

ALEJANDRO AYALA TABARES

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E USO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS
NO BIOCONTROLE DE *Campylobacter jejuni***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

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

T

A973i
2016 Ayala Tabares, Alejandro, 1982-
Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos líticos no
biocontrole de *Campylobacter jejuni* / Alejandro Ayala Tabares.
– Viçosa, MG, 2016.
xv, 69f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Regina Célia Santos Mendonça.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Frango de corte. 2. *Campylobacter jejuni*.
3. Bacteriófagos. 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. 636.5082

ALEJANDRO AYALA TABARES


**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E USO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS
NO BIOCONTROLE DE *Campylobacter jejuni***


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

APROVADA: 19 de dezembro de 2016.


Márcia Maria de Carvalho


Wilmer Edgard Luera Peña


José Antonio Marques Pereira
(Coorientador)


Regina Célia Santos Mendonça
(Orientadora)

A Deus todo poderoso, meus pais,
meu irmão e minha namorada.

DEDICO.

“La injusticia es humana pero más humana es la lucha contra la injusticia”

Bertolt Brecht.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus Todo Poderoso, de quem vem toda a força necessária para alcançar nossos objetivos durante nossa existência.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade da realização deste curso.

A meus pais, Luz Elena Tabares G., José Jaime Sanchez P., e ao meu irmão Moises Camilo Sanchez Tabares, por todo o amor, paciência e dedicação.

A meu amigo Alberto Ayala, livre como a palavra liberdade.

À professora Regina Célia Santos Mendonça, por me abrir as portas que conduzem ao mundo da ciência; pela amizade, compreensão, confiança e orientação.

Aos professores Luiz Fernando Teixeira Albino, e José Antonio Marques Pereira, pela dedicação, disposição e orientação deste trabalho.

Aos professores Monique Renon Eller, Wilmer Edgard Luera Peña e Márcia Maria de Carvalho, pelas sugestões durante a revisão deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), em especial ao Nélio Souza, Arthur Sodré, Rodrigo Cardoso, Luiz Augusto Albino, Angélica Batalha e Luana Souza, pela amizade e apoio durante os experimentos.

De maneira muito especial a Yenny Isabel Fonseca R., pela sua compreensão e apoio para que eu pudesse oferecer o melhor neste trabalho.

Aos professores Maria Cristina Dantas Vanetti, Phillippa Connerton, Eber Antônio Alves Medeiros e Humberto Moreira Húngaro, pela assistência e apoio.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo estímulo constante.

Aos amigos, colegas e funcionários do Departamento de Zootecnia, em especial a Germán Ramírez e Mauricio Miguel e os amigos de outras áreas Sergio Castro e Leonardo Tellez pelo apoio e amizade.

À Fundação Oswaldo Cruz, pela doação dos micro-organismos utilizados nesta pesquisa.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise, em especial a Karla Veloso Gonçalves Ribeiro, pela colaboração e sua grande disponibilidade.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
CAPITULO I.....	4
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1.1. Produção de carne de frango.....	4
1.2. <i>Campylobacter</i> spp.....	4
1.2.1. <i>Campylobacter</i> na cadeia produtiva de carne de ave.....	5
1.3. Campilobacteriose em humanos.....	6
1.4. <i>Campylobacter</i> , resistência a antibióticos e antimicrobianos.....	7
1.4.1. Enrofloxacina.....	8
1.5. Bacteriófagos.....	9
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
CAPÍTULO II: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE BACTERIÓFAGOS PARA <i>Campylobacter jejuni</i> A PARTIR DE FEZES DE FRANGO.....	16
RESUMO.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1. Obtenção dos bacteriófagos.....	19
2.1.1. Coleta de amostras de fezes de frango.....	19
2.1.2. Isolamento dos bacteriófagos.....	19
2.1.3. Purificação dos bacteriófagos.....	20
2.1.4. Propagação e titulação dos bacteriófagos.....	21
2.2. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos.....	21
2.3. Concentração dos bacteriófagos.....	22
2.4. Exame da morfologia dos bacteriófagos.....	22

2.5.	Avaliação da viabilidade dos bacteriófagos.....	23
2.5.1.	Avaliação da viabilidade dos bacteriófagos após exposição a diferentes valores de pH.....	23
2.5.2	Avaliação da viabilidade dos bacteriófagos após exposição a diferentes concentrações de sais biliares.....	24
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1.	Isolamento, purificação e propagação de bacteriófagos.....	25
3.2.	Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados.....	25
3.3.	Análise da morfologia dos bacteriófagos.....	26
3.4.	Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade do coquetel de bacteriófagos, expostos a diferentes valores de pH.....	29
3.5.	Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade do coquetel de bacteriófagos, expostos a diferentes concentrações de sais biliares.....	31
4.	CONCLUSÃO.....	33
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
	CAPÍTULO III: BIOCONTROLE DE <i>Campylobacter jejuni</i> EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.....	37
	RESUMO.....	37
1.	INTRODUÇÃO.....	39
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1.	Biossegurança e biossegurança.....	41
2.2.	Alimentação das aves.....	42
2.3.	Recepção e manejo dos pintinhos.....	42
2.4.	Transferência dos frangos para as gaiolas metabólicas.....	42
2.5.	Preparo da suspensão dos micro-organismos.....	43
2.6.	Propagação e titulação do coquetel de bacteriófagos.....	43
2.7.	Delineamento experimental.....	44
2.8.	Coleta de amostras e abate dos animais.....	47
2.8.1	Coleta de amostras para análise microbiológica.....	47
2.9.	Métodos de análise microbiológica.....	48
2.9.1.	Frangos livres de <i>C. jejuni</i>	48
2.9.2.	Contagem de <i>C. jejuni</i>	48
2.9.3.	Determinação de presença ou ausência de bacteriófagos nos tecidos.....	49
2.10.	Análise estatística.....	49
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50

3.1. Análises microbiológicas de amostras de fezes.....	52
3.2. Análise microbiológica de amostras do ceco.....	59
3.3. Análise de presença ou ausência de bacteriófagos nas amostras dos órgãos.....	62
4. CONCLUSÕES.....	64
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	65
6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS.....	69

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1.	Câmara de anaerobiose (Thermo, 1025) para ativação das cepas de <i>C. jejuni</i> e isolamento dos bacteriófagos.....	20
Figura 2.	Lises do bacteriófago BC14 em <i>C. jejuni</i> B12013.....	26
Figura 3.	Fotomicrográfica do bacteriófago BC7 e BC14 por MET.....	27

CAPÍTULO III

Figura 1.	Recepção de pintinhos com 1 dia de idade.....	42
Figura 2.	Fluxograma da distribuição dos ensaios para a avaliação o controle de <i>C. jejuni</i> (IOC/ATCC 33560) e <i>C. jejuni</i> (B12013) em frangos de corte.....	44
Figura 3.	Fluxograma do cronograma para o controle de <i>C. jejuni</i> (IOC/ATCC 33560) e <i>C. jejuni</i> (B12013) em frangos de corte.....	45
Figura 4.	Inoculação do coquetel de bacteriófagos à concentração de 10^8 UFP·mL ⁻¹	46
Figura 5.	Coleta de amostras para análises microbiológicas.....	47
Figura 6.	Coleta das amostras de fezes para contagem de <i>C. jejuni</i> com presença de sangue e mucosa nas fezes das aves.....	50
Figura 7.	Intestino com colapso da parede intestinal e presença de petéquias.....	51
Figura 8.	Fígado com presença de necroses distal.....	51
Figura 9.	Contagem de <i>C. jejuni</i> (B12013) em fezes de frango submetidos a diferentes tratamentos.....	54
Figura 10.	Contagem de <i>C. jejuni</i> (IOC/ATCC 33560) em fezes submetidos a diferentes tratamentos.....	57
Figura 11.	Média da contagem de <i>C. jejuni</i> (B12013) em ceco de frango submetidos a diferentes tratamentos.....	59
Figura 12.	Contagem de <i>C. jejuni</i> (IOC/ATCC 33560) em fezes submetidos a diferentes tratamentos.....	60

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1.	Bactérias utilizadas na avaliação do espectro lítico.....	21
Quadro 2.	Média de medições das estruturas dos bacteriófagos BC7 e BC14.....	28

CAPÍTULO II

Quadro 1.	Médias de contagem de <i>C. jejuni</i> (B12013) em fezes no 42° dia.....	55
Quadro 2.	Médias de contagem de <i>C. jejuni</i> (IOC/ATCC 33560) em fezes no 42° dia.....	58
Quadro 3.	Médias de contagem de <i>C. jejuni</i> (B12013) em ceco no 42° dia.....	60
Quadro 4.	Médias de contagem de <i>C. jejuni</i> (IOC/ATCC 33560) em ceco no 42° dia.....	61
Quadro 5.	Avaliação da translocação dos bacteriófagos em fígado e baço.....	62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Viabilidade do coquetel de bacteriófagos expostos a diferentes valores de pH.....	29
Tabela 2.	Viabilidade do coquetel de bacteriófagos expostos a diferentes concentrações de sais biliares.....	31

RESUMO

AYALA TABARES, Alejandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2016. **Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos líticos no biocontrole de *Campylobacter jejuni***. Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Coorientadores: Luiz Fernando Teixeira Albino e José Antonio Marques Pereira.

A carne de frango consiste em uma matriz ideal para a multiplicação de microorganismos, e, portanto, é associada a numerosas infecções em humanos. Entre as bactérias que mais geram infecções intestinais, a partir do consumo de produtos avícolas, encontra-se a espécie *Campylobacter jejuni*. O uso indiscriminado de antibióticos na produção animal, pode contribuir na seleção de bactérias resistentes, que podem ser disseminadas durante a produção ou processamento dos alimentos. Desta forma, são necessárias novas alternativas para o controle desse patógeno, como a utilização de bacteriófagos. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar o efeito de um coquetel de bacteriófagos de forma individual ou associado ao antibiótico enrofloxacina, no controle de *C. jejuni*, em frangos de corte. Foram isolados seis bacteriófagos (BC2, BC7, BC10, BC14, BC18 e BC19) a partir de fezes de frango coletadas em duas granjas avícolas na região de Viçosa, no Estado de Minas Gerais. Os bacteriófagos foram avaliados quanto à especificidade frente a diferentes cepas bacterianas. Cinco bacteriófagos foram específicos para *C. jejuni*, e um (bacteriófago BC14) além de apresentar ação lítica nas cepas de *C. jejuni*, apresentou atividade lítica frente a *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (CDC0111ab). A caracterização morfológica de dois bacteriófagos (BC7 e BC14) por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), evidenciou que os bacteriófagos apresentam cabeça icosaédrica e cauda de tamanho médio, indicando que provavelmente eles são vírus da ordem Caudovirales, família *Myoviridae*, e subfamília *Eucampyvirinae*. O coquetel de bacteriófagos foi afetado maioritariamente quando exposto a pH 2,5 (redução de 6,90) ciclos logarítmicos, e aos sais biliares nas concentrações de (0,3 e 1,0) %, com redução de (0,37 e 0,51) ciclos logarítmicos, respectivamente. Portanto, os animais devem ser previamente tratados com um antiácido como CaCO₃, a fim de manter a viabilidade dos bacteriófagos no trato gastrointestinal das aves.

A sinergia entre os bacteriófagos e a enrofloxacina, levou a redução de 1,08 ciclos logarítmicos de *C. jejuni* (B12313), e 1,48 ciclos logarítmicos de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) nas fezes dos frangos após cinco dias de tratamento. No conteúdo cecal, a redução de *C. jejuni* (B12313) com tratamento de coquetel de bacteriófagos foi de 2,58 ciclos logarítmicos, e o tratamento com o antibiótico foi de 1,67 ciclos logarítmicos. Nos frangos infectados com *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560), a redução foi de 2,42 ciclos logarítmicos com o uso de coquetel de bacteriófagos, e de 2,51 ciclos logarítmicos com o antibiótico enrofloxacina. Os bacteriófagos são apresentados como uma ferramenta útil na redução do patógeno *C. jejuni*, antes e após o abate. Mais investigações devem ser feitas com outros antibióticos, com o objetivo de aumentar o conhecimento de sinergia entre bacteriófagos e antibióticos como terapêutico dentro da granja. Em conteúdo cecal, as análises indicaram atuação mais eficiente do coquetel de bacteriófagos isoladamente. Isso indica que o tratamento com fagos seria eficiente no controle da contaminação da carne durante o abate.

ABSTRACT

AYALA TABARES, Alejandro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. December, 2016. **Isolation, characterization and use of lytic bacteriophages in biocontrol of *Campylobacter jejuni***. Adviser: Regina Célia Santos Mendonça. Co-Advisers: Luiz Fernando Teixeira Albino and José Antonio Marques Pereira.

Poultry meat, consist of an ideal matrix for the multiplication of microorganisms and thus is a source of numerous infections in humans. Among the bacteria, which generates more intestinal infection from the consumption of poultry products, is the species *Campylobacter jejuni*. The indiscriminate use of antibiotics in animal production may contribute to the selection of resistant bacteria, which may be disseminated during food production or processing. Therefore, new alternatives are needed to control this pathogen, such as the use of bacteriophages. The objective of this study was to isolate, characterize and evaluate the effect of a cocktail of bacteriophages individually or associated with the antibiotic enrofloxacin, in the control of *C. jejuni*, in broilers. Six bacteriophages were isolated (BC2, BC7, BC10, BC14, BC18 and BC19) from chicken feces collected from two poultry farms in the region of Viçosa, in the State of Minas Gerais. The bacteriophages were evaluated for specificity against different bacterial strains. The bacteriophage BC14 besides presenting lytic power over the strains of *C. jejuni* presented lithic activity against *Salmonella* Typhimuium (ATCC 14028) and *Escherichia coli* (CDC0111ab). The morphological characterization of two bacteriophages (BC7 e BC14) by transmission electron microscopy (TEM) showed that bacteriophages had icosahedral head and medium-sized tail indicating that they are probably viruses of the order Caudovirales order and *Myoviridae* family. The bacteriophage cocktail was mostly affected when exposed to pH 2.5 (reduction of 6.90) log₁₀ units and bile salt in the concentrations of (0.3 and 1.0) %, with a reduction of (0.37 and 0.51) log₁₀ units respectively. Therefore, animals should be pretreated with an antacid such as CaCO₃, in order to maintain the viability of bacteriophages in the gastrointestinal tract of birds. A synergy was observed between bacteriophage and enrofloxacin with a reduction of 1,08 log₁₀ units of *C.*

jejuni (B12313) and 1.48 log₁₀ units of *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) in the feces of the chickens after five days of treatment. In the cecal content, the reduction of *C. jejuni* (B12313) with treatment of bacteriophage cocktail was 2.58 log₁₀ units, and treatment with the antibiotic was 1.67 log₁₀ units. In chickens infected with *C. jejuni* (IOC / ATCC 33560), the reduction was 2.42 log₁₀ units with the use of bacteriophage cocktail, and 2.51 log₁₀ units with the antibiotic enrofloxacin. Bacteriophages are presented as a useful tool in the reduction of the *C. jejuni* pathogen, before and after slaughter. Further investigations should be made with other antibiotics, with the aim of increasing the knowledge of synergy between bacteriophages and antibiotics as a therapeutic process within the farm. In cecal content, the analyzes indicated a more efficient performance of the bacteriophage cocktail alone. This indicates that phage treatment would be effective in controlling meat contamination during slaughter.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cadeia de produção de frango de corte ocupa uma posição de destaque na economia brasileira e mundial. Ao longo do tempo, esta cadeia tem sido constantemente desenvolvida, apresentando mudanças importantes nas formas de produção, industrialização, comercialização e consumo em todo o mundo (COSTA et al., 2015).

Fatores como nutrição, transporte, manejo, temperatura ambiente, métodos de apanha das aves na granja, tempo de jejum, tecnologia de abate, tempo, temperatura de resfriamento, sexo e idade dos animais, reconhecidamente afetam a qualidade da carcaça e da carne destinada ao consumo humano. Visando a melhoria do ganho de peso e as características da carcaça, os avicultores vêm utilizando recursos como a aplicação de aditivos, na alimentação das aves (TENÓRIO, 2015).

Uma maneira eficaz de melhorar o desempenho do crescimento das aves e melhorar a absorção de nutrientes é por meio da utilização de promotores de crescimento, ou de aditivos potenciadores de desempenho, tais como antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos, probióticos, prebióticos, ou misturas desses componentes (LUEGAS et al., 2015).

O uso indiscriminado de antibióticos favorece a emergência de micro-organismos resistentes, o que enfraquece gradativamente a antibioticoterapia. A relevância da possível seleção de bactérias resistentes a antibióticos usados em agropecuária, e o subsequente impacto das mesmas sobre a saúde humana e dos animais, fez com que este seja um assunto de preocupação crescente na cadeia de alimentos de origem animal.

As aves domésticas são, um reservatório prevacente de *Campylobacter* o qual é excretado em grande número no ambiente. A rota principal da infecção em humanos está associada ao consumo de produtos contaminados. A colonização da carne por *Campylobacter* pode ser aumentada no abate devido à contaminação cruzada em larga escala. Entretanto, a grande diversidade

desse micro-organismo leva à dificuldade de identificação epidemiológica (CIOLFI, 2010).

Desta forma, há uma necessidade de desenvolvimento de outras técnicas para o controle desse micro-organismo, e entre elas está o uso de bacteriófagos. A ação bactericida dos bacteriófagos líticos se dá pela lise da célula hospedeira, dando continuidade ao ciclo lítico com a progênie resultante (MARTINS e MARTINS, 2014).

A utilização de bacteriófagos ou produtos fágicos como aditivos na dieta de frangos, apresenta-se como um potencial método para o biocontrole biológico de patógenos. Portanto, neste estudo, bacteriófagos foram isolados, caracterizados e aplicados para reduzir a contaminação por *Campylobacter jejuni* na etapa final da cadeia produtiva de frangos de corte, aumentando assim a segurança microbiológica dos alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar, caracterizar e avaliar o efeito de bacteriófagos líticos no biocontrole de *C. jejuni* em frangos de corte.

2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar e purificar bacteriófagos para *C. jejuni*;
- b) Avaliar a especificidade dos bacteriófagos;
- c) Avaliar a morfologia dos bacteriófagos selecionados;
- d) Avaliar a viabilidade dos bacteriófagos em condições de pH (2,5 a 8,0) e de sais biliares (0,3 % e 1,0 %), similares às encontradas no trato gastrointestinal de frangos;
- e) Avaliar a eficácia do uso dos bacteriófagos como alternativa no biocontrole de *C. jejuni*, durante o ciclo de finalização da produção de frangos de corte;
- f) Avaliar a eficiência dos bacteriófagos associados ao antibiótico enrofloxacin, no tratamento da campilobacteriose, na produção de frangos de corte.

CAPITULO I

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Produção de carne de frango

Nas últimas décadas, a produção brasileira de frangos de corte passou a ser uma das atividades mais competitivas do setor nacional do agronegócio. Entre todos os estados, o Paraná é o maior produtor de carne de aves do Brasil. Dado o crescimento no comércio internacional de carne de frango, os requisitos para o controle de patógenos, desde a etapa de reprodução animal, até o processamento da carne, também foram intensificadas (FERRO et al., 2015).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), a produção brasileira atingiu 13,14 milhões de toneladas de carne de frango em 2015, um volume 5,4 % superior ao de 2014. Foram abatidos 5,79 bilhões de cabeças de frangos em 2015, colocando o Brasil no segundo maior produtor mundial de carne de frango, superando a China e atrás apenas dos Estados Unidos.

O Brasil é também o maior exportador mundial de frango, tendo exportado 3.880 milhões de toneladas do produto em 2016, seguido pelos Estados Unidos, com 3.221 milhões de toneladas de carne de frango (USDA, 2016).

Mesmo com a produção de excelente qualidade, cerca de 8 % da produção total de aves é desperdiçada, devido às medidas sanitárias relacionadas com o processo de abate. Essas perdas se devem à contaminação de carcaças por material fecal, e corresponde a 22,84 % de todas as carcaças que são condenadas pelo Serviço Brasileiro de Inspeção Federal (STEFANI et al., 2014).

1.2 *Campylobacter* spp.

As bactérias do gênero *Campylobacter* são bacilos gram-negativos, não esporulados, oxidase e catalase positivos, urease negativos, são curvos ou em forma de espiral. Quando as culturas estão em estresse, podem apresentar forma cocoide ou esférica (VLIET e KETLEY, 2001).

Uma ou ambas extremidades da célula têm um flagelo polar, que lhes dá movimento em forma circular (GUERRY et al., 1991), o qual facilita a colonização da mucosa intestinal. São quimiorganotróficos, mas em vez de utilizar as vias oxidativas de carboidratos ou fermentação, usam aminoácidos e intermediários do ciclo de Krebs como fonte de energia. Para o crescimento em microaerofilia, exigem concentrações de oxigênio que podem variar de (3 a 15) %, e de dióxido de carbono entre (3 a 5) %.

1.2.1 *Campylobacter* na cadeia produtiva de carne de ave

A infecção por *C. jejuni* ou *C. coli*, é adquirida principalmente através da cadeia alimentar (WILSON et al., 2008). Ambos, *C. jejuni*, e *C. coli* em menor grau, são comensais do intestino de diferentes aves de consumo, incluindo frango, pato, avestruz, entre outros (CUOMO et al., 2007; PERKO-MAKELA et al., 2011; SHEPPARD et al., 2010).

A carne de frango é a principal fonte de infecção por *Campylobacter* no homem. Estima-se que, direta ou indiretamente, a ingestão desse alimento pode resultar em até 80 % dos casos (VELLINGA et al., 2002; STRACHAN e FORBES, 2010). O trato intestinal das aves é um habitat ideal para o desenvolvimento de *C. jejuni* e *C. coli*, especialmente as criptas da mucosa do intestino posterior, perto da superfície das células epiteliais. Esses locais apresentam uma concentração de oxigênio baixa, sem chegar a um ambiente anaeróbio (onde o patógeno não poderia se desenvolver) (LEE e NEWELL, 2006) e temperatura de 42 °C, que é ótima para o desenvolvimento dessas bactérias (SNELLING et al., 2005). A variação da temperatura corporal entre os hospedeiros pode explicar a razão pela qual não ocorre infecção em aves e ocorre em humanos (KHANNA et al., 2006).

Em alguns casos, a ocorrência de *Campylobacter* no fígado de aves pode ser o resultado da contaminação dos conteúdos intestinais durante o processamento. No entanto, o isolamento da bactéria no tecido interno de amostras de fígado de aves pode ser indício de que *Campylobacter* pode migrar para esses órgãos. Reconhece-se que a bactéria pode atravessar a barreira

intestinal dos animais e dos seres humanos, processo conhecido como translocação bacteriana (FIRLIEYANTI et al., 2016).

1.3 Campilobacteriose em humanos

O período de incubação é de (2 a 5) dias após a ingestão de alimentos ou água contaminada. Os sintomas da infecção por *Campylobacter*, que ocorrem geralmente (2 a 10) dias após a ingestão do alimento contaminado, incluem febre, dor abdominal e diarreia (normalmente sanguinolenta). Em alguns casos, os médicos podem prescrever antibióticos, quando a diarreia é severa. A doença pode durar cerca de uma semana. Algumas complicações podem incluir meningite, infecções do trato urinário, artrite, e raramente, síndrome de Guillain-Barré (SGB) (USDA, 2013).

A SGB é a maior causa de paralisia flácida generalizada no mundo. Consiste em uma doença autoimune grave, que afeta o sistema nervoso. Ocorre quando os anticorpos que atuam contra o *Campylobacter* atacam as células nervosas, com a destruição da bainha de mielina dos nervos periféricos, causando paralisia neuromuscular aguda, podendo comprometer os músculos da respiração e levar o paciente à morte (TAKAHASHI et al., 2005). A SGB se desenvolve em um de cada 1000 casos notificados de campilobacteriose (CLARK, 2016).

Outra síndrome decorrente da infecção por *C. jejuni* é a Síndrome de Reiter, ou artrite reativa. Os sintomas incluem inflamação das articulações, olhos, ou órgãos reprodutivos ou urinários. Em média, os sintomas aparecem 18 dias após a infecção (MURRAY, 2007).

Campylobacter também pode causar apendicite ou infectar partes específicas do corpo, incluindo a cavidade abdominal, coração, sistema nervoso central, vesícula biliar, bexiga urinária ou sanguínea (CLARK, 2016).

1.4 *Campylobacter*, resistência a antibióticos e antimicrobianos

Campilobacteriose é uma doença auto-limitativa, a qual é normalmente tratada por meio da substituição de fluidos e eletrólitos perdidos. Os antibióticos são recomendados se os sintomas se prolongarem ou ocorrer enterite grave, sepse, complicações intestinais, ou quando a doença atinge indivíduos imunocomprometidos (KOVÁCS, 2004). A resistência aos antibióticos pelo *Campylobacter* é um problema crescente de saúde pública em todo o mundo, reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (McDERMOTT et al., 2006).

Existe uma crescente resistência frente aos diferentes antibióticos como os macrolídeos (eritromicina), tetraciclina e fluoroquinolonas (enrofloxacina), os mais frequentemente prescritos. O único tratamento alternativo é gentamicina (AARESTRUP e ENGBERG, 2001).

O número de casos de campilobacteriose em todo o mundo ultrapassaram os casos documentados de salmonelose e shigelose (COVER et al., 2014). Em doenças gastrointestinais humanas o *Campylobacter* foi o patógeno mais isolado na União Europeia, desde 2005. Juntamente com o aumento de casos de campilobacterioses, também foi documentado um aumento do número de cepas de *Campylobacter*, isoladas em humanos, apresentando-se resistentes à ampicilina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico e tetraciclina. O mesmo foi observado em isolados a partir de carne de frango, os quais apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e à tetraciclina (EFSA e ECDC 2013).

O uso excessivo e indiscriminado de antibióticos em animais de produção, pode contribuir na seleção de bactérias resistentes, as quais podem ser disseminadas durante a produção ou processamento de alimentos. Desta forma, desde 2006, a União Europeia e outros países já proibiram o uso de alguns antibióticos na produção animal (EFSA, ECDC e EMEA 2009).

Os antibióticos têm sido usados por décadas como aditivos alimentares em frangos de corte, a fim de prevenir, controlar infecções e melhorar as taxas de crescimento das aves (IGIMI et al., 2008; ROZYNEK et al., 2009).

A utilização de antibióticos não regulamentados tem contribuído para um aumento da resistência contra os antibióticos, não apenas em *Campylobacter*, mas também em outras bactérias com um aumento do número de infecções em seres humanos (KOVÁCS, 2004). Na Europa e nos EUA, a fluoroquinolona administrada nas aves foi responsável pelo aumento da resistência de *C. jejuni* contra estes agentes em cepas isoladas, a partir de animais e seres humanos (SMITH e FRATAMICO, 2010).

1.4.1 Enrofloxacin

Nos últimos anos, há uma tendência crescente de resistência aos antibióticos, por parte da bactéria *Campylobacter* em todo o mundo, especialmente cepas isoladas na cadeia alimentar. Alguns antibióticos, como as quinolonas e macrolídeos, têm despertado a maior preocupação, devido à sua importância na medicina humana (HAN et al., 2016).

A enrofloxacin é uma quinolona de terceira geração, com boa absorção em grande variedade de animais domésticos após a administração oral ou parentérica. Sua biodisponibilidade, aproximadamente do 60 %, e sua boa penetração nos tecidos resultam em boas concentrações plasmáticas terapêuticas (SUMANO E GUTIÉRREZ, 2000).

Estudos farmacocinéticos demonstraram que as concentrações de enrofloxacin no soro e tecido (fígado e rins) estão acima da MIC da maioria dos micro-organismos gram-negativos, validando assim a sua eficácia. A enrofloxacin é parcialmente metabolizada no fígado e a excreção renal é a principal via de eliminação, tanto por filtração como por excreção tubular (SUMANO E GUTIÉRREZ, 2000; SUMANO E OCAMPO, 2006).

Este antibiótico tem sido amplamente utilizado na avicultura brasileira, na produção de aves de corte e em aves de postura, segundo o Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet) do Estado do Paraná (Frasão et al., 2005).

1.5 Bacteriófagos

Os bacteriófagos foram descobertos de forma independente pelos microbiologistas Frederick W. Twort (1915) e Félix d'Hérelle (1917) (XIE et al., 2005).

Os bacteriófagos são naturalmente predadores de bactérias e são ubíquos no ambiente. A maioria das espécies bacterianas têm seus próprios bacteriófagos específicos e *Campylobacter* não é a exceção. Os bacteriófagos específicos, para *Campylobacter* têm sido isolados de diferentes fontes, como água de esgoto, efluentes de pocilgas e de granjas de corte.

Os bacteriófagos podem ser líticos, cujo ciclo leva à destruição da célula hospedeira, ou podem ser atenuados, isto é, além de serem capazes de desenvolver um ciclo lítico, podem desenvolver um ciclo lisogênico, onde o genoma viral pode ser integrado no cromossomo bacteriano, ou pode permanecer no citoplasma da célula bacteriana, em um estado conhecido como profago (HUFF et al., 2005; MARTINS e MARTINS, 2014).

Mais de 95 % dos fagos descritos na literatura pertencem à ordem Caudovirales. As três famílias principais são definidas pelas suas morfologias: 60 % dos fagos são caracterizados como pertencentes à família *Siphoviridae*, que possuem caudas longas e flexíveis; 25 % como da família *Myoviridae*, com caudas contráteis, dupla camada e 15 % restante como da família *Podoviridae*, que têm caudas curtas e grossas (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005).

Os bacteriófagos de *Campylobacter*, membros da família *Myoviridae*, podem ser categorizados em três grupos (grupos I, II e III) com base no tamanho do genoma e do tamanho da cabeça. O grupo I são fagos com diâmetros de cabeça de 143,8 nm, e tamanhos de genoma de 320 kb; grupo II: fagos com diâmetros de cabeça de (83 a 99) nm, e tamanhos médios de genoma de 184 kb; e o grupo III, fagos com tamanhos de cabeça média de (100 a 130) nm, e tamanhos médios de genoma de 138 kb. Os bacteriófagos do grupo II e III pertencem à subfamília *Eucampyvirinae* (SAILS et al., 1998; CONNERTON et

al., 2011; JAVED et al., 2014; JANEŽ et al., 2014; SØRENSEN et al., 2015; FIRLIEYANTI et al., 2016).

Como relatado por Segundo et al. (2010), as aplicações dos bacteriófagos são cada vez maiores, uma vez que os resultados obtidos em experimentos têm sido bons, e sua utilização tem-se estendido para a indústria de alimentos. A Intralix, por exemplo, tem dois produtos aprovados pela FDA, para usar em produtos de consumo humano: ListShield, agindo especificamente contra *Listeria monocytogenes*, e EcoShield contra *Escherichia coli*.

O biocontrole de bactérias, mediante o uso de bacteriófagos, se espalhou para áreas tão importantes e diversas como:

- Alimentos (Intralix, EBI Food Segurança, New Horizons).
- Sanitização ambiental (Intralix, Novolytics)
- Aplicações veterinárias (Intralix, EBI Food de segurança, Novolytics)
- Aplicação direta em seres humanos (Intralix, New Horizons, Exponencial Biotherapies, Novolytics, Fago-Biotech, Eliava Institute).

Na pecuária, o uso de bacteriófagos para biocontrole de patógenos têm sido estudado. No entanto, não existe um controle eficaz para reduzir completamente a carga de *C. jejuni* em frangos. Sendo assim, o uso de várias medidas, tais como boas práticas agropecuárias e biossegurança, associadas aos bacteriófagos, pode ser uma alternativa, a fim de garantir a segurança da matéria-prima.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; ENGBERG J. **Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter***. *Veterinary Research*, 32(3-4): 311–321, 2001.

CIOLFI, F. **Potencial antimicrobiano de extratos e óleos essenciais de vegetais não tradicionais sobre patógenos de origem alimentar**. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

CLARK, M. ***Campylobacter***. *Foodborne Illness*, 2016. Disponível em: <http://www.foodborneillness.com>. Acessado em 12/06/2016.

CONNERTON, P.L.; TIMMS, A.R.; CONNERTON, I.F. ***Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy**. *Journal of Applied Microbiology*, 111(2): 255–265, 2011.

COSTA, L.S.; FERREIRA, G.L.A.; BRENE, P.R.A. **A indústria de frango de corte no mundo e no Brasil e a participação da indústria avícola paranaense neste complexo**. *Ciências Sociais em Perspectiva*, 14(27): 319–341, 2015.

COVER, K.E.; RUIZ, S.A.; CHAPMAN A.S. **Reported gastrointestinal infections in the U.S. Air Force, 2000-2012**. *Medical Surveillance Monthly Report*, 21(6):2-7, 2014.

CUOMO, A.; DIPINETO, L.; SANTANIELLO, A.; MATTEOLI, G.; SARLI, T.; VECCHIA, D.D.; FIORETTI, A.; MENNA, L.F.; **Detection of thermotolerant *Campylobacter* in ostriches (*Struthio camelus*) in Italy**. *Veterinary Journal*, 174(2): 439-41, 2007.

EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EMEA, (European Medicines Agency). **Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on Scientific Opinion of the European Centre for Disease Prevention and Control ; Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards ; Opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use ; Scientific Opinion of the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks**. 7(11): 78 p, 2009.

EFSA, ECDC. **The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2011**. 1(4): 250, 2013.

FERRO, I.D.; BENETTI, T.M.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; ABRAHÃO, W.M.; FARAH, S.M.S.S.; LUCIANO, F.B.; MACEDO, R.E.F. **Evaluation of antimicrobial**

resistance of *Campylobacter* spp. isolated from broiler carcasses. British Poultry Science, 56(1): 66–71, 2015.

FIRLIEYANTI, A.S.; CONNERTON, P.L.; CONNERTON, I.F. ***Campylobacters and their bacteriophages from chicken liver: the prospect for phage biocontrol.*** International Journal of Food Microbiology, 237: 121–127, 2016.

FRASÃO, B.S.; CÔRTEZ, L.R.; NASCIMENTO, E.R.; CUNHA, N.C.; ALMEIDA, V.L.; AQUINO, M.H.C. **Detecção de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* isolados de frangos de criação orgânica.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 35(7): 613–619, 2015

GUERRY, P.; ALM, R.A.; POWER, M.E.; LOGAN, S.M.; T.; TRUST, J. **Role of flagellin genes in *Campylobacter* mobility.** Journal of Bacteriology, 173: 4757–4764, 1991.

HAN, X.; ZHU, D.; LAI, H.; ZENG, H.; ZHOU, K.; ZOU, L.; WU, C.; HAN, G.; LIU, S. **Prevalence, antimicrobial resistance profiling and genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broilers at slaughter in China.** Food Control, 69: 160–170, 2016.

HUFF, W.E.; HUFF, G.R.; RATH, N.C.; BALOG, J.M.; DONOGHE, A.M. **Alternative to antibiotics: utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent food borne pathogens.** Poultry Science, 84(4): 655–659, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Em 2015, abate de suínos e de frangos bate recorde, mas o abate de bovinos e as aquisições de leite e de couro recuam, 2016.** Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3124&busca=1&t=2015-abate-suinos-frangos-bate-recorde-bovinos-aquisicoes-leite-couro-recuam>. Acessado em 23/10/2016.

IGIMI, S.; OKADA, Y.; ISHIWA, A.; YAMASAKI, M.; MORISAKI, N.; KUBO, Y.; ASAKURA, H.; YAMAMOTO, S. **Antimicrobial resistance of *Campylobacter*: prevalence and trends in Japan.** Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 25(9):1080–1083, 2008.

JANEŽ, N.; KOKOŠIN, A.; ZALETEL, E.; VRANAC, T.; KOVAČ, J.; VUČKOVIĆ, D.; MOŽINA, S.S.; SERBEC, V.C.; ZHANG, Q.; ACCETTO, T.; PODGORNIK, A.; PETERKA, M. **Identification and characterisation of new *Campylobacter* group III phages of animal origin.** FEMS Microbiology Letters, 359(1): 64–71, 2014.

JAVED, M.A.; ACKERMANN, H.W.; AZEREDO, J.; CARVALHO, C.M.; CONNERTON, I.; EVOY, S.; HAMMERL, J.A.; HERTWIG, S.; LAVIGNE, R.; SINGH, A.; SZYMANSKI, C.M.; TIMMS, A.; KROPINSKI, A.M. **A suggested classification for two groups of *Campylobacter myoviruses***. Archives of Virology, 159(1): 181–190, 2014.

KHANNA, M.R.; BHAVSAR, S.P.; KAPADNIS, B.P. **Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni***. Letters in Applied Microbiology, 43: 84-90, 2006.

KOVÁCS, K.J.; **Investigation of virulence-associated factors in the pathogenesis of *Campylobacter jejuni*, and the anti-*Campylobacter* mode of action of clove essential oil**. Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School University of Pécs, Hungary. Pécs. 117, 2004.

KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: biology and applications**. CRC Press. 527, 2005.

LEE, M.D.; NEWELL, D.G. ***Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche**. Avian Diseases, 50: 1-9, 2006.

LUEGAS, J.A.P.; ALBINO, L.F.T.; TAVERNARI, F.C.; BARROS, V.R.S.M.; PESSOA, G.B.S.; ROSTAGNO, H.S. **Efeito da adição de probióticos na dieta sobre digestibilidade ileal da matéria seca e da proteína de frangos de corte**. Archivos de zootecnia, 64(247): 5, 2015.

MARTINS, S.C.S.; MARTINS, C.M. **Bacteriófagos: ferramenta para controle de bactérias patogênicas**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 10: 18, 2014.

McDERMOTT, P.F.; BODEIS-JONES, S.M.; FRITSCH, T.R.; JONES, R.N.; WALKER, R.D. **Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents**. Journal of Clinical Microbiology, 43(12): 6136-6138, 2005.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of clinical microbiology**, 9 ed, Washington, 2007.

PERKO-MAKELA P.; ALTER, T.; ISOHANNI, P.; ZIMMERMANN, S.; LYHS, U. **Distribution of *Campylobacter jejuni* isolates from turkey farms and different stages at slaughter using pulsed-field gel electrophoresis and *flaA*-Short variable region sequencing**. Zoonoses Public Health, 58:388-98, 2011.

- ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FANGRAT, K.; SZCZEZEPA, A.B.; WARDAK, S.; SZYCH, J.; KONIECZNY, P.; ALBRECHT, P.; DZIERZANOWSKA, D. **Trends in antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolates in Poland (2000- 2007)**. Polish Journal of Microbiology, 58(2): 111–115, 2009.
- SAILS, A.D.; WAREING, D.R.A.; BOLTON, F.J.; FOX, A.J.; CURRY, A. **Characterisation of 16 *Campylobacter jejuni* and *C. coli* typing bacteriophages**. Journal of Medical Microbiology, 47(2): 123–128, 1998.
- SEGUNDO, N.A.; HERNÁNDEZ, E.B.; LÓPEZ O.V.; TORRES, O.A. **Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia)**. Farmaceuticas, 41(3): 17-26, 2010.
- SHEPPARD, S.K.; COLLES, F.; RICHARDSON, J.; CODY, A.J.; ELSON, R.; LAWSON, A.; BRICK, G.; MELDRUM, R.; LITTLE, C.L. OWEN, R.J. **Host association of *Campylobacter* genotypes transcends geographic variation**. Applied and Environmental Microbiology, 76: 5269-5277, 2010.
- SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M. **Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter***. Journal of Food Protection, 73(6): 1141–1152, 2010.
- SNELLING, W.J.; MATSUDA, M.; MOORE, J.E. DOOLEY, J.S. ***Campylobacter jejuni***. Letters in Applied Microbiology, 41(4): 297-302, 2005.
- SØRENSEN, M.C.H.; GENÇAY, Y.E.; BIRK, T.; BALDVINSSON, S.B.; JÄCKEL, C.; HAMMERL, J.A.; VEGGE, C.S.; NEVE, H.; BRØNDSTED, L. **Primary isolation strain determines both phage type and receptors recognised by *Campylobacter jejuni* bacteriophages**. PLoS ONE, 10(1): 1–18, 2015.
- STEFANI, L.M.; BACKES, R.G.; FARIA, G.A.; BIFFI, C.P.; ALMEIDA, J.M.; SILVA, H.K.DA.; NEVES, G.B.; LANGARO, A. **Trimming and washing poultry carcass to reduce microbial contamination: a comparative study**. Poultry Science, 93(12): 3119–22, 2014.
- STRACHAN, N.J.; FORBES, K.J. **The growing UK epidemic of human campylobacteriosis**. Lancet, 376: 665-7, 2010.
- SUMANO, H.L.; GUTIÉRREZ, L.O. **Problemática del uso de enrofloxacin en la avicultura en México**. Vet. Méx, 31(2): 137, 2000.
- SUMANO, L.H.S.; OCAMPO, C.L. **Farmacología Veterinaria**. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 3ª edición. México, DF., 1082, 2006.

TAKAHASHI, M.; KOGA, M.; YOKOYAMA, K.; YUKI, N. **Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré and Fisher syndromes in Japan.** Journal of Clinical Microbiology, 43(1): 335-339, 2005.

TENÓRIO, A.G.; **Avaliação de desempenho, morfometria intestinal e qualidade de carne de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com extrato de algas.** Produção e nutrição animal. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 78, 2015.

USDA. United States Department of Agriculture. ***Campylobacter* perguntas y respuestas, 2013.** Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov>. Acessado em 12/10/2016.

USDA. United States Department of Agriculture. **Livestock and poultry: World markets and trade, 2016.** Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov>. Acessado em: 23/10/2016.

VLIET, A.H.M.V.; KETLEY, J.M.; **Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection.** Journal of Applied Microbiology, 92: 433-442, 2001.

VELLINGA, A.; VAN, L.F. **The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter* enteritis.** Emerging Infectious Disease journal, 8: 19-22, 2002.

WILSON, D.J.; GABRIEL, E.; LEATHERBARROW, A.J.; CHEESBROUGH, J.; GEE, S.; BOLTON, E.; FOX, A.; FEARNHEAD, P.; HART, C.A.; DIGGLE, P.J.; **Tracing the source of campylobacteriosis.** PLoS Genetics, 4(9): e1000203, 2008.

XIE, H.; ZHUANG, X; KONG, J.; MA, G.; ZHANG, H. **Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens.** The journal of general and applied microbiology, 51(3): 159-63, 2005.

CAPÍTULO II

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE BACTERIÓFAGOS PARA *Campylobacter jejuni*, A PARTIR DE FEZES DE FRANGO

RESUMO

O Brasil é o segundo produtor mundial, e o maior exportador de carne de frango no mundo. No entanto, na cadeia produtiva desse produto são encontrados patógenos que afetam a produção ou que são zoonóticos para o homem, tais como o *Campylobacter jejuni*. Esse patógeno tem sido reportado na Europa como o principal causador de doenças veiculadas por alimentos. Apesar da relevância que este micro-organismo tem para a saúde pública, a sua detecção em alimentos não é exigida pela legislação brasileira. Devido à resistência de *C. jejuni* aos antibióticos, novas alternativas para o controle desse patógeno, têm sido utilizadas como medida preventiva ou terapêutica, como é o caso do uso de bacteriófagos. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar o efeito lítico dos bacteriófagos no biocontrole de diferentes cepas de *C. jejuni* y outros patógenos *in vitro*. Foi possível isolar 19 bacteriófagos de amostras de fezes de frango, coletadas em duas granjas avícolas na região de Viçosa, no Estado de Minas Gerais. Após estocagem a 4 °C durante 5 meses, apenas 6 bacteriófagos (BC2, BC7, BC10, BC14, BC18 e BC19) mantiveram ação lítica frente ao hospedeiro. Cinco bacteriófagos foram específicos para *C. jejuni*, e um (bacteriófago BC14) além de apresentar ação lítica nas cepas de *C. jejuni*, apresentou atividade lítica frente a *Salmonella Typhimuium* (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (CDC0111ab). Os bacteriófagos BC7 e BC14, possuem cabeça icosaédrica de comprimento (107,2 e 94,9) nm, respectivamente e cauda (100,1 e 97,9) nm, respectivamente, o que indica que eles pertençam à ordem Caudovirales, e da família *Myoviridae*, e subfamília *Eucampyvirinae*. Os seis bacteriófagos apresentaram sensibilidade a pH baixo, com redução da viabilidade de 6,90 ciclos logarítmicos a pH 2,5, e resistência a sais biliares nas concentrações de (0,3 e 1,0) %. Os fagos isolados são eficientes no biocontrole de *C. jejuni*. Entretanto, devido à sensibilidade a ambientes ácidos, sugere-se que eles sejam protegidos antes de serem usados como biocontrole.

1. INTRODUÇÃO

Campylobacter são bactérias gram-negativas, com forma de espiral, microaerófilas, pertencentes à família Campylobacteriaceae. As espécies de importância do gênero *Campylobacter* em nível de saúde pública, são *C. jejuni* e *C. coli*, que são as principais causadoras de infecções bacterianas veiculadas por alimentos. Esses micro-organismos podem ser isolados de várias espécies animais, mas a ave é o principal reservatório deste patógeno (DHAMA et al., 2013).

Reconhecido como um patógeno entérico de origem alimentar desde 1970, *Campylobacter* se tornou uma grande preocupação em todo o mundo. Sua enfermidade é denominada campilobacteriose (FIRLIEYANTI et al., 2016), e os sintomas mais comuns são gastroenterite, diarreia, dor abdominal, cólicas e febre. A doença também pode levar a complicações como a síndrome de Guillain-Barré, e a síndrome hemolítico-urêmica. Esta enfermidade acomete pessoas de perfis diferentes, em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Nos países em desenvolvimento, afeta principalmente crianças menores de 5 anos de idade com mais frequência do que outras faixas etárias. Já em países desenvolvidos, a enfermidade afeta de igual maneira jovens e adultos. Recentemente, o número de casos no Reino Unido tem sido maior entre os idosos. (SILVA et al., 2016).

Frangos infectados são responsáveis pela contaminação de carcaças durante o processamento. Alguns pontos são especialmente importantes para a contaminação cruzada, tais como a evisceração, e a imersão em tanques de refrigeração (SILVA et al., 2016).

Segundo Janež et al (2014), devido à frequente resistência a antibióticos apresentado por *Campylobacter*, bem como a capacidade para sobreviver em ambientes hostis e em estado viável não cultivável, têm surgido alternativas como o uso dos bacteriófagos como agentes antibacterianos em granjas e em carcaças de frangos, para reduzir a incidência de campilobacterioses em humanos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar bacteriófagos para *C. jejuni*, caracterizar os mesmos quanto à sua morfologia, avaliar o potencial lítico frente a outras cepas bacterianas, e a viabilidade *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Minas Gerais.

Utilizou-se o micro-organismo de referência *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (IOC/ATCC 33560), INCQS 00642, fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS-FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. O micro-organismo foi utilizado como hospedeiro no processo de isolamento, purificação, propagação e viabilidade dos bacteriófagos.

2.1. Obtenção dos bacteriófagos

2.1.1. Coleta de amostras de fezes de frango

Foram coletadas amostras de fezes frescas de frango de duas granjas avícolas na região de Viçosa, no Estado de Minas Gerais. As amostras foram mantidas sob refrigeração em caixa térmica, e transportadas ao LAMPOAH, para posteriores análises.

2.1.2. Isolamento dos bacteriófagos

Para o isolamento dos bacteriófagos, foi utilizada a metodologia adaptada de Atterbury et al (2005). Um grama de fezes de frango foi pesado (Shimadzu, AU220) e inoculado em 10 mL de caldo triptona de soja (TSB, HIMEDIA®), juntamente com 1 mL de *C. jejuni* em fase logarítmica (10^8 UFC·mL⁻¹), e mantido sob agitação (Solab, SL 221) a 100 rpm durante 24 h a 42 °C, em atmosfera microaerófila (5 % O₂, 10 % CO₂, 2 % H₂, e 83 % N₂). Após esse período, as amostras foram centrifugadas (Sigma, 3K30, ROTOR 12111H) a 8.600·g por 10 min, e posteriormente filtradas em membrana hidrofílica de PVDF de 0,22 µm (Millex®).

Foi avaliada a presença de bacteriófagos utilizando a técnica de microgotas. Um volume de 5 mL de ágar TSA sobrecamada (TSB adicionado de 0,7 % de ágar-ágar Difco™), foram fundidos a 48 °C, misturados com 500 µL de suspensão, contendo *C. jejuni* em fase logarítmica, e logo vertidos em placas

contendo ágar TSA base (TSB, adicionado de 1,2 % de ágar- ágar Difco™). Após a solidificação, 10 µL dos filtrados contendo os bacteriófagos foram inoculados sobre o ágar, na forma de microgotas e incubados durante 24 h a 42 °C, em atmosfera microaerófila (Thermo, 1025) (Figura 1). A presença de bacteriófagos foi avaliada mediante a observação de formação de placas de lise (zonas translúcidas).



Figura 1. Câmara de anaerobiose (Thermo, 1025) para ativação das cepas de *C. jejuni*, e isolamento dos bacteriófagos.

2.1.3. Purificação dos bacteriófagos

Para purificar os bacteriófagos, primeiramente foram misturados 500 µL de *C. jejuni* em fase logarítmica, e 100 µL do filtrado contendo os bacteriófagos. Em seguida, incubou-se a 42 °C por 15 minutos sob agitação (100 rpm), a fim de permitir que o bacteriófago adsorvesse na membrana da bactéria (CARRILLO et al., 2007). Imediatamente, a mistura foi plaqueada usando a técnica de sobrecamada em ágar. As placas foram incubadas durante 24 h a 42 °C, em atmosfera microaerófila. Após a obtenção da formação de placas de lise estas foram retiradas com ajuda de uma pipeta tipo Pasteur, adicionadas a 5 mL de TSB, juntamente com 500 µL de *C. jejuni* ativado, e incubadas por 18 h a 42 °C, em atmosfera microaerófila. As amostras foram centrifugadas a 8.600-g por 10 min e filtradas em membrana hidrofílica de PVDF, com poro de 0,22 µm. O filtrado foi diluído com solução tampão SM [50 mM Tris-HCl [pH 7,5], (SIGMA®); 0,1 M NaCl (Vetec®); 8 mM MgSO₄ (Alphatec) e 0,01 % gelatina (Difco™)], a fim de obter lises isoladas. O mesmo ciclo foi repetido por três vezes.

2.1.4. Propagação e titulação dos bacteriófagos

Após a obtenção dos bacteriófagos isolados e purificados, foi realizada a propagação dos mesmos, adicionando às placas de Petri, contendo as placas de lise 5 mL de solução tampão SM, e incubou-se a 17 °C sob agitação (100 rpm) por 24 h. O caldo recuperado foi centrifugado a 8.600·g por 10 min, filtrado e diluído em série decimal com solução tampão SM, a fim de determinar a concentração (título) dos bacteriófagos na suspensão estoque. O título dos bacteriófagos foi determinado pela técnica de sobrecamada em ágar. Foram avaliadas placas de Petri com 10 a 100 placas de lise, e os resultados expressos em UFP·mL⁻¹ (CARRILLO et al., 2005).

2.2. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos

A avaliação do espectro lítico de cada bacteriófago foi realizada pela técnica da microgota em superfície, usando como meio de cultivo TSA, e como hospedeiros, bactérias fornecidas pela Fiocruz e pelo LAMPOAH, conforme detalhado no Quadro 1. As placas foram incubadas por 24 h nas temperaturas ótimas de crescimento para cada micro-organismo. A atividade lítica foi avaliada mediante a observação de formação de placas de lise (ADAMS, 1959; HUNGARO et al., 2013).

Quadro 1. Bactérias utilizadas na avaliação do espectro lítico.

Micro-organismo	Temperatura de incubação (°C)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> INCQS 00026 (ATCC 25619) ¹	37 ± 1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> INCQS 00077 (NCTC 10038) ¹	30 ± 1
<i>Salmonella</i> Typhimurium INCQS 00150 (ATCC 14028) ¹	37 ± 1
<i>Salmonella</i> Enteritidis INCQS 00258 (ATCC 13076) ¹	37 ± 1
<i>Escherichia coli</i> INCQS 00180 (CDC0111ab) ¹	37 ± 1
<i>Escherichia coli</i> INCQS 00171 (O157:H7 ATCC 43895) ¹	37 ± 1
<i>Listeria monocytogenes</i> INCQS 00353 (ATCC 15313) ¹	30 ± 1
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus INCQS 00249 (ATCC 25904) ¹	37 ± 1
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> INCQS 00098 (ATCC 9610) ¹	28 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> INCQS 00262 (ATCC 33560) ¹	42 ± 1

<i>Campylobacter jejuni</i> INCQS 00642 (IOC/ATCC 33560) ¹	42 ± 1
<i>Campylobacter coli</i> INCQS 00263 (ATCC 33559) ¹	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (A52013) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (B12013) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (C42013) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter coli</i> (D22013a) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter coli</i> (D22013b) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (D32013) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (D42013a) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (E22013) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (E32013a) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (E32013b) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (F12013b) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (F22013) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (F32013) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (G12013) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (G52013) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (H42013) ²	42 ± 1
<i>Campylobacter jejuni</i> (I52013) ²	42 ± 1

1: Bactérias fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS-FIOCRUZ); 2: Bactérias isoladas no LAMPOAH (HUNGARO et al., 2015).

2.3. Concentrações dos bacteriófagos

Os bacteriófagos foram concentrados segundo metodologia adaptada de Sambrook e Russell (2001). Em um tubo de policarbonato foi adicionado uma primeira camada de 3 mL de glicerol 40 %. Sobre ela, uma segunda camada de 4 mL de glicerol 5 %, diluído em tampão SM. A terceira camada a ser adicionada foi 5 mL da suspensão de bacteriófago com título 10^8 UFP·mL⁻¹. Finalmente, a quarta camada a ser adicionada, foi 1 mL de tampão SM (pH 7,5). Os tubos foram centrifugados a 19.500·g (BECKMAN J2-MC, Brea – CA, EUA, rotor JA-20) por 2 horas a 20 °C. Finalmente o sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspendido em 1 mL de tampão SM.

2.4. Exame da morfologia dos bacteriófagos

Uma alíquota de 10 µL de suspensão do bacteriófago concentrada foi depositada na superfície de um grid (revestido com Formvar carbono). Imediatamente, foi adicionada uma gota do contraste acetato de uranila a 2 % (solução aquosa, p/v) sobre a superfície do grid, e deixado por 30 s, retirando-

se o excesso com papel filtro. Os grids foram submetidos à secagem em temperatura ambiente por 24 h, e posteriormente visualizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) no Núcleo de Microscopia da Universidade Federal de Viçosa, em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss, EM 109 – trifásico).

2.5. Avaliação da viabilidade dos bacteriófagos

Neste estudo levou-se em conta as concentrações de pH e dos sais biliares no trato gastrointestinal das aves, para avaliar a estabilidade *in vitro* dos bacteriófagos nestas condições. Todos os ensaios foram repetidos três vezes e as análises realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em UFP·mL⁻¹ e transformados em escala logarítmica (log₁₀ UFP·mL⁻¹). A comparação das médias foi realizada utilizando-se o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade por meio do software R versão 3.3.1.

2.5.1. Avaliação da viabilidade dos bacteriófagos após exposição a diferentes valores de pH

A viabilidade foi realizada a partir da mistura dos seis bacteriófagos. Cada bacteriófago foi propagado independentemente (item 2.1.4) até atingir concentração equimolares (10⁸ UFP·mL⁻¹) Depois os bacteriófagos foram misturados, diluídos e titulados novamente antes dos procedimentos *in vitro*, para garantir uma concentração de 10⁸ UFP·mL⁻¹.

Os valores de pH e o tempo de exposição dos bacteriófagos utilizados foram baseados nas informações de Vanbelle (1999) e Gauthier (2002) relatando que o pH das aves varia segundo os diferentes órgãos do sistema digestório. Assim, o pH no papo é de 5,5, com tempo médio de passagem de 50 min; no proventrículo e moela o pH varia de (2,5 a 3,5), com tempo de passagem de 90 minutos; no intestino delgado, especificamente no duodeno, jejuno e íleo o pH é de (5 a 6; 5,5 a 7 e 7 a 7,5), respectivamente, já o tempo de passagem é de (5 a 8) min, (20 a 30) min e (50 a 70) min, respectivamente; no intestino grosso o pH é de 8, no reto com tempo de passagem de 25 min, o pH dos cecos é de 6,9, e da cloaca, de 8.

A metodologia usada foi descrita por Albino et al. (2014). Uma alíquota de 100 µL da suspensão de bacteriófagos (10^8 UFP·mL⁻¹) foram adicionados em microtubos, contendo 900 µL de tampão SM, com pH ajustado em 2,5; 5,0; 5,5; 6,5 e 8,0, com ácido clorídrico 1,0 N (Vetec®) e hidróxido de sódio 0,1 N (Vetec®). A viabilidade dos bacteriófagos foi avaliada em intervalos de 30 min, durante 90 min. Em cada tempo foram feitas diluições seriadas das amostras com solução tampão SM (pH 7,5) para neutralizar o pH da solução. A contagem de bacteriófagos foi feita mediante o plaqueamento pela técnica de sobrecamada em ágar. As placas foram incubadas durante 24 h a 42 °C, em atmosfera microaerófila.

2.5.2. Avaliação da viabilidade dos bacteriófagos após exposição a diferentes concentrações de sais biliares

As concentrações de sais biliares utilizadas foram baseadas nas informações de Lin et al (2003) que mediram as concentrações de sais biliares em frangos comerciais em duodeno, jejuno e ceco obtendo valores de 1,75; 7,0 e 0,085 mg/mL, respectivamente.

Tendo em conta que as concentrações de sais biliares podem variar, dependendo de fatores como espécie, dieta, compartimento gastrointestinal e estado de jejum, neste estudo foram aumentados os valores de sais biliares descritos por Lin et al. (2003), a concentrações de 3 mg/mL e 10 mg/mL. O teste foi realizado segundo a metodologia adaptada de Albino et al. (2014).

Foram adicionados 100 µL da suspensão dos bacteriófagos (10^8 UFP·mL⁻¹) em 900 µL de tampão SM, com concentrações de sais biliares (Difco®) de 3 mg/mL (0,3 %) e 10 mg/mL (1,0 %). A viabilidade dos bacteriófagos foi avaliada em intervalos de 30 min durante 90 min. Em cada tempo foram feitas diluições seriadas das amostras com solução tampão SM. A contagem de bacteriófagos foi feita mediante o plaqueamento pela técnica de sobrecamada em ágar. As placas foram incubadas durante 24 h a 42 °C, em atmosfera microaerófila.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento, purificação e propagação de bacteriófagos

A presença de bacteriófagos foi observada mediante a formação de placas de lise sobre o meio TSA semissólido contendo a cultura *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560). Foi possível isolar 19 bacteriófagos de 28 amostras de fezes de frango, mas após estocagem em tampão SM (pH 7,5) a 4 °C durante 5 meses, apenas 6 bacteriófagos mantiveram viabilidade e ação lítica detectável. Os bacteriófagos foram nomeados BC2, BC7, BC10, BC14, BC18 e BC19.

Ottosson e Stenström (2003), relatam que os colifagos expostos a diferentes temperaturas seguem um decaimento logarítmico a partir do dia zero, reduzindo mais rapidamente a 20 °C do que a 4 °C. Em outro estudo dirigido por Shan et al (2014), isolaram bacteriófagos para *Burkholderia pseudomallei*, o qual apresentou um comportamento dependente da temperatura de incubação da bactéria, sendo de ciclo lítico quando incubado com a bactéria a temperaturas de 37 °C, e passando a ciclo lisogênico, em temperatura baixa de 25 °C.

Possivelmente os bacteriófagos armazenados a temperaturas de 4 °C tiveram diminuição na concentração, devido à inativação ou por passarem de um ciclo lítico a um ciclo lisogênico, uma vez que, dentre os 19 bacteriófagos isolados de fezes frescas de aves, apenas 6 conservaram sua ação lítica. Durante o armazenamento não foi utilizado nenhum crioprotector como o glicerol.

3.2. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados

Os seis bacteriófagos apresentaram atividade lítica para as bactérias: *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560), *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560), *C. jejuni* (B12013) (Figura 2), *C. jejuni* (D32013), *C. jejuni* (D42013a), e *C. jejuni* (E22013), *C. jejuni* (E32013b).

O bacteriófago BC14 também apresentou ação lítica nas cepas bacterianas: *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (CDC0111ab), e *Campylobacter jejuni* (F12013b).



Figura 2. Lises do bacteriófago BC14, em *C. jejuni* B12013

O bacteriófago BC14 apresentou especificidade para *C. jejuni*, *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli*, o que indica a possibilidade deste bacteriófago ter reconhecimento de diferentes receptores. Neste sentido, Rossi e Almeida (2010) descreveram que os bacteriófagos podem infectar diferentes bactérias, mediante o reconhecimento de receptores, como membrana externa que transporta proteínas, lipopolissacarídeos, carboidratos, e estruturas especializadas, como os flagelos.

Alguns bacteriófagos podem se ligar a vários receptores ou a mais de um receptor simultaneamente. Segundo Dini (2011), um mesmo bacteriófago pode ter várias moléculas como receptores e ter diferentes adesinas em sua estrutura. O bacteriófago BC14 reconhece receptores de superfície nas espécies *C. jejuni*, *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (CDC0111ab), o que indica que, quanto mais receptores o bacteriófago reconhece, maior o número de hospedeiros.

Os bacteriófagos BC2, BC7, BC10, BC18 e BC19 têm a capacidade de reconhecer receptores na estrutura da superfície de *C. jejuni*, sendo assim específicos para uma espécie bacteriana.

3.3. Análise da morfologia dos bacteriófagos

Os bacteriófagos BC7, BC2, BC10, BC18 e BC19, apresentaram comportamento semelhante na avaliação da especificidade. Dessa forma foi escolhido o bacteriófago BC7 para sua análise morfológica. Da mesma forma,

o bacteriófago BC14 foi avaliado morfológicamente, pois além de apresentar espectro lítico para o *C. jejuni*, também apresentou para as espécies de *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (CDC0111ab).

A morfologia dos bacteriófagos BC7 e BC14 foram observados por meio de microscópio eletrônico de transmissão (Figura 3), e feitas as medidas em nanômetros (nm), utilizando o software ImageJ 1.50i (Quadro 2).

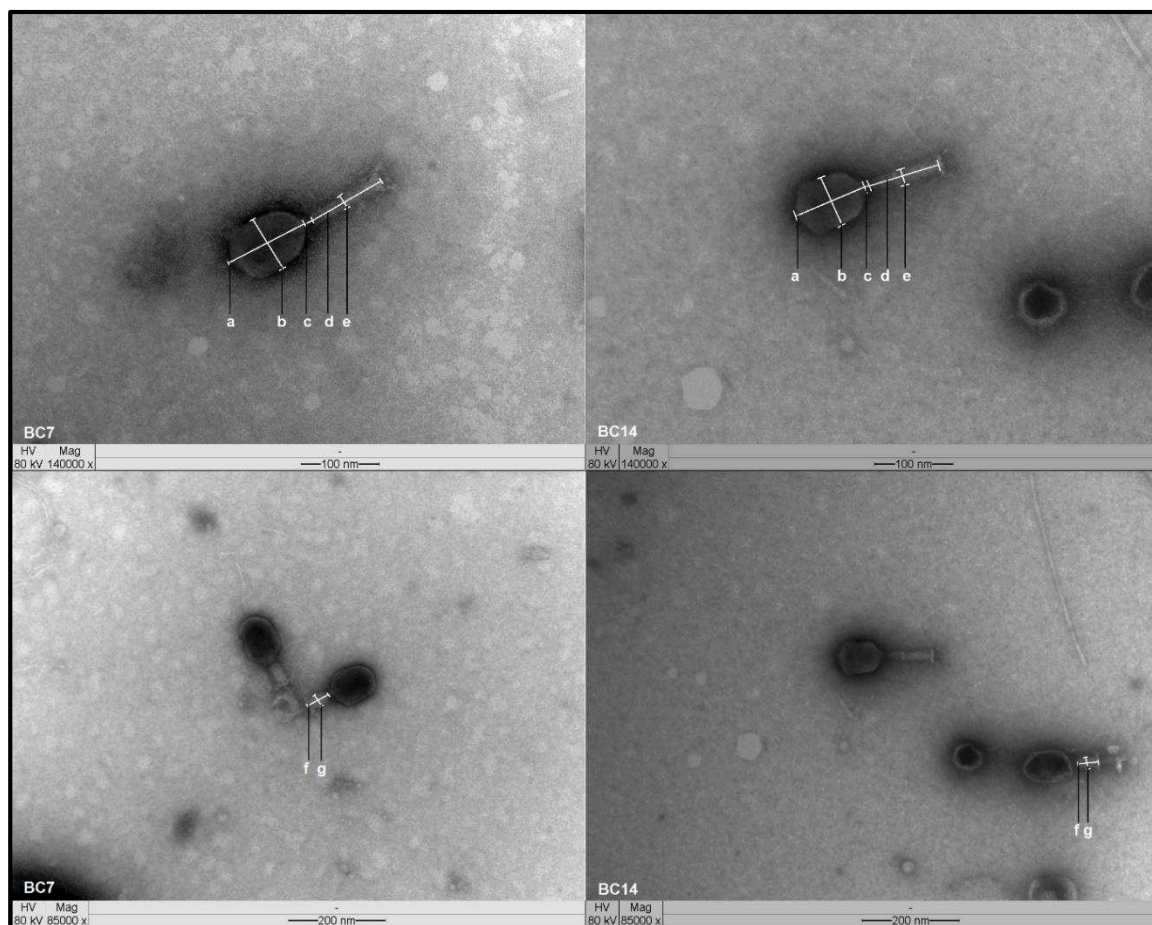


Figura 3. Fotomicrográfrica do bacteriófago BC7 e BC14 por MET. Observação com aumento de 140.000 x e 85.000 x.

Na observação morfológica dos bacteriófagos, eles apresentaram cabeça de forma icosaédrica, presença de pescoço, e uma cauda composta por anéis, que lhes permitem aos bacteriófagos ser contrácteis. A visualização da cauda mostrou na parte final presença das espículas, que atuam como sítios de ligação à bactéria. De acordo com as características morfológicas, os bacteriófagos foram classificados como pertencentes à ordem Caudovirales e família *Myoviridae*.

Quadro 2. Média de medições das estruturas dos bacteriófagos BC7 e BC14.

Pontos de medida	Bacteriófagos	
	BC7 (nm)	BC14 (nm)
Comprimento (diâmetro) da cabeça (a)	107,2	94,9
Largura da cabeça (b)	73,5	65,1
Pescoço (c)	10,2	7,8
Comprimento da cauda (d)	100,1	97,9
Largura da cauda (e)	15,8	16,9
Comprimento da cauda contraída (f)	47,3	42,9
Largura da cauda contraída (g)	25,4	23,4

Os resultados encontrados são semelhantes aos encontrados por Carvalho et al. (2010), que caracterizaram três bacteriófagos por microscopia eletrônica de transmissão (MET), observando estruturas de tamanho semelhante, com fibras de cauda na extremidade distal. Essas morfologias são típicas da família *Myoviridae*. Em estudo conduzido por Javed et al. (2014), cerca de 200 bacteriófagos isolados foram capazes de infectar as bactérias *Campylobacter coli* ou *Campylobacter jejuni*, sendo a grande maioria membros da família *Myoviridae*, e o restante da família *Siphoviridae*.

Javed et al. (2014) classificaram por medição o bacteriófago CP220: cabeça 92 nm, cauda de (148 por 18) nm e pescoço de (8 por 8) nm o qual classificou no grupo II; e o bacteriófago CP81: cabeça 96 nm, e cauda de (115 por 18) nm, e pescoço de (8 por 8) nm, no grupo III.

Jäckel et al. (2015) estudaram e classificaram o bacteriófago CP21 no grupo II, o qual mostrou a morfologia típica de um miovírus com uma cabeça isométrica (diâmetro igual a 93) nm, e uma cauda contrátil longa (135 por 24) nm. O CP21, como outros fagos de *Campylobacter*, tem um pescoço sem colar, e uma pequena placa de base. Suas fibras da cauda são frágeis.

Os campylofagos obtidos neste estudo têm cabeças icosaédricas e caudas contráteis (Figura 4). Os grupos de bacteriófagos comumente estudados na literatura são os II e III, e a diferença mais notável é o diâmetro da cabeça.

O bacteriófago BC7 apresentou um comprimento de 107,2 nm, o qual indica que pode ser classificado no grupo III, grupo composto por bacteriófagos que apresentam cabeça de diâmetro entre (100 e 130) nm, como descrito por Connerton et al. (2011). O bacteriófago BC14 tem um comprimento de 94,9, podendo ser classificado no grupo II, pois este grupo apresenta uma média de comprimento entre (83 e 99) nm, segundo a classificação descrita por Connerton et al. (2011).

Também foi possível observar nos bacteriófagos contraídos ao lado da cauda, umas partículas que são referenciadas na literatura como corpos esféricos e correspondem a uma reminiscência de vesículas da membrana do hospedeiro, que possivelmente foi produzida pela bactéria como um mecanismo de defesa primitivo contra a infecção fágica, ou são derivadas de células lisadas após infecção do bacteriófago, e produção da progênie (KROPINSKI et al., 2011).

Mais estudos devem ser feitos como proteômica para conhecer a procedência e composição dos corpos esféricos. Além disso, devem realizar-se análise dos genomas sequenciados dos bacteriófagos, afim de caracterizá-los.

3.4. Avaliação *in vitro* da viabilidade do coquetel de bacteriófagos, expostos a diferentes valores de pH

Viabilidade dos bacteriófagos quando expostos a diferentes pH (Tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade do coquetel de bacteriófagos expostos a diferentes valores de pH.

pH	Contagem* (\log_{10} UFP·mL ⁻¹)			
	Tempo (min)			
	0	30	60	90
2,5	8,86 ^a ± 0,06	3,13 ^b ± 0,14	2,32 ^c ± 0,21	1,96 ^c ± 0,17
5,0	8,86 ^a ± 0,06	7,81 ^b ± 0,22	7,30 ^{bc} ± 0,20	6,89 ^c ± 0,10
5,5	8,86 ^a ± 0,06	7,91 ^b ± 0,06	7,83 ^b ± 0,14	7,71 ^b ± 0,05
6,5	8,86 ^a ± 0,06	8,28 ^b ± 0,16	8,14 ^{bc} ± 0,08	7,78 ^c ± 0,07
8,0	8,86 ^a ± 0,06	8,65 ^a ± 0,10	8,71 ^{ab} ± 0,06	8,54 ^b ± 0,07

*Médias de contagem de bacteriófagos (\log_{10} UFP·mL⁻¹) acompanhadas pela mesma letra entre linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5 %.

O coquetel de bacteriófagos apresentou baixa tolerância quando exposto a pH de 2,5 em relação aos demais intervalos analisados. A contagem passou de 8,86 log₁₀ UFP·mL⁻¹ para 1,96 log₁₀ UFP·mL⁻¹, após 90 min de tempo de contato.

O pH do sistema digestório das aves, além de participar da digestão dos alimentos, serve como mecanismo de defesa para reduzir a proliferação de micro-organismos.

Albino et al. (2014) observaram que os bacteriófagos apresentaram maior sensibilidade quanto expostos a pH 2, em comparação com pH 3 e 4 após 120 min de contato. De igual maneira, Knezevic et al. (2011) concluíram que ao submeter os bacteriófagos a pH 1,5 durante 30 min, eles eram inativados, mas a pH 3, 5 e 9, evidenciava-se a sobrevivência dos bacteriófagos. Para O'flynn et al. (2006), durante os ensaios *in vivo* com 3 bacteriófagos diferentes (st104a, st104b e Felix 01), submetidos a acidez do suco gástrico suíno (pH 2,5), foi possível observar uma sobrevivência para os bacteriófagos st104a e Felix 01, de 10 e 30 %, respectivamente. Frente às condições ácidas, o bacteriófago st104b não foi detectado, após duas horas de exposição a pH 2,5.

O bacteriófago contém o seu genoma de ácido nucleico (DNA ou RNA) envolto em um capsídeo formado de proteínas ou lipoproteínas; o ácido nucleico e o capsídeo combinados formam o nucleocapsídeo (KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005). Quando as proteínas são expostas a concentrações extremas de pH, podem sofrer desnaturação, gerando o desdobramento da cadeia polipeptídica, destruindo a estrutura de maior organização (secundária, terciária ou quaternária). Essas proteínas se desdobram de tal forma que sua porção hidrofóbica fica exposta e unem-se entre elas, formando proteínas que não têm valor biológico (MADIGAN et al., 2010).

Pelo fato de as estruturas fágicas (capsídeo e cauda) serem compostas por proteínas, provavelmente elas podem ser desnaturadas quando são expostas a pH baixo, com o qual o material genético fica exposto sem proteção do capsídeo, o que conduz à inativação dos bacteriófagos. Porém, os bacteriófagos devem ser protegidos mediante o uso de um antiácido, antes de serem usados *in vivo*.

3.5. Avaliação *in vitro* da viabilidade do coquetel de bacteriófagos, expostos a diferentes concentrações de sais biliares

Observou-se que o resultado dos sais biliares, em diferentes concentrações, teve pouco efeito sobre a viabilidade do coquetel de bacteriófagos. Nas concentrações de 0,3 % (3 mg/mL) e 1,0 % (10 mg/mL) de sais biliares a redução foi de (0,37 e 0,51) \log_{10} UFP·mL⁻¹, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Viabilidade do coquetel de bacteriófagos expostos a diferentes concentrações de sais biliares.

Sais biliares (%)	Contagem* (\log_{10} UFP·mL ⁻¹)			
	Tempo (min)			
	0	30	60	90
0,3	8,86 ^a ± 0,06	8,56 ^b ± 0,04	8,55 ^b ± 0,04	8,49 ^b ± 0,06
1,0	8,86 ^a ± 0,06	8,48 ^b ± 0,02	8,39 ^b ± 0,07	8,35 ^b ± 0,06

*Médias de contagem de bacteriófagos na linha (\log_{10} UFP·mL⁻¹) acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %.

A bÍlis é uma secreção digestiva que desempenha um papel importante na emulsificação e solubilização dos lipÍdeos, e tem a capacidade de afetar os fosfolipÍdios e proteÍnas de membranas celulares, perturbando a homeostase celular (BEGLEY et al., 2005). Segundo Kutter e Sulakvelidze (2005), o capsÍdeo envolve o material genético, e pode estar constituÍdo por uma proteÍna ou lipoproteÍna.

Gabig et al. (2002) observaram que os sais biliares possuem efeito inibidor para a formação de placas de lise dos bacteriófagos, testados em culturas de *E. coli*, somente quando os sais biliares são misturados com carboidratos.

Resultados similares a este estudo foram propostos por Albino et al. (2014), mostrando que as contagens de bacteriófagos não foram influenciadas pela concentração de sais biliares, após 120 min de contato.

Neste estudo houve redução na concentração dos bacteriófagos quando expostos a valores elevados de sais biliares, o que indica que os bacteriófagos apresentam uma porção lipoproteica ou proteica, em que a bÍlis pode afetar em

menor intensidade essas estruturas. No entanto, essa diminuição não afeta o uso em biocontrole.

4. CONCLUSÃO

Fezes de frango são fonte de bacteriófagos, que podem ser utilizados como uma estratégia para o biocontrole de patógenos;

Os bacteriófagos isolados são pertencentes à ordem Caudovirales, família *Myoviridae*, subfamília *Eucampyvirinae* (grupo II e III).

Cinco bacteriófagos foram específicos para *C. jejuni* e um, além de apresentar atividade lítica para cepas de *C. jejuni*, também apresentou para *Salmonella* Typhimurium e *E. coli*. Essa característica pode ser favorável no uso do coquetel dos bacteriófagos no biocontrole de outros patógenos.

A viabilidade do coquetel de bacteriófagos foi afetada quando ele foi exposto a um ambiente ácido, e em menor intensidade quando exposta a concentrações de sais biliares. Isso sugere que afim de manter a viabilidade e efetividade de esses agentes, medidas de proteção dos bacteriófagos ao trato gastrointestinal das aves, como o uso de antiácidos devem ser usadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.H. **Bacteriophages**. New York: Interscience, 450–451, 1959.
- ALBINO, L.A.A. **Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella Typhimurium***. Tese (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2011.
- ALBINO, L.A.A.; ROSTAGNO, M.C.; HUNGARO, 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.
- ATTERBURY, R.J.; DILLON, E.; SWIFT, C.; CONNERTON, P.L.; FROST, J.A.; DODD, C.E.; REES, C.E.; CONNERTON, I.F. **Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca**. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4885–4887, 2005.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. **The interaction between bacteria and bile**. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4): 625–651, 2005.
- CARRILLO, C.L.; ATTERBURY, R.J.; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P.L.; DILLON, E.; SCOTT, A.; CONNERTON, I.F. **Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens**. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 6554–6563, 2005.
- CARRILLO, C.L.; CONNERTON, F.L.; PEARSON, T.; CONNERTON, I.F. **Free-range layer chickens as a source of *Campylobacter* bacteriophage**. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 92(3): 275–284, 2007.
- CARVALHO, C.M.; GANNON, B.W.; HALFHIDE, D.E.; SANTOS, S.B.; HAYES, C.M.; ROE, J.M.; AZEREDO, J. **The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens**. *BMC microbiology*, 10: 232, 2010.
- CONNERTON, P.L.; TIMMS, A.R.; CONNERTON, I.F. ***Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy**. *Journal of Applied Microbiology*, 111(2): 255–265, 2011.
- DHAMA, K.; RAJAGUNALAN, S.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A.K.; KUMAR, A.; TIWARI, R.; AND KAPOOR, S. **Food-borne pathogens of animal origin-diagnosis, prevention, control and their zoonotic significance: A Review**. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16: 1076-1085, 2013.
- DINI, C. **Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas**

por alimentos (ETA). Tesis (Doctorado) Universidad Nacional de la Plata. 2011.

FIRLIEYANTI, A.S.; CONNERTON, P.L.; CONNERTON, I.F. **Campylobacters and their bacteriophages from chicken liver: the prospect for phage biocontrol**. International Journal of Food Microbiology, 237: 121–127, 2016.

GABIG, M.; ANTOSIEWICZ, A.H.; KWIATKOWSKA, M.; LOS, M.; THOMAS, M.S.; WEGRZYN, G. **The cell surface protein Ag43 facilitates phage infection of *Escherichia coli* in the presence of bile salts and carbohydrates**. Microbiology, 148(5): 1533–1542, 2002.

GAUTHIER, R. **Intestinal health, the key to productivity (The case of organic acids)**. Nutrition, 1–14, 2002.

HUNGARO, H.M.; MENDONÇA, R.C.S.; GOUVÊA, D.M.; VANETTI, C.D.; PINTO, C.L.O. **Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents**. Food Research International, 52: 75-81, 2013.

JÄCKEL, C.; HAMMERL, J.A.; REETZ1, J.; KROPINSKI, A.M.; HERTWIG, S. **Campylobacter group II phage CP21 is the prototype of a new subgroup revealing a distinct modular genome organization and host specificity**. BMC Genomics, 16(1): 1–16, 2015.

JANEŽ, N.; KOKOŠIN, A.; ZALETEL, E.; VRANAC, T.; KOVAČ, J.; VUČKOVIĆ, D.; MOŽINA, S.S.; SERBEC, V.C.; ZHANG, Q.; ACCETTO, T.; PODGORNIK, A.; PETERKA, M. **Identification and characterisation of new Campylobacter group III phages of animal origin**. FEMS Microbiology Letters, 359(1): 64–71, 2014.

JAVED, M.A.; ACKERMANN, H.W.; AZEREDO, J.; CARVALHO, C.M.; CONNERTON, I.; EVOY, S.; HAMMERL, J.A.; HERTWIG, S.; LAVIGNE, R.; SINGH, A.; SZYMANSKI, C.M.; TIMMS, A.; KROPINSKI, A.M. **A suggested classification for two groups of Campylobacter myoviruses**. Archives of Virology, 159(1): 181–190, 2014.

KNEZEVIC, P.; OBREHT, D.; CURCIN, S.; PETRUSIC, M.; ALEKSIC, V.; KOSTANJSEK, R.; PETROVIC, O. **Phages of *Pseudomonas aeruginosa*: response to environmental factors and *in vitro* ability to inhibit bacterial growth and biofilm formation**. Journal of Applied Microbiology, 111(1): 245–254, 2011.

KROPINSKI, A.M.; ARUTYUNOV, D.; FOSS, M.; CUNNINGHAM, A.; DING, W.; SINGH, A.; PAVLOV, A.R.; HENRY, M.; EVOY, S.; KELLY, J.; SZYMANSKI, C.M. **Genome and proteome of *Campylobacter jejuni***

bacteriophage NCTC 12673. Applied and Environmental Microbiology, 77(23): 8265–8271, 2011.

KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: biology and applications**. CRC Press. 527p, 2005.

LIN, J.; SAHIN, O.; MICHEL, L.O.; ZHANG, Q. **Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni***. 71(8): 4250–4259, 2003.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 1128, 2010.

O'FLYNN, G.; COFFEY, A.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P. **The newly isolated lytic bacteriophages st104a and st104b are highly virulent against *Salmonella enterica***. Journal of Applied Microbiology, 101(1): 251–259, 2006.

OTTOSSON, J.; STENSTRÖM, T.;A. **Growth and reduction of microorganisms in sediments collected from a greywater treatment system**. Letters in Applied Microbiology, 36(3): 168–172, 2003.

ROSSI, L.P.R.; ALMEIDA R.C.C. **Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos**. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 69(2): 151–156, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Purification of bacteriophage λ particles by centrifugation through a glycerol step gradient**. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Spring Harbor Laboratory Press, 3ª edição, 2.52–2.53, 2001.

SHAN, J.; KORBSRISATE, S.; WITHATANUNG, P.; ADLER, N.L.; MARTHA R.J.; CLOKIE, M.R.J.; GALYOV, E.E. **Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen**. Frontiers in microbiology, 5: 599, 2014.

SILVA, D.T.; TEJADA, T.S.; MENEZES, D.B.; DIAS, P.A.; TIMM, C.D. ***Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil**. International Journal of Food Microbiology, 217: 189–194, 2016.

VANBELLE, M. **The use of feed additives in the E.U. Regulations, problems and future**. Eastern Nutrition Conference, Animal Nutrition Association of Canada, Niagara Falls, Ontario, Canadian Poultry, 1999.

CAPÍTULO III

BIOCONTROLE DE *Campylobacter jejuni* EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

RESUMO

O uso indiscriminado de antibióticos na avicultura favoreceu o desenvolvimento de mecanismos de resistência da bactéria *Campylobacter jejuni* a diversos antibióticos, levando à tendência de reduzir o uso de antibióticos em produções animais. Este trabalho teve como objetivo usar um coquetel de bacteriófagos no biocontrole de *C. jejuni* em frangos de corte, para isso foram utilizadas uma estirpe de referência *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) e uma cepa selvagem *C. jejuni* (B12013). Foram empregados um total de 60 frangos da linhagem Cobb, distribuídos em gaiolas metabólicas em um delineamento inteiramente casualizado, com 10 tratamentos e 3 repetições. Os frangos foram inoculados com *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) ou *C. jejuni* (B12013) aos 31 e 32 dias (2 inoculações) via oral. Nos dias 37 a 39 (3 doses) eles foram tratados via oral com soluções contendo o coquetel de fagos $8,47 \pm 0,01 \log_{10}$ UFP·mL⁻¹, o antibiótico enrofloxacina (10 mg·kg) ou uma associação de ambos. CaCO₃ ao 30 % (p/v), foi usado para evitar a inativação dos bacteriófagos pela acidez do trato digestivo dos animais. Foi avaliado o número de *C. jejuni* nas fezes, por 5 dias consecutivos, e em conteúdo cecal após abate (42 dias). Em amostras de fezes foi observada sinergia entre os fagos e o antibiótico apresentando uma redução da cepa de *C. jejuni* (B12313) de 1,08 ciclos logarítmicos e com a cepa *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560), 1,48 ciclos logarítmicos antes do abate. No conteúdo cecal, o tratamento mais eficiente foi o coquetel de bacteriófagos, logrando uma redução do *C. jejuni* (B12313) de 2,58 ciclos logarítmicos, frente ao tratamento com enrofloxacina de 1,67 ciclos logarítmicos, e a mistura de bacteriófagos com o antibiótico 1,35 ciclos logarítmicos. Com o patógeno *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560), os frangos tratados com o coquetel de bacteriófagos, com antibiótico enrofloxacina e a mistura de bacteriófagos com o antibiótico, tiveram uma redução de (2,42; 2,51 e 1,91) ciclos logarítmicos, respectivamente. Os bacteriófagos não levam a uma total redução do *C. jejuni*, mas reduziram a carga bacteriana antes do abate. Na contagem de conteúdo cecal não houve

sinergia entre o coquetel de bacteriófagos e o antibiótico, sendo mais efetivo o uso individual do coquetel de bacteriófagos, ou o antibiótico.

1. INTRODUÇÃO

A microbiota das carcaças de aves podem conter bactérias envolvidas em surtos de doenças veiculadas por alimentos, sendo algumas indicadoras de contaminação fecal, como por exemplo: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Campylobacter* spp. (STEFANI et al., 2014).

Entre as principais causas de doenças veiculadas por alimentos, as infecções pelo gênero *Campylobacter* spp., ganharam notoriedade nos últimos anos, por serem relacionadas ao aumento do número de doenças entéricas em todo o mundo, especialmente para aqueles associados à manipulação, ou consumo de carne de aves (FERRO et al., 2015).

O gênero *Campylobacter* tem chamado a atenção da comunidade científica pela sua resistência aos antibióticos tradicionalmente utilizados como terapia em humanos (FERRO et al., 2015). Sua patogenicidade está associada a complicações pós-infecciosas como artrite reativa, meningite, endocardite, septicemia, síndrome de Guillain-Barré, miocardite, perimiocardites, síndrome de Miller Fisher, encefalopatia, e espondilodiscite. Nos últimos anos a campilobacteriose é considerada a doença de origem alimentar bacteriana mais frequente na Europa, seguida de salmonelose e yersiniose. A taxa de infecção tem sido estimada em entre 20 e 60 pessoas a cada 100.000, por ano (KANDARI, 2013; HESSULF et al., 2016).

No Brasil, apesar da elevada probabilidade da contaminação de *Campylobacter* em lotes de aves e alimentos, não existe um padrão para o controle desse micro-organismo. (SILVA et al., 2016). Porém, estudos estão sendo realizados com o objetivo de reduzir a carga bacteriana antes do abate, e/ou durante o processamento da carcaça, na unidade de abate.

Os bacteriófagos vêm sendo reconhecidos como agentes terapêuticos para o controle de patógenos em produções de gado e aves, representando um potencial no biocontrole de *Campylobacter*. A aplicação de dose única ou misturas de bacteriófagos para o controle de *Campylobacter*, foram estudadas e consideradas eficazes na redução da colonização intestinal de frangos, por *C. jejuni* e *C. coli* (FIRLIEYANTI et al., 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi

avaliar o efeito de bacteriófagos no biocontrole de *C. jejuni* em frangos de corte, de forma isolada e combinado com antibióticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA). Ambos os laboratórios pertencem à Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa (Minas Gerais).

O micro-organismo de referência utilizado como hospedeiro foi *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (IOC/ATCC 33560), INCQS 00642, fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS-FIOCRUZ) no Rio de Janeiro, e a cepa selvagem *C. jejuni* (B12013), proveniente do banco de culturas do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH).

O protocolo de utilização de animais proposto neste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP/UFV), nas normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, Lei nº 11.794 (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação), e seus instrumentos de regulamentação e de acordo com a legislação vigente.

A preparação do experimento obedeceu aos procedimentos de biossegurança, preconizados por Wilson e Chosewood (2015), com vazio sanitário mínimo de 15 dias, com repetição da execução da limpeza e desinfecção de um a dois dias, antes da entrada dos animais.

2.1. Biosseguridade e biossegurança

Os comedouros e bebedouros foram limpos, abastecidos duas vezes ao dia, e foi realizada a limpeza diária das instalações e das bandejas, para evitar a proliferação de insetos.

Para o controle de pragas e roedores nas instalações e ambientes, foram usados produtos como: (Cypermeit® Vansil) como repelente de insetos, tiametoxam (Moscuate Insetimax®) para o controle de moscas, Deltametrina (K-

Othrine® Bayer) para desinsetização de ambientes externos, e Warfarina (Ri-Do-Rato® Rogama) para o controle de roedores.

2.2. Alimentação das aves.

Os frangos receberam água e ração *ad libitum*, desde sua chegada (dia 1) até os 42 dias de idade, momento do abate. Todos os animais receberam dieta basal tipo comercial, sem a adição de antibiótico e de anticoccidianos.

2.3. Recepção e manejo dos pintinhos

Os pintinhos com 1 dia de idade (Figura 1), foram alojados em círculo de proteção para alojamento, preparado previamente com cama nova (serragem), devidamente aquecido a $(31 \pm 1) ^\circ\text{C}$ com campânulas elétricas, e abastecido de água e ração (bebedouros e comedouros manuais). As aves permaneceram no círculo até completarem 24 dias de idade. No dia 1 de idade dos pintinhos avaliou-se a presença/ausência de *C. jejuni*.



Figura 1. Recepção de pintinhos com 1 dia de idade.

2.4. Transferência dos frangos para as gaiolas metabólicas

Após 24 dias de idade, as aves foram transferidas para as gaiolas metabólicas, onde se fez a segunda avaliação de presença/ausência de *C. jejuni*. As gaiolas estavam equipadas com um comedouro do tipo calha linear, e bebedouro automático tipo copinho, instalados na lateral das baterias e um sistema de gaveta, contendo uma bandeja metálica destinada, à coleta de fezes.

2.5. Preparo da suspensão dos micro-organismos

Foram utilizados os micro-organismos *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560), cedido pela FIOCRUZ isolado de fezes de bovino, e o *C. jejuni* (B12013), proveniente do banco de culturas do LAMPOAH, isolado de carcaças de frango (HUNGARO et al., 2015).

O preparo do inóculo de *C. jejuni* foi realizado, adicionando-se 0,5 mL do micro-organismo previamente ativado em um tubo com 5 mL de caldo TSB (HIMEDIA®) e incubando-se a 42 °C por 24 h, em atmosfera microaerófila (5 % O₂, 10 % CO₂, 2 % H₂, e 83 % N₂). Subculturas foram realizadas em dois dias sucessivos, transferindo 0,5 mL em caldo TSB. Foi realizada uma terceira subcultura, transferindo 0,5 mL para um tubo contendo 5 mL de caldo seletivo Bolton (HIMEDIA), suplementado com vancomicina (10 mg) (Vancomycin Supplement, Fluka®), e incubados a 42 °C por 24 h, em atmosfera microaerófila. Do caldo Bolton foi estriado por esgotamento uma alçada em Columbia Blood Agar Base (HIMEDIA), suplementado com cefoperazone (16 mg) e amphotericina B (5 mg) (CCDA Selective Supplement (Fluka®)), e incubado a 42 °C, por 48 h em atmosfera microaerófila. Finalmente, foi inoculada uma colônia em caldo TSB a 42 °C em atmosfera microaerófila por 24 h, até atingir leitura de densidade ótica de 0,35 a (600 nm), o que corresponde a 10⁸ UFC·mL⁻¹.

As duas culturas foram diluídas independentemente até a concentração de 10⁶ UFC·mL⁻¹, e administradas aos frangos em seus respectivos tratamentos. Foi feito o controle por inoculação em placas de Petri, contendo o meio Columbia Blood Agar Base (HIMEDIA), suplementado usando-se o método de espalhamento em superfície.

2.6. Propagação e titulação do coquetel de bacteriófagos

Foram misturados em microtubos 500 µL de *C. jejuni* em fase logarítmica, 100 µL de cada bacteriófago, e incubados a 42 °C por 15 min, em atmosfera microaerófila sob agitação no shaker, para permitir que o bacteriófago se adsorvesse na membrana da bactéria (CARRILLO et al., 2007). A mistura foi plaqueada usando a técnica de sobrecamada em ágar. As placas foram incubadas a 42 °C, por 24 h, em atmosfera microaerófila. Após este período, adicionou-se 5 mL de solução tampão SM, e incubou-se a 17 °C sob agitação

(100 rpm), por 24 h. A solução recuperada foi centrifugada a 8600·g por 10 min, filtrada em membrana hidrofílica de PVDF de 0,22 µm (Millex®), e diluídos em série com solução tampão SM. Também foi determinada a concentração (UFP·mL⁻¹) dos bacteriófagos, pela técnica de sobrecamada em ágar (CARRILLO et al., 2005). Esse procedimento foi repetido até atingir a concentração de 10⁸ UFP·mL⁻¹.

2.7. Delineamento experimental

Um total de 60 frangos da linhagem Cobb, com 24 dias de idade e peso médio de 1,122 g, foram distribuídos em gaiolas metabólicas em um delineamento inteiramente casualizado, com 10 ensaios e 3 repetições, sendo que cada gaiola foi considerada como uma unidade experimental (Figura 2).

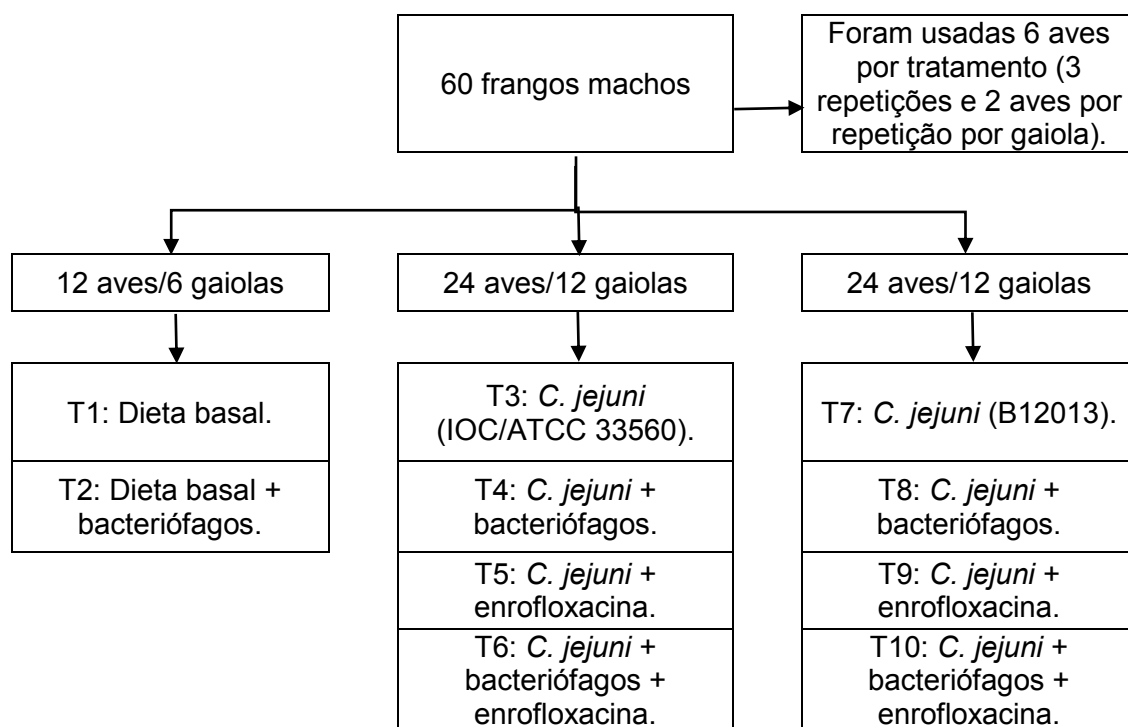


Figura 2. Fluxograma da distribuição dos ensaios para a avaliação do controle de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560), e *C. jejuni* (B12013), em frangos de corte.

Foi utilizada a metodologia proposta por Hammerl et al. (2014), com algumas adaptações. A fase experimental iniciou-se a partir do dia 31 de vida do animal até a etapa de terminação, que foi no dia 42 (Figura 3).

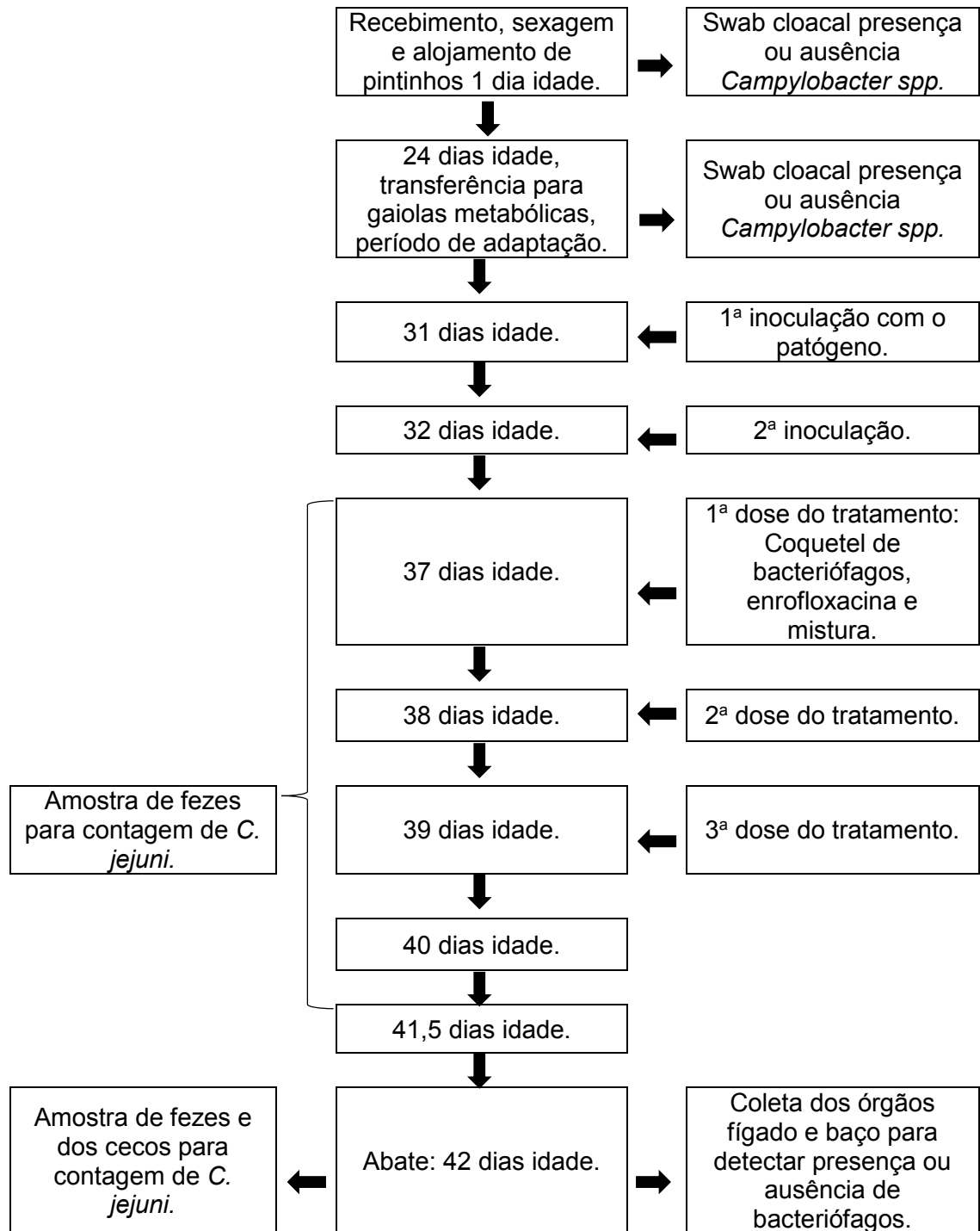


Figura 3. Fluxograma do cronograma para o controle de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) e *C. jejuni* (B12013) em frangos de corte.

O grupo de animais T1 foi o controle negativo, e não recebeu nenhum tipo de tratamento, apenas dieta basal.

Todas as inoculações de *C. jejuni* e bacteriófagos foram realizadas de forma individualizada, sendo administrada com auxílio de seringa de 1 mL, via oral.

As inoculações com o patógeno foram de 10^6 UFC·mL⁻¹, nos tratamentos contendo o coquetel de bacteriófagos foram de 10^8 UFP·mL⁻¹, em solução de tampão SM com carbonato de cálcio (CaCO₃) a 30 % (p/v) (ATTERBURY et al., 2007), para evitar a inativação dos bacteriófagos pela acidez do trato digestivo dos animais. O tratamento com enrofloxacina foi na razão de 10 mg·Kg de peso vivo. O micro-organismo de referência e a cepa selvagem foram suspensas em solução tampão fosfato salina (PBS) e diluídos até a dose de inoculação (10^6). Nos dias 31 e 32 de idade, os animais dos grupos (T3, T4, T5 e T6) foram administrados 1 mL de PBS por via oral contendo $6,46 \pm 0,11 \log_{10}$ UFC·mL⁻¹ de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) e os animais dos grupos (T7, T8, T9 e T10) foram administrados 1 mL de PBS por via oral contendo $6,62 \pm 0,30 \log_{10}$ UFC·mL⁻¹ de *C. jejuni* (B12013). Cinco dias após a infecção, durante três dias consecutivos (aos 37, 38 e 39 dias de idade dos frangos) foram administrados os tratamentos.

Os animais dos ensaios T2, T4 e T8 receberam doses de 1 mL do coquetel de bacteriófagos em solução SM com CaCO₃ a 30 % (p/v), contendo $8,47 \pm 0,01 \log_{10}$ UFP·mL⁻¹ (Figura 4).



Figura 4. Inoculação do coquetel de bacteriófagos à concentração de 10^8 UFP·mL⁻¹

Os animais dos ensaios T5 e T9 foram tratados com enrofloxacina, que foi ministrada na dose de 10 mg·kg de peso vivo, seguindo as recomendações do fabricante. O antibiótico foi ministrado por 3 dias consecutivos.

Os animais dos tratamentos T6 e T10 foram tratados com de 1 mL do coquetel dos bacteriófagos em solução SM, com CaCO₃ a 30 % (p/v), contendo $8,47 \pm 0,01 \log_{10}$ UFP·mL⁻¹, e 90 min depois, com 1 mL de antibiótico. O tempo de espera foi para evitar que os íons de cálcio apresentaram quelação da enrofloxacina (SUMANO E OCAMPO, 2006).

No dia 42 (etapa de terminação), os frangos foram abatidos após serem insensibilizados por método elétrico (eletronarcole) seguido de exsanguinação imediata, conforme Instrução Normativa n° 3 de 17/01/2000 (Brasil, 2000).

2.8. Coleta de amostras e abate dos animais

2.8.1. Coleta de amostras para análise microbiológica

Foram coletadas amostras de swabs cloacal para confirmar a presença ou ausência de *C. jejuni* no dia 1, durante o recebimento dos pintinhos, e no dia 24 de idade das aves, durante o traslado para as gaiolas metabólicas.

Após o quinto dia de inoculação do patógeno (dia 37 de idade das aves) antes de iniciar os tratamentos, foram coletadas amostras de fezes para determinar a contagem de *C. jejuni*. A partir daí foram analisadas amostras a cada 24 horas até o dia 42 de idade das aves.

Depois de abatidos os frangos, foram coletados os cecos para o mesmo fim. As amostras foram coletadas assepticamente, armazenados em sacos (Whril- Pack) a ± 4 °C (Bio-Freezer, Forma Scientific) até serem analisadas (Figura 5).



Figura 5. Coleta de amostras para análises microbiológicas. (A) cecos para contagem de *C. jejuni*, (B) de baço e (C) de fígado, para análise de translocação de bacteriófagos.

O baço e o fígado dos animais foram removidos para avaliar a translocação de bacteriófagos. As amostras foram coletadas assepticamente, armazenados em sacos (Whril- Pack) a ± 4 °C (Bio-Freezer, Forma Scientific) (Figura 5).

2.9. Métodos de análise microbiológica

2.9.1. Frangos livres de *C. jejuni*

Para detecção do patógeno *C. jejuni* nos frangos, foram realizados *swabs* cloacais no primeiro e vigésimo quarto dia de idade das aves. Os *swabs* foram incubados a (37 ± 1) °C por 4 h, em atmosfera microaerófila, em tubos esterilizados, contendo 5 mL de caldo Bolton (HIMEDIA), com 5 % de sangue desfibrinado de cavalo, e suplementado com vancomicina (10 mg) (Vancomycin Supplement, Fluka®). Depois foram incubados a 42 °C por 48 h, em atmosfera microaerófila. De cada tubo foram inoculadas alíquotas de 100 µL em placas de Petri contendo Columbia Blood Agar Base (HIMEDIA), com 5 % de sangue desfibrinado de cavalo, e suplementado com cefoperazone (16 mg) e amphotericina B (5 mg) (CCDA Selective Supplement, Fluka®), usando-se o método de espalhamento em superfície, incubado a 42 °C por 48 h, em atmosfera microaerófila. Os resultados foram expressos como presença/ausência de *Campylobacter* spp.

2.9.2. Contagem de *C. jejuni*

Para detecção do patógeno em fezes a partir do dia 37 de idade das aves, e em conteúdo cloacal no dia de abate. Foram pesadas 1 g de amostras de fezes e de conteúdo cloacal. A pós serem e foram homogeneizadas em 9 mL de solução tampão fosfato salina (PBS) (1:9) e feitas as diluições decimais seriadas, alíquotas de 100 µL foram inoculadas em placas de Petri, contendo meio Columbia Blood Agar Base (HIMEDIA), com 5 % de sangue desfibrinado de cavalo e suplementado com cefoperazone (16 mg) e amphotericina B (5 mg) (CCDA Selective Supplement, Fluka®), usando-se o método de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 42 °C por 48 h, em atmosfera microaerófila. Os resultados foram expressos como UFC·g⁻¹ *C. jejuni* e convertidos em escala logarítmica (log₁₀ UFC·g⁻¹).

2.9.3. Determinação de presença ou ausência de bacteriófagos nos tecidos

Utilizou-se a metodologia adaptada de Atterbury et al. (2005). Um grama de cada órgão foi pesado individualmente em balança analítica (Shimadzu, AUY220) e transferido a tubos de plástico de 50 mL, contendo 10 mL de TSB (HIMEDIA®), com 1 mL de *C. jejuni* em fase logarítmica (10^8 UFC·mL⁻¹). A mistura foi mantida sob agitação (Solab, SL 221) a 100 rpm, durante 24 h a 42 °C, em atmosfera microaerófila (5 % O₂, 10 % CO₂, 2 % H₂, e 83 % N₂). Após este período, as amostras foram centrifugadas (Sigma, 3K30, ROTOR 12111H) a 8.600·g por 10 min, e posteriormente filtradas em membrana hidrofílica de PVDF de 0,22 µm (Millex®).

Foi avaliada a presença ou ausência de bacteriófagos utilizando a técnica de microgotas. Para isso, 5 mL de ágar TSA sobrecamada (TSB mais 0,7 % de ágar-Difco™) foram fundidos a 48 °C e misturados com 500 µL de solução contendo *C. jejuni* em fase logarítmica, e logo vertidos em placas de Petri contendo ágar TSA base (TSB, adicionado de 1,2 % de ágar-Difco™). Após a solidificação, 10 µL dos filtrados contendo os bacteriófagos foram inoculados sobre o ágar na forma de microgotas, e incubados durante 24 h a 42 °C, em atmosfera microaerófila. A presença de bacteriófagos foi avaliada mediante a observação de formação de placas de lise (zonas translúcidas) e Os resultados foram expressos como presença/ausência de bacteriófagos.

2.10. Análise estatística

Os dados foram analisados com um delineamento inteiramente casualizado, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5 % de probabilidade. Os resultados foram expressos em UFC·g⁻¹ de *C. jejuni*, e convertidos em escala logarítmica (\log_{10} UFC·g⁻¹). Para a análise estatística foi utilizado o software R versão 3.3.1, pacote de dados ExpDes, (The R Foundation, Vienna, Austria).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dias 1 e 24, as aves não apresentaram sinais compatíveis com problemas entéricos. As amostras de *swabs* analisadas não apresentaram colônias típicas de *Campylobacter* spp.

No trigésimo primeiro dia foi feita a primeira inoculação com *Campylobacter*. Após 24 horas (32º dia de idade), todos os animais inoculados com *C. jejuni* nos ensaios (T3 até T10) apresentaram diarreia ou fezes úmidas com presença de mucosa, ou com pontos de sangue (Figura 6).



Figura 6. Coleta das amostras de fezes para contagem de *C. jejuni* com presença de sangue e mucosa, nas fezes das aves.

A partir do dia 39 a diarreia foi intermitente, com ou sem presença de mucosa nos ensaios que receberam os tratamentos com coquetel de bacteriófagos, enrofloxacina e a associação de bacteriófagos com enrofloxacina.

Nos tratamentos T3 e T7, a diarreia com presença de mucosa foi contínua até o dia 42 de idade. As aves apresentaram estertores respiratórios 24 h após a segunda inoculação (dia 33 de idade) com o patógeno *C. jejuni* (B12013), e os ruídos respiratórios foram mantidos até o dia 42.

Na necropsia foram encontrados sinais clínicos de doença infecciosa com distensão intestinal do duodeno e dos cecos, colapso da parede intestinal, petequias generalizadas dentro e fora do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de todas as aves que receberam os patógenos *C. jejuni* (B12013) e *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) (Figura7).

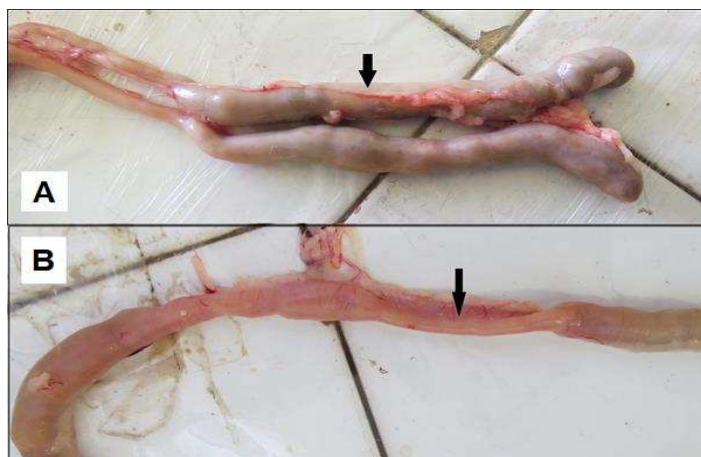


Figura 7. Intestino com colapso da parede intestinal e presença de petéquias. (A). Ceco com distinção com presença de gases (B).

Entre as aves avaliadas, só três apresentaram fígado com partes esbranquiçadas, e com presença de necroses distal no tratamento T7 (Controle positivo) (Figura 8).

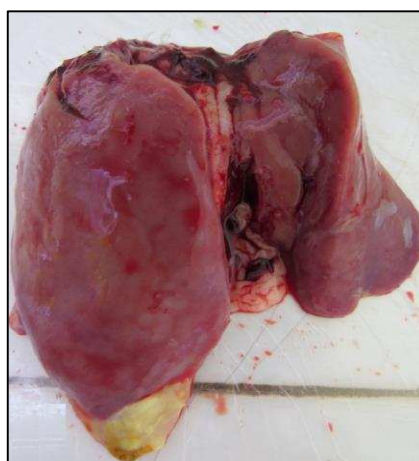


Figura 8. Fígado com presença de necrose distal.

Para as aves do tratamento T1 (controle negativo + dieta basal) e T2 (só bacteriófago + dieta basal), foram analisadas amostras de fezes durante os 5 dias experimentais. Em ambos tratamentos as aves não apresentaram sinais clínicos evidentes, e tampouco foram evidenciados problemas no trato gastrointestinal. Isto comprova que os bacteriófagos não apresentam perigo para as aves, e apenas têm espectro de ação sob as bactérias.

Nas aves inoculadas com a cepa *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) não foram detectados problemas respiratórios, nem problemas no fígado.

A comprovação da enfermidade verificada no estudo também foi descrita por Calnek (1990), que apresenta como principal alteração relacionada com a infecção por *C. jejuni* em frangos, a distensão do sistema intestinal, iniciando-se a partir do duodeno distal, até à bifurcação dos cecos, ocorrendo acúmulo de muco e fezes aquosas.

Os sinais e patologias nas aves foram provavelmente produzidos pelo patógeno, o que superou o sistema imune das aves. A patologia foi mais evidente nas aves contaminadas com a cepa que foi isolada de carcaças de aves (*C. jejuni* (B12013)) quando comparada com as aves contaminadas com a cepa cujo isolamento foi de fezes de bovino (*C. jejuni* (IOC/ATCC 33560)).

Assim pode-se observar que a origem da cepa usada para a contaminação das aves teve importância na ocorrência da doença.

3.1 Análises microbiológicas de amostras de fezes

Os resultados da contagem de *C. jejuni* (B12013) em fezes nos diferentes tratamentos avaliados, são mostrados na figura 9.

A inoculação do patógeno nos ensaios foi de 10^6 UFC·mL⁻¹, administrada em dois dias consecutivos (31 e 32 dias de idade).

No 37° dia, imediatamente antes de serem administrados os tratamentos, foram coletadas amostras de fezes em todos os ensaios, e observou-se o aumento de 1,12 ciclos logarítmico na contagem de *Campylobacter*, em relação ao inóculo administrado. O crescimento foi similar entre os tratamentos, não havendo diferença significativa. No 38° dia, observou-se que o tratamento T6 apresentou redução do patógeno em 1,15.

A contagem de *C. jejuni* no controle positivo (T3) mostrou crescimento do patógeno até o dia 39, com contagem de $9,95 \log_{10}$ UFC·g⁻¹. Apenas após este dia, o sistema imune da ave foi capaz de debelar a infecção, reduzindo a contagem no dia 42 a 8,20 UFC·g⁻¹.

A contagem do patógeno nas fezes das aves que receberam o antibiótico (T5) seguiu o mesmo comportamento, diferindo apenas na contagem máxima alcançada no dia 39 de 9,04 UFC·g⁻¹. No dia 42 a contagem foi de 7,99 UFC·g⁻¹.

Pode-se observar que o antibiótico controlou o patógeno após a administração da terceira dose. Entre ser administrada a primeira dose e terceira, o antibiótico foi capaz de retardar o crescimento do patógeno, mas apenas após a terceira dose, houve redução da contagem.

Na associação do coquetel de bacteriófagos com o antibiótico (T6), a contagem no dia 39 foi de 8,11 UFC·g⁻¹, seguida de redução até o dia 42, resultando em uma contagem de 7,12 UFC·g⁻¹.

As aves que receberam coquetel de bacteriófagos (T4) apresentaram contagem no dia 39 de 7,85 UFC·g⁻¹, e contagem de 7,67 UFC·g⁻¹, no dia 42.

Pode-se observar que logo após serem administrados os tratamentos T4 (coquetel de bacteriófagos) e T6 (associação), durante todo o experimento a contagem foi mantida constante, não havendo crescimento expressivo do patógeno.

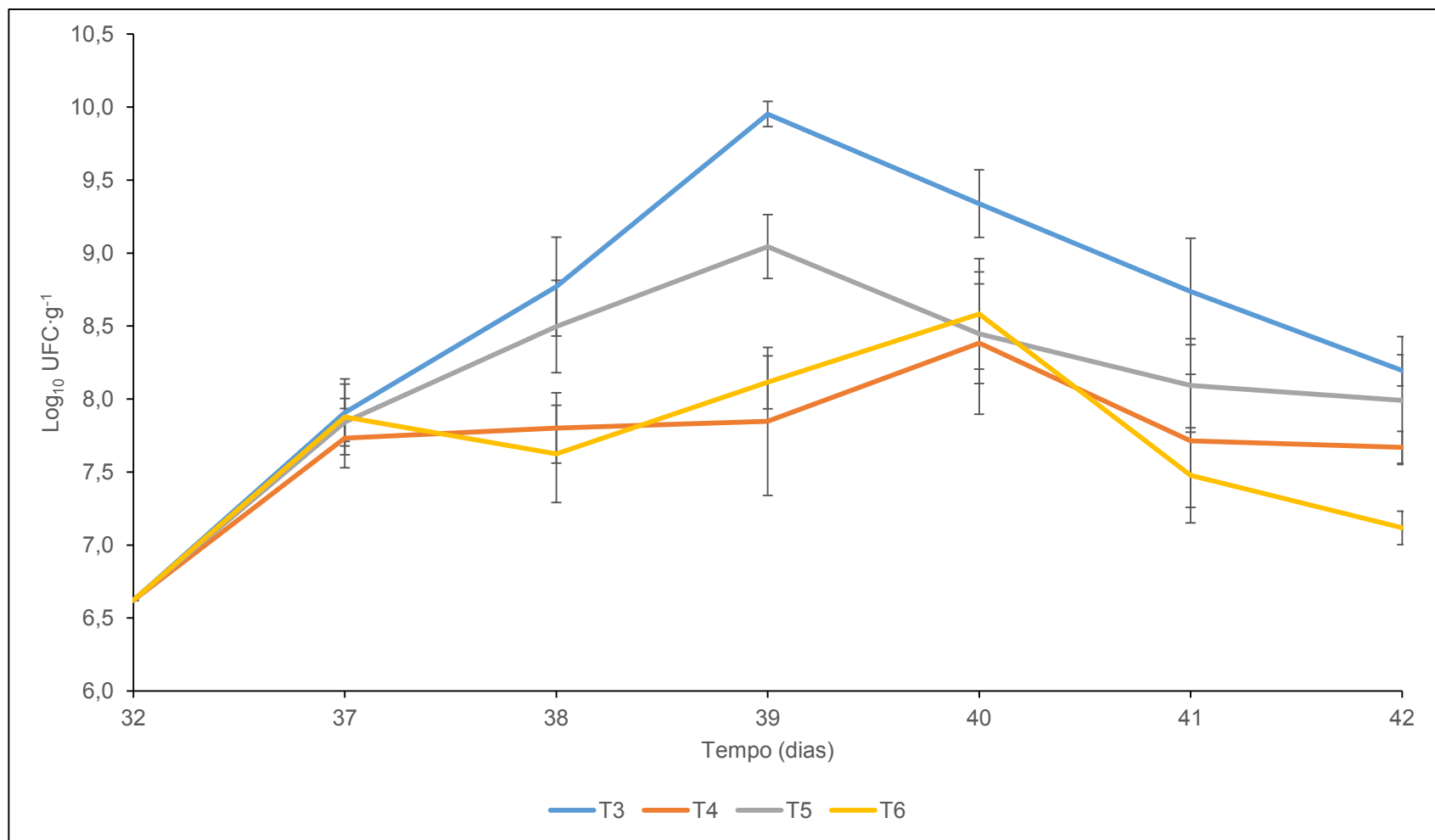


Figura 9. Contagem de *C. jejuni* (B12013) em fezes de frangos submetidos a diferentes tratamentos. T3: Controle positivo, T4: *C. jejuni* + bacteriófagos. T5: *C. jejuni* + enrofloxacina. T6: *C. jejuni* + bacteriófagos + enrofloxacina.

Ao se comparar o efeito dos tratamentos sobre o patógeno *C. jejuni* no dia 42, observou-se que o T6 (associação) foi o tratamento que apresentou redução do patógeno em 1,08 ciclos logarítmicos, mostrando que houve sinergia entre os bacteriófagos e o antibiótico. Nos tratamentos T4 (coquetel) e T5 (antibiótico), lograram controlar o patógeno em 0,53 e 0,21 ciclos logarítmicos, respectivamente. Apesar da variação, o controle positivo (T3) e os tratamentos T4 e T5 foram consideradas iguais ao nível de significância de 5 %. (Quadro 1).

Quadro 1. Médias de contagem de *C. jejuni* (B12013) em fezes no 42° dia.

TRATAMENTOS	CONTAGEM* ($\text{Log}_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$)
T3 (controle positivo)	8,20 ^a ± 0,11
T4 (coquetel de bacteriófagos)	7,67 ^{ab} ± 0,11
T5 (enrofloxacina)	7,99 ^a ± 0,44
T6 (associação coquetel e antibiótico)	7,12 ^b ± 0,11

*Médias de contagem de *C. jejuni* (B12013) ($\text{Log}_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$), acompanhadas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %.

Os resultados da contagem de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) em fezes nos diferentes tratamentos avaliados, são mostrados na figura 10.

Nos dias 31 e 32, foram inoculados os animais com o patógeno *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560), na concentração de $10^6 \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$.

No dia 37 e 38 foram avaliados os tratamentos e a avaliação não apresentou diferença significativa pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 % entre os tratamentos.

A contagem do patógeno no controle positivo (T7) apresentou no dia 39 crescimento do patógeno com contagem de $9,66 \text{log}_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$, contagem superior a qualquer outro tratamento. No dia 42 observou-se uma contagem de $8,70 \text{log}_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$. É provável que esta redução do patógeno seja pela ação do sistema imune das aves avaliadas.

A contagem de *C. jejuni* no tratamento T9 (antibiótico) apresentou uma contagem de $8,04 \text{log}_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ no dia 39, e uma contagem de $7,64 \text{log}_{10} \text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$, no dia 42.

Observou-se que o antibiótico controla o patógeno após ser administrada a segunda dose. No entanto, no dia 40 após a terceira dose, o patógeno tem um aumento na contagem de $8,45 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$.

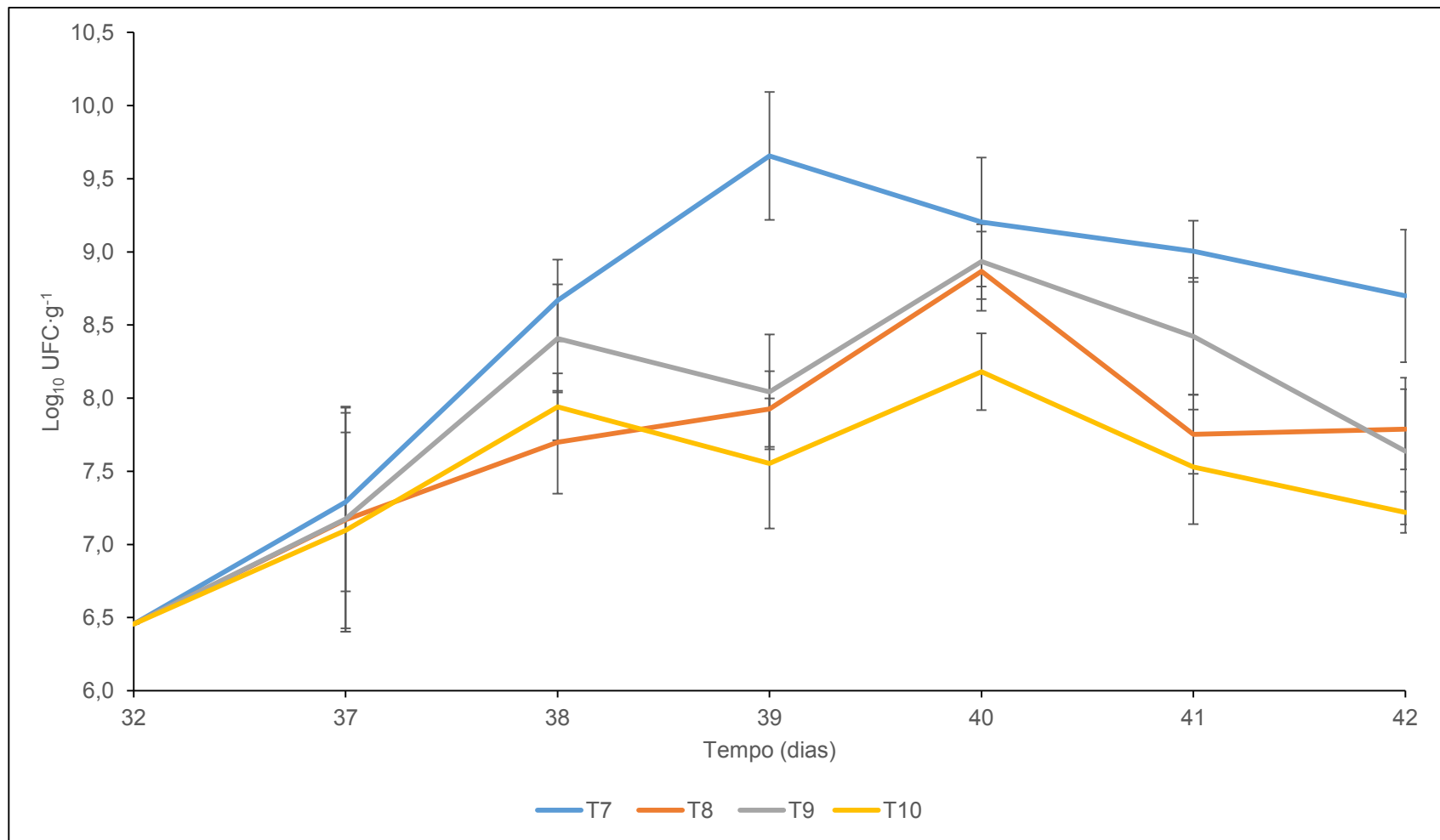


Figura 10. Contagem de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) em fezes de frangos submetidos a diferentes tratamentos. T7: Controle positivo, T8: *C. jejuni* + bacteriófagos, T9: *C. jejuni* + enrofloxacina, T10: *C. jejuni* + bacteriófagos + enrofloxacina.

Nas aves que receberam o tratamento T8 (coquetel de bacteriófagos) a contagem no dia 39 foi de 7,93 log₁₀ UFC·g⁻¹, seguido de controle até o dia 42, com uma contagem de 7,79 log₁₀ UFC·g⁻¹.

A contagem do *C. jejuni* nas fezes das aves que receberam o tratamento T10 (associação) foi de 7,55 log₁₀ UFC·g⁻¹ no dia 39, e no dia 42, de 7,22 log₁₀ UFC·g⁻¹.

Os tratamentos T8 (coquetel de bacteriófagos) e T10 (associação) conseguiram controlar o crescimento do patógeno após a primeira dose. No entanto, depois da terceira dose, o tratamento T8 no dia 42, houve um crescimento significativo do patógeno, e o tratamento T10 controlou de maneira significativa o patógeno, mostrando que houve sinergia entre os bacteriófagos e o antibiótico.

Ao se comparar o efeito dos tratamentos sobre o patógeno *C. jejuni*, no dia 42 de idade, quando comparado com o controle positivo do mesmo dia, observou-se no tratamento T10 (associação) uma redução de 1,48 ciclos logarítmicos. Os tratamentos T8 (coquetel de bacteriófagos) e T9 (antibiótico) apresentaram um efeito de controle do patógeno com 0,91 e 1,06 ciclos logarítmicos, respectivamente. Apesar da variação, os tratamentos T4 e T5, quando comparados com o controle positivo (T7), foram consideradas iguais ao nível de significância de 5 %. (Quadro 2).

Quadro 2. Médias de contagem de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) em fezes no 42° dia.

TRATAMENTOS	CONTAGEM* (Log ₁₀ UFC·g ⁻¹)
T7 (controle positivo)	8,70 ^a ± 0,45
T8 (coquetel de bacteriófagos)	7,79 ^{ab} ± 0,27
T9 (enrofloxacina)	7,64 ^{ab} ± 0,50
T10 (associação coquetel e antibiótico)	7,22 ^b ± 0,14

*Médias de contagem de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) (Log₁₀ UFC·g⁻¹), acompanhadas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %.

Em um estudo realizado por Carvalho et al. (2010), foram administrados por via oral um coquetel de bacteriófagos capaz de reduzir *C. jejuni* nas fezes

em até $2 \log_{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$. Esta redução persistiu durante todo o período experimental.

O antibiótico enrofloxacina é parcialmente metabolizado no fígado a ciprofloxacina, eles entram na célula por poros e se acumulam rapidamente dentro das bactérias. Algumas bactérias são capazes de impedir a entrada dos antibióticos dependente do sistema de transporte de energia, mas a eficiência depende da concentração das fluoroquinolonas (SUMANO e GUTIÉRREZ, 2000; SUMANO e OCAMPO, 2006).

Sørensen et al. (2015) indicaram que a ligação de um bacteriófago ao *C. jejuni* se produz mediante o reconhecimento dos receptores: polissacarídeos capsulares (CPS) e as proteínas do flagelo, como a proteína FlaAB. Isto sugere que a sinergia entre o *Campylobacter* e o antibiótico enrofloxacina é factível, devido a não competirem pelos mesmos receptores de membrana, dado que a enrofloxacina não precisa de receptores celulares, senão de poros de membrana, e os bacteriófagos requerem proteínas da cápsula e dos flagelos.

3.2 Análise microbiológica de amostras do ceco

Os resultados da contagem de *C. jejuni* (B12013) no ceco de aves, submetidas aos diferentes tratamentos, são mostrados na Figura 11.

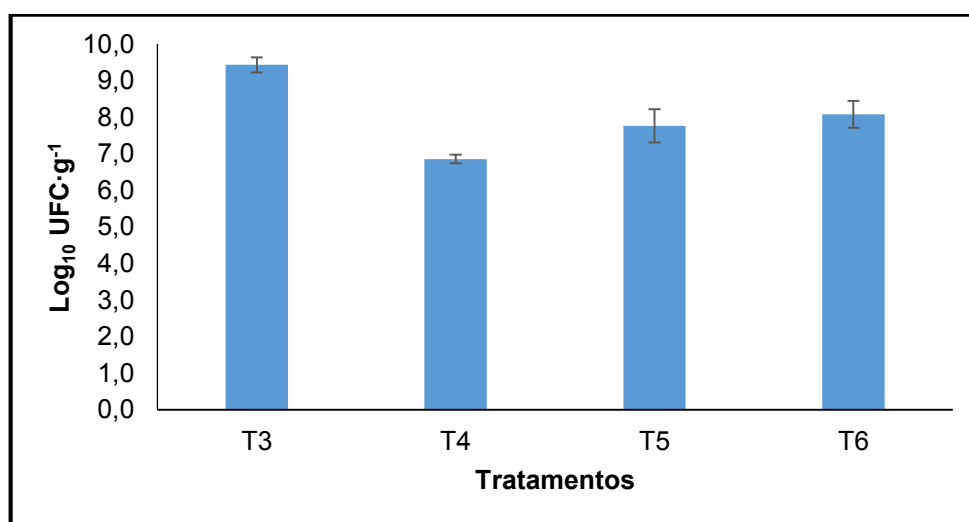


Figura 11. Média da contagem de *C. jejuni* (B12013) em ceco de frangos submetidos a diferentes tratamentos. T3: Controle positivo, T4: *C. jejuni* + bacteriófagos. T5: *C. jejuni* + enrofloxacina. T6: *C. jejuni* + bacteriófagos + enrofloxacina.

Aos 42 dias de idade o patógeno chegou à contagem de $9,43 \log_{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ no controle positivo, aumentando em 3,43 ciclos logarítmicos na contagem de *C. jejuni*, em relação ao inóculo administrado (Quadro 3).

O tratamento T5 não diferiu estatisticamente dos tratamentos T4 e T6 em nível de significância de (5 %), no dia 42.

Quadro 3. Médias de contagem de *C. jejuni* (B12013) em ceco no 42° dia.

TRATAMENTOS	CONTAGEM* ($\text{Log}_{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$)
T3 (controle positivo)	$9,43^a \pm 0,20$
T4 (coquetel de bacteriófagos)	$6,85^c \pm 0,12$
T5 (enrofloxacina)	$7,76^{bc} \pm 0,46$
T6 (associação coquetel e antibiótico)	$8,08^b \pm 0,36$

*Médias de contagem de *C. jejuni* (B12013) ($\text{Log}_{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$), acompanhadas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %.

O tratamento com o coquetel de bacteriófagos (T4) apresentou maior redução do patógeno com 2,58 ciclos logarítmicos, seguido pelos tratamentos com enrofloxacina (T5) com $1,67 \log_{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$, e a mistura de bacteriófagos com o antibiótico (T6) com 1,35 ciclos logarítmicos.

Os resultados da contagem de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) em ceco nos diferentes tratamentos avaliados, são mostrados na Figura 12.

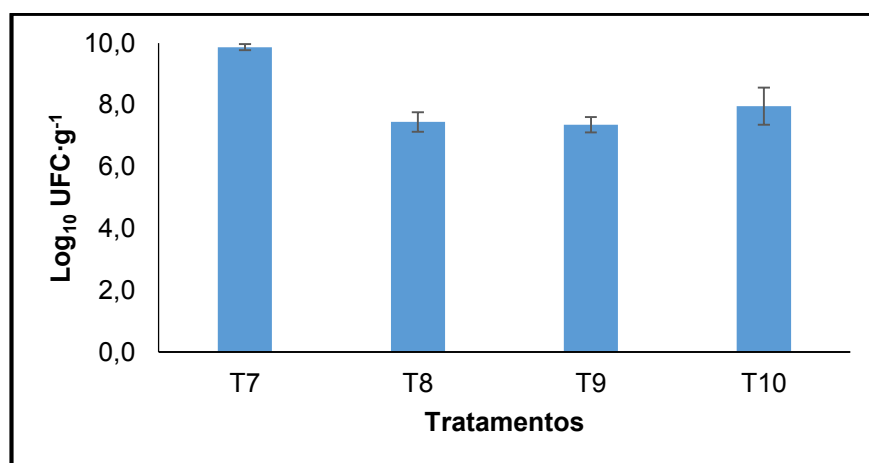


Figura 12. Contagem de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) em fezes submetidas a diferentes tratamentos. T7: Controle positivo, T8: *C. jejuni* + bacteriófagos, T9: *C. jejuni* + enrofloxacina, T10: *C. jejuni* + bacteriófagos + enrofloxacina.

No dia 42 de idade, o patógeno chegou à contagem de $9.87 \log_{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ no tratamento T3, com um aumento de 3,87 ciclos logarítmicos, com relação ao inóculo administrado.

Os tratamentos T8, T9 e T10 não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância, observando-se uma contagem de (7,449; 7,361 e 7,961) $\log_{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente aos 42 dias (quadro 4).

Quadro 4. Médias de contagem de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) em ceco no 42° dia.

TRATAMENTOS	CONTAGEM* ($\text{Log}_{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$)
T7 (controle positivo)	$9,87^a \pm 0,10$
T8 (coquetel de bacteriófagos)	$7,45^b \pm 0,32$
T9 (enrofloxacina)	$7,36^b \pm 0,25$
T10 (associação coquetel e antibiótico)	$7,96^b \pm 0,60$

*Médias de contagem de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) ($\text{Log}_{10} \text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$), acompanhadas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %.

Nas aves tratadas com antibiótico (T9), a contagem reduziu em 2.51 ciclos logarítmicos, seguida do tratamento com o coquetel de bacteriófagos (T8), com redução de 2.42 ciclos logarítmicos. Já o tratamento com o coquetel de bacteriófagos e antibiótico (T10) apresentou uma redução de 1,91 ciclos logarítmicos após abate.

Em contraste, Wagenaar et al. (2005) observaram uma redução de 1,5 ciclos logarítmicos inicial, e 3,0 ciclos logarítmicos antes do abate no conteúdo cecal. Carrillo et al. (2005), depois de infectarem experimentalmente frangos com 25 dias de idade, encontraram uma redução entre 0,5 e 5 ciclos logarítmicos de conteúdo cecal, após o tratamento com bacteriófagos. O estudo realizado por Fischer et al. (2013), demonstrou que em pintinhos de seis dias de idade, infectados com *Campylobacter*, a carga bacteriana foi permanentemente reduzida, ao usar um coquetel de bacteriófagos nas quatro semanas após o tratamento, e atingiu um máximo de 2,8 ciclos logarítmicos.

Assis (2016) realizou um experimento onde administrou enrofloxacina em frangos de corte nos dias 32 até o dia 34 de idade, encontrando no grupo de

animais tratados com enrofloxacin, as maiores concentrações de resíduos deste medicamento e de seu metabólito, ciprofloxacina, durante os dias de tratamento e até dois dias após o término deste.

Neste contexto, após três dias da terceira dose de enrofloxacin, encontrou-se redução mas não eliminação do patógeno nos cecos. Isto possivelmente devido à baixa disponibilidade do antibiótico no organismo do animal, ou à resistência ao antibiótico enrofloxacin e seu metabólito ativo a ciprofloxacina, gerada pelas cepas de estudo de *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) e *C. jejuni* (B12013).

Estudos têm demonstrado que o tratamento de aves com fluoroquinolonas como a enrofloxacin, pode levar à redução na susceptibilidade desses antibiótico aos micro-organismos como o *Campylobacter* spp. (RANDALL et al., 2016). Panzenhagen et al. (2016) encontraram contaminação de carcaças de frango com *Campylobacter* que foram resistentes aos antibióticos ciprofloxacina e enrofloxacin no estado de Rio de Janeiro.

3.3. Análise de presença ou ausência de bacteriófagos nas amostras dos órgãos

Foram coletados os órgãos fígado e baço para avaliar a translocação dos bacteriófagos nestes órgãos (Quadro 5).

Quadro 5. Avaliação da translocação dos bacteriófagos em fígado e baço.

TRATAMENTO		ÓRGÃOS	
		FÍGADO	BAÇO
T2	Coquetel	-	-
T3	Cj ¹	-	-
T4	Cj ¹ + F	+	-
T6	Cj ¹ + Enr + F	-	+
T7	Cj ²	-	-
T8	Cj ² + F	+	+
T10	Cj ² + Enr + F	+	+

(-) Resultado de lise negativo; (+) Resultado de lise positivo; (Cj¹) *C. jejuni* (B12013); (Cj²) *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560); (Enr) enrofloxacin; (F) coquetel de bacteriófagos.

Evidenciou-se a presença de bacteriófagos no fígado nos tratamentos (T4, T8, T10), e no baço nos tratamentos (T6, T8, T10). Observou-se ausência de bacteriófagos no tratamento que recebeu só bacteriófagos sem infecção com o patógeno.

Os bacteriófagos são residentes normais no lúmen intestinal e podem passar a parede do intestino mediante a translocação, para a sangue e os órgãos. Isso provavelmente é devido a receptores localizados no capsídeo dos bacteriófagos que são reconhecidos pelos enterócitos e devido à interação fágica com células do sistema imune (GÓRSKI et al., 2006).

Possivelmente, as bactérias de *C. jejuni* infectadas com os bacteriófagos, sirvam de transporte para os bacteriófagos através dos vasos linfáticos, permitindo a translocação para órgãos como o fígado e o baço. Firleyanti et al. (2016) descreveram o caminho linfático como a principal via de translocação, comparado com o sistema venoso. Os estudos *in vitro*, que demonstraram o uso de *Campylobacter*, indicam que o patógeno pode translocar através da passagem transcelular dos enterócitos, ou mediante rotas paracelulares, através das junções apertadas das células intestinais.

4. CONCLUSÕES

Frangos infectados por *C. jejuni* (IOC/ATCC 33560) e *C. jejuni* (B12013) apresentaram sinais clínicos, os quais foram mais evidentes naqueles infectados pela cepa selvagem isolada de aves do que a cepa de referência foi isolada de bovino, confirmando as teorias de que possa existir linhagens de *C. jejuni* específicas para cada hospedeiro.

A administração dos bacteriófagos não eliminou completamente o patógeno nos frangos, porém apresentou um efeito significativo, que permitiu diminuir o perigo de contaminação da carne após abate dos frangos, e com isso diminuição da probabilidade na contaminação da carcaça.

O uso de bacteriófagos não causou sintomas de doença nas aves, isso reforça a ideia de que os bacteriófagos são específicos para o controle bacteriano.

O consumo de carne de frango contaminada com cepas de *Campylobacter jejuni* resistente a enrofloxacina pode-se transformar em um problema a nível de saúde pública, gerando resistência às fluoroquinolonas que são de uso comum na medicina humana.

Os mecanismos de translocação dos bacteriófagos necessitam de mais estudos para avaliar a forma de ação dos bacteriófagos em animais.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O uso de bacteriófagos para a diminuição de *C. jejuni* antes do abate dos frangos, se mostrou uma ferramenta útil no biocontrole desse patógeno. O uso de bacteriófagos pode representar uma redução nos custos de produção de aves, uma vez que com o uso de antibióticos deve-se respeitar um período de carência para o abate e consumo das aves. A interação dos bacteriófagos com a enrofloxacina reduziu o patógeno, mas não eliminou completamente. Entretanto, pesquisas devem ser feitas para conhecer a interação dos bacteriófagos com outros tipos de antibióticos.

Estudos complementares, como a análise das sequências dos genomas dos bacteriófagos, devem ser realizados para a aplicação segura dos bacteriófagos, no controle de *C. jejuni*, na cadeia produtiva de frangos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, D.C.S.; Silva, G.R.; Lanza, I.P.; Ribeiro, A.C.S.R.; Lana, Â M.Q.; Lara, L.J.C.; FIGUEREIDO, T.C.; Cançado, S.V. **Evaluation of the Presence and Levels of Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Sulfaquinoxaline and Oxytetracycline in Broiler Chickens after Drug Administration.** Plos One, 11(11): 2016.

ATTERBURY, R.J.; BERGEN, M.A.P.V.; ORTIZ, F.; LOVELL, M.A.; HARRIS, J.A.; BOER, A.D.; WAGENAAR, J.A.; ALLEN, V.M.; BARROW, P.A. **Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens.** Applied and Environmental Microbiology, 73(14): 4543–4549, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Regulamento técnico de métodos de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue.** Disponível em: [http:// www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Brasília – DF, 2000. Acessado em: 14/01/2016.

CALNEK, B.W. **Diseases of Poultry.** Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1067, 1990.

CARRILLO, C.L.; ATTERBURY, R.J.; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P.L.; DILLON, E.; SCOTT, A.; CONNERTON, I.F. **Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens.** Applied and Environmental Microbiology, 71(11): 6554–6563, 2005.

CARRILLO, C.L.; CONNERTON, F.L.; PEARSON, T.; CONNERTON, I.F. **Free-range layer chickens as a source of *Campylobacter* bacteriophage.** Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 92(3): 275–284, 2007.

CARVALHO, C.M.; GANNON, B.W.; HALFHIDE, D.E.; SANTOS, S.B.; HAYES, C.M.; ROE, J.M.; AZEREDO, J. **The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens.** BMC microbiology, 10: 232, 2010.

FERRO, I.D.; BENETTI, T.M.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; ABRAHÃO, W.M.; FARAH, S.M.S.S.; LUCIANO, F.B.; MACEDO, R.E.F. **Evaluation of antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from broiler carcasses.** British Poultry Science, 56(1): 66–71, 2015.

FIRLIEYANTI, A.S.; CONNERTON, P.L.; CONNERTON, I.F. ***Campylobacters* and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol.** International Journal of Food Microbiology, 237: 121–127, 2016.

FISCHER, S.; Kittler, S.; Klein, G.; Glünder, G. **Impact of a Single Phage and a Phage Cocktail Application in Broilers on Reduction of *Campylobacter jejuni* and Development of Resistance**. PLoS ONE, 8(10): 1–13, 2013.

Górski, A.; Ważna, E.; Dąbrowska, B. W.; Dąbrowska, K.; Świtła-Jeleń, K.; Międzybrodzki, R. (2006). **Bacteriophage translocation**. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 46(3): 313–319, 2006.

HUNGARO, H.M.; MENDONÇA, R.C.S.; ROSA, V.O.; BADARÓ, A.C.L.; MOREIRA, M.A.S.; CHAVES, J.B.P. **Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance**. Food Control, 51: 15–22, 2015.

HESSULF, F.; LJUNGBERG, J.; JOHANSSON, P.A.; LINDGREN, M.; ENGDahl, J. ***Campylobacter jejuni* associated perimyocarditis: two case reports and review of the literature**. BMC Infectious Diseases, 16(1): 289, 2016.

KANDARI, S.A. **Characterization and comparison of *Campylobacter* Bacteriophages**. Tese (Doutorado) University of Nottingham available, United Kingdom, 2013.

PANZENHAGEN, P.H.N.; AGUIAR, W.S.; FRASÃO, B.S.; PEREIRA, V.L.A.; ABREU, D.L.C.; RODRIGUES, D.P.R.; NASCIMENTO, E.R.; AQUINO, M.H.C. **Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil**. Food Control, 61: 243–247, 2016.

RANDALL, L.; RIDLEY, A.; LEMMA, F.; HALE C.; DAVIES, R. **In vitro investigations into the use of antimicrobials in combination to maintain efficacy of fluoroquinolones in poultry**. Research in Veterinary Science, 108: 47–53, 2016.

SILVA, D.T.; TEJADA, T.S.; MENEZES, D.B.; DIAS, P.A.; TIMM, C.D. ***Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil**. International Journal of Food Microbiology, 217: 189–194, 2016.

SØRENSEN, M.C.H.; Gencay, Y.E.; Birk, T. Baldvinsson, S.B.; Jäckel, C.; Hammerl, J.A.; Vegge, C.S.; Neve, H.; Brøndsted, L. **Primary isolation strain determines both phage type and receptors recognised by *Campylobacter jejuni* bacteriophages**. PLoS ONE, 10(1): 1–18, 2015.

STEFANI, L.M.; BACKES, R.G.; FARIA, G.A.; BIFFI, C.P.; ALMEIDA, J.M.; SILVA, H.K.DA.; NEVES, G.B.; LANGARO, A. **Trimming and washing poultry**

carcass to reduce microbial contamination: a comparative study. Poultry Science, 93(12): 3119–22, 2014.

SUMANO, H.L.; GUTIÉRREZ, L.O. **Problemática del uso de enrofloxacin en la avicultura en México.** Vet. Méx, 31(2): 137, 2000.

SUMANO, L.H.S.; OCAMPO, C.L. **Farmacología Veterinaria.** Editorial McGraw-Hill Interamericana. 3ª edición. México, DF. p. 1082, 2006.

WAGENAAR, J.A.; BERGEN, M.A.P.; MARK A.; MUELLER, M.A.; WASSENAAR, T.M.; CARLTON, R.M. **Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers.** Veterinary Microbiology, 109(3–4): 275–283, 2005.

WILSON, D.; CHOSEWOOD, L. **Biosafety in microbiological and biomedical laboratories** 5th Edition. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. August 30, 2015.

ANEXO A - CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA PROTOCOLO 02/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP/UFV

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-900 - Telefone: (31) 3899.3275 - e-mail: ceuap@ufv.br - site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 27/04/16

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Isolamento, identificação, caracterização e aplicação de bacteriófago líticos no biocontrole de *Campylobacter jejuni* e aumento da atividade antibacteriana da enrofloxacin mediante uso de bacteriófagos em frangos**", protocolo nº **02/2016**, sob a responsabilidade de **Luiz Fernando Teixeira Albino** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **26/fev/2016**.

Finalidade: ()Pesquisa ()Ensino

Vigência do Projeto: de **18/03/2016** a **05/04/2016**

Espécie/linhagem: **Frango de Corte (*Gallus domesticus*)** Nº de animais: **60**

Peso: --- Idade: **24 dias** Sexo: **Macho** Origem: **Incubatorio Rivelli - CNPJ/CPF: 478.715.616-49**

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Isolation, identification and characterization of lytic bacteriophages for biocontrol *Campylobacter jejuni* of chickens and enhancement of enrofloxacin antibacterial activity by bacteriophages of broilers**" protocol nº **02/2016**, under the responsibility of **Luiz Fernando Teixeira Albino** - which involves the production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Feb, 26th, 2016**.

Finality: ()Research ()Education

Duration of the Project: from **Mar, 18th, 2016** to **Apr, 05th, 2016**.

Species / strain: **Broiler (*Gallus domesticus*)** Nº of animals: **60**

Weight: --- Age: **24 days** Sex: **Male** Source: **Incubatorio Rivelli - CNPJ/CPF: 478.715.616-49**

Mário Luiz Chizzotti
Coordenador da CEUAP/UFV