

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DOS PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

NATÁLIA FERREIRA SIMÃO

**BACTERIÓFAGOS NO BIOCONTROLE DE *Salmonella* Enteritidis EM
OVOS *IN NATURA* DE GALINHA (*Gallus gallus*).**

NITERÓI

2011

NATÁLIA FERREIRA SIMÃO

**BACTERIÓFAGOS NO BIOCONTROLE DE *Salmonella* Enteritidis EM
OVOS *IN NATURA* DE GALINHA (*Gallus gallus*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico dos Produtos de Origem Animal.

Orientador: Prof. Dr. LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA

Co-orientador: Profa. Dra. REGINA CÉLIA SANTOS MENDONÇA

Co-orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

Niterói

2011

S588 Simão, Natália Ferreira
Bacteriófagos no biocontrole de Salmonella
Enteritidis em ovos in natura de galinha (Gallus
gallus) / Natália Ferreira Simão; orientador Luiz
Antônio Trindade de Oliveira. - 2011.
81f.

Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e
Processamento Tecnológico de Produtos de Origem
Animal)- Universidade Federal Fluminense, 2011.
Orientador: Luiz Antônio Trindade de Oliveira

1. Bacteriófago. 2. Ovo. 3. Salmonella enteritidis.
I. Título.

CDD 637.5

NATÁLIA FERREIRA SIMÃO

**BACTERIÓFAGOS NO BIOCONTROLE DE *Salmonella* Enteritidis EM
OVOS *IN NATURA* DE GALINHA (*Gallus gallus*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico dos Produtos de Origem Animal.

Aprovada em ____ de _____ de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. LUIZ ANTÔNIO TRINDADE DE OLIVEIRA
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. ALFREDO TAVARES FERNANDEZ
Universidade do Grande Rio

Niterói
2011

AGRADECIMENTOS

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

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

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

À Fundação Oswaldo Cruz pela doação dos microrganismos utilizados neste experimento.

Ao professor Luiz Fernando Teixeira Albino responsável pelo setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa pelo fornecimento dos ovos para a pesquisa.

Ao Núcleo de Microscopia da Universidade Federal de Viçosa, por possibilitar a visualização microscópica dos bacteriófagos, assim como as agências financiadoras dos equipamentos (FINEP, FAPEMIG e CNPq).

Ao professor Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira pelos conselhos, atenção, paciência e principalmente pela confiança.

Ao professor Dr. Robson Maia Franco pela atenção, conselhos e disposição.

Ao professor Dr. Alfredo Tavares Fernandez pelos ensinamentos, sugestões e participação na banca examinadora.

À Marina pela ajuda na estatística deste trabalho.

Aos meus pais, José Simão Filho e Leila Ferreira Simão, e ao meu irmão, Renato Ferreira Simão, pelo carinho, pelo apoio e incentivo durante a elaboração deste trabalho.

Ao Urbano, pela paciência, compreensão e carinho.

À minha família, pela paciência, carinho e pelos cuidados prestados a Kira.

Aos amigos do Laboratório de Análises Microbiológicas de Produtos de Origem Alimentar e Hídrica, Janaína, Arthur, Kamila e principalmente ao Humberto, Márcia, Andreza, Luiz Augusto, Delaine, Ariana, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelos ensinamentos, pela parceria e principalmente pela amizade.

Aos amigos da pós-graduação, Bruna, Ângela, Anna Carolina, Maria Lúcia, Bruno, Érica, Rafael, Alexandre e César pela ajuda e companheirismo. A todos aqueles que de alguma forma contribuíram,

Meus sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, f. 8

LISTA DE TABELAS, f. 11

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, f. 12

RESUMO, f. 14

ABSTRACT, f. 16

1 INTRODUÇÃO, f. 18

2 OBJETIVOS, f. 20

2.1 OBJETIVOS GERAIS, f. 20

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, f. 20

3 JUSTIFICATIVA, f. 21

4 REVISÃO DE LITERATURA, f. 22

4.1 OVO COMO ALIMENTO, f. 22

4.1.1 Contaminação dos ovos por microrganismos, f. 23

4.1.2 Importância da qualidade dos ovos, f. 24

4.2 *Salmonella* spp., f. 24

4.2.1 Transmissão da *Salmonella* spp. pelos ovos, f.25

4.2.2 Padrões microbiológicos, f.27

4.3 BACTERIÓFAGOS, F.27

4.3.1 Utilização como biocontrole em alimentos, f. 30

5 MATERIAL E MÉTODOS, f. 33

5.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS, f. 33

5.2 PROPAGAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DOS BACTERIÓFAGOS, f. 35

5.3 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS BACTERIÓFAGOS ISOLADOS, f. 36

5.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS BACTERIÓFAGOS, f. 36

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DOS BACTERIÓFAGOS, f. 37

5.6 CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DOS OVOS COM *Salmonella* Enteritidis E BIOCONTROLE COM BACTERIÓFAGOS, f. 38

5.6.1 Isolamento e identificação de *Salmonella* spp. , f. 39

5.6.2 Contagem pela técnica de plaqueamento em profundidade, f. 40

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO, f. 41

6.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS, f. 41

6.2 PROPAGAÇÃO, DETERMINAÇÃO DA TITULAÇÃO E PRODUÇÃO DE ESTOQUE, f. 42

6.3 AVALIAÇÃO DE ESPECIFICIDADE DOS BACTERIÓFAGOS, f. 43

6.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DOS BACTERIÓFAGOS, f. 45

6.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VITRO* DOS BACTERIÓFAGOS, f. 46

6.6 AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DE OVOS COM *Salmonella* Enteritidis E BIOCONTROLE COM BACTERIÓFAGOS, f. 51

7 CONCLUSÕES, f. 58

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, f. 59

APÊNDICE I – Materiais e equipamentos utilizados, f. 68

APÊNDICE II – ANOVA *in vitro*, f. 71

APÊNDICE III – ANOVA *in vivo* (casca) , f. 73

APÊNDICE IV – anova *in vivo* (interior) , f. 75

APÊNDICE V – Metodologia de isolamento e caracterização de bacteriófagos, f. 76

APÊNDICE VI – Avaliação da atividade lítica dos bacteriófagos frente à *Salmonella* Enteritidis. Teste *in vivo*, f. 80

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Bacteriófago propagado para *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076). ,f. 42
- Fig. 2 Observação microscópica dos oito bacteriófagos de *Salmonella* Enteritidis isolados de fezes de aves através da microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 140000 x. ,f. 46
- Fig. 3 Determinação da absorbância de cultivo *Salmonella* Enteritidis na concentração de 10^6 na presença da mistura dos oito bacteriófagos adicionados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL na temperatura de 25 °C. Teste *in vitro*. ,f. 47
- Fig. 4 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL com incubação a 25 °C, sobre a contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 106. Teste *in vitro*. ,f. 48
- Fig. 5 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de seis horas. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vitro*. ,f. 49
- Fig. 6 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada

na concentração de 10^6 no tempo de oito horas. Contagem em log UFC/mL.
Teste *in vitro*. ,f. 49

Fig. 7 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de dez horas. Contagem em log UFC/mL.
Teste *in vitro*. ,f. 50

Fig. 8 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de doze horas. Contagem em log UFC/mL.
Teste *in vitro*. ,f. 50

Fig. 9 Efeito do biocontrole na casca do ovo com a mistura de oito bacteriófagos, utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL, incubados a 25 °C em diferentes dias, sobre a contagem de *Salmonella* spp., inicialmente inoculada na concentração de 10^6 . Resultados descritos em log.
Teste *in vivo*. ,f. 52

Fig. 10 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL na casca do ovo, com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de um dia. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vivo*. ,f. 53

Fig. 11 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL na casca do ovo, com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de três dias. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vivo*. ,f. 54

Fig. 12 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL na casca do ovo, com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis,

inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de cinco dias. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vivo*. ,f. 54

Fig. 13 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL na casca do ovo, com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de 10 dias. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vivo*. ,f. 55

Fig. 14 Efeito do biocontrole no interior do ovo com a mistura de oito bacteriófagos, utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL, incubados a 25 °C em diferentes dias, sobre a contagem de *Salmonella* spp., inicialmente inoculada na concentração de 10^6 . Resultados descritos em log. Teste *in vivo*. ,f. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Titulação dos oito bacteriófagos selecionados., f. 43

Tabela 2 Teste de especificidade dos bacteriófagos selecionados de fezes de aves utilizando *Salmonella* Enteritidis em relação a diferentes espécies de microrganismo de interesse em alimentos., f. 42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Φ	Bacteriófago
°C	Graus Celsius
%	Porcento
ATCC	“American Type Culture Collection”
APC	Ágar Padrão para Contagem
APT	Água Peptonada Tamponada
BHI	“Brain Heart Infusion”
B.O.D.	“Biochemical Oxygen Demand”
DNA	“Deoxyribonucleic acid”
g	grama
<i>g</i>	Gravidade
kV	quilovolt
Log	Logarítimo
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnésio hepta-hidratado
mL	mililitro
mm	milímetro
M:	Molar
mM:	milimolar
μL	microlitro
μm	micrômetro
MOI	“Multiplicity Of Infection”
n.	número
nm	nanômetro
NaCl	Cloreto de sódio

p. páginas
P.A. Pró-análise
pH potencial Hidrogeniônico
RNA “Ribonucleic acid”
rpm Rotações por Minuto
SM “Stock Medium”
Tris-HCL Trisima-hidroclorida
UFC Unidades Formadoras de Colônias
UFP Unidades Formadoras de Placas
UV Ultra Violeta
v. Volume
W Watt

RESUMO

Os ovos são importantes fontes de nutrientes para a alimentação humana. Entretanto, muitos casos de surtos alimentares causados por ingestão e posterior infecção por *Salmonella* spp. têm como origem o consumo de ovos crus contaminados e de seus derivados. A principal espécie envolvida é a *Salmonella* Enteritidis. Tendo em vista a segurança do consumidor, pesquisadores vêm utilizando os bacteriófagos como ferramenta de biocontrole em alimentos, com o intuito de eliminar ou reduzir cargas bacterianas. Portanto esta pesquisa consistirá em avaliar a capacidade dos bacteriófagos em reduzir ou eliminar a bactéria *Salmonella* Enteritidis de ovos comerciais. Os bacteriófagos foram isolados de fezes de aves de criação intensiva de propriedades da região de Viçosa-Minas Gerais, utilizando *Salmonella* Enteritidis como hospedeiro, através da técnica descrita por Atterbury et al. (2005). Foram selecionados oito bacteriófagos para uso como biocontrole em ovos. Os bacteriófagos selecionados foram avaliados quanto à especificidade em relação a várias estirpes de microrganismo, morfologia e atividade sobre *Salmonella* Enteritidis em meio de cultivo. Foram isolados bacteriófagos de *Salmonella* Enteritidis em nove amostras de fezes de aves que atingiram concentrações de 10^{11} a 10^{15} UFP/mL após propagação. Os oito bacteriófagos selecionados apresentaram atividade sobre seis estirpes de *Salmonella enterica*. Em relação à morfologia, todos apresentaram cabeça icosaédrica e pequenas caudas o que indica serem da ordem *Caudovirales* e da família *Podoviridae*. O efeito dos bacteriófagos sobre a contagem de *Salmonella* Enteritidis *in vitro* em meio de cultura foi dependente da concentração de bacteriófago utilizada. A maior redução de UFC viáveis de *Salmonella* Enteritidis foi obtida nos cultivos adicionados da mistura de

bacteriófagos na concentração inicial de 10^{12} UFP/mL a 25 °C. Obteve-se melhor resultado na redução de *Salmonella* spp. Na casca dos ovos, incubados a 25 °C, a utilizar a mistura de bacteriófagos na concentração de 10^{10} . Portanto, os bacteriófagos apresentam potencial de utilização como tecnologia complementar no controle de *Salmonella* Enteritidis. na casca dos ovos de consumo.

Palavras-chave: bacteriófago, *Salmonella* Enteritidis, ovo.

ABSTRACT

Eggs are important sources of nutrients for human consumption. However, many cases of outbreaks caused by food intake and subsequent infection by *Salmonella* spp. originate in the consumption of contaminated raw eggs and their derivatives. The main specie involved is *Salmonella* Enteritidis. Valuing consumer safety, researchers are using bacteriophages as a biocontrol tool in food, in order to eliminate or reduce bacterial loads. So this research aim to evaluate the ability of bacteriophages to reduce or eliminate the bacteria *Salmonella* Enteritidis in commercial eggs. Bacteriophages were isolated from poultry faecis on intensive properties in the region of Viçosa-Minas Gerais,, using *Salmonella* enteritidis as a host, using the technique described by Atterbury et al. (2005). Eight bacteriophages were selected to use as biocontrol in eggs. The selected bacteriophages were evaluated for their specificity against several strains of bacterias, for their morphology and for their activity against *Salmonella* Enteritidis in the culture medium. *Salmonella* Enteritidis bacteriophages were isolated from nine hens feaces samples and reached concentrations from 10^{11} to 10^{15} PFU/mL after propagation and purification. The eight selected phages showed activity against six strains of *Salmonella enterica*. About the bacteriophages morphology, all had icosahedral heads and small tails indicating that they belong to *Caudovirales* order and *Podoviridae* family. The effect of bacteriophages on *Salmonella* Enteritidis counting *in vitro* was dependent on the concentration of bacteriophage used. The most significative reductions in *Salmonella* Enteritidis viable cells in cultures added to bacteriophages pool in the initial concentration of 10^{12} PFU/mL at 25 °C. The reduction of *Salmonella* spp. In eggs shell incubated at 25 °C, had better results when u sing the bacteriophages pool at

concentration of 10^{10} . So, the bacteriophages have potential to be used as a complementary technology to control *Salmonella* Enteritidis in eggs shell.

Key words: bacteriophage, *Salmonella* Enteritidis, egg.

1 INTRODUÇÃO

Os ovos correspondem a uma importante fonte de nutrientes, e por apresentarem preços acessíveis, são utilizados pela população brasileira, fazendo parte de seu hábito alimentar. Em sua composição encontram-se proteínas, glicídios, lipídios, minerais e ácidos graxos essenciais para os seres humanos. Seu teor de proteínas de alto valor biológico assim como de vitamina A são pontos atrativos.

Apesar de tantos benefícios, os ovos podem ser veiculadores de patógenos para seus consumidores em determinadas situações. Seu conteúdo rico em nutrientes, necessários para o desenvolvimento do embrião, é extremamente compatível para o crescimento de uma série de microrganismos.

Os agentes etiológicos de doenças alimentares veiculados por alimentos são transtornos à indústria alimentícia, uma vez que o controle da contaminação do alimento por estes microrganismos patogênicos exige dedicada atenção e medidas preventivas de higiene.

O principal microrganismo associado a surtos de doença ligada ao consumo ovos é a bactéria *Salmonella* Enteritidis. Esta pode ser transmitida ao ovo por via vertical, antes de sua postura, ou pode penetrar nos ovos após a sua postura, caso seja removida ou alterada alguma das suas barreiras naturais.

A obtenção de alimentos mais seguros é uma exigência do mercado atual, principalmente pelo reconhecimento do significativo impacto que esta doença causa e de custos econômicos para a sociedade e para a agroindústria.

Os bacteriófagos vêm sendo estudados, por muitos anos, como ferramenta de biocontrole e recentemente têm sido usados para o controle bacteriológico de

alimentos a fim de ampliar a conservação e a inocuidade alimentícia, protegendo a saúde dos consumidores.

Por serem vírus específicos para bactérias o seu uso seria uma adequada maneira de reduzir a carga de bactérias patogênicas, que podem estar presentes em ovos, como a *Salmonella* spp.

Além de uma rápida ação bactericida, os bacteriófagos não interferem na microbiota natural do alimento, não causam alterações sensoriais, não poluem o ambiente e são completamente inofensivos ao ser humano e aos animais.

Portanto o objetivo desta pesquisa foi de avaliar a atividade dos bacteriófagos como biocontrole em ovos de galinhas (*Gallus gallus*) para o consumo contra a *Salmonella* Enteritidis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Biocontrole de *Salmonella* Enteritidis em ovos pelo uso de bacteriófagos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar e purificar os bacteriófagos específicos para a *Salmonella* Enteritidis a partir de fezes de galinhas poedeiras;
2. Titular os bacteriófagos isolados;
3. Avaliar a especificidade dos bacteriófagos isolados;
4. Avaliar a morfologia dos bacteriófagos isolados;
5. Avaliar a eficácia da atividade lítica *in vitro* dos bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis;
6. Avaliar a capacidade de contaminação e penetração da *Salmonella* Enteritidis nos ovos;
7. Avaliar a possibilidade de uso dos bacteriófagos isolados como ferramenta de biocontrole em ovos, para manter sua inocuidade.

3 JUSTIFICATIVA

Há necessidade de se desenvolver novas formas de combate a *Salmonella* Enteritidis, uma vez que esta bactéria coloniza assintomaticamente o oviduto de galinhas poedeiras (contaminando os ovos) e o trato gastrointestinal (contaminando o ovo a partir das fezes).

O consumo inadequado destes ovos pelo ser humano, de forma crua ou mal cozida ou a partir de seus derivados, pode levar à infecção das células intestinais pela ação da *Salmonella* spp. causando salmonelose ao consumidor.

A fim de desenvolver uma nova forma de controle desta bactéria, pesquisadores estão recorrendo aos bacteriófagos. Estes vírus vêm sendo estudados como biocontrole, e a sua utilização, em altas doses, em alimentos tem se mostrado bastante eficaz ao combate de bactérias patogênicas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 OVO COMO ALIMENTO

Segundo a Portaria Nº 01, de 21 de fevereiro de 1990, referente às Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados, entende-se pela designação “ovo”, como o ovo de galinha em casca, sendo os demais ovos acompanhados da indicação da espécie de que procede (BRASIL, 1990).

No Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, há citação de que os ovos destinados à industrialização devem apresentar a casca livre de sujeira aderente após a operação de lavagem; devem apresentar o conteúdo com qualidade para uso comestível e a casca deve estar íntegra e livre de sujeira aderente e material estranho. Para realizar a verificação da qualidade do ovo se faz necessário o exame de ovoscopia (BRASIL, 1997).

O ovo de galinha é o mais utilizado na alimentação humana. Seu peso é de aproximadamente 50g, sendo 35g de clara e 15g de gema. A clara contribui o maior percentual de proteína e vitaminas do complexo B e a gema com a parcela lipídica e as vitaminas lipossolúveis, além do conteúdo de lecitina e fosfolipídeos (ORNELLAS, 2001).

Ovos embalados inadequadamente ou expostos a correntes de vento e a agentes contaminantes, e estocados sob temperatura elevada e baixa umidade têm alterações bioquímicas do albúmen mais aceleradas e estão mais propensos à

contaminação por agentes patogênicos, reduzindo sua validade comercial (MOURA et al., 2008).

4.1.1 Contaminação dos ovos por microrganismos

A contaminação dos ovos pode ocorrer antes de sua postura, sendo denominada de transmissão vertical, ou transovariana. Tal contaminação pode ocorrer através do ovário ou oviduto da ave. Os microrganismos localizam-se na gema do ovo sem necessariamente provocar doença na ave poedeira (OLIVEIRA; SILVA, 2000).

Outra forma de contaminação pode ocorrer após a postura, quando o ovo entra em contato com o meio externo, onde a temperatura é menor que a da ave, ocorrendo retração do conteúdo interno, havendo o deslocamento da membrana interna formando a câmara de ar. Neste momento, se o ovo estiver em um ambiente sujo e contaminado, microrganismos podem ser sugados para o interior do ovo a partir dos poros da casca (MEIJERHOF, 1998).

A destruição da cutícula protetora também facilita a entrada de microrganismos através dos poros da casca (EVANGELISTA, 2005). Tal fato pode ocorrer devido a lavagem do ovo e, se a temperatura da água for menor que a do ovo, bactérias podem ser sugadas para o seu interior. Outra forma de destruição da cutícula é devido ao crescimento de fungos ou enterobactérias (bactérias proteolíticas) na casca, facilitando assim a penetração de outros microrganismos (APHA, 2001; BEZERRA, 1995; EVANGELISTA, 2005; JAY, 2005). Wang e Slavik (1998) descobriram que a destruição da cutícula do ovo também pode ocorrer devido a utilização de diferentes tipos de produtos químicos.

A presença de rachaduras na casca, mesmo que microscópicas, também favorecem a penetração de microrganismos (TODD, 1996).

O tempo, a umidade e a temperatura de armazenagem são fatores fundamentais para que as bactérias, principalmente a *Salmonella* spp., migrem para o interior do ovo (JAY, 2005; SILVA, 1995). Jay (2005) descreveu que a umidade alta favorece a multiplicação de microrganismos e promove a dilatação dos poros da casca.

Durante o armazenamento ocorrem trocas gasosas entre o ovo e o ambiente, com isso a clara perde água e dióxido de carbono alterando o seu pH de 7,6 até 9,7, tal fato promove a descentralização da gema que pode entrar em contato direto com a casca, facilitando a penetração de microrganismo (JAY, 2005).

As mudanças físicas e químicas na viscosidade da clara e na permeabilidade da membrana vitelínea, exacerbadas pelo envelhecimento do ovo, permitem a migração de bactérias (GAST; HOLT, 2001).

4.1.2 Importância da qualidade dos ovos

Segundo Peresi et al. (2004) as doenças causadas por bactérias e transmitidas por alimentos são prevalentes no Brasil e no mundo, podendo ocorrer sob a forma de surtos ou individualmente. Franco e Langraf (2008) relataram que estes surtos constituem preocupação para indústrias alimentícias e para órgãos de Saúde Coletiva.

A contaminação de alimentos por bactérias representa um sério problema na produção de alimentos seguros, onde apenas pequeno percentual das ocorrências chega ao conhecimento das instituições que investigam estas doenças, o que prejudica a qualidade da informação epidemiológica (PERESI et al., 2004).

Os ovos têm sido apontados como veiculadores de diversas bactérias, principalmente do gênero *Salmonella*, causando surtos de infecções alimentares (ANDRADE et al., 2004).

4.2 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos e a maioria das estirpes são móveis, com flagelos peritríqueos. Estas bactérias são anaeróbias facultativas, produzem gás a partir de glicose e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono e a maioria das estirpes são urease negativas (HOLT et al. 1994).

Esta bactéria possui temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37 °C, sendo a mínima em cerca de 5 °C e a máxima em 47 °C. São termossensíveis e podem ser destruídas a 60 °C por 15 a 20 minutos (FORSYTHE; 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Estas bactérias se diferenciam das demais Gram-negativas por crescerem em uma grande diversidade de meios de cultura e produzem colônias perfeitamente visíveis a 37 °C por 24 horas (JAY, 2005).

O gênero *Salmonella* foi nomeado em 1885 em homenagem ao médico veterinário Daniel E. Salmon, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA), e é composto por 2579 sorotipos, identificados por reações bioquímicas e sorológicas, dos quais, 2.557 pertencem à espécie *S. enterica* e 22 à espécie *S. bongori* (GRIMONT; WEILL, 2007).

A nomenclatura do gênero *Salmonella* é complexa, o esquema de identificação mais utilizado é denominado de Kauffman-White, dividindo o gênero em tipos sorológicos (sorotipos) baseado na composição de seus antígenos de superfície somáticos (O), os flagelos (H) e os capsulares (Vi). Segundo este esquema de classificação, o gênero *Salmonella* divide-se em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* apresenta seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (TRABULSI; ALTERTHUM; 2008).

A *Salmonella* spp. está distribuída na natureza, principalmente na água, no trato gastrointestinal dos humanos e dos animais, sendo entre estes os das aves o mais importante, seguidas dos suínos, bovinos, eqüinos, animais silvestres (tanto de sangue quente, quanto de sangue frio) e animais domiciliares como cães e gatos (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GERMANO; GERMANO, 2001; JAY, 2005). Jay (2005) considerou a presença dos insetos como hospedeiros acidentais, sendo um importante veículo de transmissão da *Salmonella* spp. para alimentos e água.

4.2.1 Transmissão da *Salmonella* spp. pelos ovos

A *Salmonella* spp. é um importante microrganismo envolvido em surtos alimentares em diversos países, sendo reconhecida universalmente como causadora

de doença (GERMANO; GERMANO, 2001; JAKABI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007).

Os principais alimentos incriminados na transmissão da *Salmonella* spp. para o ser humano são os ovos e seus derivados, sendo que a manipulação incorreta destes produtos facilita a sua disseminação (AMSON et al., 2006; TÉO; OLIVEIRA, 2005). A presença de *Salmonella* spp. em alimentos, por sua vez, os tornam impróprios para consumo (BRASIL, 2001; MOTTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

Trabulsi e Alterthum (2008) relataram que os ovos podem ser contaminados a partir de rachaduras na casca ou através da infecção transovariana, que ocorre a partir do oviduto da ave infectado, geralmente as aves são assintomáticas às infecções por *Salmonella* spp..

Guard-Petter (2001) resumiu a rota de transmissão da *Salmonella* spp. para o ser humano em colonização, sobrevivência e multiplicação do patógeno no ambiente de criação, nas aves e nos ovos.

A estocagem prolongada dos ovos a temperaturas acima de 18 °C favorece a multiplicação da bactéria no interior dos ovos, dificultando o controle (JAY, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Diversos autores estudaram a contaminação dos ovos a partir da inoculação de *Salmonella* Enteritidis a fim de verificar o comportamento da bactéria frente às barreiras naturais de proteção dos ovos (BARROS et al., 2001; SCHOENI et al., 1995; BORGES; PINTO; SILVA, 2009;

A ingestão de pratos preparados à base de ovos crus ou mal cozidos é o principal fator de risco para a ocorrência de surtos de infecção por *Salmonella* Enteritidis (EDUARDO et al., 2004).

Segundo Germano e Germano (2001) após a ingestão do alimento infectado, a *Salmonella* spp. penetra no epitélio do intestino delgado provocando inflamação, sendo o período de incubação de 18 horas, com média entre 12 a 36 horas.

As manifestações clínicas agudas foram descritas com a presença de cólicas abdominais, náuseas, vômitos, diarreia, cefaléia, calafrios e febre (FORSYTHE, 2002; GERMANO; GERMANO, 2001).

4.2.2 Padrões microbiológicos

Na Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 12 de 2/01/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, considera-se a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001).

Os critérios e padrões microbiológicos para alimentos são indispensáveis para avaliar as Boas Práticas de Produção – BPP de alimentos; a aplicação do Sistema de Análise e Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC; e a qualidade microbiológica dos produtos alimentícios, incluindo a elucidação de agentes etiológicos causadores de doenças transmitidos por alimentos (BRASIL, 2001).

Para Silva Jr (2002) um critério microbiológico é caracterizado por uma definição dos microrganismo de importância; dos métodos analíticos necessários para a sua detecção e contagem; de um plano de amostragem; do tamanho das unidades de amostras; e dos estabelecimentos onde foi realizada a coleta das amostras.

A tolerância para a amostra indicativa de *Salmonella* spp deve estar ausente em 25 gramas no ovo cru íntegro ou em conserva, gema, clara ou suas misturas pasteurizadas, resfriadas, congeladas ou em pó (BRASIL, 2001).

4.3 BACTERIÓFAGOS

Bacteriófagos são vírus específicos de bactérias, sendo parasitas intracelulares obrigatórios por falta de metabolismo próprio. São extremamente hospedeiro-específicos, capazes somente de infectar espécies específicas ou até mesmo grupos dentro de uma mesma espécie (GOODRIDGE; ABEDON, 2003; HAGENS; LOESSNER, 2007). A especificidade destes bacteriófagos é, em parte, mediada por proteínas associadas à cauda que distintivamente reconhecem moléculas da superfície da bactéria susceptível (HAGENS; LOESSNER, 2007).

Em relação a morfologia, os bacteriófagos podem ser classificados como caudados (binário), isométricos (icosaédricos), helicoidais (filamentados) e pleomórficos. Todos os bacteriófagos caudados possuem o genoma DNA e podem ser diferenciados nas seguintes famílias: *Myoviridae* (cauda longa contrátil), *Siphoviridae* (cauda longa não contrátil) e *Podoviridae* (cauda curta contrátil) (ABEDON, 2008; KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005).

Para os autores supracitados, os bacteriófagos isométricos possuem tanto o genoma DNA como o RNA, e estão presentes nas famílias *Cystoviridae* (RNA), *Microviridae* (DNA) e *Leviviridae* (RNA). Já os bacteriófagos helicoidais, representados pela família *Inoviridae*, e os pleomórficos possuem em sua maioria, o genoma DNA.

Os bacteriófagos conhecidos para a *Salmonella enterica* são os denominados Φ X174 pertencentes à família *Microviridae*. Mas já foram identificados outros bacteriófagos que parasitam alguns sorotipos desta espécie: o bacteriófago para o sorotipo Thiphimurium, que é denominado de P22 e está presente na família *Podoviridae*, e o bacteriófago para o sorotipo Enteritides, denominado de T4 e que pertence à família *Myoviridae* (ABEDON, 2008).

Sua partícula viral consiste em uma seqüência de ácido nucléico, sendo na maioria das vezes DNA – ácido desoxirribonucléico, e em sua minoria RNA – ácido ribonucléico. Ao redor do genoma de ácido nucléico há um capsídeo formado de proteínas que confere proteção, adsorção eficaz e liberação do genoma no citoplasma bacteriano. Um bacteriófago é aproximadamente 100 vezes menor que uma bactéria (GILL; ABEDON, 2003; GOODRIDGE; ABEDON, 2003).

O ciclo de um bacteriófago é caracterizado basicamente em dois tipos: o lisogênico e o lítico. Os bacteriófagos são quimicamente atraídos pelas bactérias e em seguida penetram em sua parede celular liberando seu material genético – DNA ou RNA. No ciclo lisogênico, o material genético permanece no citoplasma, o vírus se comporta morfologicamente como plasmídeo, mantendo seu material na bactéria e continua presente em sua multiplicação. No ciclo lítico o material genético do bacteriófago se associa ao genoma bacteriano e começa a se replicar no citoplasma bacteriano, utilizando estruturas da bactéria, e rapidamente forma novos bacteriófagos que lisam a parede bacteriana. Para cada bacteriófago cerca de 100 novos bacteriófagos são formados (ABEDON, 2008; GILL; ABEDON, 2003; GOODRIDGE; ABEDON, 2003). Esse rompimento é facilitado também pelo acúmulo

de enzimas que enfraquecem a parede e a membrana bacteriana, além da pressão exercida pelo aumento da quantidade de partículas no interior da bactéria (PELKENON et al., 1992).

Há um outro ciclo controverso, o pseudolisogênico, onde o bacteriófago, após infectar a bactéria produz uma resposta instável e não produtiva, não havendo a lisogênese. Neste caso o genoma do bacteriófago é mantido no interior da bactéria por tempo indeterminado. Acredita-se que isso ocorra devido a falhas na replicação do genoma ou por falta de nutrientes para a bactéria hospedeira, fazendo com que o bacteriófago não consiga retirar energia e substratos para sua replicação (ABEDON, 2008)

A descoberta oficial dos bacteriófagos foi realizada pelo pesquisador do Instituto Pasteur em Paris Felix d'Herelle em 1915 que deu o nome ao vírus de bacteriófago (devorador de bactéria). Os primeiros estudos da terapia com bacteriófagos iniciaram em 1919, quando este pesquisador utilizou um preparado de bacteriófagos em um jovem de 24 anos que estava com disenteria. 24 horas depois os sinais clínicos haviam melhorado (GOODRIDGE; ABEDON, 2003; SUMMERS¹, 1999 apud SULAKVELIDZE et al., 2001).

D'Herelle possuía um laboratório comercial em Paris que produzia cinco tipos de misturas de bacteriófagos no início de 1900. Nos Estados Unidos, também houve um laboratório, coordenado pelo cientista Eli Lilly, que produzia sete tipos de misturas de bacteriófagos para fins de biocontrole. Mas na época de 1940 houve a produção em massa da penicilina como antimicrobiano, sendo os estudos da fagoterapia descartados (BASSETT, 2007; HAGENS; LOESSNER, 2007).

Os bacteriófagos são os microrganismo mais abundantes no meio ambiente e estão presentes em grande número na água doce e salgada, solo, fezes, plantas e em alimentos de várias origens (ABEDON, 2008; GREER, 2005; HAGENS; LOESSNER, 2007; HAGENS; OFFERHAUS, 2008). Diversos autores isolaram bacteriófagos a partir das fontes supracitadas (ANDREATTI FILHO et al., 2007; CAREY-SMITH et al., 2006; HIGGINS et al., 2008; O'FLYNN et al., 2006).

¹ SUMMERS, W. C. *Felix d'Herelle and the origins of molecular biology*. New Haven: Yale University Press, 1999. 248p.

Kutter e Sulakvelize (2005) citaram que os bacteriófagos podem atingir concentrações que variam de 10^{30} a 10^{32} , tendo a função de regular o equilíbrio bacteriológico.

Por possuírem ligações químicas específicas com as bactérias são inofensivos para os seres humanos, animais e plantas (STRAUCH et al., 2007). Estas ligações em bactérias Gram-positivas são realizadas através de estruturas presentes na parede celular da bactéria (peptideoglicano, ácido teicóico e lipoteicóico), já em Gram-negativas a interação ocorre por meio do lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas de membrana. Estas interações são responsáveis, em parte, pela especificidade dos bacteriófagos frente a uma determinada estirpe ou mesmo um gênero de bactérias (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005).

Os bacteriófagos pertencem a microbiota do trato gastrointestinal dos animais (CALLAWAY, 2007) e do homem, sendo regularmente consumidos com os alimentos e a água sem causar efeitos adversos. Por isto são considerados como principais agentes contra certas bactérias patogênicas presentes em produtos alimentares (HAGENS; OFFERHAUS, 2008).

4.3.1 Utilização como biocontrole em alimentos

Segundo Bassett (2007) quase que diariamente uma grande quantidade de alimentos é contaminada por microrganismos patogênicos capazes de causar doença. Devido a este fato se faz necessário à utilização de antimicrobianos eficazes em produtos alimentares, assegurando que os consumidores tenham acesso a um abastecimento de alimentos seguros.

Esta abordagem é representada através da utilização de bacteriófagos específicos para bactérias indesejáveis (BIELKE et al., 2007) A extrema especificidade dos bacteriófagos os torna ideais para aplicações destinadas a aumentar a segurança dos alimentos durante o processo de produção (HAGENS; LOESSNER, 2007).

A especificidade dos bacteriófagos diminui a chance de mutação bacteriana para resistência, mas caso estas venham a desenvolvê-la, os bacteriófagos

mutariam para continuar a infestar as bactérias, pois necessitam de seu hospedeiro para sobreviverem, portanto a sua mutação concomitante à da bactéria é crucial (ABEDON, 2008; BASSET, 2007). Para Atterbury et al. (2007) e Kocharunchitt, Ross e McNeil (2009) o uso de bacteriófagos específicos como controle biológico é uma intervenção possível contra a redução da colonização de *Salmonella* spp..

Bassett (2007) ressaltou que o bacteriófago utilizado como ferramenta de biocontrole em alimentos é o que possui ciclo lítico. Fiorentin et al. (2004) complementam afirmando que os bacteriófagos líticos representam uma forma segura, natural, não tóxica e viável para o controle de *Salmonella* spp. em produtos derivados das aves.

Há pesquisadores que relataram o uso de bacteriófagos no controle espécie-específico de bactérias durante os processos de pré e pós-colheita na produção de alimentos e estocagem, assim como no tratamento em pré-abate de animais, reduzindo a contaminação bacteriana em carcaças, através do controle de *Salmonella* spp. em frangos (FIORENTIN; VIEIRA; BARIONI, 2005), *Escherichia coli* enteropatogênica em bezerros, leitões e cordeiros, *E. coli* O157:H7 transmitida pela carne bovina e *Listeria monocytogenes* em alimentos refrigerados (GOODE; ALLEN; BARROW, 2003; GRERR, 2005; HAGENS; LOESSNER, 2007). *E coli* em frangos de corte (OLIVEIRA et al., 2009), redução de *Campylobacter jejuni* em frangos de corte (ATTERBURY et al., 2003, ATTERBURY et al., 2005; CARRILLO et al., 2005; FROST; KRAMER; GILLANDERS, 1999; GRAJEWSKI; KUSEK; GELFAND, 1985) e *Enterobacter sakazakii* (KIM; KLUMPP; LOESSNER, 2007).

Grerr (2005) ressaltou que o controle da deterioração através do uso de bacteriófagos em carnes cruas refrigeradas e frutas pode resultar em um aumento da validade comercial destes produtos.

Olofsson, Ankarloo e Nicholls (1998) descobriram que é possível utilizar uma solução não biológica como o álcool, para a aplicação de bacteriófagos em alimentos.

A aprovação pela Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2006, do uso do bacteriófago específico para *Listeria monocytogenes* como aditivo, exclusivamente para produtos cárneos processados e em frangos abre portas para novas aplicações deste agente biológico contra as bactérias (OMS, 2006; STRAUCH et al., 2007).

Hagens e Loessner (2007) relataram que com o aumento do conhecimento e das técnicas a aceitação do uso do bacteriófago à base de métodos de detecção irá aumentar comercialmente. Para McLaughlin et al. (2006) a caracterização e o desenvolvimento dos bacteriófagos facilitará a sua utilização como reagentes de identificação, de indicadores específicos, e de controle biológico para *Salmonella* spp..

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Análises Microbiológicas de Produtos de Origem Alimentar e Hídrica do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-Minas Gerais.

Todos os reagentes e equipamentos utilizados neste experimento encontram-se inclusos no Apêndice I.

Na realização desta pesquisa foi utilizada estirpe de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 proveniente da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. Esta bactéria foi utilizada como hospedeiro no processo de propagação dos bacteriófagos específicos e na contaminação induzida de ovos comerciais.

5.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS

Foram coletadas três amostras de fezes de galinhas poedeiras em três diferentes propriedades da região de Viçosa – Minas Gerais, totalizando nove amostras. As amostras foram compostas por uma mistura de fezes de diferentes aves da mesma propriedade. As amostras de fezes de aves foram acondicionadas em embalagem de polietileno de baixa densidade e transportadas ao Laboratório de Análises Microbiológicas de Produtos de Origem Alimentar e Hídrica para posterior isolamento de bacteriófagos.

Para o isolamento de bacteriófagos específicos para *Salmonella* Enteritidis foi utilizada a metodologia adaptada de Atterbury et al. (2005). Um grama de fezes de

aves foi diluído 1:10 em tampão SM (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 0,1 M NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 0,01% gelatina) e ressuspenso por agitação em vórtex durante 5 minutos. Esta suspensão foi incubada sob agitação, em um homogeneizador, a 150 rpm a 17 °C por 24 horas, para permitir a eluição do bacteriófago para o tampão. Após este período, uma alíquota de 10 mL da solução foi transferida para um tubo de centrifuga esterilizado e submetido a centrifugação a 13.000 g por 5 minutos para remover detritos em suspensão. Em seguida, a suspensão foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm, para remover células e restos celulares. Para avaliar a presença de bacteriófagos a partir do método de isolamento usado, foi utilizada a técnica de microgotas em superfície proposta por Adams (1959), utilizando a estirpe *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 como hospedeiro.

A purificação dos bacteriófagos foi realizada por meio de metodologia descrita por Grajewski, Kusek e Gelfand (1985). Um volume de 0,5 mL do filtrado de bacteriófagos foi misturado com 10 mL da cultura hospedeira, cultivada em caldo infusão de cérebro e coração a 37 °C por 12 horas e em estufa. O filtrado e a suspensão bacteriana foram reincubados para permitir a propagação do bacteriófago por 24 horas, e posteriormente centrifugados a 13.000 g por 5 minutos e filtrados em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm. Volumes iguais de 0,5 mL de suspensão de bacteriófagos e de *Salmonella* Enteritidis cultivada por 12 horas a 37 °C foram misturados com 3 mL de ágar BHI para sobrecamada, contendo 0,7 % de Ágar-ágar, e espalhados sobre a superfície seca de placas de Petri contendo ágar BHI. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas em estufa. Após a incubação, placas de lise individuais foram selecionadas com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur e colocadas dentro de 10 mL de cultura crescida em BHI por 24 horas em estufa, e posteriormente centrifugados a 13.000 g por 5 minutos e filtrados em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm. Para cada bacteriófago, três ciclos de purificação foram realizados, a fim de garantir a pureza do estoque de bacteriófagos.

5.2 PROPAGAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DOS BACTERIÓFAGOS

Para propagação e determinação do título de bacteriófagos foi utilizada a metodologia adaptada de Frost, Kramer e Gillanders (1999). No processo de propagação foi utilizada como hospedeiro *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, cultivada a 37 °C em caldo BHI por 24 horas em estufa. Um volume de 1 mL da suspensão bacteriana foi misturado com 100 µL de suspensão estoque de cada bacteriófago isolado, adicionados em 10 mL de caldo BHI recém preparado e incubado a 37 °C por 24 horas em estufa. Após o período de incubação a suspensão foi centrifugada a 13000 g por 5 minutos e filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm. Volumes iguais de 2,5 mL de suspensão filtrada de bacteriófago e suspensão de bactéria foram misturados e incubados por 15 minutos, a 37 °C em estufa, para permitir a infecção do hospedeiro. Uma alíquota de 1 mL desta mistura foi adicionada em 5 mL de ágar BHI sobrecamada com 0,7 % de ágar, e aplicado sobre a superfície de ágar BHI disposto em placas de Petri, sendo incubados a 37 °C, por 15 a 18 horas em estufa. As placas foram examinadas para verificar o grau de lise, adicionadas de 5 mL de tampão SM e incubadas a 17 °C, sob agitação de 100 rpm por 24 horas, a fim de eluir os bacteriófagos para solução. A suspensão foi recolhida, centrifugada a 13000 g por 5 minutos e filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 µm.

Na determinação da concentração de bacteriófagos na suspensão foi utilizado tampão SM para realizar as diluições necessárias, a fim de obter contagem de Unidades Formadoras de Placas (UFP) entre 10 e 100 placas de lise por mL de suspensão (CARRILLO et al., 2005). Foram adicionados 500 µL de *Salmonella* Enteritidis, cultivada em caldo BHI a 37 °C, por 12 horas, e 100 µL do bacteriófago em 5 mL de Agar BHI sobrecamada com 0,7 % de ágar-ágar e dispostos sobre a superfície de Agar base BHI, sendo as placas de lise determinadas após período de 15 a 18 horas de incubação a 37 °C em estufa.

5.3 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS BACTERIÓFAGOS ISOLADOS

Foram utilizadas diferentes espécies de bactérias de importância em alimentos provenientes da Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro para avaliar a especificidade dos bacteriófagos selecionados:

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076
- *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum ATCC 9184;
- *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum ATCC 9120;
- *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028;
- *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi ATCC 6539;
- *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Abony ATCC 6017;
- *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis ATCC 10708;
- *S. enterica* subsp. *enterica* subsp. *arizonae* ATCC 13314;
- *Escherichia coli* ATCC 11229;
- *Listeria monocytogenes* ATCC 7644;
- *Enterococcus faecalis* ATCC 19433;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, 25923 e 6538.

A atividade lítica dos bacteriófagos selecionados foi avaliada por técnica de microgotas em superfície, proposta por Adams (1959), usando a suspensão de bacteriófagos na concentração de 10^9 UFP/mL.

5.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS BACTERIÓFAGOS

O tratamento realizado com os bacteriófagos para possibilitar a visualização foi adaptado da técnica descrita por Sambrook e Russel (2001). Foi transferido 1 mL da solução de estoque dos bacteriófagos para tubos de eppendorfs esterilizados, posteriormente foi adicionado ao tubo polietilenoglicol 8000 na concentração de 10% do volume total, a amostra ficou em geladeira a 4 °C durante a noite, para decantar os bacteriófagos. Em seguida os tubos foram centrifugados a 11.000 g por 20

minutos a 4 °C, o sobrenadante foi dispensado e o “pellet” foi re-suspendido com 1 mL de tampão SM, os tubos permaneceram em repouso em temperatura ambiente (24°C) por uma hora. O polietilenoglicol e os resíduos foram extraídos da solução através da adição de 1 mL de clorofórmio. Após a agitação em vortex os tubos foram centrifugados a 3.000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante (solução com bacteriófagos) foi retirado cuidadosamente e transferido para eppendorfs estéreis.

Uma gota da suspensão foi depositada na superfície de uma tela de microscopia eletrônica, revestida com resina “formvar” por um minuto e posteriormente adicionou-se uma gota de solução aquosa de acetato de uranila 2 % na superfície da tela, deixando em contato por 15 segundos. O excesso de acetato de uranila foi removido com papel absorvente, e a tela secou a temperatura ambiente (24 °C) por 24 horas. Posteriormente, fez-se a observação em microscópio eletrônico de transmissão a 80 kV em 85000 x de magnitude para visualização e em 140000 x para fotografar.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DOS BACTERIÓFAGOS

Para a avaliação da atividade lítica foi transferido 1 mL da cultura de *Salmonella* Enteritidis cultivada a 37 °C em estufa, até atingir a concentração de 10^7 e 1 mL da mistura dos oito bacteriófagos em diferentes concentrações, 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP mL. Estas alíquotas foram adicionadas a frascos contendo 8 mL de caldo BHI, totalizando um volume de 10 mL e uma concentração de *Salmonella* Enteritidis de 10^6 . Culturas de *Salmonella* Enteritidis concentradas em 10^6 sem adição de bacteriófagos foram utilizadas como controle. Os frascos foram incubados a 25 °C em estufa B.O.D..

A atividade dos bacteriófagos foi determinada por medida da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, em intervalos de duas horas por 12 horas. Além da absorbância, foi realizada a contagem de *Salmonella* Enteritidis ao final de cada intervalo de tempo, por meio de técnica de plaqueamento em profundidade em Ágar Padrão para Contagem (APC) adaptada da Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa, e a contagem de UFC realizada após 12 horas de incubação.

5.6 CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DOS OVOS COM *Salmonella* Enteritidis E BIOCONTROLE COM BACTERIÓFAGOS

Foram coletados 100 ovos *in natura*, recém postos, da granja de poedeiras da Universidade Federal de Viçosa. O transporte das amostras até o Laboratório de Análises Microbiológicas de Produtos de Origem Alimentar e Hídrica do Departamento de Alimentos foi realizado em embalagens próprias para ovos, a temperatura ambiente.

Todos os ovos foram observados em um ovoscópio adaptado com lâmpada de 100 W, sendo selecionados 91 ovos ausentes de rachaduras, fissuras e quebras. Os ovos selecionados passaram por um processo de desinfecção em etanol a 70 % por 10 minutos, conforme a técnica utilizada por Hierro et al. (2009). Após a secagem dos ovos, por 30 minutos em temperatura ambiente de 30°C, foi feita a separação dos grupos:

- Grupo 1: um ovo (dia 0) que foi destinado para a pesquisa de *Salmonella* spp., seguindo a técnica descrita pela Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003);
- Grupo 2: 18 ovos que foram incubados a 25 °C em estufa B.O.D., sem contaminação, mantidos como controle;
- Grupo 3: 72 ovos que foram destinados para a contaminação com a *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076:
 - Sub-grupo 3.1: 18 ovos que foram incubados a 25 °C estufa B.O.D;
 - Sub-grupo 3.2: 54 ovos que foram destinados ao biocontrole com bacteriófagos com posterior incubação a 25 °C estufa B.O.D.

Os ovos pertencentes aos grupos dois e três foram incubados pelos períodos de 24 horas, 48 horas, 72 horas, cinco dias, 10 dias e 15 dias. Para cada tratamento e período de tempo foram utilizados três ovos.

A técnica de contaminação experimental foi adaptada da metodologia utilizada por Wang e Slavik (1998), onde a *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 foi incubada em 1000 mL de caldo BHI a 37 °C em estufa até atingir a concentração de 10⁶ UFC. Após a adaptação do cultivo à temperatura ambiente de trabalho (30 °C),

foram submersos, em uma bandeja esterilizada de polietileno, 72 ovos por três minutos. Após a secagem de 30 minutos foi realizada a separação dos ovos em sub-grupos, onde 18 ovos foram destinados à incubação a 25 °C e 54 ovos foram destinados ao biocontrole com bacteriófagos.

Para o biocontrole foi preparada uma mistura com os oito bacteriófagos isolados, em diferentes concentrações (10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP) em 1000 mL de Água Peptonada Tamponada (APT). Para cada concentração foram separados 18 ovos que foram submersos por cinco minutos em bandejas esterilizadas de polietileno. Após o tratamento dos ovos foi realizada a secagem a temperatura ambiente por 30 minutos e posterior incubação a 25 °C.

Após a incubação, um ovo de cada tratamento foi destinado para a pesquisa de *Salmonella* spp. e para a contagem através da técnica de plaqueamento em profundidade em ágar Rambach.

5.6.1 Isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

A técnica utilizada neste experimento é a descrita pela Instrução Normativa 62 (BRASIL 2003).

A primeira fase do isolamento é a de pré-enriquecimento da *Salmonella* spp., onde foi realizada a quebra do ovo de forma asséptica, separando a casca do seu interior. A casca foi transferida para um saco esterilizado para stomacher que continha 75 mL de APT e o interior transferido para um saco esterilizado para stomacher que continha 525 mL de APT. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em Stomacher por um minuto a 100 rpm em velocidade média e posteriormente incubadas em estufa a 37 °C por 24 h horas.

Após este período foi realizada a etapa de enriquecimento, onde foi transferido 1,0 mL de cada amostra para um tubo contendo 10 mL de caldo Selenito Cistina e 100 µL para um tubo contendo 10 mL caldo Rappaport Vassiliadis. Ambos foram incubados em banho-maria a 45 °C por 24 horas. Terminado o prazo, os tubos de enriquecimento seletivo foram levemente agitados e em seguida foi retirada uma alíquota de cada tudo, com o auxílio de uma alça de platina, e estriada em placas de petri contendo Ágar Bismuto Sulfito, Ágar *Salmonella-Shigella*, Ágar Rambach e

Ágar Verde Brilhante. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 24h em estufa, para verificar se houve o desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella* spp.

Com o auxílio de uma agulha de platina, foi removida uma UFC típica e inoculada em tubos contendo Ágar Lisina Ferro e Ágar Tríplice Açúcar Ferro inclinados. A inoculação foi realizada por picada e estrias no bisel. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24h em estufa. Posteriormente observou se a ocorrência de reação típica de *Salmonella* spp. nos meios.

No tubo contendo TSI pôde-se observar a alteração da cor do meio para amarelo (ácido) na base, com ou sem produção de gás sulfídrico e rosa (alcalino) ou inalterado no bisel. No tubo contendo LIA pôde-se observar que não houve alteração da cor do meio.

5.6.2 Contagem pela técnica de plaqueamento em profundidade

A técnica utilizada neste experimento é adaptada a técnica descrita pela Instrução Normativa 62 (BRASIL 2003).

Após a seleção de seis diluições adequadas (-3, -4, -5, -6, -7 e -8) das amostras, foi retirada com uma alíquota de 1,0 mL de cada diluição, e colocada em uma placa de Petri onde foi vertido, aproximadamente, 20 mL de Ágar Rambach previamente fundido e resfriado entre 45-50 °C. Posteriormente homogeneizou-se o inóculo ao ágar com movimentos circulares sobre a bancada, cinco vezes em sentido horário e cinco vezes em sentido anti-horário. Assim que o ágar semeado solidificava, as placas foram colocadas invertidas na estufa em temperatura de 37°C, onde foram incubadas por 24 horas. Em seguida feita procedida a contagem das UFC típicas de *Salmonella* spp.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS

A presença de bacteriófagos foi observada por meio da formação de placas de lise sobre a superfície de ágar BHI semi-sólido contendo a cultura de *Salmonella* Enteritidis.

Foram encontrados bacteriófagos específicos para *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) em todas as amostras das propriedades avaliadas. Das nove amostras de fezes todas (100%) apresentaram bacteriófagos para *Salmonella* Enteritidis. Esta porcentagem de isolamento é elevada em comparação com os resultados encontrados por Fiorentin et al. (2004) porém a quantidade de amostras foi menor. Esses autores encontraram bacteriófagos específicos para *Salmonella* spp. em 4,7 % das 107 amostras de fezes de aves coletadas na região do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Somente um dos bacteriófagos encontrados por esses autores foi isolado de fezes de aves confinadas, os outros foram isolados de fezes de aves criadas em sistema livre.

Callaway (2007) isolou bacteriófagos de fezes de suínos específicos para *Salmonella* Typhimurium em 50 % das propriedades pesquisadas, porém em apenas seis das 360 amostras de fezes coletadas. Higgins et al. (2008) isolaram nove bacteriófagos de fezes de frango de corte específicos para *Salmonella* spp. em seis das 17 propriedades pesquisadas sendo sete isolados de ambientes que apresentavam *Salmonella* spp. e dois de ambientes nos quais não se isolou *Salmonella* spp.. O'Flynn et al. (2006) pesquisaram bacteriófagos específicos para

Salmonella Typhimurium em 100 amostras originárias de fontes variadas e isolaram apenas sete bacteriófagos temperados de fezes de suínos saudáveis e dois bacteriófagos virulentos de fezes de suínos contaminados com *Salmonella* spp.. Elevada incidência de bacteriófagos foi observada por Carey-Smith et al. (2006), que isolaram oito bacteriófagos diferentes em três amostras de água de esgoto, utilizando três sorotipos de *Salmonella enterica*.

6.2 PROPAGAÇÃO, DETERMINAÇÃO DA TITULAÇÃO E PRODUÇÃO DE ESTOQUE

Foram selecionados oito bacteriófagos isolados de fezes de galinhas poedeiras, que apresentaram melhor grau de lise, e foram propagados em *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) como hospedeiro (Figura 1), alcançando concentrações entre 10^{11} e 10^{15} UFP mL, individualmente (Tabela 1), já a mistura dos oito bacteriófagos alcançou a concentração de $2,1 \times 10^{15}$. Foram armazenados e estocados conforme descrito no item 5.2, e receberam um código de numeração correspondente (F + número).

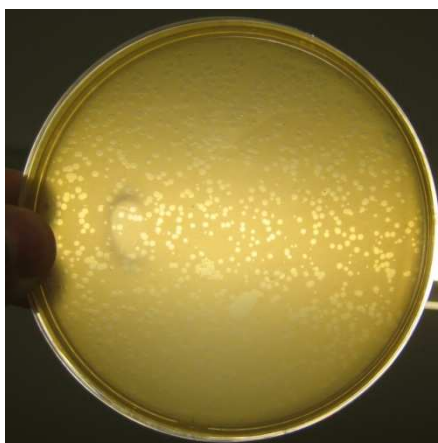


Fig. 1 Bacteriófago propagado para *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076)

Tabela 1 Titulação dos oito bacteriófagos selecionados.

Bacteriófagos	Titulação (UFP/mL)
F1	$6,6 \times 10^{14}$
F2	$1,0 \times 10^{15}$
F3	$1,5 \times 10^{11}$
F4	$5,0 \times 10^{15}$
F5	$1,9 \times 10^{14}$
F6	$3,4 \times 10^{14}$
F7	$2,0 \times 10^{15}$
F8	$9,9 \times 10^{15}$

Legenda: UFP – Unidade Formadora de Placas

6.3 AVALIAÇÃO DE ESPECIFICIDADE DOS BACTERIÓFAGOS

Os oito bacteriófagos selecionados apresentaram atividade lítica contra seis dos sete estirpes de *Salmonella* spp. testados, sendo que apenas o serovar *Salmonella* Choleraesuis não foi lisado. A espécie *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* também não foi lisada por nenhum bacteriófago. Também não houve ação fágica para as bactérias de outros gêneros, como a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (Tabela 2). Resultados diferentes foram encontrados por Callaway (2007) que testou a atividade de bacteriófagos isolados para *Salmonella* Typhimurium em relação a outros seis serovares de *Salmonella enterica*, e apenas um bacteriófago apresentou atividade sobre outro sorotipo de *Salmonella* (Derby). Entretanto, O'Flynn et al. (2006) avaliaram a capacidade lítica de dois bacteriófagos isolados de fezes de suíno e um bacteriófago controle (Felix 01), e observaram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, nos quais somente um serovar (*Salmonella* Branderup) de oito serovares de *Salmonella enterica* foi resistente aos bacteriófagos testados por estes autores. Bielke et al. (2007) também observaram amplo espectro de ação de dois bacteriófagos isolados para *Salmonella* Enteritidis de esgoto doméstico sobre sete de outros 10 serovares de *Salmonella* spp. avaliados.

Tabela 2 Teste de especificidade dos bacteriófagos selecionados de fezes de aves utilizando *Salmonella* Enteritidis em relação a diferentes espécies de microrganismo de interesse em alimentos.

MICRORGANISMO	ATCC	BACTERÍÓFAGOS							
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	6539	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	14028	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	13076	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Gallinarum	9184	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Pullorum	9120	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	10708	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony	6017	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	13314	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	11229	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	25923	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	13565	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	6538	-	-	-	-	-	-	-	-

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

O amplo espectro de atividade dos bacteriófagos sobre outros serovares de *Salmonella* spp. observado no presente estudo e por outros autores da literatura constatada pode ter ocorrido devido à similaridade de estruturas presentes na superfície das bactérias deste gênero. Os bacteriófagos de *Salmonella* spp. podem apresentar especificidade de ligação por um tipo de lipopolissacarídeo (O₁₂) encontrado na superfície da maioria das estirpes de *Salmonella* dos grupos A, B e D do sistema *Kauffman-White* conforme relatos de Goode, Allen e Barrow (2003). De acordo com o estudo de Grimont e Weill (2007), as estirpes de *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Gallinarum, Pullorum, Abony e Typhi, utilizadas neste experimento, apresentam o oligossacarídeo O₁₂ em sua superfície, enquanto que as estirpes de *Salmonella Choleraesuis* e *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* não são constituídas por esta estrutura.

6.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DOS BACTERIÓFAGOS

Observou-se por meio de microscopia eletrônica de transmissão que os oito bacteriófagos isolados de fezes de aves e selecionados para utilização como biocontrole em ovos apresentaram morfologia semelhante.

Os oito bacteriófagos apresentaram cabeça icosaédrica e pequenas caudas (Figura 2). De acordo com as observações microscópicas, os oito bacteriófagos podem ser classificados como pertencentes à ordem *Caudovirales* e família *Podoviridae*. Resultados semelhantes foram encontrados por McLaughlin et al. (2006). Estes autores observaram predominância de bacteriófagos de *Salmonella* spp. da família *Podoviridae* em amostras de efluente de pocilgas nos Estados Unidos. Contudo Atterbury et al. (2007) encontraram resultados diferentes, onde bacteriófagos da família *Myoviridae* foram isolados para *Salmonella* Enteritidis em fezes de frango e efluente de abate. Em outro estudo, dois bacteriófagos de *Salmonella* spp. isolados de fezes de suíno foram classificados por O'Flynn et al. (2006) como pertencentes à família *Siphoviridae*. Carey-Smith et al. (2006) e Kocharunchitt, Ross e McNeil (2009) observaram morfologias diferentes em bacteriófagos de *Salmonella* spp. isolados de água de esgoto, sendo classificados nas famílias *Myoviridae* e *Siphoviridae*.

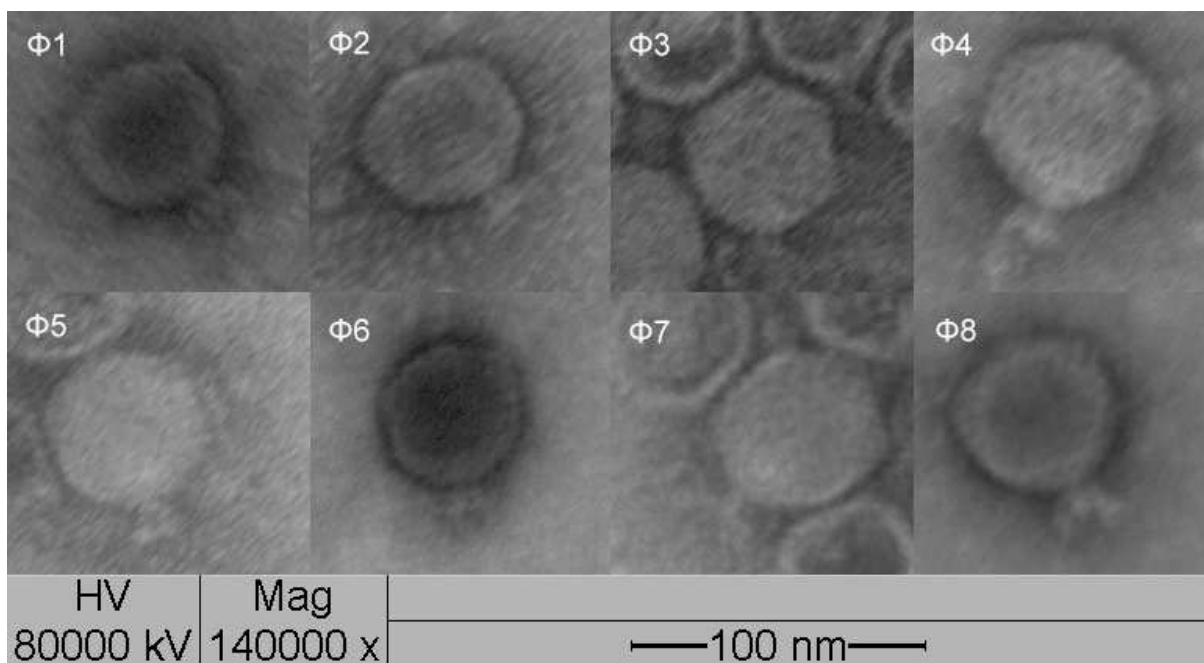


Fig. 2 Observação microscópica dos oito bacteriófagos de *Salmonella* Enteritidis isolados de fezes de aves através da microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 140000 x.

6.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VITRO* DOS BACTERIÓFAGOS

Observou-se que houve a redução da absorbância medida em espectrofotômetro a 600 nm quando utilizada a mistura dos oito bacteriófagos nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL aos cultivos de *Salmonella* Enteritidis incubados à 25 °C na concentração de 10^6 , comparando com o controle sem adição de bacteriófagos, sendo que a concentração de 10^{12} obteve melhores resultados (Figura 3).

A retomada do crescimento de *Salmonella* Enteritidis observada após 10 horas de incubação a na presença da mistura de bacteriófagos na concentração de 10^{14} indica a presença de células resistentes ao bacteriófago ou a alteração de ciclo de infecção lítico para lisogênico. Resultados semelhantes foram observados por O'Flynn et al. (2006) e Kim, Klumpp e Loessner (2007) que atribuíram a retomada do crescimento bacteriano em cultivos na presença de bacteriófagos à mutações da bactéria e desenvolvimento de resistência.

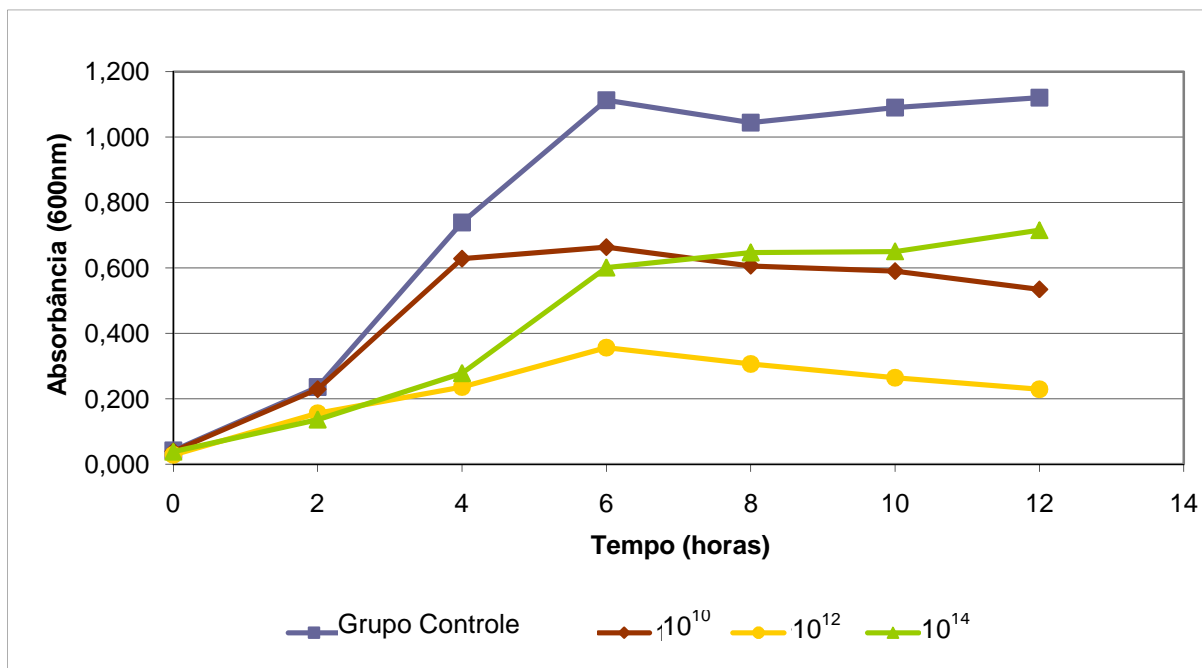


Fig. 3 Determinação da absorvância de cultivo *Salmonella* Enteritidis na concentração de 10^6 na presença da mistura dos oito bacteriófagos adicionados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL na temperatura de 25 °C. Teste *in vitro*.

No gráfico constam as médias da contagem de UFC viáveis de *Salmonella* Enteritidis para os grupos avaliados. A comparação do perfil de crescimento demonstra diminuição da velocidade de crescimento de *Salmonella* Enteritidis para os grupos tratados com a mistura de bacteriófago nas concentrações de 10^{10} e 10^{14} ao passo que o grupo tratado com a concentração de 10^{12} mostrou melhor resultado em relação a diminuição do número de UFC iniciais de 10^6 (Figura 4.). Dado o diferente perfil de crescimento, os grupos foram comparados em cada tempo de avaliação, utilizando Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste para comparação de médias ($\alpha = 0,05$).

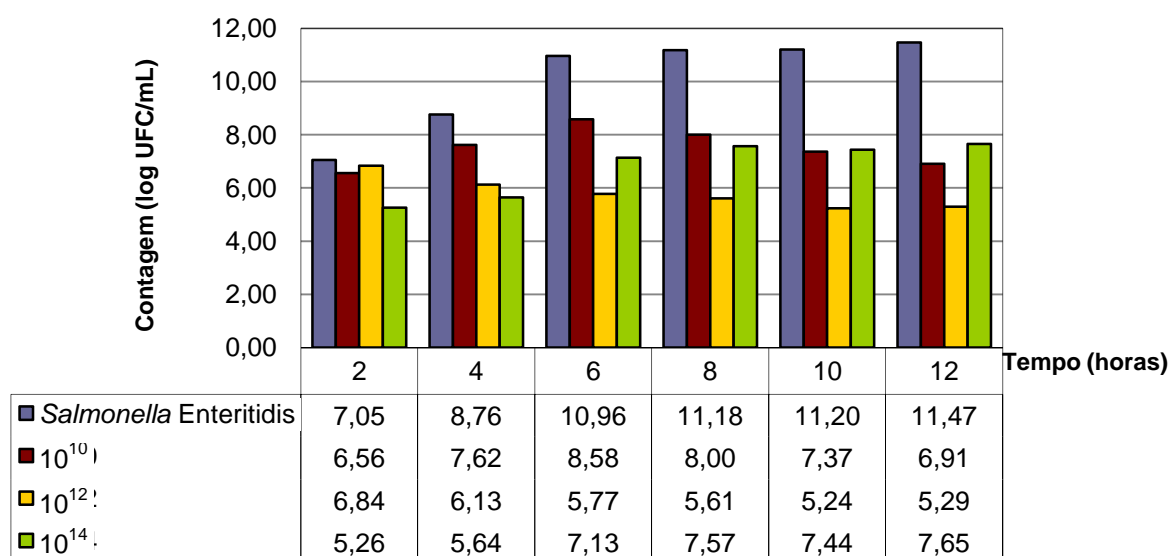


Fig. 4 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL com incubação a 25 °C, sobre a contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 . Teste *in vitro*.

Abaixo é apresentada a ANOVA para a contagem de UFC viáveis nos tempos 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas em função dos tratamentos com diferentes concentrações da mistura de bacteriófagos. O resultado do teste é apresentado nas figuras (Figura 5-8), onde médias iguais entre si estão dispostas entre as mesmas linhas do intervalo de confiança.

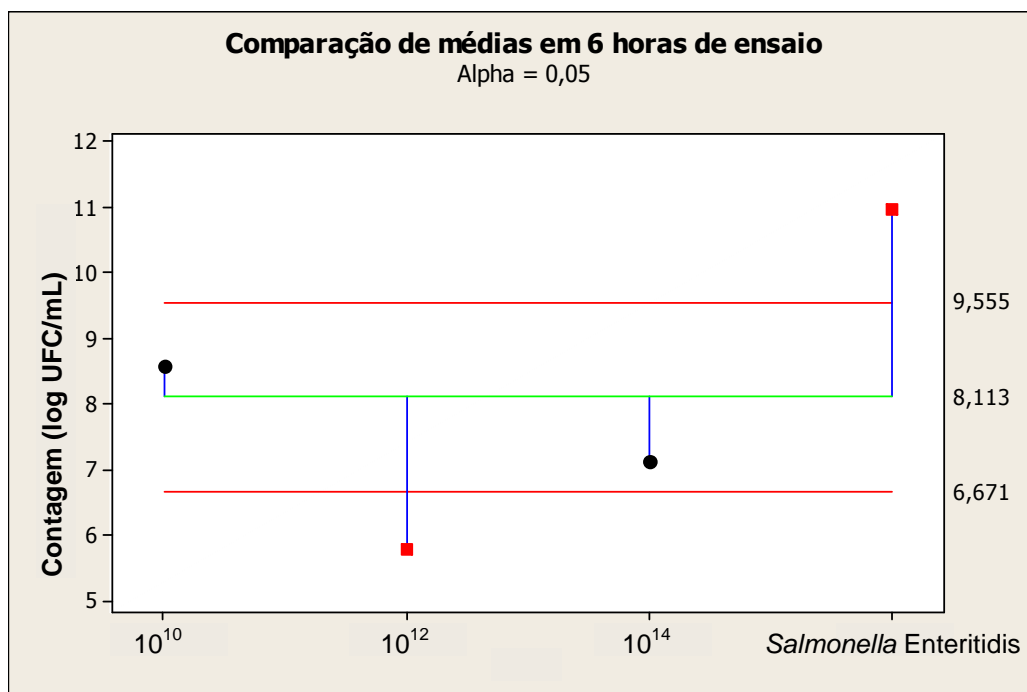


Fig. 5 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de seis horas. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vitro*.

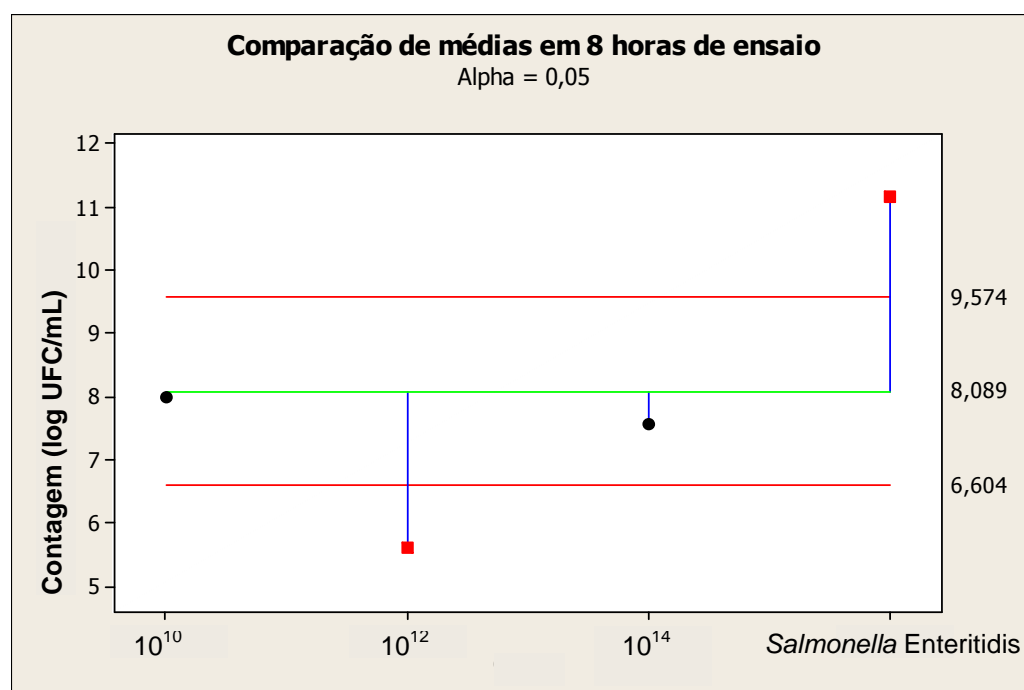


Fig. 6 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de oito horas. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vitro*.

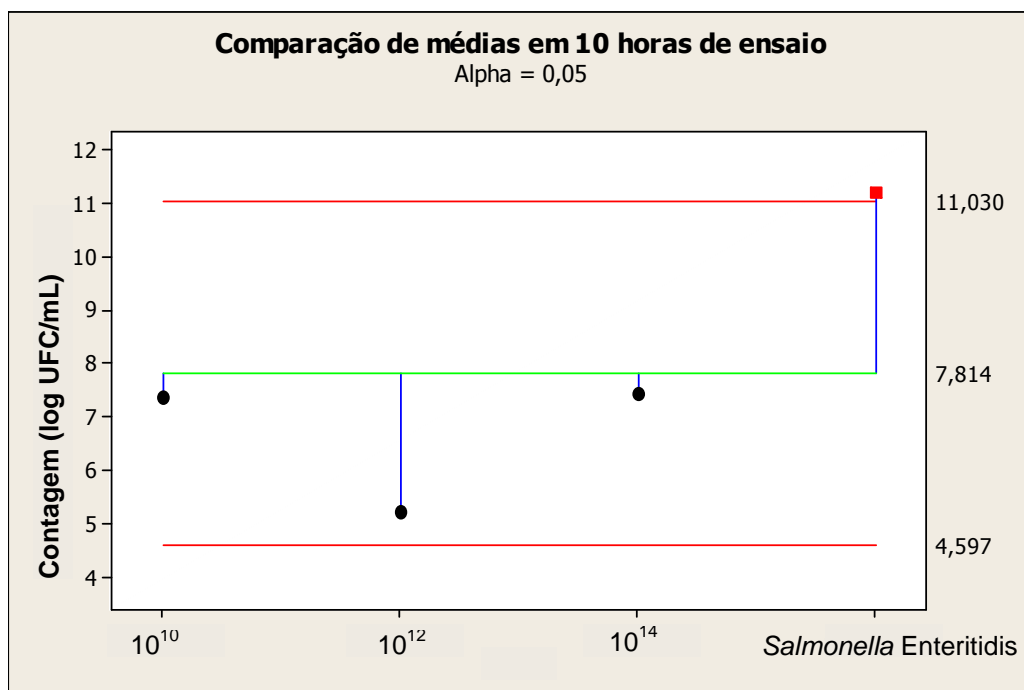


Fig. 7 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de dez horas. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vitro*.

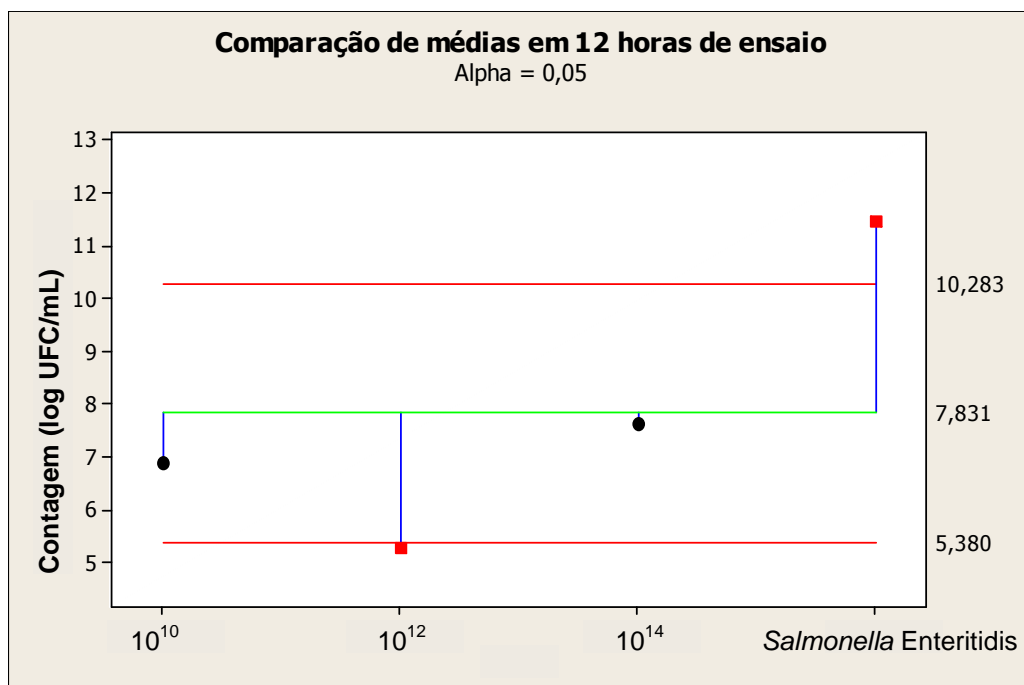


Fig. 8 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de doze horas. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vitro*.

Segundo o resultado da ANOVA, até quatro horas de cultivo não foi possível observar diferença significativa na contagem de células dos grupos avaliados (p-valor=0,144 para duas horas e p-valor=0,124 para quatro horas). Para as contagens realizadas entre seis e 12 horas de cultivo observou-se influência significativa dos tratamentos (p-valor = 0,004; 0,004; 0,048; 0,016, respectivamente), ou seja, pelo menos uma das médias difere das demais. Diante deste resultado, foi realizado o teste de comparação de médias para as contagens de seis, oito, 10 e 12 horas onde pode-se observar que a concentração da mistura de bacteriófagos a 10^{12} obteve melhores resultados em relação a redução de UFC viáveis de *Salmonella* Enteritidis reduzindo um ciclo log. em comparação à contaminação inicial de 10^6 .

Kocharunchitt, Ross e McNeil (2009) obtiveram resultados semelhantes ao deste estudo ao utilizarem bacteriófagos na concentração de 10^8 em cultivo de *Salmonella* Oranienburg incubados a 25 °C, obtendo redução de um ciclo log. em 12 horas de incubação. Contudo Andreatti Filho et al. (2007) obtiveram resultados diferentes quando utilizados bacteriófagos isolados de aviários na concentração de 10^9 em um cultivo de 10^6 de *Salmonella* Enteritidis incubados a 37 °C, onde a redução foi significativa apenas em duas horas de incubação, reduzindo um ciclo log. Assim como Atterbury et al. (2007) que após utilizar bacteriófagos na concentração de 10^6 em cultivos de *Salmonella* Enteritidis na mesma concentração incubados a 37 °C obtiveram melhor redução de UFC viáveis em duas horas de incubação, com relação ao tempo de 10 horas os autores obtiveram redução de apenas um ciclo log, comparando com este estudo, onde o melhor tempo de redução foi em 10 horas também reduzindo um ciclo log..

6.6 AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DE OVOS COM *Salmonella* Enteritidis E BIOCONTROLE COM BACTERIÓFAGOS

Foi observado que o grupo um estava ausente para *Salmonella* spp., tanto na casca como no interior do ovo.

Em relação à contagem em log. de UFC viáveis de *Salmonella* spp. na casca do ovo, pode-se constatar observando o (Figura 9) com as médias de contagem nos ovos avaliados incubados a 25 °C. A comparação do perfil de crescimento mostra

diminuição da velocidade de crescimento de *Salmonella* spp. para os grupos tratados com a mistura de bacteriófagos nas concentrações de 10^{12} e 10^{14} , ao passo que no grupo tratado com bacteriófago 10^{10} observou-se melhor resultado em relação a diminuição do número de UFC viáveis em comparação com a contaminação inicial de 10^6 , divergindo da avaliação *in vitro* onde a concentração de 10^{12} obteve melhor resultado. Enquanto que o grupo contaminado apenas com *Salmonella* Enteritidis não obteve redução da contagem de UFC viáveis até o 10º dia de incubação. Já o grupo controle (sem contaminação) obteve resultados nulos para todos os dias de incubação.

Dado o diferente perfil de crescimento, os grupos foram comparados em cada tempo de avaliação, utilizando Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste para comparação de médias ($\alpha = 0,05$), de modo a verificar se a contagem de UFC viáveis observada nos grupos com inoculação da mistura de bacteriófagos e *Salmonella* Enteritidis diferia significativamente da contagem para o grupo contaminado apenas por *Salmonella* Enteritidis.

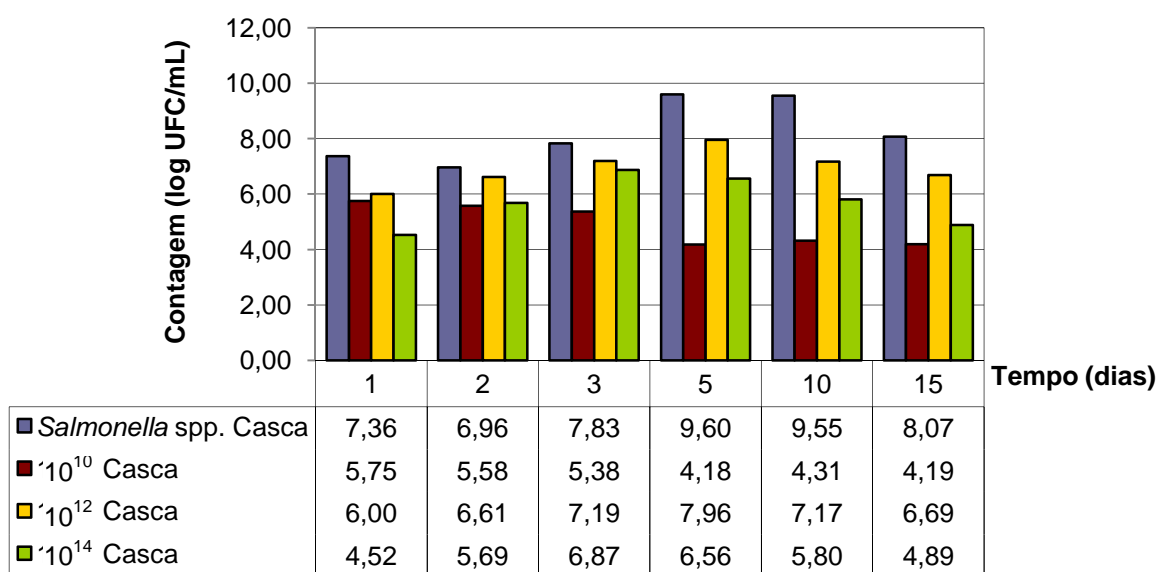


Fig. 9 Efeito do biocontrole na casca do ovo com a mistura de oito bacteriófagos, utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL, incubados a 25 °C em diferentes dias, sobre a contagem de *Salmonella* spp., inicialmente inoculada na concentração de 10^6 . Resultados descritos em log. Teste *in vivo*.

Pode-se observar nas figuras 10-13 a ANOVA para a contagem de UFC viáveis nos tempos um, dois, três, cinco, 10 e 15 dias após inoculação em função dos tratamentos com diferentes concentrações de bacteriófagos. Segundo o resultado da ANOVA, somente para as contagens retiradas dois e 15 dias após a contaminação não foi observada diferença significativa entre os grupos (p -valor = 0,287 e p -valor = 0,091, respectivamente). Para as contagens realizadas em um, três, cinco e 10 dias após a contaminação observou-se influência significativa dos tratamentos (p -valor = 0,002; 0,003; 0,001; 0,001, respectivamente), ou seja, pelo menos uma das médias difere das demais. Diante deste resultado, foi realizado teste de comparação de médias para as contagens de um, três, cinco e 10 dias após inoculação. O resultado do teste é apresentado nos gráficos abaixo, onde médias iguais entre si estão dispostas entre as mesmas linhas do intervalo de confiança.

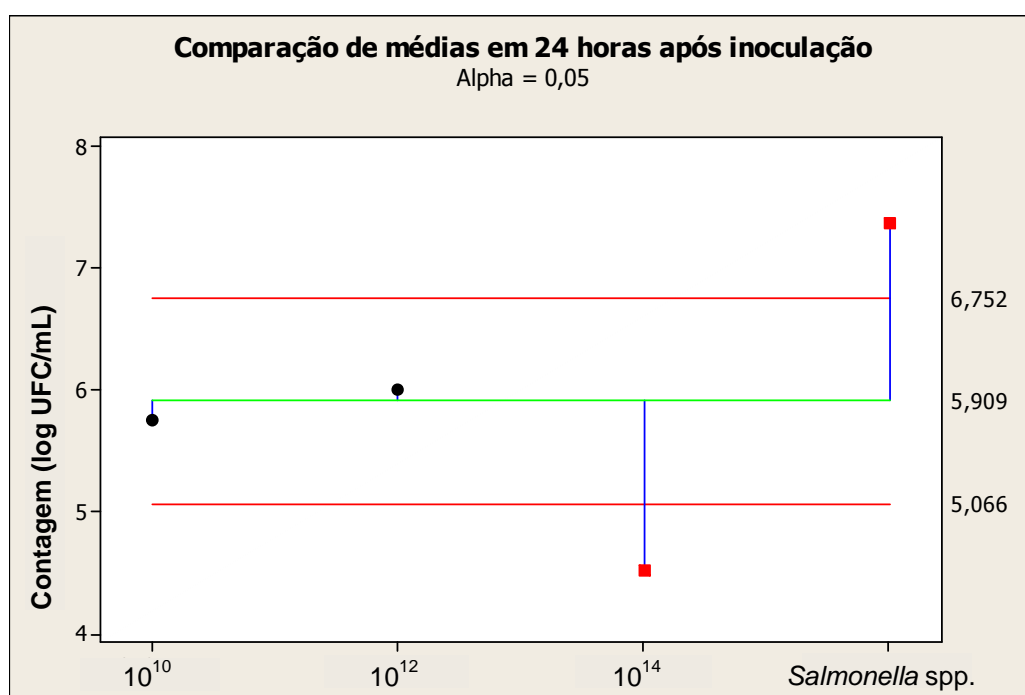


Fig. 10 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL na casca do ovo, com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de um dia. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vivo*.

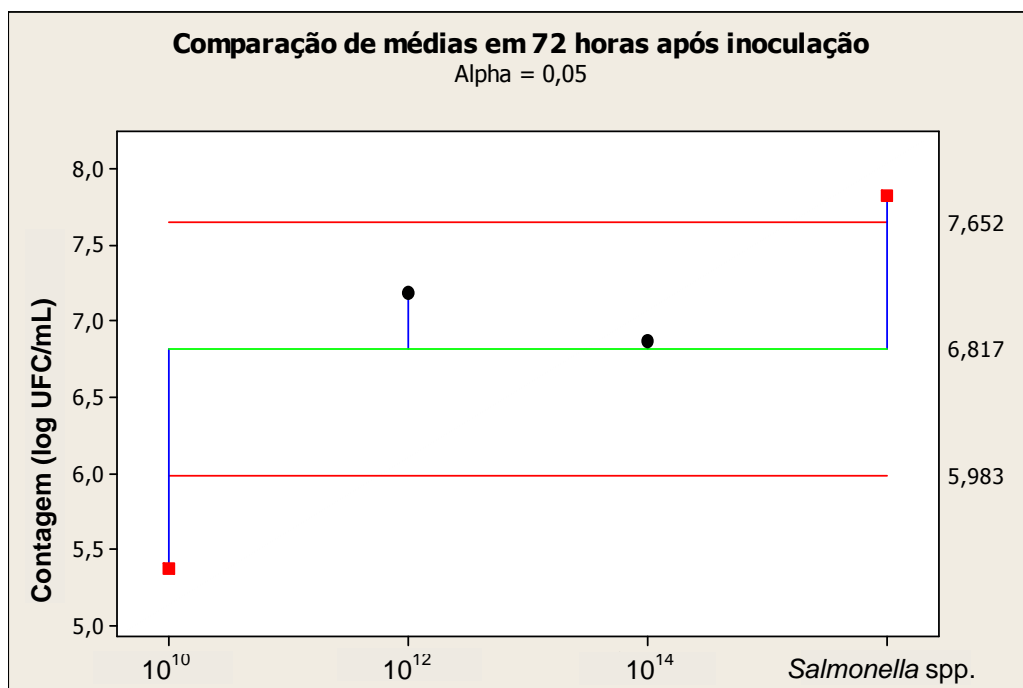


Fig. 11 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL na casca do ovo, com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de três dias. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vivo*.

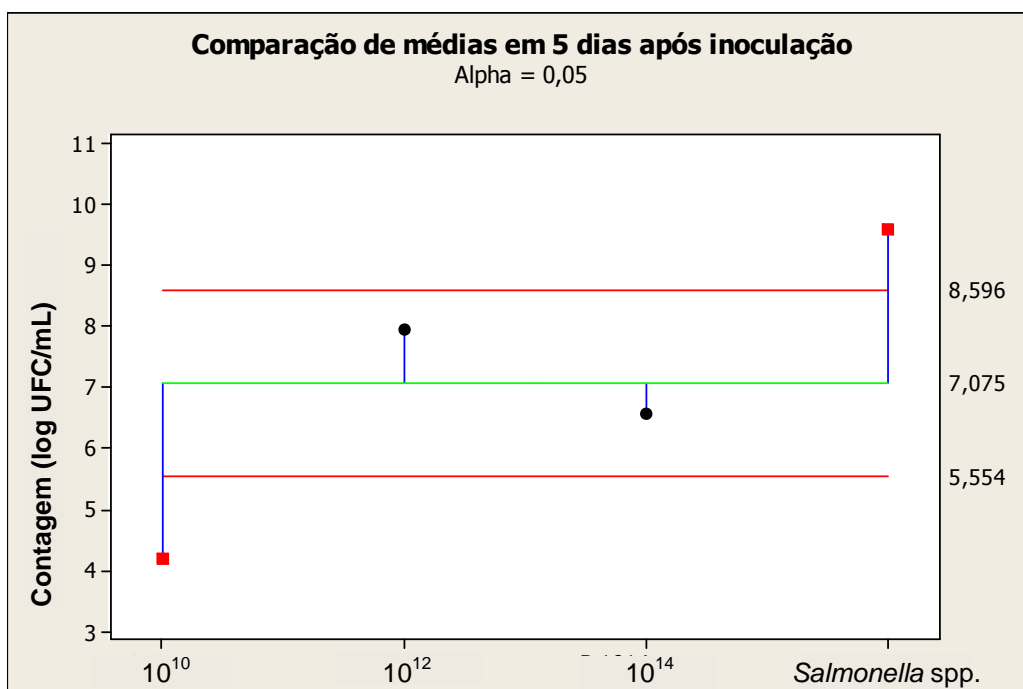


Fig. 12 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL na casca do ovo, com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de cinco dias. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vivo*.

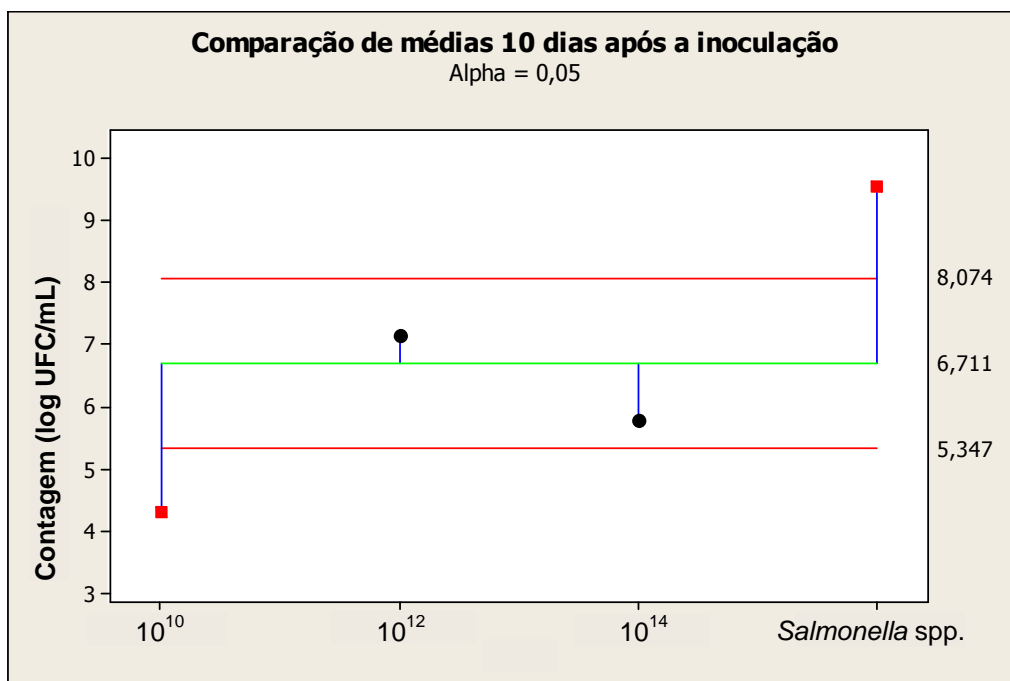


Fig. 13 Efeito do tratamento com a mistura de oito bacteriófagos utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL na casca do ovo, com incubação a 25 °C, sobre a média da contagem de *Salmonella* Enteritidis, inicialmente inoculada na concentração de 10^6 no tempo de 10 dias. Contagem em log UFC/mL. Teste *in vivo*.

A análise dos gráficos leva a interpretação de que em 24 horas de incubação, o tratamento com concentração 10^{14} da mistura de bacteriófagos foi mais eficiente em reduzir a contagem de UFC viáveis na casca do ovo em aproximadamente, dois ciclos log. Em comparação a contaminação inicial de 10^6 , sendo que os demais tratamentos diferiram significativamente do controle e foram estatisticamente iguais entre si. A partir do terceiro dia de incubação o tratamento que apresentou melhor desempenho na diminuição da contagem de UFC viáveis na casca foi a mistura de bacteriófagos a 10^{10} , que reduziu um, dois e dois ciclos log., respectivamente, nos dias três, cinco e 10 quando comparada a contaminação inicial de 10^6 . Os demais tratamentos com bacteriófago foram estatisticamente iguais entre si e diferiram significativamente do controle.

Com relação à contagem UFC viáveis de *Salmonella* spp. na casca do ovo Barros et al. (2001) obtiveram resultados parecidos ao do presente estudo, após contaminarem ovos com *Salmonella* Enteritidis a 10^6 , incubados a 25 °C, previamente lavados com água, onde a contagem permaneceu constante até o sétimo dia, onde atingiu a concentração de 6,7 log. UFC/mL. Enquanto que Oliveira

e Silva (2000), após contaminarem o ovo com *Salmonella* Enteritidis na concentração de 10^5 , observaram a redução da contagem da bactéria durante a armazenagem dos ovos por 15 dias a 25 °C atingindo a concentração de 2,53 log UFC/g.

Com relação à redução da contagem de UFC viáveis de *Salmonella* spp. na casca do ovo através do uso da mistura de bacteriófagos não foram encontrados na literatura estudos para discussão, por tanto os resultados serão discutidos com autores que realizaram trabalhos parecidos reduzindo *Salmonella* spp. em alimentos. Goode, Allen e Barrow (2003) a partir do uso de uma mistura de bacteriófagos na concentração de 10^7 para reduzir a *Salmonella* Enteritidis em pele de frango, obtiveram a redução da contagem de UFC viáveis de dois ciclos log.. Assim como Kocharunchitt, Ross e McNeil (2009) que após contaminarem sementes de alfafa com *Salmonella* Oranienburg na concentração de 10^6 adicionadas de bacteriófagos na concentração de 10^8 conseguiram reduzir um ciclo log. após três horas de incubação a 25 °C. Já Fiorentin, Vieira e Barioni (2005) obtiveram resultados diferentes quando ao utilizarem uma mistura de bacteriófagos na concentração de 10^9 em pele de frango contaminada com *Salmonella* Enteritidis na concentração de 10^8 obtiveram redução de dois, quatro e quatro ciclos log. em três, seis e nove dias de incubação a 4 °C, respectivamente.

Referente a análise da contagem em log. de UFC viáveis no interior do ovo pode ser constatado no gráfico (Figura 14) as médias da contagem de UFC viáveis de *Salmonella* spp. para os grupos avaliados. Nos cinco primeiros dias após a inoculação a contagem de UFC viáveis teve valor nulo, assim como o grupo controle (sem contaminação) que obteve valores nulos para todos os dias do experimento. A comparação do perfil de crescimento mostra diminuição da contagem inicial de UFC viáveis no interior de ovos que sofreram co-contaminação por *Salmonella* Enteritidis e pela mistura de bacteriófagos, o que deve estar diretamente relacionado à diminuição da contaminação na casca para estes tratamentos. Os grupos foram comparados em cada tempo de avaliação, utilizando Análise de Variância (ANOVA) de modo a verificar se a contagem de células observada nos grupos com contaminação de *Salmonella* Enteritidis e bacteriófago diferia significativamente da contagem de *Salmonella* spp..

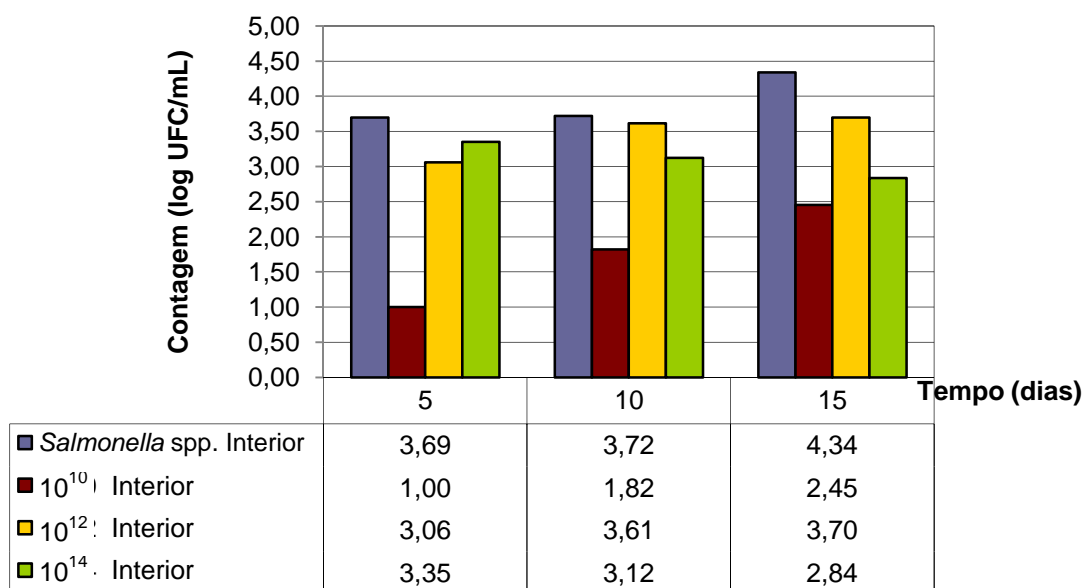


Fig. 14 Efeito do biocontrole no interior do ovo com a mistura de oito bacteriófagos, utilizados nas concentrações iniciais de 10^{10} , 10^{12} e 10^{14} UFP/mL, incubados a 25 °C em diferentes dias, sobre a contagem de *Salmonella* spp., inicialmente inoculada na concentração de 10^6 . Resultados descritos em log. Teste *in vivo*.

A ANOVA realizada para a contagem de UFC viáveis no interior dos ovos nos tempos 5, 10 e 15 dias após contaminação em função dos tratamentos com diferentes concentrações da mistura de bacteriófagos revelou que os grupos contaminados com *Salmonella* Enteritidis e com a mistura de bacteriófagos não diferem significativamente do grupo *Salmonella* spp. para todos os tempos avaliados (p-valor = 0,241; 0,727 e 0,100).

Com relação à contagem de *Salmonella* spp. no interior do ovo, diferente do presente estudo, Schoeni et al. (1995) após contaminarem ovos com fezes de aves contendo 10^4 UFC/g de *Salmonella* Enteritidis com incubação de 25°C observaram que após três dias houve a penetração da bactéria no interior dos ovos na concentração de 75 UFC/g. Diferente de Borges, Pinto e Silva (2009) que obtiveram resultados de penetração mais rápidos, onde ovos incubados a 30°C por 48 horas obtiveram contagem de 5,60 log UFC/mL após contaminação inicial de *Salmonella* Enteritidis a 10^7 .

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos sobre o estudo no uso do biocontrole de *Salmonella* Enteritidis em ovos de galinha (*Gallus gallus*) através do uso de bacteriófagos foi possível concluir que:

- Bacteriófagos líticos para *Salmonella* Enteritidis foram isolados de amostras de fezes de aves de criação, multiplicar no hospedeiro em condições laboratoriais e atingir altas concentrações (10^{15} UFP/mL) pelas metodologias utilizadas;
- Os bacteriófagos isolados não apresentaram atividade lítica sobre as estirpes de bactérias Gram-positivas utilizadas neste estudo;
- Os oito bacteriófagos selecionados apresentaram características de especificidade semelhantes frente as diferentes estirpes de *Salmonella enterica*, podendo pertencer a um mesmo grupo ou linhagem;
- Através da microscopia eletrônica de transmissão foi observado que os oito bacteriófagos selecionados pertencem à família *Podoviridae*;
- A eficácia *in vitro* dos bacteriófagos indicou a lise celular e a diminuição das células em suspensão de *Salmonella* Enteritidis no meio de cultivo utilizado no presente estudo;
- Foi observada presença constante de *Salmonella* spp. na casca e no interior, a partir do quinto dia, dos ovos incubados a 25 °C sem a presença dos bacteriófagos;
- O biocontrole com a mistura de bacteriófagos na casca do ovo se mostrou significativo ao observar a redução da contagem de *Salmonella* spp. nos mesmos quando comparado ao grupo controle de ovos contaminados;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDON, S. T. *Bacteriophage Ecology*: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2008. 508 p.

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

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

ANDRADE, M. A.; CAFÉ, M. B.; JAYME, V. de S.; ROCHA, P. T.; LEANDRO, N. S. M.; STRINGHINI, J. H. Avaliação da qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados em Goiânia, Goiás, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v. 5, n. 4, p. 221-228, 2004.

ANDREATTI FILHO, R. L.; HIGGINS, J. P.; HIGGINS, S. E.; GAONA, G.; WOLFENDEN, A. D.; TELLEZ, G.; HARGIS B. M. Ability of Bacteriophages Isolated from Different Sources to Reduce *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis In Vitro and In Vivo. *Poultry Science*, n. 86, p. 1904–1909, 2007.

APHA – American Public Health Association. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4^a ed. Washington-DC, editado por: Frances Pouch Downes, Keithito. 2001. 676 p.

ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, P.L.; DODD, C.E.R.; REES, C.E.D.; CONNERTON, I.F. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 8, p. 6302–6306, 2003.

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

ATTERBURY, R.J.; VAN BERGEN, M. A. P.; ORTIZ, F.; LOVELL, M. A.; HARRIS, J. A.; DE BOER, A.; WAGENAAR, J. A.; ALLEN, V. M.; BARROW, P. A. Bacteriophage Therapy To Reduce *Salmonella* Colonization of Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 14, p. 4543–4549, 2007.

BASSET, K. D. *Use of bacteriophage as an antimicrobial in food products*. Manhattan, 2007. 57 f. Dissertação (mestre em ciências) – Colégio de agricultura, Kansas State University, Manhattan. Disponível em: <<http://krex.k-state.edu/dspace/bitstream/2097/451/1/KellyBassett2007.pdf>>. Acesso em: 06/05/2009.

BARROS, M. R.; ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; SAMPAIO, H. M.; CROCCI, A. J. Sobrevivência de *Salmonella* enteritidis em Ovos Contaminados Artificialmente, Após Desinfecção e Armazenados em Diferentes Temperaturas. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 3, n. 3, 2001.

BEZERRA, R. *Recuperação e pesquisa de Salmonella spp. e detecção de anticorpos em ovos comerciais de galinha Gallus gallus (Linnaeus, 1758)*. São Paulo, 1995. 59 p. (Dissertação de mestrado – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo).

BIELKE, L.; HIGGINS, S.; DONOGHUE, A.; DONOGHUE, D.; HARGIS, B.M. *Salmonella* host range of bacteriophages that infect multiple genera. *Poultry Science*, v. 86, p. 2536–2540, 2007.

BORGES, K. A.; PINTO, A. T.; SILVA, E. N. Efeito da oscilação de temperatura e umidade do ar no comportamento de *Salmonella* Enteritidis em ovos de galinha contaminados. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.1, n. 37, p. 25-30, 2009.

BRASIL. Portaria N° 1, de 21 de fevereiro de 1990. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Divisão de Inspeção de Carnes e Derivados – DICAR. Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 44, p. 4421, 06 de mar. 1990. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Inspeção de produtos de origem animal – DIPOA. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos decretos nº 1.255, de 25 de junho de 1962; 1.236 de 02 de setembro de 1994; 1.182 de 08 de fevereiro de 1996 e 2.244, de 04 de junho de 1997. Diário oficial da república federativa do Brasil, Brasília, DF, 1997, p.108-109.

_____. Ministério da Saúde. Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.abic.com.br/arquivos/leg_resolucao12_01_anvisa.pdf> Acessado em: 12/11/2009

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 06/05/2009.

CALLAWAY, T.R. Use of naturally-occurring bacteriophage to reduce *Salmonella* in swine prior to harvest. *Research report*, 2007. Disponível em <<http://www.pork.org>>. Acesso em 22/11/2010.

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

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*, v. 71, n. 11, p. 6554–6563, 2005.

CLOCKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A, M. *Bacteriophages: methods and protocols*. Volume 1: isolation, characterization, and interactions. Nova Iorque: Humana Press, 2009. 307 p.

EDUARDO, M. B. P.; KATSUAYA, E. M.; BASSIT, N. P.; MELLO, M. L. R. *Salmonella* Enteritidis, São paulo, Brasil. *REVNET DTA*, v. 4, n. 3, maio 2004. Visto em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/revp04_vol4n3.pdf#page=11>. Acesso em: 10/11/2009.

EVANGELISTA J. *Tecnologia de alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 652p.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D.; BARIONI, W.JR. Use of Lytic Bacteriophages to Reduce *Salmonella* Enteritidis in Experimentally Contaminated Chicken Cuts. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.7, n.4, p. 255-260, 2005.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D.; BARIONI, W.JR; BARROS, S. *In vitro* characterization and *in vivo* properties of *Salmonellae* lytic bacteriophages isolated from free-range layers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 6, n. 2, p. 121 - 128, 2004.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002. 484 p.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

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

GAST, R. K.; HOLT, P. S. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella enteritidis* deposition on the egg yolk membrane. *Poultry Science*, v. 80, p. 997-1002. 2001.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 2. ed, São Paulo: Livraria Varela, 2001. 655 p.

GILL, J.; ABEDON, S. T. *Bacteriophage Ecology and Plants*. Department of food Science – University of Guelph - Ontario, 2003. Disponível em: <<http://apsnet.org/online/feature/phages/>>. Acesso em: 05/05/2009.

GOODE, D.; ALLEN, V. M.; BARROW, P. A. Reduction of Experimental *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Chicken Skin by Application of Lytic Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 8, p. 5032 – 5036, 2003.

GOODRIGE, L; ABEDON, S. Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: Application of phage therapy to industry. V. 53, n. 6, 2003. Disponível em: <www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/literome/0009801.pdf>. Acesso em: 06/05/2009.

GOODRIGE, L.; GRIFFITHS, M. Reporter bacteriophage assay as a means to detect foodborne pathogenic bacteria. *Food Research International*, v. 35, p. 863-870, 2002.

GRAJEWSKI, B.A.; KUSEK, J.W.; GELFAND, H.M. Development of a bacteriophage typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Epidemiology and Infection*, v. 104, p. 403–414, 1985.

GREER, G. G. Bacteriophage Control of Foodborn Bacteria. *Journal of Food Protection*, v. 68, n. 5, p. 1102 – 1111, 2005.

GRIMONT, H.F.; WEILL, F.X. *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*, 9 ed. Institut Pasteur. 2007. Visto em: <<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>>. Acesso em: 23/11/2010.

GUARD-PETTER, J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environmental microbiology*, v. 3, n. 7, p. 421-430, 2001.

HANGENS, S.; LOESSNER, M. J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 76, n. 3, p. 513 – 519, 2007.

HANGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages – New weapons for food safety. *Food Technology*, v. 62, n. 4, p. 46 – 54, 2008.

HIERRO, E.; MANZANO, S.; ORDÓÑEZ, J. A.; HOZ, L.; FERNÁNDEZ, M. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology. *International Journal of Food Microbiology*, v. 135, p. 125-130, 2009.

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

HOLT, J. G.; SNEATH, N. R.; STALEY, J. T; WILLIAM, S. S. T. *Bergey`s manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Estados Unidos: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1994. 787p.

JAKABI M.; GELLI, D.S.; RISTORI, C. A.; DE PAULA, A. M. R.; SAKUMA, H.; LOPES, G. I. S. L.; FERNANDES, S. A.; LUCHESI, R. B. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in raw meat marketed in São Paulo city, Brazil, and Evaluation of its cold tolerance in grownd beef. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 63, n. 2, p. 238-242, 2004.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

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

KOCHARUNCHITT, C.; ROSS, T.; MCNEIL, D. L. Use of bacteriophages as biocontrol agents to control *Salmonella* associated with seed sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, n. 128, p. 453–459, 2009.

KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. *Bacteriophages: biology and applications*. United States of America: CRC Press, 2005. 510p.

MCLAUGHLIN, M.R.; BALAA, M.F.; SIMS, J.; KING, R. isolation of *Salmonella* bacteriophages from swine effluent lagoons. *Journal of Environmental Quality*, v. 35, p. 522-528, 2006.

MEIJERHOF, R. Efectos Del transporte en huevos fértiles y pollitos: desde el huevo al pollito. *Avicultura Profesional*, v. 16, nº 3, p. 18-20. 1998

MOTTA, M. R. A.; BELMONTE, M. A.; PANETTA, J. C. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. *Revista Higiene Alimentar*, v. 14, n. 78/79, p. 59-62, 2000.

MOURA, A. M. A.; OLIVEIRA, N. T. E.; THIEBAUT, J. T. L.; MELO, T. V. Efeito da temperatura de estocagem e do tipo de embalagem sobre a qualidade interna de ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, n. 2, p. 578-583, 2008.

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

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v.52, n.6, 2000.

OLIVEIRA, M. F. M.; SILVA, J. A.; BRITO, M. C. Aspecto da Contaminação Alimentar por *Salmonella*. *Revista Higiene Alimentar*, v. 21, n. 118, p. 47-54, 2007.

OLIVEIRA, A.; SILLANKORVA, S.; QUINTA, R.; HENRIQUES, A.; SERENO, R.; AZEREDO, J. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic

Escherichia. coli strains, *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, p. 1919–1927, 2009.

OLOFSSON, L., ANKARLOO, J., NICHOLLS, I. A. Phage viability in organic media: insights into phage stability. *Journal of molecular recognition*, v. 11, p. 91–93, 1998.

OMS – Organização Mundial da Saúde. *Federal Register*, v. 71, n. 160, p. 47729-47732, 18 August 2006. Disponível em: <www.who.int/idh/rils/results.cfm?language=english&type=ByTopic&strTopicCode=XIIIB&strRefCode=USA>. Acesso em: 10/05/2009.

ORNELLAS, L.H. Técnica Dietética. Ed. Atheneu, São Paulo. 7^a. ed. 2001.

PARDI, M. C., SANTOS, F.I., SOUZA, E.R., PARDI, H.S. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*. Goiânia: editora EdUFF/UFMG, 1993. 2 v. 520 p.

PELKENON, S., AALTO, J., FINNE, J. Differential Activities of Bacteriophage Depolymerase on Bacterial Polysaccharide: Binding Is Essential but Degradation Is Inhibitory in Phage Infection of KI-Defective *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 174, n. 23, p. 7757-7761, 1992.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C. de; TEIXEIRA, I. S. de C.; LIMA, S. I. de; CARNICEL, F. A.; HOFFMANN, F. L. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos Contaminados por *Staphylococcus Aureus*, Ocorridos no Período de Dezembro de 2001 a Abril de 2003, na Região de São Jose do Rio Preto – SP. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 63, n^o2, p. 232-237, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W.. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3^aed, 2001.

SCHOENI, J. L.; GLASS, K. A.; MCDERMOTT, J. L.; WONG, A. C. L. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. *International Journal of Food Microbiology*, n. 24, p. 385-396, 1995.

SILVA, E. N. *Salmonella enteritidis* em aves e saúde pública. *Higiene Alimentar*, v. 9, p. 7-13, 1995.

SILVA JR, E. A. da. *Manual de Controle Higiênico Sanitário em Alimentos*. 5ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2002. 623 p.

STRAUCH, E.; HAMMERL, J. A.; HERTWIN, S. Bacteriophages: New tool for safer food?. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, v. 2, p. 138-143, 2007.

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

TÉO, C. R. P. A; OLIVEIRA, T. C. R. M. *Salmonella* spp.: O ovo como veículo de transmissão e as implicações da resistência antimicrobiana para a saúde pública. *Ciências agrárias*, v. 26, n. 2, p. 195-210, 2005.

TODD, E. C. D. Risk assessment of use of cracked eggs in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, v. 30, p. 125-143. 1996.

TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

WANG,H., SLAVIK, M. F. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 3, p. 276-279, 1998.

APÊNDICE I – Materiais e equipamentos utilizados

- **Materiais permanentes:**
 - Autoclave vertical Prismatec CS e Fabber-Primar modelo 103;
 - Balança de precisão BEL;
 - Banho Maria FANEN;
 - Bico de bunsen;
 - Câmara de fluxo laminar com lâmpada UV;
 - Centrífuga SIGMA 3K30;
 - Contador de colônias mecânico PHOENIX CP 600 plus;
 - Espectrofotômetro Bioespectro SP-22;
 - Estufa bacteriológica FABBE;
 - Estufa B.O.D. FANEM 347 CD;
 - Geladeira CONSUL Biplex CRM45 e Gelomatic Superluxo 330;
 - Homogeneizador CERTOMAT MOII;
 - Medidor de pH Nova Orgânica 7.1;
 - Micro-ondas BRASTEMP;
 - Microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109;
 - Stomacher Marconi MA 440;
 - Vortex Biomixer QL-901;

- **Vidrarias e materiais diversos**
 - Alça de platina;
 - Bastão de vidro;
 - Béquers;
 - Eppendorf de 1,5 mL;
 - Erlenmeyers;

- Espátula de aço inox;
 - Estantes diversas;
 - Fita crepe;
 - Lâminas de vidro;
 - Papel pardo;
 - Pinças;
 - Pipetas automáticas GILSON e LAB MATE;
 - Pipeta de Pasteur;
 - Placas de Petri descartáveis (90x15mm);
 - Ponteiras para pipetas automáticas;
 - Potes de vidro diversos;
 - Provetas;
 - Seringas 10mL e de 20mL;
 - Tubos de ensaio de tamanhos diversos;
 - Tubos de centrífuga;
 - Rolo de barbante;
 - Suportes para membrana;
- Materiais de consumo
 - Ágar ágar, tipo I HIMEDIA;
 - Ágar Bismuto Sulfito ACUMEDIA;
 - Ágar Lisina Ferro DIFCO;
 - Ágar Padrão Contagem MERCK;
 - Ágar Salmonela-Shigela MERCK;
 - Ágar Rambach MERCK;
 - Ágar Tríplice Açúcar Ferro DIFCO;
 - Ágar Verde Brilhante modificado HIMEDIA;
 - Água destilada;
 - Álcool a 70%;
 - Caldo infusão cérebro coração (BHI) HIMEDIA;
 - Caldo Rappaport Vassiliadis HIMEDIA;
 - Caldo Selenito Cistina HIMEDIA;
 - Cloreto de Sódio VETEC;
 - Fosfato de potássio monobásico anidro VETEC;

- Fosfato de sódio bibásico anidro VETEC;
- Gelatina;
- Membrana de acetato de celulose com poro de 0,22 μm e 25 mm de diâmetro SARTORIO;
- Peptona bacteriológica HIMEDIA;
- Solução tampão pH 4;
- Solução tampão pH 7;
- Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) CHEMCO;
- Tela para microscopia eletrônica com filme de “formvar” KOCH
- Trisima-hidroclorida SIGMA.

APÊNDICE II – ANOVA *in vitro*

Análise de Variância para contagem em 2h de cultivo do experimento *in vitro*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	3,8690	1,2897	3,22	0,144
Resíduo	4	1,6027	0,4007		
Total	7	5,4716			

Análise de Variância para contagem em 4h de cultivo do experimento *in vitro*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	12,160	4,053	3,60	0,124
Resíduo	4	4,508	1,127		
Total	7	16,668			

Análise de Variância para contagem em 6h de cultivo do experimento *in vitro*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	29,5303	9,8434	26,93	0,004
Resíduo	4	1,4618	0,3655		
Total	7	30,9922			

Análise de Variância para contagem em 8h de cultivo do experimento *in vitro*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	31,933	10,644	27,47	0,004
Resíduo	4	1,550	0,388		
Total	7	33,484			

Análise de Variância para contagem em 10h de cultivo do experimento *in vitro*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	36,884	12,295	6,76	0,048
Resíduo	4	7,273	1,818		
Total	7	44,157			

Análise de Variância para contagem em 12h de cultivo do experimento *in vitro*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	41,104	13,701	12,97	0,016
Resíduo	4	4,225	1,056		
Total	7	45,330			

APÊNDICE III – ANOVA *in vivo* (casca)

Análise de Variância para contagem em 24h após inoculação do experimento *in vivo*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	12,2173	4,0724	13,43	0,002
Resíduo	8	2,4256	0,3032		
Total	11	14,6428			

Análise de Variância para contagem em 48h após inoculação do experimento *in vivo*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	4,2207	1,4069	1,50	0,287
Resíduo	8	7,5025	0,9378		
Total	11	11,7232			

Análise de Variância para contagem em 72h após inoculação do experimento *in vivo*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	9,7248	3,2416	10,91	0,003
Resíduo	8	2,3774	0,2972		
Total	11	12,1023			

Análise de Variância para contagem em 5 dias após inoculação do experimento *in vivo*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	47,408	15,803	16,00	0,001
Resíduo	8	7,899	0,987		
Total	11	55,306			

Análise de Variância para contagem em 10 dias após inoculação do experimento *in vivo*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	44,529	14,843	18,70	0,001
Resíduo	8	6,350	0,794		
Total	11	50,878			

Análise de Variância para contagem em 15 dias após inoculação do experimento *in vivo*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	27,742	9,247	3,07	0,091
Resíduo	8	24,134	3,017		
Total	11	51,877			

APÊNDICE IV – ANOVA *in vivo* (interior)

Análise de Variância para contagem em 5 dias após inoculação do experimento *in vivo*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	5,6580	1,8860	2,12	0,241
Resíduo	4	3,5628	0,8907		
Total	7	9,2207			

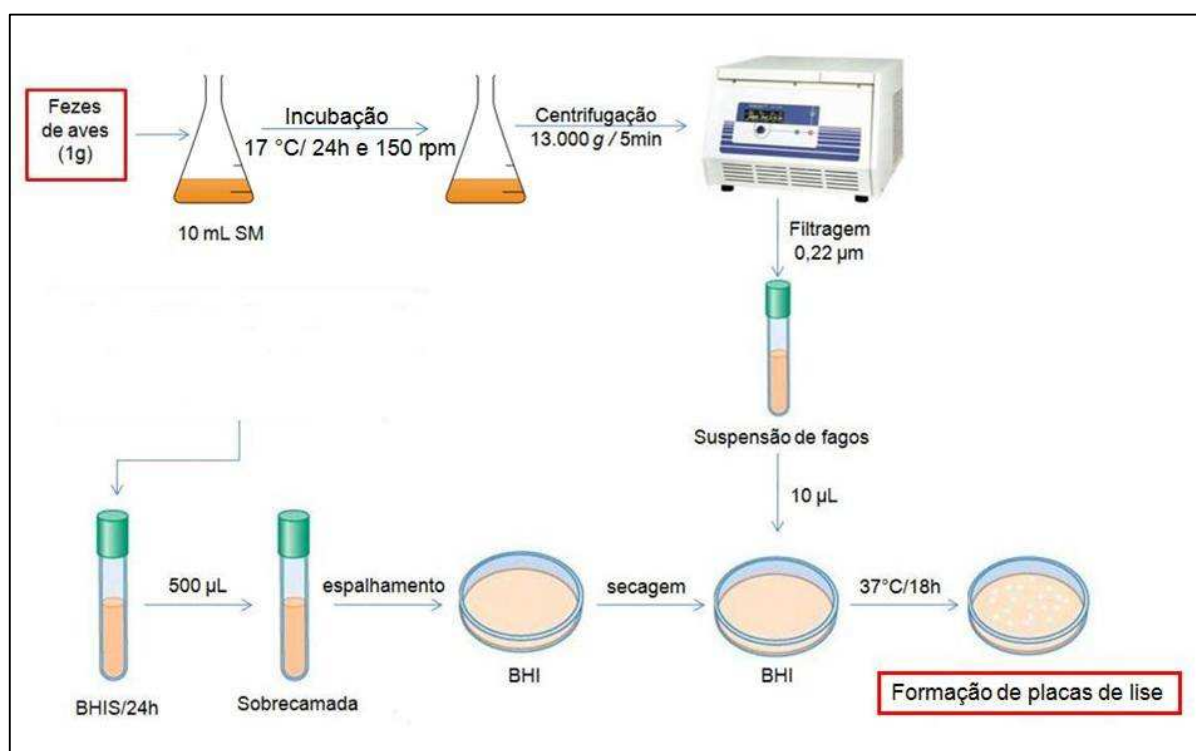
Análise de Variância para contagem em 10 dias após inoculação do experimento *in vivo*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	1,680	0,560	0,46	0,727
Resíduo	4	4,904	1,226		
Total	7	6,584			

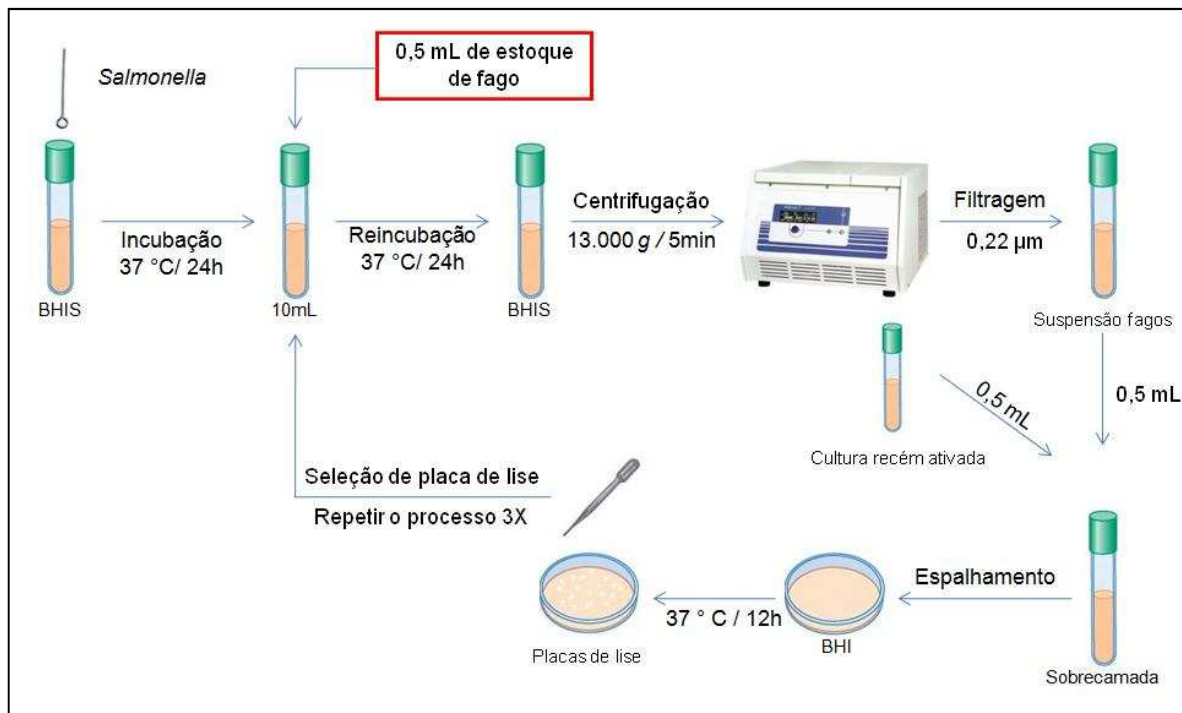
Análise de Variância para contagem em 15 dias após inoculação do experimento *in vivo*

FV	GL	SQ	QM	F	P
Trat	3	4,8845	1,6282	4,19	0,100
Resíduo	4	1,5528	0,3882		
Total	7	6,4372			

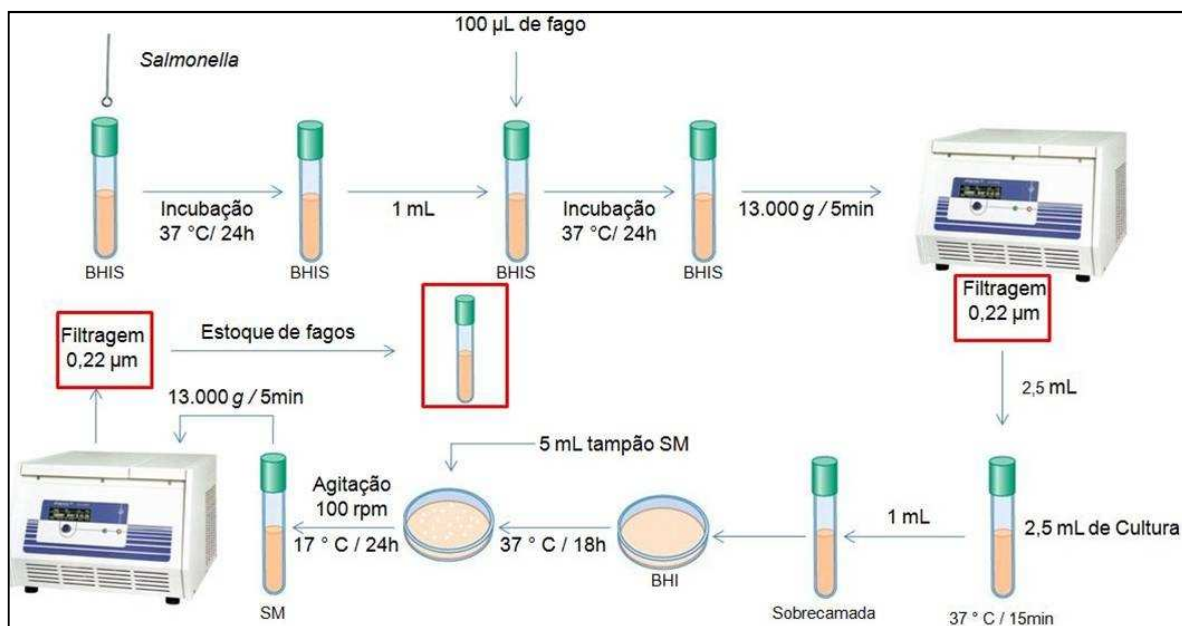
APÊNDICE V – Metodologia de isolamento e caracterização de bacteriófagos



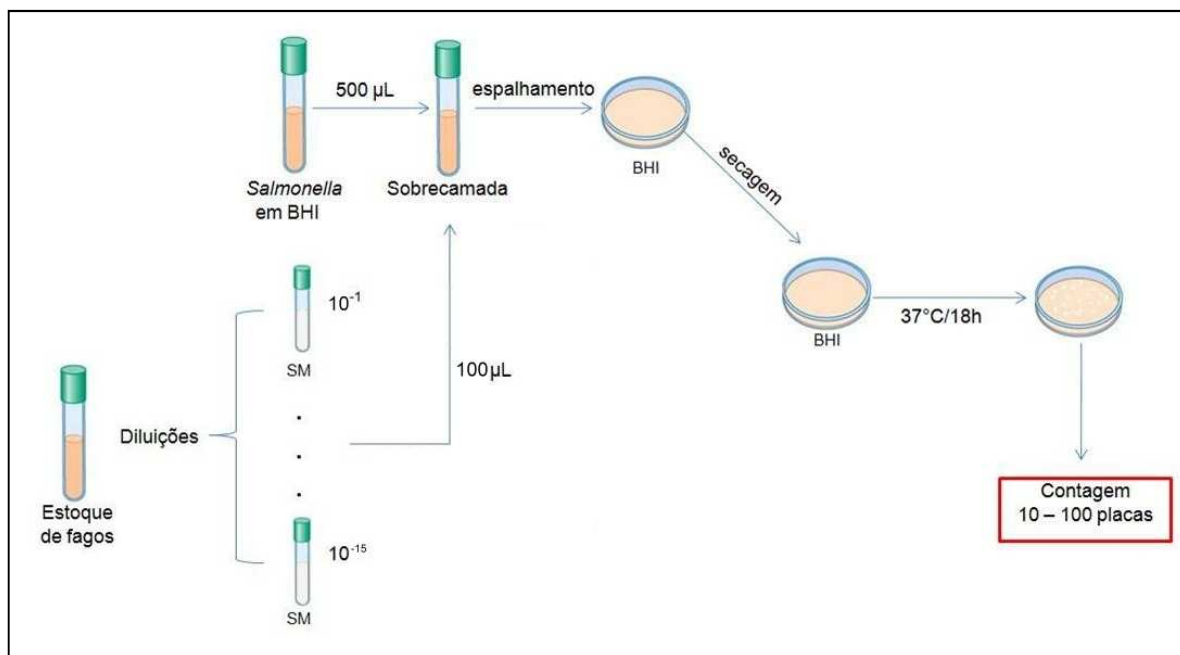
Isolamento de bacteriófagos



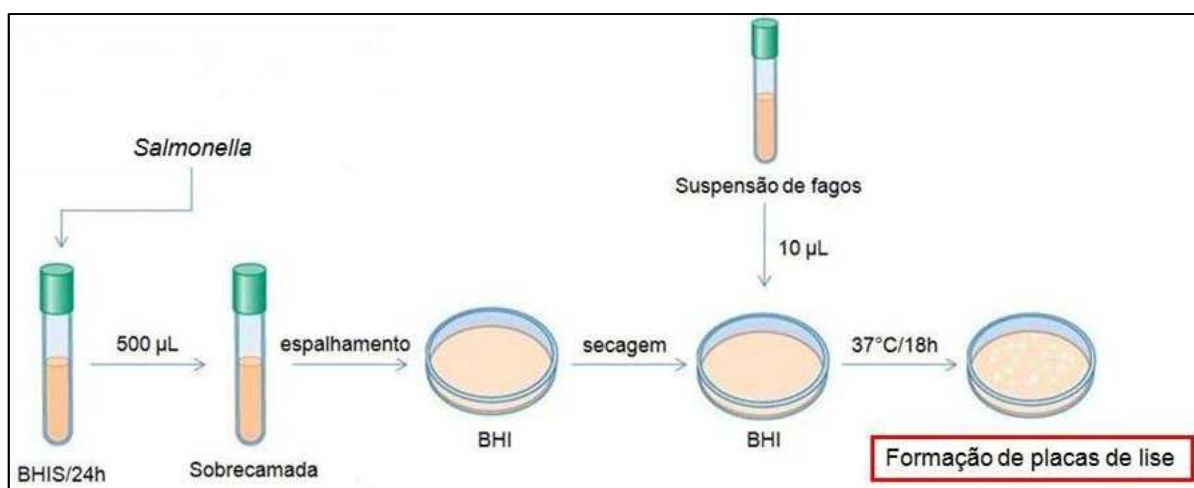
Purificação de bacteriófagos



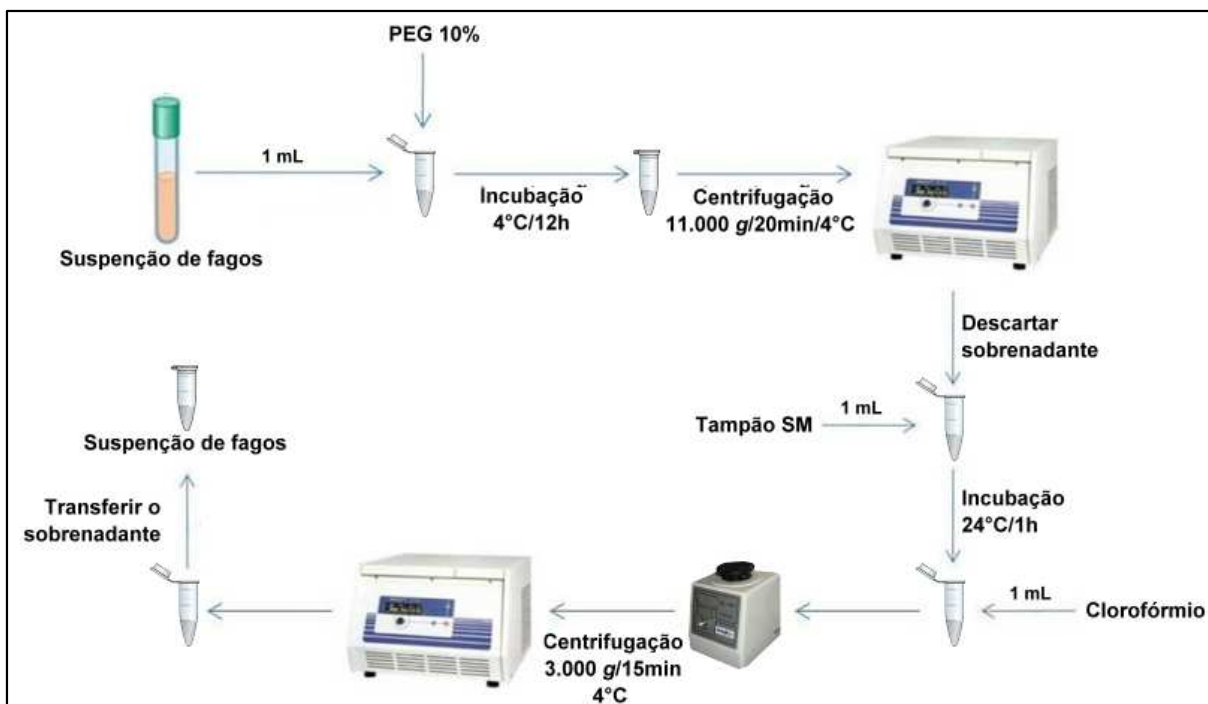
Propagação de bacteriófagos



Titulação de bacteriófagos



Especificidade dos bacteriófagos



Preparo do bacteriófago para avaliação morfológica

APÊNDICE VI – Avaliação da atividade lítica dos bacteriófagos frente à *Salmonella* Enteritidis. Teste *in vivo*

