos analisados por MET, e constatou que 23,8 % (1.320) pertenciam à família Myoviridae, 59 % (3.269) pertenciam à família Siphoviridae e 13,9 % (771) pertenciam à família Podoviridae.

Após o início dos experimentos foi constatado que o bacteriófago DR não se replicava nas culturas de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*, possivelmente por ter entrado no ciclo lisogênico, e como o objetivo deste trabalho foi isolar apenas bacteriófagos do ciclo lítico, apenas o bacteriófago CHI foi usado na sequência dos experimentos.

### **3.2. Avaliação da eficiência de bacteriófagos na redução de *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis* em carne suína moída**

O resultado das médias de contagem de *Salmonella* nos diferentes tratamentos, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Médias de contagem ( $\log_{10}$  UFC·g<sup>-1</sup> ± desvio padrão) de Salmonella Typhimurium e Salmonella Enteritidis em amostras de carne suína moída incubadas em diferentes temperaturas e tempos de estocagem.

<b>Carne suína moída</b>				
Patógeno	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Controle	Bacteriófago
Salmonella Typhimurium	4	1	4,04 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	3,74 ± 0,21 <sup>Ab</sup>
		7	3,90 ± 0,24 <sup>Aa</sup>	3,46 ± 0,45 <sup>Ab</sup>
		14	2,09 ± 0,41 <sup>Ba</sup>	2,11 ± 0,40 <sup>Ba</sup>
	24	1	7,48 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	5,83 ± 0,24 <sup>Ab</sup>
		2	8,39 ± 0,08 <sup>Ba</sup>	7,00 ± 0,19 <sup>Bb</sup>
Salmonella Enteritidis	4	1	5,49 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	5,25 ± 0,15 <sup>Ab</sup>
		7	5,06 ± 0,10 <sup>ABa</sup>	4,43 ± 0,23 <sup>Bb</sup>
		14	4,64 ± 0,23 <sup>Ba</sup>	4,55 ± 0,24 <sup>Ba</sup>
	24	1	7,71 ± 0,15 <sup>Aa</sup>	6,67 ± 0,11 <sup>Ab</sup>
		2	8,55 ± 0,10 <sup>Ba</sup>	7,25 ± 0,20 <sup>Bb</sup>

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha, para o mesmo patógeno e temperatura de incubação, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em relação as medias ( $\log_{10}$  UFC·g<sup>-1</sup>) de crescimento para a temperatura de 4 °C em ambos os patógenos podemos perceber que: entre um dia e duas semanas do tratamento controle, houve redução significativa ( $P < 0,05$ ) de 1,95  $\log_{10}$  UFC·g<sup>-1</sup> em Salmonella Typhimurium e 0,95  $\log_{10}$  UFC·g<sup>-1</sup> em Salmonella Enteritidis, respectivamente. Estas reduções podem ter ocorrido devido a alguns fatores como: a necessidade de adaptação ao meio, diferença na composição de nutrientes e não crescimento do patógeno em baixas temperaturas. Apesar da temperatura ótima de crescimento estar entre 5 °C e 47 °C, dependendo das condições do meio, o patógeno pode crescer em temperaturas inferiores a 4 °C, mas em uma velocidade menor em comparação com à temperatura ótima (PUI et al., 2011; TORTORA, FUNKE e CASE, 2013). Assim como no tratamento controle, no tratamento com bacteriófagos também foi possível observar redução nas concentrações iniciais do patógeno, entre um dia e duas semanas de 1,6  $\log_{10}$  UFC·g<sup>-1</sup> para Salmonella Typhimurium e de 0,7  $\log_{10}$  UFC·g<sup>-1</sup> para Salmonella Enteritidis.

Comparando o efeito dos tratamentos, apenas o tratamento que foi incubado por duas semanas a 4 °C, não apresentou efeito na redução da contaminação por Salmonella. Apesar dos bacteriófagos possuírem a capacidade de infectar e lisar a célula hospedeira, as bactérias possuem diversos mecanismo que impedem a

adesão, a infecção, e a replicação do bacteriófago (DY et al., 2014). Além disso, o mecanismo de sobrevivência da bactéria em baixas temperaturas pode limitar a adesão e infecção do patógeno na célula hospedeira.

Os resultados encontrados neste estudo são similares aos resultados encontrados por outros autores, mas em outras matrizes alimentares. Em trabalho realizado por Zinno et al., (2014) foram utilizados bacteriófagos (MOI de  $10^3$  UFP/UFC) para o controle de *Salmonella Typhimurium* em peito e em carne moída de frango. Foram encontrados valores de redução de 1,7 e 1,4  $\log_{10}$  UFC·g<sup>-1</sup> após 24 horas de incubação a 4 °C. O resultado encontrado foi superior ao apresentado por este trabalho, entretanto, os autores utilizaram MOI 100 vezes maior que os aplicados neste experimento. Guenther et al., (2012) também obtiveram resultados superiores de redução em salsichas tipo hot-dog. A redução da contaminação de *Salmonella Typhimurium* foi de 3  $\log_{10}$  UFC·mL<sup>-1</sup> após 6 dias de incubação tanto em 8 °C quanto em 15 °C, utilizando MOI de  $10^5$  UFP/UFC. Como os bacteriófagos líticos se replicam e lisam as células bacterianas, quanto maior o MOI aplicado, conseqüentemente, maior será a redução da contaminação do patógeno (HOOTON et al., 2011; SUKUMARAN et al., 2015). Os resultados deste trabalho mostraram-se em conformidade em relação aos estudos citados acima. Provavelmente, com a elevação do MOI aplicado, maior seria a redução da contaminação dos patógenos.

Autores que utilizaram coquetel de bacteriófagos, também obtiveram resultados similares aos apresentados neste trabalho. Hooton et al., (2011) utilizaram um coquetel com quatro bacteriófagos para reduzir a contaminação de *Salmonella Typhimurium* em pele de porco armazenadas a 4 °C. Foram encontradas reduções de 0,9 e 0,7  $\log_{10}$  UFC·mL<sup>-1</sup> (MOI de  $10^3$  UFP/UFC) em um dia e uma semana, respectivamente. Spricigo et al., (2013) também testou o efeito de um coquetel com três bacteriófagos (MOI de  $10^3$  UFP/UFC) contra *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis* em peitos de frango armazenados à 4 °C por 1 dia e uma semana. Em *Salmonella Typhimurium* foram encontradas reduções de 1,6 e 2,2  $\log_{10}$  UFC·mL<sup>-1</sup> e para *Salmonella Enteritidis* 0,7 e 0,9  $\log_{10}$  UFC·mL<sup>-1</sup> em um dia e uma semana, respectivamente. A utilização de um coquetel com diferentes bacteriófagos não resultou em maiores níveis de redução. A utilização de apenas um bacteriófago não garante diminuição no desenvolvimento da resistência do hospedeiro. Entretanto,

o processo de isolamento, propagação, purificação e a aplicação é mais rápido quando realizado com apenas um bacteriófago (LABRIE et al., 2010).

Apesar do crescimento bacteriano em ambos tratamentos realizados a 24 °C ao longo do tempo, os resultados das comparações entre as médias das concentrações do tratamento controle com o tratamento com bacteriófagos, foram estatisticamente significativos. As maiores reduções ocorreram no dia um ( $1,65 \log_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e no dia dois ( $1,38 \log_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em *Salmonella* Typhimurium, seguidas pelos dias dois ( $1,3 \log_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e dia um ( $1,0 \log_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em *Salmonella* Enteritidis. Como a temperatura interfere diretamente no crescimento de *Salmonella* é justificável que as maiores reduções estejam presentes nos tratamentos com as maiores temperaturas (PUI et al., 2011). Isto ocorreu, provavelmente, pelo efeito lítico do bacteriófago sobre a bactéria hospedeira

### 3.3. Avaliação da eficiência de bacteriófagos na redução de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis em ovos líquidos

O resultado das médias de contagem de *Salmonella* nos diferentes tratamentos, estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2. Médias de contagem ( $\log_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1} \pm$  desvio padrão) de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis em amostras de ovos líquidos incubadas em diferentes temperaturas e tempos de estocagem.

Ovos líquidos				
Patógeno	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Controle	Bacteriófago
<i>Salmonella</i> Typhimurium	4	1	$4,86 \pm 0,12^{Aa}$	$4,25 \pm 0,25^{Ab}$
		7	$4,61 \pm 0,25^{Aa}$	$4,10 \pm 0,21^{ABb}$
		14	$3,92 \pm 0,23^{Ba}$	$3,90 \pm 0,27^{Ba}$
	24	1	$8,90 \pm 0,07^{Aa}$	$5,76 \pm 0,16^{Ab}$
		2	$9,22 \pm 0,05^{Ba}$	$8,63 \pm 0,12^{Bb}$
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4	1	$5,66 \pm 0,08^{Aa}$	$5,52 \pm 0,08^{Aa}$
		7	$5,07 \pm 0,12^{Ba}$	$4,91 \pm 0,13^{Ba}$
		14	$3,63 \pm 0,29^{Ca}$	$3,77 \pm 0,27^{Ca}$
	24	1	$8,91 \pm 0,11^{Aa}$	$7,98 \pm 0,26^{Ab}$
		2	$9,33 \pm 0,07^{Ba}$	$8,71 \pm 0,22^{Bb}$

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e pela mesma letra minúscula na linha, para o mesmo patógeno e temperatura de incubação, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Analisando os resultados dos tratamentos a 4 °C apresentados na Tabela 2, podemos observar que os houve redução na concentração ( $\log_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ ) inicial dos

patógenos em relação ao aumento do tempo de incubação para os dois patógenos. A concentração de *Salmonella Typhimurium*, nos tratamentos a 4 °C foram superiores aos apresentados no experimento com carne suína moída. Além disso, o valor da redução apresentado pelo patógeno ao longo do tempo foi menor do que o apresentado no experimento utilizando carne suína moída, sendo a diferença entre eles de aproximadamente,  $1 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ .

No tratamento controle a 4 °C, *Salmonella Enteritidis* apresentou concentração similar nos tratamentos incubados por um dia e por sete dias, entretanto no tratamento incubado por duas semanas, o resultado da redução foi menor, cerca de  $1 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ , em comparação com o experimento com a carne suína moída. Além disso, o valor da redução apresentado pelo patógeno ao longo do tempo foi maior do que o apresentado em carne suína moída, sendo a diferença entre os experimentos de, aproximadamente,  $1,01 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Nos tratamentos com bacteriófagos, ambos os patógenos apresentaram crescimentos superiores em relação ao experimento com carne suína moída. Entretanto os efeitos dos tratamentos nos ovos líquidos foram diferentes aos encontrados no outro experimento. As reduções foram superiores ( $p < 0,05$ ) para *Salmonella Typhimurium* e inferiores para *Salmonella Enteritidis* ( $p > 0,05$ ). Comparando a viabilidade e crescimento entre os dois patógenos nos diferentes experimentos, podemos observar que o crescimento de *Salmonella Typhimurium* foi melhor em ovos líquidos do que em carne suína moída, no entanto *Salmonella Enteritidis* teve melhor crescimento que *Salmonella Typhimurium* em todos os tratamentos. O crescimento superior de *Salmonella Enteritidis* é refletido nas concentrações das médias de contagens ( $\log_{10} \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ ), em comparação com tratamentos com *Salmonella Typhimurium*. As diferenças genéticas dos sorotipos de *Salmonella*, podem ter influenciado na capacidade de sobrevivência e crescimento nas diferentes matrizes alimentares (GANTOIS et al., 2009; PORWOLLIK, 2011). Sendo assim, o melhor desempenho de viabilidade apresentado por *Salmonella Enteritidis*, ocorreu provavelmente por possuir genes específicos que permitem sua melhor adaptação às condições do meio, em relação à *Salmonella Typhimurium* (MARTELLI et al., 2012).

Poucos estudos presentes na literatura relacionam a aplicação de bacteriófagos em ovos líquidos ou antes de serem processados. Um estudo realizado por Roberson et al., (2011) avaliou a viabilidade dos bacteriófagos no interior de ovos. Os autores inocularam a suspensão de bacteriófagos através de um furo feito na câmara de ar do ovo, e permitiram sua difusão por 24 horas. Após o período de seis dias, os bacteriófagos ainda permaneciam viáveis, tanto na gema, quanto no albúmen. A capacidade do bacteriófago resistir ao processo de pasteurização já foi demonstrada e sugerida por Rajesh et al.,(2001) em leite, para evitar a contaminação de Salmonella em queijo cheddar. Conforme o resultado significativo ( $p < 0.05$ ) encontrado em nosso trabalho, podemos sugerir a utilização dos bacteriófagos em ovos líquidos, o que garantiria uma melhor segurança dos ovoprodutos após o processo de pasteurização.

#### **4. CONCLUSÃO**

Foi possível isolar e caracterizar um bacteriófago capaz de lisar os dois principais sorotipos de Salmonella de importância na saúde pública. A aplicação deste bacteriófago no controle da contaminação de Salmonella Typhimurium e Salmonella Enteritidis em carne suína moída e em ovos líquidos teve resultados significativos. Entretanto o valor do MOI aplicado aparenta estar relacionado à pouca redução logarítmica das concentrações médias dos patógenos. Mesmo assim, estes resultados embasam o uso de bacteriófagos como uma possível ferramenta no controle de patógenos em carne suína moída e em ovos líquidos antes do processamento.

## 6. CAPÍTULO III

### AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE LEITÕES APÓS A UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS E ANTIBIÓTICOS

#### RESUMO

Para reduzir a incidência clínica de patógenos resistentes em humanos, diversos países estão proibindo a utilização de antibióticos nos sistemas de criação de animais de produção. Além disso, o crescente aumento da produção, da comercialização e do consumo de produtos produzidos em sistemas de criação livre de antibióticos e sistemas orgânicos de produção, contribuem para a redução e eliminação dos antibióticos da cadeia de produção de animais. Com a limitação da utilização dos antibióticos surge a necessidade de encontrar alternativas biológicas que possam controlar o crescimento bacteriano. Por serem específicos à determinadas bactérias e não apresentarem efeitos colaterais os bacteriófagos surgem como uma das principais alternativas biológicas de controle de patógenos, mas pouco se sabe sobre o efeito dos bacteriófagos no interior do trato gastrointestinal. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito causado pelos bacteriófagos no trato gastrointestinal de suínos em relação ao efeito causado pelos antibióticos utilizados como melhoradores de desempenho. Dezoito suínos utilizados para o experimento foram divididos em três tratamentos: Tratamento controle (TC), tratamento com antibióticos (TA) e tratamento com bacteriófagos (TB). A ração dos suínos do TA foi suplementada com AUREO S-P 250®. Os animais do TB receberam diariamente, via oral, 5 mL do coquetel contendo  $1,0 \times 10^{10}$  UFP·mL<sup>-1</sup> de bacteriófagos e os suínos do TC receberam apenas a ração basal. Após os 21 dias de tratamento os animais foram novamente pesados e abatidos, e o conteúdo fecal do íleo, ceco e cólon foram coletados para a realização das análises. Para avaliar a diversidade de bactérias no cólon, íleo e ceco, a região V3 do gene 16S rRNA do DNA metagenômico foi amplificada pela reação da polimerase em cadeia (PCR), usando os primers 338F e 518R e analisada pela DGGE. Analisando o dendograma foi possível observar que a maioria das amostras do ceco e do cólon se agruparam de forma heterogênea. Estes agrupamentos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,001$ ) na composição microbiana presentes em cada amostra. Mesmo os efeitos dos tratamentos não terem se agrupado de forma homogênea no dendograma, os padrões de amplicons das amostras mostrou efeito

significativo ( $p < 0,10$ ) somente na comparação entre o TA e o TC, enquanto para as outras comparações (TB x TC e TB x TA) os efeitos não foram significativos ( $p > 0,05$ ). Este resultado sugere uma pequena mudança na composição da microbiota dos animais do TB, apesar do resultado não ter sido estatisticamente significativo. Os resultados do peso final dos animais não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ), novos estudos devem ser realizados para confirmar se os bacteriófagos podem ou não serem utilizados como melhoradores de desempenho. Além disso, outras metodologias, como a análise metagenômico, poderão ser empregadas para avaliar quais foram os micro-organismos foram alterados nos tratamentos.

## 1. INTRODUÇÃO

O atual declínio no desenvolvimento de novos antibióticos pela indústria farmacêutica e o crescente aparecimento de patógenos resistentes a antibióticos, gerou uma crise mundial na saúde pública. A infecção por estes patógenos coloca em risco a saúde humana, resultando em falhas nos tratamentos, piora nos quadros clínicos e morte do paciente (CDC, 2013). A estimativa do número de mortes relacionadas a patógenos resistentes a antibióticos chega em 700.000 por ano (O'NEILL, 2014).

A resistência a antibióticos adquirida pelo patógeno tem sido relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos pelos humanos e principalmente pela constante utilização em animais de produção (MARSHALL e LEVY, 2011; CANTON et al., 2013; BELL et al., 2014; KARIUKI et al., 2015). O consumo mundial de antibióticos para animais de produção foi de 64.000 toneladas em 2010, sendo a China (24 %), os Estados Unidos (13 %), o Brasil (9 %), a Índia (3 %) e a Alemanha (3 %) os países que mais utilizaram e coincidentemente foram os principais países responsáveis pela produção, exportação e consumo de carne no mundo (HEINRICH BÖLL FOUNDATION, 2014; FAO, 2015; BOECKEL et al., 2015). A utilização de antimicrobianos como melhoradores de desempenho, tem o objetivo de reduzir a microbiota presente no trato gastrointestinal do animal, permitindo maior absorção de nutrientes e ganho de peso, resultando em melhor conversão alimentar. Entretanto, sua utilização constante pode contribuir para a seleção de micro-organismos resistentes (HUR et al., 2012; WHEATLEY et al., 2014; SMID, et al., 2014; PANDE et al., 2015).

Para reduzir a incidência clínica de patógenos resistentes em humanos, diversos países estão proibindo a utilização de antimicrobianos nos sistemas de criação de animais de produção (ANDERSSON e HUGHES, 2010; MATHER et al., 2013; WHO, 2015). Além disso, o crescente aumento da produção, da comercialização e do consumo de produtos produzidos em sistemas de criação livre de antibióticos e sistemas orgânicos de produção, contribuem para a redução e eliminação dos antibióticos da cadeia de produção de animais (LI et al., 2011; BAJPAI et al., 2012; RICKE et al., 2012; VAN LOO et al., 2012).

Com a proibição da utilização de antimicrobianos na produção animal, e a diminuição do desenvolvimento de novos antimicrobianos, surge a necessidade de encontrar alternativas biológicas que possam controlar o crescimento microbiano. Uma alternativa promissora para o controle de patógenos na produção animal é a utilização de bacteriófagos (GOLKAR et al., 2014; VERBEKEN et al., 2014; SERWER et al., 2014).

Bacteriófagos são vírus parasitas obrigatórios de células bacterianas, que utilizam a maquinaria celular do hospedeiro para se multiplicarem. São ubíquos, e por isso podem ser encontrados em todos os lugares em que seu hospedeiro está presente (SULAKVELIDZE, 2011). O valor total estimado da população de bacteriófagos no planeta chega a  $10^{32}$  (WITTEBOLE et al., 2014). São específicos a um determinado gênero ou espécie bacteriana, e essa especificidade é mediada pela interação das proteínas associadas à cauda do bacteriófago e os antígenos presentes na superfície do hospedeiro bacteriano. Após a adesão inicia-se o processo de infecção. O bacteriófago possui diversos ciclos de vida, mas apenas o ciclo lítico é viável para uso no controle de patógenos (WITTEBOLE, 2014; ENDERSEN et al., 2014). Durante o ciclo lítico o bacteriófago se apodera da maquinaria celular do hospedeiro para produzir novos virions. O acúmulo de virions no interior da célula força sua ruptura, causando a lise e a morte bacteriana. O rompimento da membrana bacteriana lança os virions ao meio, possibilitando o encontro com outros hospedeiros bacterianos que com a repetição do ciclo poderão também ser lisados. Quanto maior o número de bactérias, maior será a chance de contato entre o bacteriófago e seu hospedeiro. E conseqüentemente, quanto maior o número de bacteriófagos maior será a redução da contaminação (PAEPE et al., 2014).

A utilização de bacteriófagos em humanos e na produção animal, já foram sugeridas por diversos autores para reduzir ou controlar a contaminação por patógenos (MONK et al., 2010; KUTATELADZE e ADAMIA, 2010; GOODRIDGE e BISHA et al., 2011; RYAN et al., 2011; ENDERSEN et al., 2014; TSONOS et al., 2014). Apesar de não terem sido relatados efeitos colaterais em humanos e em animais, pouco se sabe sobre o efeito dos bacteriófagos no interior do trato gastrointestinal. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito causado pelos bacteriófagos no trato gastrointestinal de suínos em relação ao efeito causado pelos antibióticos utilizados como melhoradores de desempenho.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo**

Foram utilizados 10 diferentes bacteriófagos (Seis da família Siphoviridae [NWI; CHI; LI DR; WI; CV], e quatro da família Myoviridae [BE; BL; VI; CI]) provenientes do banco de culturas microbiológicas do laboratório do Dr. Paul D. Ebner (Departamento de Zootecnia da Universidade de Purdue, West Lafayette – IN, EUA). A concentração do coquetel de bacteriófagos foi padronizada em  $1,0 \times 10^{10}$  UFP·mL<sup>-1</sup> em tampão PBS.

### **2.2. Animais**

O experimento foi conduzido sob as orientações e aprovação do Comitê de Ética de Uso e Cuidados de Animais da Universidade de Purdue. Anteriormente ao início do experimento, os animais passaram por um período de adaptação de 14 dias, a fim de reduzir o stress e regularizar o consumo de ração. Os animais foram alimentados com ração balanceada, formulada a base de milho e farelo de soja, e alojados individualmente, de forma aleatória, em baias metálicas suspensas (3 m<sup>2</sup>), com piso e laterais teladas, dotadas de comedouro semiautomático e bebedouros tipo nipple. As baias estavam localizadas em prédio de alvenaria, com piso e laje de concreto e controle de temperatura ambiente automático. Foram utilizados 18 suínos com pesos similares, entre 15 e 20 kg e, durante os 21 dias do experimento, os animais receberam 2 kg de ração, uma vez por dia sendo o consumo de água “ad libitum”.

### **2.3. Delineamento experimental**

Os animais foram pesados, numerados e distribuídos em delineamento inteiramente casualizados, com seis suínos por tratamento. A ração dos suínos do tratamento com antibióticos foi suplementada com AUREO S-P 250® (Zoetis®, Florham Park - NJ, EUA), composto por aproximadamente, 100 g de cloridrato de tetraciclina, 100 g de sulfametazina e 50 g de penicilina, por tonelada de ração. Os animais do TB receberam diariamente, via oral, 5 mL do coquetel de bacteriófagos ( $10^{10}$  UFP·mL<sup>-1</sup>). Após os 21 dias de tratamento os animais foram novamente pesados e abatidos, e o conteúdo da digesta presente do íleo, ceco e as fezes do colón foram coletados para a realização das análises.

## 2.4. Extração do DNA

O DNA genômico presente nas amostras foram extraídos, em duplicata, utilizando o FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, Irvine-CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, adaptadas para fezes, descritas a seguir:

Foram adicionados 0,2 g de fezes, 122  $\mu$ L da solução de lise tamponada MT buffer, e 978  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio nos tubos Lysing Matrix Tubes. Estes tubos possuem pequenas esferas de sílica que ajudam a lisar os micro-organismos presentes nas fezes e liberar seu genoma no meio. Os tubos foram agitados no FastPrep FP120 (MP Biomedicals, Irvine-CA, EUA) por 30 segundos a 5,5 m/s. Após agitação os tubos foram centrifugados a 13.000 x g (Galaxy 16, VWR, Radnor – PA, EUA) por 30 segundos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado 250  $\mu$ L de reagente PPS (Protein Precipitation Solution). A solução foi misturada vertendo-se o tubo 10 vezes, manualmente. O tubo foi centrifugado por 5 minutos, a 13.000 x g (Galaxy 16, VWR, Radnor – PA, EUA) e o sobrenadante transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 1 mL de suspensão de matriz de ligação (Binding Matrix Suspension). A solução foi outra vez misturada, manualmente, invertendo-se o tubo, por 2 minutos, para permitir a ligação do DNA à matriz e, posteriormente, foi deixado em repouso por 3 minutos para permitir a decantação da matriz de sílica. Em seguida, 500  $\mu$ L do sobrenadante foi removido cuidadosamente, para evitar que a matriz de ligação fosse ressuspendida. A matriz foi ressuspendida no sobrenadante restante e 600  $\mu$ L da mistura, transferidos para o tubo Spin Filter Tubes, o qual foi centrifugado a 13.000 x g (Galaxy 16, VWR, Radnor – PA, EUA), por 2 minutos. O conteúdo do tubo de coleta foi descartado e o restante do sobrenadante foi transferido para o filtro Spin Filter e procedeu-se nova centrifugação. Foram adicionados 500  $\mu$ L de solução de lavagem SEWS-M (Etanol + Sal) e centrifugado a 13.000 x g (Galaxy 16, VWR, Radnor – PA, EUA), por 2 minutos. O volume no tubo de coleta foi descartado, o filtro recolocado no tubo de coleta e novamente centrifugado por 2 minutos para retirar a solução de lavagem residual. O filtro foi acoplado a um novo tubo e colocado para secagem durante 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se, então, 50  $\mu$ L de DES (Água livre de DNase/Pirogênio) ao filtro contendo a matriz, a qual foi ressuspendida por pipetagem e centrifugado por 5 minutos, a 13.000 x g (Galaxy 16, VWR, Radnor – PA, EUA) para transferir e eluir o DNA para o tubo de coleta.

## 2.5. Quantificação do DNA

As amostras de DNA foram quantificadas utilizando o Quant-iT™ PicoGreen® ds DNA kit (Invitrogen, Carlsband – CA, EUA). Para isso, foi necessário a preparação das amostras para a construção de uma curva analítica padrão. O reagente PicoGreen 200x foi diluído em tampão 1x Tris-EDTA (TE) para atingir a concentração 1x e a amostra de DNA padrão 50 x foi diluída em tampão TE para atingir a concentração 2 µg·mL<sup>-1</sup>. As proporções dos reagentes e seus respectivos volumes seguiram as recomendações do fabricante, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Protocolo para a elaboração da curva analítica padrão

<b>Tampão TE, µL</b>	<b>DNA padrão , µL</b>	<b>PicoGreen, µL</b>	<b>Concentração final, ng·mL<sup>-1</sup></b>
0	1000	1000	1000
500	500	1000	500
900	100	1000	100
990	10	1000	10
999	1	1000	1
1000	0	1000	0

Após a adição dos reagentes nas microplacas de 96 poços (modelo Greiner UV-STAR®, Sigma-Aldrich, St. Louis - MO, EUA), estas foram incubadas por 2 a 5 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após o período de incubação as amostras foram visualizadas e quantificadas em espectrofotômetro GENios (TECAN®, Mannedorf - CH, Suécia) para a construção da curva analítica padrão. Como o reagente PicoGreen é excitado no comprimento de onda 480 nm e emite fluorescência no comprimento de onda 520 nm, estes valores foram definidos para a leitura no aparelho.

Para a determinação da concentração do DNA extraído das amostras, uma nova microplaca de 96 poços foi utilizada. Dois microlitros de cada amostra foram diluídos em 998 µL de tampão TE 1x e 100 µL da solução PicoGreen adicionados. As amostras foram incubadas por 2 a 5 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e a absorbância quantificadas pelo espectrofotômetro (excitação 480 nm e fluorescência 520 nm). Após análise, as amostras foram padronizadas em tubos contendo 10 ng/µL.

## 2.6. Amplificação por PCR da região 16S rRNA

Para avaliar a diversidade de bactérias no colón, íleo e ceco, a região V3 do gene 16S rRNA do DNA metagenômico foi amplificada pela reação da polimerase em cadeia (PCR), usando os primers 338F (5' – **CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG** GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG – 3'; o GC-clamp está em negrito) e 518R (5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG – 3'). O GC-clamp, sequência rica em guanina e citosina, é adicionado no primer para prevenir que o DNA seja completamente desnaturado em fita simples, melhorando a resolução e visualização das bandas no gel (NAKATSU et al., 2000; NYBERG et al., 2008; ARIEFDJOHAN et al., 2010).

Para 100 µL da solução de PCR foram utilizados, 70,7 µL de Ultra Pure™ livre de DNase e RNase, 10 µL de tampão Taq 1x (1,5 mol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 8 µL da solução de MgCl<sub>2</sub> (2 mol·L<sup>-1</sup>), 0,8 µL de dNTPs (0,8 mol·L<sup>-1</sup>), 5 µL de albumina do soro bovino (BSA; 0,1 %), 1,5 µL de cada primer (0,5 µmol·L<sup>-1</sup>), 0,5 µL de Taq polimerase (1.25 U) e 2 µL de DNA da amostra (10 ng/µL) (NAKATSU e MARSH, 2007). Todos os reagentes utilizados neste procedimento foram da Invitrogen (Carlsbad – CA, EUA).

A reação de PCR foi realizada no termociclador iCycler (BIO-RAD, Hercules – CA, EUA) seguindo os seguintes ciclos: 94 °C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguido por 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 30 segundos. A extensão final foi a 72 °C por 7 minutos (BURKHOLDER et al., 2008). Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com 0,5 µg·mL<sup>-1</sup> de brometo de etídio (BIO-RAD, Hercules – CA, EUA) em tampão TAE 1x (BIO-RAD, Hercules – CA, EUA), usando fragmentos de DNA lambda – Hind III (Invitrogen, Carlsbad – CA, EUA) como marcador molecular, a 80 volts (SH 500, Shelton Scientific, Shelton – CT, EUA) durante 45 minutos. Os géis foram visualizados em transiluminador e fotografados (UVP BioImaging system, UVP LLC, Upland – CA, EUA).

## 2.7. Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE)

Para a realização do DGGE, foi utilizado o equipamento DCode™ Universal Mutation Detection System, com géis de poli-acrilamida (8 %, acrilamida-bisacrilamida na proporção de 37,5:1) em gradientes de desnaturação de 30 – 60 %, sendo que 100

% do desnaturante contém 7 mol·L<sup>-1</sup> de uréia e 40 % (v/v) de formamida deionizada em tampão TAE 1x. Uma alíquota de 40 µL de cada amostra de DNA amplificado, foram misturadas com 8 µL de loading buffer 5x [0,025 % (p/v) de bromofenol azul, 0,025 % (m/v) xileno cianol, 47 % (v/v) de 1 mol·L<sup>-1</sup> EDTA e 47 % (v/v) de glicerol] antes de ser injetada no gel. Todos os equipamentos e reagentes utilizados nesta etapa pertenciam a BIO-RAD (Hercules – CA, EUA). Os géis foram imersos em tampão TAE 1x, a cuba aquecida a 60 °C, e as amostras adicionadas. Foi usado um gel para cada tipo de amostra (íleo, ceco ou colón), e as amostras de cada tratamento, foram separadas no gel com a utilização de marcador molecular para facilitar a visualização e a identificação dos amplicons. A eletroforese dos géis ocorreu a 200 volts por 10 minutos, seguindo por 70 volts por 16 horas a 60 °C. Após o fim da eletroforese, os géis foram corados usando SYBR® Green I (Cambrex Bio Science, Rockland – ME, EUA), visualizados em transiluminador e fotografados (UVP BioImaging system, UVP LLC, Upland – CA, EUA).

## **2.8. Análise dos amplicons formados no DGGE**

O padrão de similaridade dos amplicons formados no DGGE, foram calculados baseando-se na presença e ausência de bandas, e os valores foram expressos como um coeficiente de similaridade. O coeficiente de similaridade é calculado baseado na seguinte formula:  $D_{sc} = [2j/(a+b)]$ , onde a = ao número de bandas da coluna 1 no DGGE, b = ao número de bandas da coluna 2 no DGGE, e j = ao número comum de bandas entre as colunas 1 e 2 no DGGE, e  $D_{sc} = 1$  indica que as colunas são iguais (ARIEFDJOHAN et al., 2010). Com os resultados obtidos, foram construídos dendogramas apresentando a similaridade entre os padrões de bandas formadas entre as amostras, usando o software BioNumerics (BioNumerics, Applied Maths, Austin – TX, EUA).

## **2.9. Análises estatísticas**

Todas os dados gerados foram analisados usando o software SAS 9.1 (SAS Institute, Cary – NC, EUA). Os índices de similaridade entre os locais de coleta das amostras foram analisados usando o comando: “MIXED MODEL” do SAS, e a diferença entre os tratamentos foram determinadas pela separação das médias do teste de Tukey-Kramer. A diferença significativa foi determinada usando  $p < 0,10$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de adaptação um dos animais do grupo tratado com antibióticos morreu, desta forma foram usados apenas 5 animais no TA e 6 nos demais tratamentos.

#### 3.1. Quantificação do DNA presente nas amostras

Durante a coleta das amostras fecais, foi observado que existia pouco ou nenhum material ileal de todos os animais abatidos, refletindo baixos resultados na quantificação do DNA presentes nas amostras (Quadro 1).

Quadro 1. Quantificação (ng/ $\mu$ L) das amostras de DNA presentes nas fezes de cada local do intestino em seu respectivo animal e tratamento.

TC			TB			TA		
Suíno	Local	Qnt.	Suíno	Local	Qnt.	Suíno	Local	Qnt.
8	Íleo	4	11	Íleo	171	7	Íleo	2.27
	Ceco	256		Ceco	168		Ceco	171
	Colón	274		Colón	125		Colón	89
9	Íleo	N/D	12	Íleo	191	15	Íleo	4.2
	Ceco	82		Ceco	183		Ceco	114
	Colón.	120		Colón	158		Colón	149
10	Íleo	46	14	Íleo	141	17	Íleo	2.85
	Ceco	228		Ceco	208		Ceco	148
	Colón	162		Colón	198		Colón	178
13	Íleo	N/D	18	Íleo	N/D	20	Íleo	N/D
	Ceco	188		Ceco	215		Ceco	130
	Colón	94		Colón	128		Colón	150
16	Íleo	N/D	21	Íleo	N/D	22	Íleo	142
	Ceco	85		Ceco	54		Ceco	139
	Colón	105		Colón	60		Colón	158
19	Íleo	N/D	23	Íleo	54			
	Ceco	162		Ceco	129			
	Colón	201		Colón	149			

N/D – Não detectável; TC – Tratamento Controle; TB – Tratamento com bacteriófagos; TA – Tratamento com antibióticos.

Como os valores da quantificação do DNA do íleo foram abaixo do esperado, e algumas vezes não detectáveis, o material foi desprezado e o experimento realizado apenas com as amostras do ceco e do colón.

A quantidade e qualidade do DNA extraído das amostras está diretamente relacionado à metodologia de extração utilizada durante o experimento. Nechvatal et al., (2008) utilizando diferentes combinações de metodologias de extração e

preservação do DNA, quantificaram entre 12 e 25 ng/μL de DNA em amostras de fezes humanas. Por outro lado, Ariefdjohan et al., (2010) utilizando a mesma metodologia empregada neste experimento, quantificou entre 151,3 e 187,2 ng/μL de DNA em amostras de fezes humanas. A eficiência da metodologia de extração permite uma maior recuperação do DNA e conseqüentemente uma melhor avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a microbiota das diferentes partes do intestino do animal. Quanto maior o DNA recuperado das amostras, maiores são as chances de encontrar as diferenças relacionadas aos efeitos dos tratamentos do experimento (SCUPHAM et al., 2007).

### 3.2. PCR e DGGE

O produto da PCR das amostras do ceco e do colón foram utilizados para a realização da DGGE (Figura 1 e Figura 2). Os amplicons formados nos géis mostram as diferentes espécies presentes nas comunidades bacterianas de cada amostra.

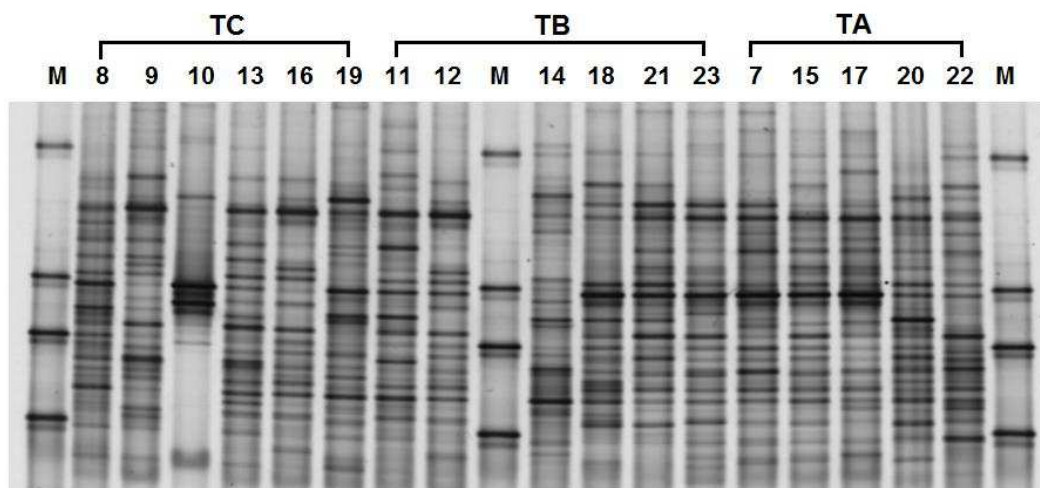


Figura 1. DGGE de amplicons da região V3 do rDNA 16S das amostras microbianas presente no ceco dos animais. Gradientes de desnaturação de 30 – 60 %, separados por seus respectivos tratamentos. M representa o marcador molecular utilizado.

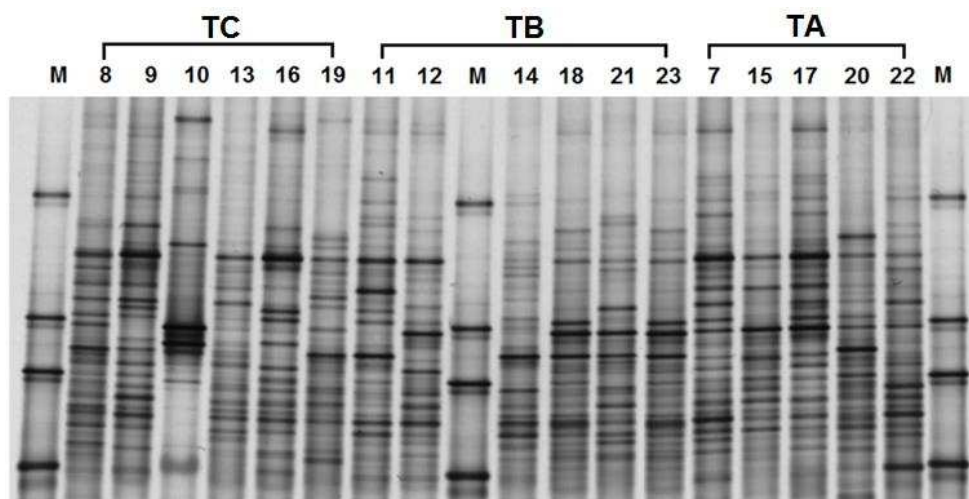


Figura 2. DGGE de amplicons da região V3 do rDNA 16S das amostras microbianas presente no colón dos animais. Gradientes de desnaturação de 30 – 60 %, separados por seus respectivos tratamentos. M representa o marcador molecular utilizado

Analisando o padrão dos amplicons formados nas figuras, é possível perceber que o suíno 10, pertencente ao tratamento controle, apresentou um padrão diferente dos outros animais. A avaliação deste resultado é complexa, já que nenhum dos animais apresentou nenhuma mudança comportamental ou alteração clínica, durante o período de realização do experimento, que pudesse justificar tal alteração. Entretanto, diversos fatores intrínsecos e extrínsecos podem ter contribuído para este resultado. Como o trato gastrointestinal possui diferentes comunidades microbianas, ao longo da mucosa, responsáveis por funções nutricionais e imunológicas, qualquer alteração na dieta, no ambiente ou causada por uma infecção bacteriana, podem resultar na modificação da composição microbiana presente no intestino do animal (HILL et al., 2010; WU e WU, 2012; SCHOKKER et al., 2015; FRESE et al., 2015).

Para avaliar o efeito dos tratamentos na microbiota do ceco e do cólon, os padrões de amplicons formados nos géis da DGGE foram comparados e plotados em um dendograma (Figura 3).

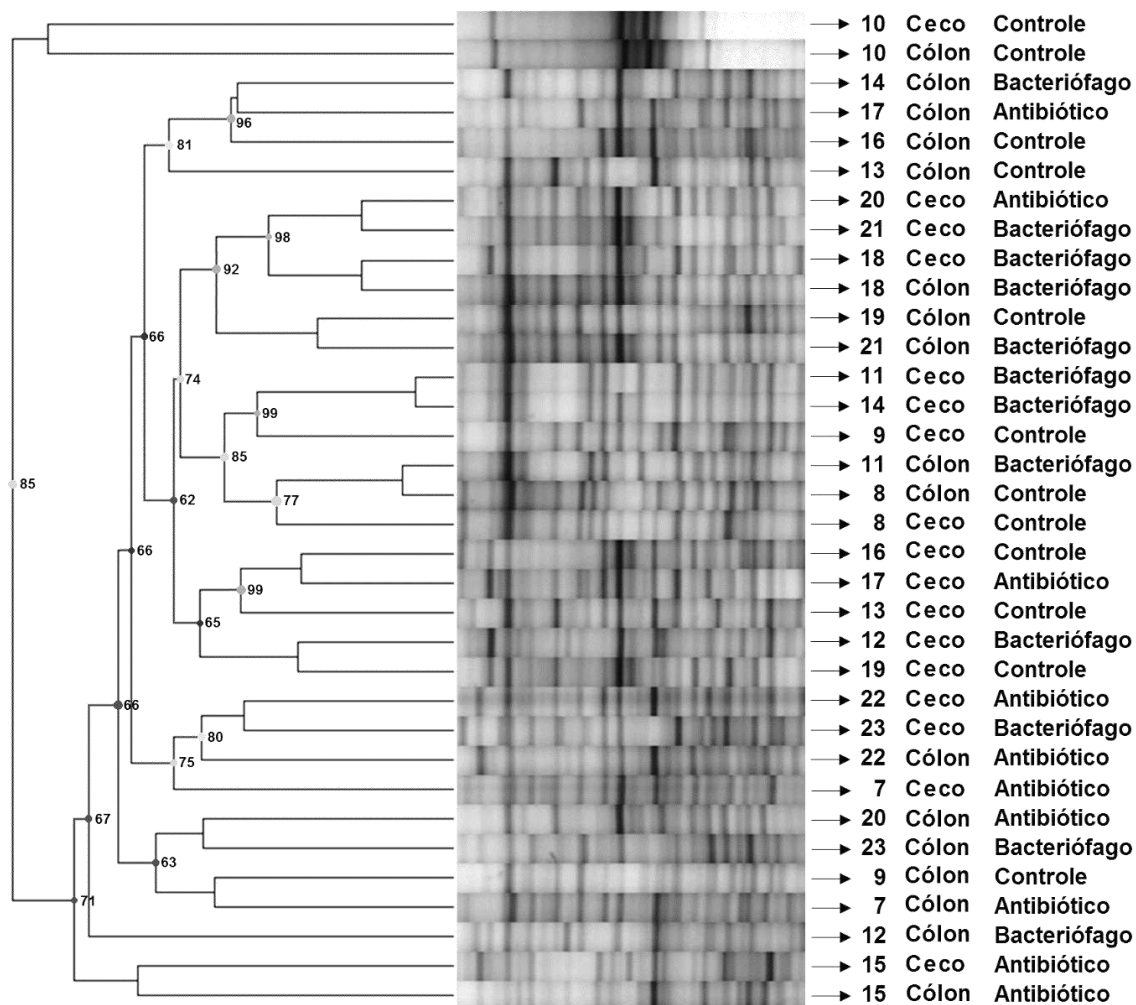


Figura 3. Dendrograma

Analisando o dendrograma 6 6 poss6vel observar que a maioria das amostras do ceco e do c6lon se agruparam de forma heterog6nea. Estes agrupamentos apresentaram uma diferen7a significativa ( $p < 0,001$ ) na composi76o microbiana presentes em cada amostra. Apesar do ceco e do c6lon pertencerem ao intestino grosso, diversos fatores influenciam na composi76o e desenvolvimento de diferentes comunidades bacterianas em cada parte do intestino. Durante a passagem do bolo alimentar pelo intestino, a velocidade das contra76es perist6lticas diminui quase pela metade quando chegam ao intestino grosso, e continuam diminuindo at6 serem excretados pelo reto (HIPPER e EHRLEIN, 2001). Esta redu76o de velocidade permite que as bact6rias presentes na mucosa fermentem substratos que n6o foram absorvidos pelo intestino. A fermenta76o destes substratos produz gases, 6cidos graxos de cadeia curta (AGCC), e diversos outros metabolitos que possuem a capacidade de alterar as caracter6sticas bioqu6micas e fisiol6gicas da mucosa, e

consequentemente, alterarem o crescimento e a composição da comunidade bacteriana local (RASTALL e GIBSON, 2015).

Apesar dos tratamentos não terem se agrupado de forma homogênea no dendograma, a análise estatísticas entre os padrões de amplicons das amostras encontrou efeito significativo ( $p < 0,10$ ) somente na comparação entre o TA e o TC, enquanto para as outras comparações (bacteriófagos x controle e bacteriófagos x antibióticos) os efeitos não foram significativos ( $p > 0,05$ ). Já que os antibióticos possuem grande efeito na redução e modificação da microbiota presente no trato gastrointestinal resultando em maior ganho de peso e uma melhor conversão alimentar. Entretanto não houve efeito significativo ( $p > 0,05$ ) entre os pesos dos animais de cada tratamento. Isso pode ter ocorrido devido a baixo número de animais utilizados no experimento. Além disso, o efeito causado na microbiota dos animais deste tratamento está de acordo com o encontrado por diversos autores que avaliaram o efeito dos antibióticos na microbiota das fezes de suínos (ALLEN et al., 2011; KIM et al., 2012; LOOFT et al., 2012).

Uma das desvantagens da utilização de antibióticos é a alteração na comunidade microbiana benéfica presente no trato gastrointestinal. Bactérias lácticas presentes no lúmen possuem a capacidade de fermentar e produzir ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Estes AGCC são capazes de: estimular o desenvolvimento de células da mucosa, aumentando a absorção de nutrientes; estimular e ativar a resposta imune e anti-inflamatória; estimular a produção de muco e impedir a adesão e contaminação por patógenos, e vários outros efeitos que estão diretamente relacionados à saúde e a nutrição do animal (STEED e MACFARLANE, 2009; HARDY et al., 2013; CONLON e BIRD, 2015). Muitas das bactérias presentes no ceco e no cólon não são espécies dominantes da microbiota intestinal. Sendo assim, a utilização de antibióticos pode alterar a composição da microbiota local e comprometer diversos efeitos benéficos causados pelas colônias bacterianas (LOOFT et al., 2014).

A comparação entre os tratamentos, com antibióticos e com os bacteriófagos, não resultou em efeito estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ). Este resultado demonstra que as alterações causadas na composição da microbiota não foram diferentes entre os tratamentos. O suplemento utilizado na ração dos animais do tratamento com antibióticos, é composta por três antimicrobianos: a tetraciclina, a

sulfametazina e pela penicilina. A tetraciclina e a sulfametazina são antimicrobianos de amplo espectro, capazes de matar tanto bactérias gram positivas quanto bactérias gram negativas, enquanto a penicilina possui efeito apenas em bactérias gram positivas (GUIMARÃES et al., 2010; WALSH e WENCEWIZ, 2014). Como este suplemento possui efeito sobre amplo espectro de bactérias e o resultado da comparação entre o tratamento com bacteriófagos não foi significativo, podemos sugerir que os bacteriófagos conseguiram modificar a microbiota tanto do ceco quanto do cólon em relação ao tratamento controle que teve resultado estatisticamente significativo. Além disso, a comparação entre os tratamentos controle e com bacteriófagos também não tiveram resultado estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), indicando que não houve mudança na composição em relação ao efeito dos tratamentos. Os resultados apresentados pelo efeito do tratamento com bacteriófagos, entra em contradição com a literatura. Praticamente todos os autores afirmam categoricamente que os bacteriófagos são específicos para uma determinada gênero ou espécie bacteriana (ABEDON, 2009; HYMAN e ABEDON, 2012; TAYLOR, 2014).

#### **4. CONCLUSÃO**

Foi possível observar a diferença significativa na composição microbiana, entre as amostras que pertenciam ao TC e ao TA. Este resultado sugere uma pequena mudança na composição da microbiota dos animais do TB, apesar do resultado não ter sido estatisticamente significativo. Os resultados do peso final dos animais não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), novos estudos devem ser realizados para confirmar se os bacteriófagos podem ou não serem utilizados como melhoradores de desempenho. Além disso, outras metodologias, como a análise metagenômico, poderão ser empregadas para avaliar quais foram os micro-organismos foram alterados nos tratamentos.

## 5. REFERÊNCIAS

ABCS. Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Manual brasileiro de boas práticas agropecuárias na produção de suínos**. Brasília, DF; MAPA; Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2011. 140 p.

ABCS. Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Projeto Nacional de Desenvolvimento da Suinocultura**. 2015. Disponível em: <http://www.abcs.org.br/pnds/o-projeto>. Acessado em: 25/07/2015.

ABDOU, A.M.; KIM, M.; SATO, K. Functional Proteins and Peptides of Hen's Egg Origin. In: Hernandez-Ledesma B. e Hsieh C-C. **Bioactive food peptides in health and disease**. Croacia: Intech, 2013. 276 p. ISBN 978-953-51-0964-8

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Balanço dos setores suinícola e avícola de 2014 com projeções para o ano de 2015**. Disponível em <http://zip.net/bvrxls>. Acessado em: 02/07/2015. 2014.

ABEDON, S.T. **Kinetics of Phage-Mediated Biocontrol of Bacteria**. Foodborne pathogens and disease, 6(7):807-815, 2009.

ABULREESH, H.H. Salmonellae in the Environment. In: **Salmonella - Distribution, adaptation, control measures and molecular technologies**. Croacia: Intech, 2012. 516 p. ISBN 978-953-51-0661-6

ACKERMANN, H.W. **Bacteriophage electron microscopy**. Advances in Virus Research, 82:1-32, 2012.

ADHAM, M.A.; MUJO, K.; KENJI, S. Functional Proteins and Peptides of Hen's Egg Origin. In: Blanca H-L e Chia-Chien H. **Bioactive Food Peptides in Health and Disease**. InTech ISBN 978-953-51-0964-8, 276 pages, 2013.

AKHTAR, M.; VIAZIS, S.; DIEZ-GONZALEZ, F. **Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against Salmonella enterica serovars**. Food Control, 38:67-74, 2014.

ALBINO, L.A.A.; ROSTAGNO, M.H.; HÚNGARO, H.M.; MENDONÇA, R.C.S. **Isolation, characterization, and application of bacteriophages for Salmonella spp. biocontrol in pigs**. Foodborne pathogens and disease, 11(8):602-9, 2014.

ALCAINE, S.D.; WARNICK, L.D.; WIEDMANN, M. **Antimicrobial resistance in nontyphoidal Salmonella**. Journal of Food Protection, 70(3):780-790, 2007.

ALLEN, H.K.; LOOFT, T.; BAYLES, D.O.; HUMPHREY, S.; LEVINE, U.Y.; ALT, D. **Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes**. MBio, 2(6): 00260–11, doi:10.1128/mBio.00260-11, 2011.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, C.; CAPITA, R. **Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006**. International Journal of Food Microbiology, 153(3):281-287, 2012.

ANDERSSON, D.I.; HUGHES, D. **Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?** Nature Reviews Microbiology, 8:260–271, 2010.

ANDINO, A.; HANNING, I. **Salmonella enterica: Survival, colonization, and virulence differences among serovars**. Hindawi Publishing Corporation. Scientific World Journal, Volume 2015, Article ID 520179, 2015.

AO, T.T.; FEASEY, N.A.; GORDON, M.A.; KEDDY, K.H.; ANGULO, F.J.; CRUMP, J.A. **Global Burden of Invasive Nontyphoidal Salmonella Disease**. Emerging Infectious Diseases, 21(6):2015, 2010.

ARGUELLO, H.; CARVAJAL, A.; COLLAZOS, J.A.; GARCIA-FELIZ, C.; RUBIO, P. **Prevalence and serovars of Salmonella enterica on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses**. Food Research International, 45:905–912, 2012.

ARIEFDJOHAN, M.W.; SAVAIANO, D.A.; NAKATSU, C.H. **Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens**. Nutrition Journal, 9:23, 2010.

ARNOLD, M.E.; MARTELLI, F.; MCLAREN, I.; DAVIES, R.H. **Estimation of the rate of egg contamination from Salmonella-infected chickens**. Zoonoses Public Health, 61(1):18–27, 2014.

AVISITE. **Perspectivas apontam crescimento de 9% do consumo per capita de ovos em 2014**. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/noticias/?codnoticia=15390> Acessado em 06/07/2015, 2014.

AYGUN A. **Effects of force molting on eggshell colour, egg production and quality traits in laying hens**. Revue de Médecine Vétérinaire, 164, 2, 46-51, 2013.

BAER, A.A.; MILLER, M.J.; DILGER, A.C. **Pathogens of interest to the pork industry: A review of research on interventions to assure food safety**. Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety, 12(2):1-35, 2013.

BAJPAI, V.K.; BAEK, K.-H.; KANG, S.C. **Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review**. Food Research International, 45:722–734, 2012.

BAKER, R.C.; QURESHI, R.A.; HOTCHKISS, J.H. **Effect of an elevated level of carbon dioxide containing atmosphere on the growth of spoilage and pathogenic bacteria at 2, 7, and 13 °C**. Poultry Science, 65:729-37, 1986.

BARBOSA, N.A.A.; SAKOMURA, N.K.; MENDONÇA M.O.; FREITAS E.R.; FRENANDES, J.B.K. **Qualidade de ovos comerciais provenientes de poedeiras comerciais armazenados sob diferentes tempos e condições de ambientes**. ARS Veterinária, 24(2):127-133, 2008.

BARBOSA, V.M.; BAIÃO, N.C.; MENDES, P.M.M.; ROCHA, J.S.R.; POMPEU M.A.; CARDEAL P.C. **Avaliação da qualidade da casca dos ovos provenientes de matrizes pesadas com diferentes idades**. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, 64(4):1036-1044, 2012

BEARSON, S.M.D.; ALLEN, H.K.; BEARSON, B.L.; LOOFT, T.; BRUNELLE, B.W.; KICH, J.D.; TUGGLE, C.K.; BAYLES, D.O.; ALT, D.; LEVINE, U.Y.; STANTON, T.B. **Profiling the gastrointestinal microbiota in response to Salmonella: Low versus high Salmonella shedding in the natural porcine host**. Infection, Genetics and Evolution, 16:330–340, 2013.

- BELL, B.G.; SCHELLEVIS, F.; STOBBERINGH, E.; GOOSSENS, H.; PRINGLE, M. **A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance**. BMC Infectious Diseases, 14:13, 2014.
- BENLI, H.; SANCHEZ-PLATA, M.X.; ILHAK, O.I.; GONZALES, M.T.N.; KEETON J.T. **Evaluation of antimicrobial activities of sequential spray applications of decontamination treatments on chicken carcasses**. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 28(3):405-410, 2015.
- BERTECHINI, A.G.; MAZZUCO, H. **The table egg: A review**. Ciência e Agrotecnologia, 37(2):115-122, 2013.
- BESTMAN, M.; WAGENAAR, J-P. **Health and Welfare in Dutch Organic Laying Hens**. Animals, 4:374-390, 2014.
- BEUCHAT, L.; KOMITOPOULOU, E.; BETTS, R.; BECKERS, H.; BOURDICHON, F.; JOOSTEN, H.; FANNING, S.; TER KUILE, B. **Low-water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens**. Journal of Food Protection, 76:150–172, 2013.
- BHUNIA, A.K. **Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis**. New York: Springer Science + Business Media, 2008. 289 p.
- BIELKE, L.; HIGGINS S.; DONOGHUE, A.; DONOGHUE, D.; HARGIS, B.M. **Salmonella host range of bacteriophages that infect multiple genera**. Poultry Science, 86:2536–2540, 2007.
- BLAIR, J.M.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J.V. **Molecular mechanisms of antibiotic resistance**. Nature Reviews Microbiology, 13:42–51, 2015.
- BOECKER, T.P.V.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; ROBINSON, T.P.; TEILLANT, A. **Global trends in antimicrobial use in food animals**. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 112(18): 5649–5654, 2015.
- BORGES, K.A.; PINTO, A.T.; SILVA, E.N. **Efeito da oscilação de temperatura e umidade do ar no comportamento de Salmonella Enteritidis em ovos de galinha contaminados**. Acta Scientiae Veterinariae, 37(1): 25-30, 2009.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Definida nova data para controle eletrônico de antibióticos**. ANVISA Publicações Eletrônicas. Disponível em: <http://goo.gl/ce9sDE>. Acessado em 21/07/2015, Brasília – DF, 2013.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Orientações gerais para a implantação da Subrede Analítica de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde**. ANVISA Publicações Eletrônicas. Disponível em: <http://goo.gl/85uPma>. Acessado em 22/07/2015, Brasília – DF, 2015c.
- BRASIL. Câmara dos Deputados. **Projeto de lei nº 699-a, de 2015**. Ementa: Proíbe a venda direta ao consumidor de carne previamente moída. Disponível em: <http://goo.gl/4FuUPQ>. Acessado em 20/07/2015, Brasília – DF, 2015b.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura Pesca e Agropecuária. **Brasil atua na prevenção da Diarreia Epidêmica de Suínos**. 2015a. Disponível em: <http://goo.gl/4zDhe7>. Acessado em: 22/07/2015

BRASIL. Câmara dos Deputados. **Projeto de Lei 1847 de 2011**. 2016. Disponível em: <http://goo.gl/czamtY>. Acessado em: 26/01/2016

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura Pesca e Agropecuária. **Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal**. 2015. Acessado em: 25/01/2015. Disponível em: [www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados](http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados).

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura Pesca e Agropecuária. **Instrução normativa nº 83 de 21 de novembro de 2003**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Bovina em Conserva (Corned Beef) e Carne Moída de Bovino. Disponível em: <http://goo.gl/rGqBN4>. Acessado em 20/07/2015, Brasília – DF, 2003.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº1, de 21 de fevereiro de 1990**. Normas gerais de inspeção de ovos e derivados. 1990. Disponível em: <http://goo.gl/MCQneP>. Acessado em 24/07/2015.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio – Brasil 2013/14 a 2023/2024**. Disponível em: <http://goo.gl/0IFdlU>. Acessado em 25/07/2015, Brasília – DF, 2014a.

BRASIL. MS. Ministério da Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos**. Organograma. Disponível em: <http://goo.gl/b4uaVB>. Acessado em 22/07/2015, Brasília – DF, 2014b.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ÂNGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN B. **Salmonella nomenclature**. Journal of Clinical Microbiology, 38:2465-2467, 2000.

BURKHOLDER, K.M.; THOMPSON, K.L.; EINSTEIN, M.E.; APPLGATE, T.J.; PATTERSON, J.A. **Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to Salmonella Enteritidis colonization in broilers**. Poultry Science, 87:1734-1741, 2008.

BUTAYE, P.; ARGUDIN, M.A.; THERELFAL, J. **Introduction to antimicrobial - Resistant foodborne pathogens**. In: CHEN, C.; YAN, X.; JACKSON, A.R. Antimicrobial resistance and food safety. Waltham – MA: Academic Press - Elsevier, 2015. 452 p.

BUTTLER, M.S.; COOPER, M.A. **Antibiotics in the clinical pipeline in 2011**. The Journal of Antibiotics, 64:413-425, 2011.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; BRABBAN, A.; KUTTER, B.; KARRIKER, L.; STHL, C.; WAGSTROM, E.; ANDERSON, R.; POOLE, T.L.; GENOVESE, K.; KRUEGER, N.; HARVEY, R.; NISBET, D.J. **Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce Salmonella populations in growing swine**. Foodborne Pathogens and Disease, 8(2):261-6, 2011.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; BRABBAN, A.; KUTTER, E.; KARRIKER, L.; STAHL, C. **Occurrence of Salmonella-specific bacteriophages in swine feces collected from commercial farms**. Foodborne Pathogens and Disease, 7:851-856, 2010.

- CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A.M.M.; FALCÃO, J.P. **Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of Salmonella Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil.** Food Microbiology, 32:254-264, 2012.
- CANTON, R.; HORCAJADA, J.P.; OLIVER, A.; GARBAJOSA, P.R.; VILA, J. **Inappropriate use of antibiotics in hospitals: the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 4:3<sup>11</sup>, 2013.
- CARATTOLI, A. **Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(6):2227–2238, 2009.
- CARDINAELS, R.; VELDE, J.V.; MATHEUS, W.; LIEDEKERKE, P.V.; MOLDENAERS, P. **A rheological characterisation of liquid egg albumen.** Inside Food Symposium, Leuven, Belgium, 2013.
- CAREY-SMITH G.V.; BILLINGTON C.; CORNELIUS A.J.; HUDSON A.; HEINEMANN. **Isolation and characterization of bacteriophages infecting Salmonella spp.** FEMS Microbiology Letter, 258:182–186, 2006.
- CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCIA-GIMENO, R.M. **Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review.** Food Research International, 45:545 – 55, 2013.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Preliminary incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food — Foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 2006–2014.** U.S. Department of Health and Human Services. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report, 64(18):485-511, 2015a.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. **National Salmonella surveillance annual report, 2012.** NCEZI. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases. November 2014. Disponível em: <http://goo.gl/Nq4bKM>. Acessado em 22/07/2015.
- CDC. Center of Disease and control. **Making health care safer.** NCEZI. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Division of Healthcare Quality Promotion. CDC Vital Signs, March 2014. Disponível em: <http://goo.gl/PWpYOh> . Acessado em: 21/07/2015
- CDC. Center of Disease Control. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.** U.S. Department of Health and Human Services. 2013. 114 p. Disponível em: <http://goo.gl/JBIYVs>. Acessado em 27/07/2015.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **About antimicrobial resistance.** 2015b. Disponível em: <http://goo.gl/aeWQe8>. Acessado em 27/07/2015.
- CHANISHVILI, N. **Phage-therapy – History from Twort and D’Herelle through soviet experience to current approaches.** In: MARAMOROSCH, K.; SHATKIN, A.J.; MURPHY, F.A. Advances in virus research: Bacteriophages, Part B. New York – NY: Elsevier, 86:3-40, 2012.
- CHEN, H.M.; WANG, Y.; SU, L.H.; CHIU, C.H. **Nontyphoid Salmonella infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy.** Pediatrics and Neonatology, 54:147-152, 2013.

- CLEMENTE, L.; CORREIA, I.; THEMUDO, P.; NETO, P.; CANIÇA, M.; BERNARDO, F. **Antimicrobial susceptibility of Salmonella enterica isolates from healthy breeder and broiler flocks in Portugal.** The Veterinary Journal, 200:276–281, 2014.
- COFFEY, B.; MILLS, S.; COFFEY, A.; MCAULIFFE; ROSS, R.P. **Phage and their lysins as biocontrol agents for food safety.** Annual Review of Food Science and Technology, 1:449–68, 2010.
- COLVILLE, T.; BASSERT, J.M. **Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária.** São Paulo – SP: Elsevier, 2010. 543 p.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária.** 2014. Disponível em: <http://goo.gl/2QTV8y>. Acessado em 28/07/2015.
- CONLON, M.A.; BIRD, A.R. **The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health.** Nutrients, 7:17-44, 2015.
- CORTTERILL, O.J.; GLAUERT J. **Thermal resistance of Salmonellae in egg yolk containing 10 percent sugar or salt after storage at various temperatures.** Poultry Science, 50(1):109-15, 1971.
- CURTIS N; HAEUSLER G.M. Non-typhoidal Salmonella in Children: Microbiology, Epidemiology and Treatment. In: CURTIS N; FINN, A.; POLLARD, A. **Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX.** Advances in Experimental Medicine and Biology. New York – NY: Springer Science + Business. 2013. 252 p.
- DEB, M.; KAPOOR, L. **Salmonella nomenclature seen in the literature.** Indian Journal of Medical Microbiology, 23:204-205, 2005.
- DeWINTER, L.M.; ROSS, W.H.; COUTURE, H.; FARBER, J.F. **Risk Assessment of Shell Eggs Internally Contaminated with Salmonella Enteritidis.** International Food Risk Analysis Journal, 1(1): 40-81, 2011.
- DY, R.L.; RICHTER, C.; SALMOND, G.P.C.; FINERAN, P.C. **Remarkable mechanisms in the microbes to resist phage infection.** Annual Review of Virology, 1:307–31, 2014.
- ECDC/EFSA/EMA. European Centre for Disease Prevention and Control; European Food Safety Authority; European Medicines Agency. **ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals.** Stockholm/Parma/London: ECDC/EFSA/EMA, 2015. EFSA Journal, 13(1):4006, 2015. 114 p.
- EFSA. European Food Safety Authority. **Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis infections associated with consumption of eggs from Germany.** 2014b. Disponível em: <http://goo.gl/msXbeM>. Acessado em 02/08/2015.
- EFSA. European Food Safety Authority. **Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens.** EFSA Journal, 12(7):3782, 2014a.
- EFSA. European Food Safety Authority. **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013.** EFSA Journal, 13(1):3991, 2015.

- ENDERSEN, L.; O'MAHONY, J.; HILL, C.; ROOS, R.P.; MCAULIFFE, O.; COFFEY, A. **Phage Therapy in the Food Industry**. Annual Review of Food Science and Technology, 5:327-49, 2014.
- EVANGELOPOULOU, G.; KRITAS, S.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; BURRIEL, A.R. **The commercial impact of pig Salmonella spp. infections in border-free markets during an economic recession**. Veterinary World, 8(3):257-272, 2015.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food Outlook – Biannual report on global food market**. 2015. Disponível em: <http://goo.gl/Tmhkaz>. Acessado em 03/08/2015.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Manual on meat cold store operation and management**. FAO, 1991. Disponível em <http://goo.gl/U4WacF>. Acessado em: 17/07/2015
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of United Nations – Statistics Division. **Browse data – Production and Consumption**. Disponível em <http://goo.gl/n1iRzl>. Acessado em: 04/07/2015.
- FDA. Food and Drug Administration. **Are you storing food safely?** Consumer Health Information. 2014. Disponível em: <http://goo.gl/t6Ulql>. Acessado em: 04/07/2015
- FINSTAD, S.; O'BRYAN, C.A.; MARCY, J.A.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. **Salmonella and broiler processing in the United States: relationship to foodborne salmonellosis**. Food Research International, 45:789–794, 2012.
- FOLEY, S.L.; JOHNSON, T.J.; RICKE, S.C.; NAYAK, R.; DANZELSEN, J. **Salmonella pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 77:582–607, 2013.
- FRESE, S.A.; PARKER, K.; CALVERT, C.C.; MILLS, D.A. **Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning**. Microbiome, 3:28, 2015.
- FURLAN, R.L. Anatomia - Fisiologia In: BERCHIERI, A.Jr.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2009. 800 p.
- GALARCE, N.E.; BRAVO, J.L.; ROBESON, J.P.; BORIE, C.F. **Bacteriophage cocktail reduces Salmonella enterica serovar Enteritidis counts in raw and smoked salmon tissues**. Revista Argentina de Microbiología, 46(4):333-337, 2014.
- GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T.J. **Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis**. FEMS Microbiology Review, 33(4):718-38, 2009.
- GARCIA, P.; MARTINEZ, B.; OBESO, J.M.; RODRIGUEZ, A. **Bacteriophages and their application in food safety**. Letters in Applied Microbiology, 47:479–485, 2008.
- GARRIDO, V.; SANCHEZ, S.; ROMAN, B.S.; ZABALZA-BARANGUA, A.; DIAZ-TENDERO, Y.; FRUTOS, C.; MAINAR-JAIME, R.C.; GRILLO, M.J. **Simultaneous infections by different Salmonella strains in mesenteric lymph nodes of finishing pigs**. BMC Veterinary Research, 10: 59, 2014.

- GAST, R.K.; HOLT, P.S. **Assessing the Frequency and Consequences of Salmonella Enteritidis Deposition on the Egg Yolk Membrane.** Poultry Science 80:997–1002, 2001.
- GAST, R.K.; GUARD-PETTER, J.; HOLT PETER, S. **Effect of Prior Serial In Vivo Passage on the Frequency of Salmonella enteritidis Contamination in Eggs from Experimentally Infected Laying Hens.** Avian Diseases, 47(3):633-639, 2003.
- GAST, R.L.; GURAYA, R.; GUARD-PETTER, J.; HOLT PETER, S. **Frequency and Magnitude of Internal Organ Colonization Following Exposure of Laying Hens to Different Oral Doses of Salmonella Enteritidis.** International Journal of Poultry Science, 10(4):325-331, 2011.
- GAST, R.K.; GURAYA, R. **Continuing multiplication of Salmonella Enteritidis strains in egg yolk during refrigeration at 7.2 °C.** International Journal of Poultry Science, 12(11):622-627, 2013.
- GOLE, V.C.; ROBERTS, J.R.; SEXTON, M.; MAY, D.; KIERMEIRER, A.; CHOUSALKAR, K.K. **Effect of egg washing and correlation between cuticle and egg penetration by various Salmonella strains.** International Journal of Food Microbiology, 182–183:18–25, 2014a.
- GOLE, V.C.; ROBERTS, J.R.; SEXTON, M.; MAY, D.; KIERMEIRER, A.; CHOUSALKAR, K.K. **Effect of Egg Washing and Correlation between Eggshell Characteristics and Egg Penetration by Various Salmonella Typhimurium Strains.** PLoS ONE 9(3): e90987, 2014b.
- GOLKAR, Z.; BAGASRA, O.; PACE, D.G. **Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis.** The Journal of Infection in Developing Countries, 8(2):129-136, 2014.
- GOODRIDGE, L.D.; BISHA, B. **Phage based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods.** Bacteriophages, 1(3):130-7, 2011.
- GORMLEY, F.J.; LITTLE, C.L.; MURPHY, N.; PINNA, D.E.; MCLAUCHIN, J. **Pooling raw shell eggs: Salmonella contamination and high risk practices in the United Kingdom food service sector.** Journal of Food Protection, 73(3):574-8, 2010.
- GÓRSKI, A.; WAZNA, E.; DABROWSKA, B.W.; DABROWSKA, K.; SWITAŁA-JELEŃ, K.; MIEDZYBRODZKI, R. **Bacteriophage translocation.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, 46(3):313-9, 2006.
- GOUVEIA, D.M.; MENDONÇA, R.C.S.; SOTO, M.L.; CRUZ, R.S. **Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging.** LWT - Food Science and Technology, 63(1):85-91, 2015.
- GRAY, J.T.; FEDORKA-CRAY, P.J. **Salmonella.** Em: CLIVER, D.O.; RIEMANN, H.P. Foodborne diseases, San Diego. Academic Press, 2002
- GREENWOOD, D.; BARER, M.; SLACK, R.; IRVING, W. **Medical Microbiology - A guide to microbial infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control.** New York – NY: Elsevier, 2012. 752 p. ISBN: 978-0-443-10209-7

- GROSS, S.; JOHNE, A.; ADOLPHS, J.; SCHLICHTING, D.; STIGEL, K. **Salmonella in table eggs from farm to retail – When is cooling required?** Food Control, 47: 254-263, 2015.
- GUENTHER, S.; HERZIG, O.; FIESELER, L.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M. **Biocontrol of Salmonella Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2.** International Journal of Food Microbiology, 154:66–72, 2012.
- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. **Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** Química Nova, 33(3):667-679, 2010.
- HAFEZ, H.M. Salmonella infections in turkey. In: BARROW, P.A.; METHNER, U. **Salmonella in domestic animals.** Wallingford: CABI Publishing, 2013.
- HAGARA, A.; OHLSON, M.B.; MILLER, S.I. **Salmonella interplay with host cells.** Nature Reviews Microbiology, 6:54-66, 2008.
- HAMMACK, T. Salmonella species. In: **Bad Bug Book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook.** FDA, 2012. 463 p.
- HARDY, H.; HARRIS, J.; LYON, E.; BEAL, J.; FOEY, A. **Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal.** Nutrients, 5:1869-1912, 2013.
- HARGREAVES, K.R.; KROPINSKI, A.M.; CLOKIE M.R.J. **Bacteriophage behavioral ecology.** Bacteriophage, 4: e29866. 2014.
- HEINRICH BÖLL FOUNDATION. **Meat Atlas.** Berlin, Germany. Friends of Earth Europe, 2014. Disponível em: <https://goo.gl/gWJHkv>. Acessado em: 12/07/2015.
- HENDRIX, R.W. Bacteriophages. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology.** Philadelphia – PA: Lippincott Williams e Wilkins, 2013. 2664 p.
- HERING S.D.; KIM J.; JIANG X.; DOYLE M.P.; ERICKSON, M.C. **Use of a mixture of bacteriophages for biological control of Salmonella Enterica strains in compost.** Applied and environmental microbiology, 76(15):5327-5332, 2010.
- HILL, D.A.; HOFFMANN, C.; ABT, M.C.; DU, Y.; KOBULEY, D.; KIRN, T.J. **Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis.** Mucosal Immunology, 3:148–158, 2010.
- HIPPER, K.; EHRLEIN, H.J. **Motility of the large intestine and flow of digesta in pigs.** Research in Veterinary Science, 71:93-100, 2001.
- HOOTON, S.P.T.; TIMMS, A.R.; ROWSELL, J.; WILSON, R.; CONNERTON, I.F. **Salmonella Typhimurium-specific bacteriophage FSH19 and the origins of species specificity in the Vi01-like phage family.** Virology Journal, 8:498, 2011.
- HORNE, P.L.M. **Competitiveness of the EU egg sector - International comparison base year 2013.** Wageningen, LEI Wageningen UR. 2014. 36 p.
- HOWARD, Z.R.; MOORE, R.W.; ZABALA-DIAZ, I.B.; LANDERS, K.L.; BYRD, J.A.; KUBENA, L.F.; NISBET, D.J.; BIRKHOOD, S.G.; RICKE, S.C. **Ovarian laying hen follicular maturation and in vitro Salmonella internalization.** Veterinary Microbiology, 108: 95–100, 2005.

HOWARD, Z.R.; O'BRYAN, C.A.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. **Salmonella Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control**. Food Research International 45:755–764, 2012.

HUGAS, M.; BELOEIL, P.A. **Controlling Salmonella along the food chain in the European Union - progress over the last ten years**. Euro Surveillance, 19(19):20804, 2014.

HUNGARO, H.M.; LOPEZ, M.E.S.; ALBINO, L.A.A.; MENDONÇA, R.C.S.; Bacteriophage: The Viruses Infecting Bacteria and Their Multiple Applications. In: ELIAS S.A. **Reference module in earth systems and environmental sciences**. New York – NY: Elsevier, 2014.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J.H.; **Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: a review**. Food Research International, 45:819–830, 2012.

HY-LINE. **Manual de Manejo: W-36 Poedeiras Comerciais**. Hy-Line Internacional, 2015.

HYMAN, P.; ABEDON, S.T. **Bacteriophages in health and disease**. Cambridge – MA: CAB International, 2012. 296 p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE - Estatística da produção pecuária**. 2015. Disponível em: <http://goo.gl/Fn2MI5>. Acessado em 20/07/2015.

ISMAIL, R.; AVIAT, F.; MICHEL, V.; BAYON, I.L.; GAY-PERRET, P.; KUTNIK, M.; FEDERIGHI, M. **Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: A review of the literature**. International Journal of Environmental Research and Public Health, 10:6169-6183, 2013.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P.I.; WEILL, F.X. **Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme**. Institute Pasteur - Research in Microbiology, 165:526-530, 2014.

JANCZAK, A.M.; RIBER, A.B. **Review of rearing-related factors affecting the welfare of laying hens**. Poultry Science, 00:1–16, 2015.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. New York-NY: Springer Science, 2005. 790 p.

JONES, D.R.; ANDERSON, K.E. **Housing system and laying hen strain impacts on egg microbiology**. Poultry Science, 92(8):2221-5, 2013.

JONES, D.R.; COX, N.A.; GUARD, J.; FEDORKA-CRAY, P.J.; BUHR, R.J.; GAST, R.K.; ABDO, Z.; RIGSBY, L.L.; PLUMBLEE, J.R.; KARCHER, D.M.; ROBISON, C.I.; BLATCHFORD, R.A.; MAKAGON, M.M. **Microbiological impact of three commercial laying hen housing systems**. Poultry Science, 94(3):544-551, 2015.

KARIUKI, S.; GORDON, M.A.; FEASEY, N.; PARRY, C.M. **Antimicrobial resistance and management of invasive Salmonella disease**. Vaccine, 33:S21–S29, 2015.

KAYSER, M.; NITZKO, S.; SPILLER, A. **Analyses of differences in meat consumption patterns**. International Food and Agribusiness Management Review, 16(2):1-14, 2013.

- KIM, H.B.; BOREWICZ, K.; WHITE, B.A.; SINGER, R.S.; SREEVATSAN, S.; TU, Z.J. **Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 109:15485–15490, 2012.
- KINGORI, A.M. **A review of the uses of poultry eggshells and shell membrane.** International Journal of Poultry Science, 10(11):908-912, 2011.
- KUTATELADZE, M.; ADAMIA, R. **Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics.** Trends in Biotechnology, 28: 591–595, 2010.
- LABRIE, S.J.; SAMSON, J.E.; MOINEAU, S. **Bacteriophage resistance mechanisms.** Nature Reviews Microbiology, 8(5):317-27, 2010.
- LELEU, S.; MESSENS, W.; REU, K.D.; PRETER, S.D.; HERMAN, L.; HEYNDRICKX, M.; BAERDEMAEKER, J.D.; MICHELS, C.W. **Effect of Egg Washing on the Cuticle Quality of Brown and White Table Eggs.** Journal of Food Protection, 74(10):1649–1654, 2011.
- LI, M.; MUTHAIYAN, A.; O'BRYAN, C.A.; GUSTAFSON, J.E.; LI, Y.; CRANDALL, P.G. **Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of Staphylococcus aureus.** Current Pharmaceutical Biotechnology, 12: 1240–1254, 2011.
- LOOFT, T.; JOHNSON, T.A.; ALLEN, H.K.; BAYLES, D.O.; ALT, D.P.; STEDTFELD, R.D. **In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 109:1691–1696, 2012.
- LOOFT, T.; ALLEN, H.K.; CANTAREL, B.L.; LEVINE, U.Y.; BAYLES, D.O.; ALT, D.P.; HENRISSAT, B.; STANTON, T.B. **Bacteria, phage and pigs: the effect of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations.** The ISME Journal, 8:1566–1576, 2014.
- LORENZONI, G. **Poultry Diseases Influenced by gastrointestinal health: Traditional treatments and innovation solutions.** Nottingham, Nottingham Press, 2010.
- LUKANOV, H.; ALEXIEVA, D. **Trends in battery cage husbandry systems for laying hens - Enriched cages for housing laying hens.** Agricultural Science and Technology, 5(2):143-152, 2013
- LY-CHATAIN, M.H. **The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy.** Frontier in Microbiology, Article 51, 1-7, 2014.
- MADIGAN M.T; MARTINKO J.M; BENDER K.S; BUCKLEY D.H; STAHL D.A. **Brock biology of microorganisms.** Glenview – IL: Pearson education, 2015. 1041 p.
- MADDADI, M.S.; HASSANZADEH, M.; BOZOGMEHRIFARD, M.; SHOJAEI, H.; YAZDANI, A.; KARIMI, V.; BARIN, A. **Study on Two Inoculation Routs of Salmonella enteritidis in Abilities to Colonize in Internal Organs and to Contaminate of Eggs in Broiler Breeder Hens.** International Journal of Poultry Science, 9(3):254-258, 2010.
- MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S. **J. International collaboration on enteric disease 'burden of illness' studies. The**

**global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis.** *Clinical Infectious Diseases*, 50:882-889, 2010.

MAKA, L.; MACKIW, E.; SCIEZYNSKA, H.; PAWLOWSKA, K.; POPOWSKA, M. **Antimicrobial susceptibility of Salmonella strains isolated from retail meat products in Poland between 2008 and 2012.** *Food Control*, 36:199-204, 2014.

MARON, D.F.; SMITH, T.J.S.; NACHMAN, K.E. **Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey.** *Globalization and Health*, 9:48, 2013.

MARSHALL, B.M.; LEVY, S.B. **Food animals and antimicrobials: Impacts on human health.** *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4):718-733, 2011.

MARTELLI, F.; DAVIES, R.H. **Salmonella serovars isolated from table eggs: An overview.** *Food Research International*, 45:745–754, 2012.

MATHER, A.E.; REID, S.W.J.; MASKELL, D.J.; PARKHILL, J.; FOOKES, M.C.; HARRIS, S.R. **Distinguishable epidemics of multidrug-resistant Salmonella typhimurium DT104 in different hosts.** *Science*, 341:1514–1517, 2013.

McCALLIN, S.; SARKER S.A.; BARRETTO, C.; SULTANA, S.; BERGER, B.; HUQ, S. **Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects.** *Virology*, 443:187–96, 2013.

McGLONE, J.J. **The future of pork production in the world: Towards, sustainable, welfare-positive system.** *Animals*, 3:401-415, 2013.

MEDEIROS, F.M.; ALVES, M.G.M. **Qualidade de ovos comerciais.** *Revista Eletrônica Nutrime*, 1(4):3515-3524, 2014.

MICHALSKI, C. B., R. E. BRACKETT, Y. C. HUNG AND G. O. I. EZEIKE. **Use of capillary tubes and plate heat exchanger to validate USDA pasteurization protocols for elimination of Salmonella Enteritidis from liquid egg products.** *Journal of Food Protection*, 62(2):112-117, 1999.

MIRANDA, J.M.; ANTON, X.; REDONDO-VALBUENA, C.; ROCA-SAAVERA, P.; RODRIGUEZ, J.A.; LAMAS, A.; FRANCO, C.M.; CEPEDA, A. **Egg and egg-derived foods: Effects on human health and use as functional foods.** *Nutrients*, 7:706-729, 2015.

MOLLER, C.O.A.; NAUTA, M.J.; CHRISTENSEN, B.B.; HANSEN, T.B. **Modelling transfer of Salmonella Typhimurium DT104 during simulation of grinding of pork.** *Journal of Applied Microbiology*, 112:90–98, 2011.

MONK, A.B.; REES, C.D.; BARROW, P.; HAGENS, S.; HARPER, D.R. **Bacteriophage applications: where are we now?** *Letters in Applied Microbiology*, 51:363–369, 2010.

MORAES, I.A. **Reprodução nas aves domésticas.** Disponível em: <http://goo.gl/ogfuaj>. Acesso em 03/07/2015.

NAKATSU, C.H.; MARSH, T.L. **Analysis of microbial communities with denaturing gradient gel electrophoresis and terminal restriction fragment length polymorphism.** In: REDDY, C.A.; BEVERIDGE, T.L.; BREZNAK, J.A.; MARZLUF,

G.A.; SCHIMIDT, T.M.; SNYDER, L.R. *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington - D.C.: ASM Press, 2007. 791 p.

NAKATSU, C.H.; TORSVIK, V.; OVREAS, L. **Soil community analysis of 16S rDNA polymerase chain reaction products**. *Soil Science Society of America Journal*, 64:1382-1388, 2000.

NARMS. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria. **Human isolates final report**. 2013. Disponível em: <http://goo.gl/IJEKBJ>. Acessado em 26/07/2015.

NECHVATAL, J.M.; RAM, J.L.; BASSON, M.D.; NAMPRACHAN, P.; NIEC, S.R.; BADSHA, K.Z.; MATHERLY, L.H.; MAJUMDAR, A.P.N.; KATO, I. **Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces**. *Journal of Microbiological Methods*, 72:124-132, 2008.

NEVES, M.M.; HENRY, M. **Gema do ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 36(4):209-214, 2012.

NOBREGA, F.L.; COSTA, A.R.; KLUSKENS, L.D.; AZEREDO, J. **Revisiting phage therapy: new applications for old resources**. *Trends in Microbiology*, 23(4):185-91, 2015.

NORTON, S.; HUHTINEN, E.; CONATY, S.; HOPE, K.; CAMPBELL, B.; TEGEL, M.; BOYD, R.; CULLEN, B. **A large point-source outbreak of Salmonella Typhimurium linked to chicken, pork and salad rolls from a Vietnamese bakery in Sydney**. *Western Pacific Surveillance and Response*, 3(2): 16-23, 2012

NYBERG, L.; TURCO, R.F.; NIES, L. **Assessing the impact of nanomaterials on anaerobic microbial communities**. *Environmental Science e Technology*, 42: 1938-1943, 2008.

OECD-FAO. Organization for Economic Co-operation and Development; Food and Agriculture Organization of the United Nations. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2014**. OECD Publishing, 2014. Disponível em: <https://goo.gl/LoVMc1>. Acessado em: 02/08/2015.

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

O'NEIL, J. **Review on antimicrobial resistance. antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations**. 2014. Disponível em: <http://goo.gl/OeCt5f>. Acessado em 25/07/2015.

PAEPE, M.D.; LECLERC, M.; TINSLEY, C.R.; PETIT, M.A. **Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health?** *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*, Review Article, Volume 4, article 39, 2014.

PAINTER, J.A.; HOEKSTRA, R.M.; AYERS, T.; TAUXE, R.V.; BRADEN, C.R.; ÂNGULO, F.J.; GRIFFIN, P.M. **Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998-2008**. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 2013.

- PANDE, V.V.; GOLE, V.C.; MCWHORTER, A.R.; ABRAHAM, S.; CHIUSALKAR, K.K. **Antimicrobial resistance of non-typhoidal Salmonella isolates from egg layer flocks and egg shells**. International Journal of Food Microbiology, 203:23–26, 2015.
- PARLIAMENTARY ASSEMBLY. **Phage therapy, a public health issue – Motion for a resolution**. Council of Europe, 2014. Disponível em: <http://goo.gl/T6L77D>. Acessado em: 02/08/2015.
- PAS. Programa Alimento Seguro. Consumidor. **Cartilha do Consumidor para uma Alimentação Segura**. Brasília: SENAI/DN, 2007.
- PASQUALI, F.; KLEIN G.; REICH, F.; MANFREDA G.; VALERO A. **Modelling survival behaviour of Salmonella enterica ser. Enteritidis, Typhimurium and Tennessee on table eggs during storage at different temperatures**. Food Control 59:314-319, 2016.
- PHOENIX, D.A.; HARRIS, F.; DENNISON, S.R. **Novel antimicrobial agents and strategies**. Weinheim, Germany: Wiley, 2014. 440 p. ISBN<sup>10</sup>: 3527336389
- PORWOLLIK, S. **Salmonella: From Genome to Function**. NORFOLK – UK: CAISTER ACADEMIC PRESS, 2011. 313 P. ISBN: 978<sup>1</sup>-904455-73-8
- PUI, C.F.; WONG, W.C.; CHAI, L.C.; TUNUNG, R.; JEYALETCHUMI, P.; NOOR HIDAYAH, M.S. **Salmonella: a foodborne pathogen**. International Food Research Journal, 18:465–473, 2011.
- RAGHIANTE, F.; ROCHA, T.T.; ROSSI, D.A.; SILVA, P.L. **Penetration Time of Salmonella Heidelberg Through Shells of White and Brown Commercial Eggs**. Brazilian Journal of Poultry Science, 12(4):273-277, 2010.
- RAJESH, M.; HIRVI, Y.; HILL, A.; GRIFFITHS, M.W. **Effect of phage on survival of Salmonella Enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk**. Journal of Food Protection, 64(7):927-33, 2001.
- RASTALL, R.A.; GIBSON, G.R. **Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health**. Current Opinion in Biotechnology, 32:42–46, 2015.
- REFARDT, D. **Within-host competition determines reproductive success of temperate bacteriophages**. The ISME Journal, 5:1451–1460, 2011.
- REHAULT-GODBERT, S.; HERVE-GREPINET, V.; GAUTRON, J.; CABAU, C.; NYS, Y.; HINCKE, M. **Molecules involved in chemical defence of the chicken egg**. Improving the safety and quality of eggs and egg products. Elsevier, New York – NY, 1:183-208, 2011.
- RÉHAULT-GODBERT, S.; LABAS, V.; HELLOIN, E.; HERVÉ-GRÉPINET, V.; SLUGOCKI, C.; BERGES, M. **Ovalbumin-related protein X is a heparin-binding overpin exhibiting antimicrobial activities**. Journal of Biology and Chemistry, 288:17285-17295, 2013.
- REIS R.S. e HORN F. **Enteropathogenic Escherichia coli, Samonella, Shigella and Yersinia: cellular aspects of host bacteria interactions in enteric diseases**. Gut Pathogens, 2(8):1-12, 2010.

RICKE, S.C.; VAN LOO, E.J.; JOHNSON, M.G.; O'BRYAN, C.A. **Organic meat production and processing**. New York – NY: Wiley Scientific/IFT. 2012. ISBN: 978-0-8138-2126-9

ROBERSON, J.; VALENCIA, M.; RETAMALES, J.; BORIE, C. **Stability inside hen eggs of a Salmonella Enterica serovar**. Electronic Journal of Biotechnology, 14(4): 0717-3458, 2011 .

RODRIGUEZ-NAVARRO, A.B.; DOMINGUEZ-GASCA, N.; MUNOZ, ORTEGA-HUERTAS, A. **Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness**. Poultry Science, 92:3026–3035, 2013.

ROSE-MARTEL, M.; HINCKE M. **Eggshell as a Source of Novel Bioactive Molecules**. Journal of Food Science and Engineering, 3: 219-225, 2013.

ROSSI, M.; NYS, Y.; ANTON, M.; BAIN, M.; KETELAERE, B.D.; REU, K.D; DUNN, I.; GAUTRON, J.; HAMMERSHOJ, M.; HIDALGO, A.; MELUZZI, A.; MERTENS, K.; NAU, F.; SIRRI, F. **Developments in understanding and assessment of egg and egg product quality over the last century**. World's Poultry Science Association, 69:414-429, 2013.

ROSTAGNO, M.H.; CALLAWAY, T.R. **Pre-harvest risk factors for Salmonella enterica in pork production**. Food Research International, 45:634–640, 2012.

ROSTAGNO, M.H.; EICHER, S.D.; LAY, D.C.Jr. **Immunological, physiological, and behavioral effects of Salmonella enterica carriage and shedding in experimentally infected finishing pigs**. Foodborne Pathogens and Disease, 8(5):623-30, 2011.

RUXTON, C.H.S.; DERBYSHIRE, E.; GIBSON, S. **The nutritional properties and health benefits of eggs**. Nutrition e Food Science, 40(3):263-279, 2010.

RYAN, E.M.; GORMAN, S.P.; DONNELLY, R.F.; GILMORE, B.F. **Recent advances in bacteriophage therapy: How delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy**. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 63: 1253–1264, 2011.

SAMLI, H.E.; AGMA, A.; SENKOYLU, N. **Effects of Storage Time and Temperature on Egg Quality in Old Laying Hens**. Journal Applied Poultry Research, 14:548-553, 2005.

SANDERSON, K.E.; NAIR, S. Taxonomy and Species Concepts in the genus Salmonella. In: BARROW, P.A.; METHNER, U. **Salmonella in domestic animals**. Wallingford: CABI Publishing, 2013. 463 p. ISBN: 9781845939021

SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A.C.M.; XAVIER, H.T.; MAGNONI, C.D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A.M. I **Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 100(1Supl.3):1-40, 2013.

SANTOS, B.M. Fisiopatologia do Sistema Genitourinario In: BERCHERI, A.Jr.; SILVA, E.N.; FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das Aves**. Campinas: Facta, 2009. ISBN<sup>13</sup>: 978-85-352-7470-7

- SARKER, S.A.; McCALLIN, S.; BARRETTO, C.; BERGER, B.; PITTET, A.C.; SULTANA, S. **Oral T4-like phage cocktail application to ealthy adult volunteers from Bangladesh.** *Virology*, 434:222–32, 2012.
- SCHOENNI, J.L.; GLASS, K.A.; McDEMOTT, J.L.; WONG, A.C.L. **Growth and penetration of Salmonella Enteritidis, Salmonella Heidelberg and Salmonella Typhimurium in eggs.** *International Journal of Food Microbiology*, 24:385-396, 1995.
- SCHOKKER, D.; ZHANG, J.; VASTENHOEW, S.A.; HEILIG, H.G.H.J.; SMIDT, H.; REBEL, J.M.J.; SMITS, M.A. **Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs.** *PLoS ONE*, 10(2):e0116523, 2015.
- SCHNEIDER, W.J. **Receptor-mediated mechanisms in ovarian follicle and oocyte development.** *General and Comparative Endocrinology*, 163:18-23, 2009
- SCHULTE-DRÜGGELTE, R.; SVENSSON, S. **Hatchery management guide.** Lohmann Tierzucht, 2011.
- SCUPHAM, A.J.; JONES, J.A.; WESLEY, I.V. **Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota.** *Journal of Applied Microbiology*, 102(2):401-409, 2007.
- SERKAYA, A.; EYRAUD, J.; BIRKENBACH, A.; FRANZ, C.; ACKERLEY, N. **Analytical framework for examining the value of antibacterial products.** US Department of Health and Human Services, 2014. Disponível em: <http://goo.gl/tjAOMa>. Acessado em 22/07/2015.
- SHIN, J.Y.; XUN, P.; NAKAMURA, Y.; HE, K. **Egg consumption in relation to risk of cardiovascular disease and diabetes: a systematic review and meta-analysis.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(1):146-159, 2013.
- SERWER, P.; WRIGHT, E.T.; CHANG, J.T.; LUI, X. **Enhancing and initiating phage-based therapies.** *Bacteriophage*, 4: e961869, 2014.
- SHIVAPRASAD, H.L.; METHNER, U.; BARROW, P.A. *Salmonella infections in the domestic fowl.* In: BARROW, P.A.; METHNER, U. **Salmonella in domestic animals.** Wallingford: CABI Publishing, 2013. ISBN 0851992617
- SMID, J.H.; HOEK, A.H.A.M.; AARTS, H.J.M.; HAVELAAR, A.H.; HERES, A.H.; JONGE, R.; PIELAAT, A. **Quantifying the sources of Salmonella on dressed carcasses of pigs based on serovar distribution.** *Meat Science*, 96:1425-1431, 2014.
- SNOW, L.C.; DAVIES, R.H.; CHRISTIANSEN, K.H.; CARRIQUE-MAS, J.J.; WALES, A.D.; O'CONNOR, J.L.; COOK, A.J.C.; EVANS, S.J. **Survey of the prevalence of Salmonella species on commercial laying farms in the United Kingdom.** *Veterinary Record*, 161:471-476, 2007.
- SOK, K.M.; SCHEIDELER, S.E. **Egg Cleaning Procedures for the backyard flock.** *Poultry Management.* University of Nebraska, G1724. 2007
- SPADA, F.P.; GUTIERREZ, E.M.R.; SOUZA, M.C.; BRAZACA, S.G.C.; LEMES, D.E.A.; FISCHER, F.S.; COELHO, A.A.D.; SAVINO, V.J.M. **Viscosity of egg white**

**from hens of different strains fed with commercial and natural additives.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, 32(1): 47-51, 2012.

SPELLBERG, B.; GUIDOS, R.; GILBERT, D.; BRADLEY; BOUCHER, H.W.; SCHELD, W.M.; BARTLETT, J.G.; EDWARDS, J.Jr. **The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the infectious diseases society of America.** *Clinical Infectious Diseases*, 46:155–64, 2008.

SPRICIGO, D.A.; BARDINA, C.; CORTES, P.; LLAGOSTERA, M. **Use of a bacteriophage cocktail to control Salmonella in food and the food industry.** *International Journal of Food Microbiology*, 165:169–174, 2013.

STEED, H.; MACFARLANE, S. Mechanisms of Prebiotic Impact on Health. In: **Prebiotics and Probiotics Science and Technology.** New York – NY: Springer Science, 1:135-144, 2009.

STEVENS, M.P.; GRAY, J.T. Salmonella infections in Pigs. In: BARROW, P.A.; METHNER, U. **Salmonella in domestic animals.** Wallingford: CABI Publishing, 2013. ISBN-13: 978-1845939021

SU, L.H.; WU, T.L.; CHIU, C.H. **Development of carbapenem resistance during therapy for non-typhoid Salmonella infection.** *Clinical Microbiology and Infection*, 18(4): 91-4, 2012.

SUKUMARAN, A.T.; NANNAPANENI, R.; KIESS, A.; SHARMA, C.S. **Reduction of Salmonella on chicken meat and chicken skin by combined or sequential application of lytic bacteriophage with chemical antimicrobials.** *International Journal of Food Microbiology*, 207:8–15, 2015.

SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophage: A new journal for the most ubiquitous organisms on Earth.** *Bacteriophage*,1:1-2, 2011b.

SULAKVELIDZE, A. **The Challenges of Bacteriophage Therapy.** *European Industrial Pharmacy*, 14:1-5, 2011a.

SVARA, F.; RANKIN, D.J. **The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance.** *BMC Evolutionary Biology*,11:130, 2011.

SWIATKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WLOSEK, A.; KRAWCZYK, J.; PUCHALA, M.; JÓZEFIAK, D. **Effects on performance and eggshell quality of particle size of calcium sources in laying hens' diets with different Ca concentrations.** *Archives Animal Breeding*, 58: 301–307, 2015.

SWITT, A.I.M.; SULAKVELIDZE, A.; WIEDMANN, M.; KROPINSKI, A.M.; WISHART, D.S.; POPPE, C.; LIANG, Y. **Salmonella phage and prophages: genomics, taxonomy, and applied aspects.** In: SCHATTEN, H.; EISENSTARK, A. *Salmonella Methods and Protocols.* New York – NY: Springer Protocols - Springer, 2015.

TAYLOR, M.W. **Viruses and man: A history of interactions.** Springer International Publishing Switzerland, 2014. ISBN: 978-3-319-07757-4

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology: an introduction.** New York – NY: Pearson Education, 2013. ISBN-13: 978-0321796677

TPCT. The Pew Charitable Trusts. **Tracking the pipeline of antibiotics in development.** 2015. Disponível em: <http://goo.gl/H6BsSj>. Acessado em: 16/09/2015.

TPS. The Poultry Site. **Global poultry trends - Egg consumption continues to grow in Americas**. Article 3395. 2015. Disponível em: <http://goo.gl/xVJiJq>. Acesso em 06/07/2015.

TSONOS, J.; VANDENHEUVEL, D.; BRIERS, Y.; DE GREVE, H.; HERNALSTEENS, J.P.; LAVIGNE, R. **Hurdles in bacteriophage therapy: deconstructing the parameters**. Veterinary Microbiology, 171(3-4):460-9, 2014.

TURKI, Y.; OUZARI, H.; MEHRI, I.; AMMAR, A.B.; HASSEN, A. **Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for the biocontrol of Salmonella of wastewater**. Food Research International, 45:1099–1105, 2012.

USDA. United States Department of Agriculture. **MLG 4.08**. Isolation and Identification of Salmonella from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Catfish Products and Carcass and Environmental Sponges. 2014. Disponível em: <http://goo.gl/OaPRaK>. Acessado em 22/11/2015.

USDA. United States Department of Agriculture. **Scientific Report of the 2015 Dietary Guidelines Advisory Committee**. 2015c. Disponível em: <http://goo.gl/7nl3qy>. Acessado em: 14/07/15.

USDA. United States Department of Agriculture. **USDA Agricultural Projections to 2024**. Interagency Agricultural Projection Committee. 2015b. Disponível em: <http://goo.gl/IP83St>. Acessado em 14/07/2015.

USDA. United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. 2015a. Disponível em: <http://goo.gl/C8FQFH>. Acessado em: 15/07/2015.

USDA. United States Department of Agriculture. **Serving it safe**. 2009. Disponível em: <http://goo.gl/CvHmAe>. Acessado em: 16/07/2015.

USDA/FSIS. United States Department of Agriculture; **Food Safety and Inspection Service. Serotypes Profile of Salmonella Isolates from Meat and Poultry Products** - January 1998 through December 2011. 2011. Disponível em: <http://goo.gl/ioRftk>. Acessado em 14/07/2015.

VAN LOO, E.J.; ALALI, W.; RICKE, S.C. **Food safety and organic meats**. Annual Review of Food Science and Technology, 3:205–225, 2012.

VANDAMME, E.J.; MIEDZYPBRODZKI, R. **Phage therapy and phage control to be revisited urgently!** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 89:329–333, 2013.

VERBEKEN, G.; HUYS, I.; PIRNAY, J.P.; JENNES, S.; CHANISHVILI, N.; SCHERES, J.; GORSKI, A.; VOS, D.D.; CEULEMANS, C. **Taking bacteriophage therapy seriously: A moral argument**. Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, Article ID 621316, 2014.

WALDNER, L.L.; MACKENZIE, K.D.; KOSTER, W.; WHITE, A.P. **From exit to entry: Long-term survival and transmission of Salmonella**. Pathogens, 1:128–155, 2012.

WALL S.K.; ZHANG J.; ROSTAGNO, M.H.; EBNER, P.D. **Phage therapy to reduce preprocessing Salmonella infections in market-weight swine**. Applied and environmental microbiology, 76(1): 48-53, 2010.

- WALSH, C.T.; WENCEWICZ, T.A. **Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective.** *The Journal of Antibiotics*, 67:7–22, 2014.
- WELLMAN-LABADIE, O.; LAKSHMINARAYANAN, R.; HINCKE, M.T. **Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins.** *FEBS Letters*, 582:699–704, 2008.
- WHEATLEY, P.; GIOTIS, E.S.; MCKEVITT, A.I. **Effects of slaughtering operations on carcass contamination in an Irish pork production plant.** *Irish Veterinary Journal*, 67:1, 2014.
- WEINBAUER, M.G. **Ecology of prokaryotic virus.** *FEMS Microbiology Reviews*, 28:127–181, 2004.
- WHILEY, H.; ROSS, K. **Salmonella and Eggs: From Production to Plate.** *International Journal of Environmental Research and Health*, 12:2543-2556, 2015.
- WHO. World Health Organization. **World Health Day – 7 April 2011.** 2011. Disponível em <http://goo.gl/9sIDdz>. Acessado em: 21/07/2015.
- WHO. World Health Organization. **Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance.** WHO Library Cataloguing in Publication Data, 2015. Disponível em: <http://goo.gl/D2fRCN>. Acessado em 21/07/2015.
- WILHELM, B.; RAJIC, A.; GREIG, J.D.; WANDDELL, L.; HARRIS, J. **The effect of hazard analysis critical control point programs on microbial contamination of carcasses in abattoirs: a systematic review of published data.** *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(9):949-60, 2011.
- WITTEBOLE, X.; ROOCK, S.D.; OPAL, S.M. **A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens.** *Virulence*, 5(1):226–235, 2014.
- WONG, C.L.; SIEO, C.C.; TAN, W.S.; ABDULLAH, N.; HAIR-BEJO, M.; ABU, J.; HO, Y.W. **Evaluation of a lytic bacteriophage,  $\Phi$  st1, for biocontrol of Salmonella enterica serovar Typhimurium in chickens.** *International Journal of Food Microbiology*, 172:92–101, 2014.
- WOOLSTON, J.; PARKS, A.R.; ABULADZE, T.; ANDERSON, B.; LI, M.; CARTER, C.; HANNA, L.F.; HEYSE, S.; CHARBONNEAU, D.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages lytic for Salmonella rapidly reduce Salmonella contamination on glass and stainless steel surfaces.** *Bacteriophage*, 3(3):e25697, 2013.
- WU, H.J.; WU, E. **The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity.** *Gut Microbes*, 3(1):4–14, 2012.
- ZHAO, P.Y.; BAEK, H.Y.; KIM, I.H. **Effects of bacteriophage supplementation on egg performance, egg quality, excreta microflora, and moisture content in laying hens.** *Asian-Australia Journal of Animal Science*, 25(7):2015-1020, 2012.
- ZHENG, X.; O'CONNOR, J.; HUCHZERMAYER, F.; WANG, X.; WANG, X.; WANG, Y.; WANG, M.; ZHONGHE, Z. **Preservation of ovarian follicles reveals early evolution of avian reproductive behavior.** *Nature*, 495:507-513, 2013.

ZINNO, P.; DEVIRGILIIS, C.; ERCOLINI, D.; ONGENG, D.; MAURIELLO, G. **Bacteriophage P22 to challenge Salmonella in foods**. *International Journal of Food Microbiology*, 191:69–74, 2014.