

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICO E BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA O CONTROLE DE
Salmonella sp. EM SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Mariana Gomes Nogueira

**PORTO ALEGRE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICO E BACTERÍOFAGOS LÍTICOS PARA O CONTROLE DE
Salmonella sp. EM SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Autora: Mariana Gomes Nogueira*
Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias Especialidade
na área de Bacteriologia Aplicada.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Co-orientadora: Dr^a Jalusa Deon Kich

**PORTO ALEGRE
2010**

*Médica Veterinária

N778A Nogueira, Mariana Gomes

Avaliação de probiótico e bacteriófagos líticos para o controle de *Salmonella* sp em suínos experimentalmente infectados. / Mariana Gomes Nogueira. – Porto Alegre: UFRGS, 2010.

76 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2010. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, Orient.

1. Bacteriologia veterinária 2. *Salmonella* sp: suínos 3. Probióticos
4. Bacteriófagos I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema, Orient. II. Kich, Jalusa Deon, Co-orient. III. Título.

CDD 616.07581

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Mariana Gomes Nogueira

Avaliação de probiótico e bacteriófagos líticos para controle de *Salmonella* sp. em suínos experimentalmente infectados

Aprovada em 26 de fevereiro de 2010.

APROVADA POR

Profª Drª Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Orientadora e Presidente da Comissão

Drª Jalusa Deon Kich
Co-orientadora

APROVADA POR

Drª Marjo Cadó Bessa
Membro da Comissão

APROVADA POR

Profª Drª Sílvia Dias de Oliveira
Membro da Comissão

APROVADA POR

Profª Drª Marisa da Costa
Membro da Comissão

*Dedico esta vitória aos meus pais,
cuja fé em mim me ensinou
a ter fé em mim mesma e em Deus*

AGRADECIMENTOS

“Gratidão é uma sensação tão agradável, cresce onde sementinhas são lançadas, floresce sob o sol. De um coração caloroso e bom, cresce mais quando é cuidada. Quase todos temos motivos para a gratidão, quando pessoas em nossas vidas têm tempo para partilhar e nos fazer saber por bons atos que nós estamos em seus pensamentos e que elas se importam.” (Anônimo)

Agradeço as minhas orientadoras Marisa Cardoso e Jalusa Kich e a minha amiga Juliana, obrigada.

*“A genialidade é um por cento inspiração e
noventa e nove por cento transpiração”*

Thomas Edison

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Médias das Densidades Óticas no teste de ELISA indireto para a detecção de IgG anti-*Salmonella* em amostras de soro entre os dias -14 e 35 após a inoculação oral com *Salmonella* Typhimurium em suínos tratados com bacteriófago ou probiótico, e animais não tratados (controle).....41
- FIGURA 2** - Frequência (%) de órgãos positivos para *Salmonella*, colhidos na necropsia de suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico ou não tratados (controle).....42
- FIGURA 3** - Distribuição das densidades óticas de IgA, média, valor mínimo e máximo 35 dias pós-inoculação (DPI) oral com *Salmonella* Typhimurium em suínos tratados com bacteriófago e probiótico, e animais não tratados (controle).....45

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Frequências (%) médias de excretores fecais de *Salmonella* sp. por tratamento e dias pós-inoculação (DPI) entre os dias 3 e 28 após a inoculação oral de *Salmonella* Typhimurium em suínos sem tratamento (controle) ou tratados com suspensão de bacteriófago ou probiótico.....40
- TABELA 2** - Médias da quantificação de *Salmonella* (\log_{10} de NMP) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F para os dois blocos, entre os dias 3 e 28 pós-inoculação (DPI) oral com *Salmonella* Typhimurium em suínos tratados com bacteriófago e probiótico, e animais não tratados (controle).41
- TABELA 3** - Média da quantificação de *Salmonella* (\log_{10} .UFC.g⁻¹) no conteúdo cecal, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco e tratamento em suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico ou não-tratado (controle).....43
- TABELA 4** - Média da quantificação de coliformes totais (\log_{10} .UFC.g⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco, tratamento em dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico, ou animais não tratados (controle).....43
- TABELA 5** - Média da quantificação de *Enterococcus* sp. (\log_{10} .UFC.g⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco, tratamento em dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico, ou animais não tratados (controle).....44
- TABELA 6.** Média da quantificação de *Lactobacillus* sp. (\log_{10} .UFC.g⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco, tratamento em dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico, ou animais não tratados (controle).....45
- TABELA 7.** Média da medida (micrômetros) de vilosidades intestinais, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco e tratamento em suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico ou não tratados (controle).....46

RESUMO

Devido à limitação do uso de antimicrobianos, alternativas que seguem a linha de controle biológico, como os bacteriófagos líticos e probióticos, vêm sendo propostos para o controle de *Salmonella* sp. em animais de produção. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração oral de probiótico e bacteriófagos líticos sobre a ocorrência de infecção e excreção fecal de *Salmonella* sp. em suínos em fase de crescimento e terminação. O experimento foi realizado em dois períodos (blocos), com duração de 49 dias, em suínos com 43 dias de idade. Estes animais foram divididos em três tratamentos: T1 (controle), T2 (bacteriófagos) e T3 (probiótico), com 12 animais em cada tratamento e 10 animais controle. Após duas semanas de alojamento, os suínos foram inoculados com *Salmonella* Typhimurium (dia 0 P.I.). Os animais receberam uma suspensão de bacteriófagos líticos (CNPSA1, CNPSA3 e CNPSA4) por oito dias consecutivos, quatro dias antes e quatro dias após inoculação. O probiótico foi fornecido pela via oral nos dois primeiros dias de alojamento (10^8 Unidade Formadora de Colônia-UFC/ g), posteriormente o produto (10^7 UFC/g) foi fornecido diariamente na ração na concentração de 1%. Foram realizadas colheitas de sangue (-14, 0, 7, 14, 21, 28 e 35 PI) para pesquisa de IgG anti-*Salmonella*, e de fezes (-14, -7, 0, 3, 7, 14, 21 e 28) para pesquisa e quantificação de *Salmonella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e coliformes totais. No dia 35PI os animais foram eutanasiados e fragmentos de órgãos foram coletados para pesquisa de *Salmonella*. Foram coletados segmentos do intestino delgado para análise de morfometria e pesquisa de IgA de mucosa. Os resultados indicam que o tratamento de suínos na fase de crescimento não foi capaz de impedir a infecção dos animais, e a soroconversão ocorreu a partir do dia 7PI. Não foi observada menor excreção de *Salmonella* nos grupos tratados. Não houve efeito sobre a população de *Lactobacillus*, *Enterococcus* e coliformes totais, nem diferença na morfometria de vilosidades entre grupos. O grupo tratado com probiótico apresentou uma tendência a maiores densidades óticas no teste de ELISA para pesquisa de IgA anti-*Salmonella* na mucosa intestinal. A partir disso, conclui-se que o tratamento com probiótico e fagos líticos testados de acordo com o protocolo proposto no presente estudo não influenciam a infecção e excreção de *Salmonella* sp. em suínos em fase de crescimento e terminação.

Palavras Chaves: *Salmonella*, suínos, probiótico, bacteriófagos líticos

ABSTRACT

Due to the limited use of antimicrobial, alternatives that follow the line of biological control, as lytic bacteriophages and probiotics, have been proposed for the control of *Salmonella* sp. animal production. The aim of this study was to evaluate the effect of oral administration of probiotic and lytic bacteriophages on the occurrence of infection and fecal excretion of *Salmonella* sp. in growing pigs. The experiment was conducted in two periods (blocks), lasting 49 days, in 43 days old pigs. These animals were divided into three treatments: T1 (control), T2 (bacteriophages) and T3 (probiotic), with 12 animals in each treatment and 10 control animals. After two weeks of accommodation, the pigs were inoculated with *Salmonella* Typhimurium (day 0 PI). The animals received a suspension of lytic bacteriophages (CNPSA1, CNPSA3 and CNPSA4) for eight consecutive days, four days before and four days after inoculation. The probiotic was given orally in the first two days of lodging (10^8 of Colony Forming Units-CFU / g), then the product (10^7 CFU / g) was supplied daily in the diet at a concentration of 1%. Were collected blood (-14, 0, 7, 14, 21, 28 and 35 PI) for the detection of IgG anti-*Salmonella*, and feces (-14, -7, 0, 3, 7, 14, 21, 28) for research and quantification of *Salmonella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* and Coliforms. On 35PI the animals were euthanized and samples of organs were collected for *Salmonella*. We collected small intestinal segments for morphometric analysis and research of mucosal IgA. The results indicate that treatment of pigs in the growing phase was not able to prevent infection of animals, and seroconversion occurred on the day 7PI. There was no lower excretion of *Salmonella* in the treated groups. There was no effect on the population of *Lactobacillus*, *Enterococcus* and Coliforms, and no difference in the morphology of villi between groups. The group treated with probiotic showed a trend to higher optical densities in ELISA for the detection of IgA anti-*Salmonella* in the intestinal mucosa. From this, it is concluded that treatment with probiotic and lytic phages tested in accordance with the protocol proposed in this study did not influence the infection and excretion of *Salmonella* sp. in growing pigs.

Keywords: *Salmonella*, pigs, probiotics, lytic bacteriophages

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 <i>Salmonella</i> : características gerais.....	16
2.2 Salmonelose.....	17
2.3 Epidemiologia	18
2.4 Patogenia	20
2.5 Controle de <i>Salmonella</i>	22
2.5.1 Probiótico.....	24
2.5.2 Bacteriófagos.....	27
CAPÍTULO III - ARTIGO.....	32
Avaliação de probiótico e bacteriófagos líticos para controle de <i>Salmonella</i> sp. em suínos experimentalmente infectados.....	32
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 <i>Delineamento experimental e seleção dos animais</i>	36
2.2 <i>Tratamentos</i>	37
2.3 <i>Inoculação dos animais</i>	37
2.4 <i>Colheitas de materiais</i>	38
2.5 <i>Análise laboratoriais</i>	38
<i>Isolamento de Salmonella</i>	38
<i>Quantificação de Salmonella</i>	38
<i>Quantificação de Lactobacillus, Enterococcus e Coliformes totais</i>	38
<i>Pesquisa de IgG sérica e IgA ileal</i>	39
<i>Histopatologia e morfometria</i>	39
2.6 <i>Análise Estatística</i>	39
3. RESULTADOS.....	40
3.1 <i>Excreção de Salmonella sp. nas fezes</i>	40
3.2 <i>Pesquisa de IgG sérica</i>	41
3.3 <i>Pesquisa de Salmonella em amostras colhidas na necropsia</i>	42
3.4 <i>Quantificação de Coliformes totais, Lactobacillus sp. e Enterococcus sp.</i>	43
3.5 <i>Pesquisa de IgA</i>	45
3.6 <i>Análise morfométrica de vilosidades intestinais</i>	46
4. DISCUSSÃO	46
5. CONCLUSÃO.....	52
6. REFERÊNCIAS.....	52

CAPÍTULO IV. PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	58
ANEXOS	72
ANEXO 1 – Dieta basal formulada para o experimento.....	73
ANEXO 2 – Composição total de células viáveis, em UFC/g, presentes no probiótico Florafort®Vitafort em pasta e pó.....	73
ANEXO 3 – Protocolo de isolamento de <i>Salmonella</i> segundo Michael, Cardoso e Costa (2003).....	74
ANEXO 4 – Protocolo de quantificação de <i>Salmonella</i> segundo Borowsky, Sella e Cardoso (2004)..	74
ANEXO 5 – Protocolo teste de Elisa para <i>Salmonella</i> Typhimurium, segundo Kich et al. (2007), pesquisa de IgG e adaptação para IgA.....	75
ANEXO 6 – Percentual de presença e níveis descritivos de probabilidade do teste exato de Fisher para histologia, em diferentes tratamentos e lesões para órgãos acometidos.....	76

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

O aumento da população humana e a melhoria de sua condição econômica têm levado a uma demanda crescente por alimentos, destacando-se as proteínas de origem animal, como a carne suína. Em resposta a essa tendência, nas últimas décadas houve um aumento expressivo na produção de suínos, diminuindo a idade de abate em decorrência das melhorias genéticas, nutricionais e sanitárias introduzidas. Este avanço tecnológico resultou no fortalecimento do setor suinícola brasileiro, colocando o país como 4º exportador mundial de carne suína, exportando 59.678 toneladas até setembro de 2009 (ABIPECS, 2009). Paralelamente, houve o desenvolvimento do conceito de qualidade e normas de biossegurança para atender consumidores que passaram a exigir do sistema produtivo maior transparência, bem como procedimentos de manejo, nutrição, sanidade, bem-estar animal, e garantia da inocuidade dos produtos. Este conceito sustenta a abertura de novos mercados e manutenção dos já estabelecidos, acompanhado por programas de rastreabilidade e do preço dos produtos.

Em detrimento dessa intensificação, ainda há problemas que persistem e necessitam ser enfrentados. A contaminação por *Salmonella* é um destes problemas, uma vez que a presença deste microorganismo nos produtos de origem animal representa perigo potencial à saúde pública, por ser uma das principais causas de toxinfecções alimentares em humanos. Os produtos de origem avícola são os principais veiculadores de *Salmonella* para o homem (CDC, 2009; EFSA, 2008), porém, alimentos de origem suína têm representado uma importante parcela dos casos humanos: 15% na Dinamarca e Holanda (BORCH et al., 1996; BERENDS et al., 1998) e 24% nos Estados Unidos (CDC, 2009).

No Brasil não existe uma normativa para controle de *Salmonella* em suínos, porém em 2007 o MAPA emitiu uma circular (Nº130/2007/CGPE/DIPOA) que orienta os frigoríficos exportadores a monitorarem a contaminação das carcaças. Antes mesmo da liberação desta circular as agroindústrias já possuíam protocolos internos de controle bem estabelecidos, uma vez que este patógeno representa barreira à comercialização dos produtos. Os suínos podem ser portadores de uma variedade de sorovares de *Salmonella* que podem não causar sintomas clínicos no animal, porém são fontes de manutenção da bactéria ao longo da cadeia de produção, inclusive nas plantas frigoríficas. A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005) considera potencialmente patogênica para humanos a presença de qualquer sorovar de *Salmonella* no alimento. Por isso, torna-se importante implementar programas de controle de *Salmonella* abrangentes, desde a produção dos animais nas granjas até o processamento no frigorífico.

As infecções bacterianas são normalmente combatidas com o uso de antimicrobianos, porém essa medida tem demonstrado ser ineficiente na redução do número de suínos portadores de *Salmonella* em linfonodos mesentéricos (FEDORKA-CRAY et al., 1999). Conjuntamente, a emergência de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos contaminando alimentos, levou à hipótese de que cepas resistentes poderiam ser transmitidas ao consumidor pela cadeia alimentar. Estudo recente, na Dinamarca, demonstrou a transferência de gene de resistência a sulfonamida identificado em isolado de *Escherichia coli* proveniente de suíno para isolados que colonizavam o intestino humano (TROBOS et al., 2008). A múltipla resistência em isolados de *Salmonella*, proveniente de suínos, tem sido observada na maioria dos países produtores (BAGGESEN et al., 2000; GEBREYES et al., 2004; BYWATER et al., 2004). Nesta perspectiva, a União Européia vem restringindo cada vez mais o uso de antimicrobianos na produção animal e os Estados Unidos ampliando seu programa de uso prudente de antibióticos (NARMS, 2006). O Brasil, como grande produtor e exportador, precisa estar alinhado com essa tendência mundial, ou seja, diminuir a infecção por bactérias patogênicas em condições restritas de uso de antimicrobianos.

Métodos alternativos aos antimicrobianos, como os probióticos, já têm sido adotados na avicultura para diminuir patógenos intestinais (ROSSI et al., 2007). Esses são constituídos de bactérias vivas adicionadas à ração, com o objetivo de reforçar ou restabelecer o equilíbrio entre os componentes da microbiota intestinal, ou seja, promovem a probiose. Seu principal mecanismo de ação baseia-se na propriedade de competir por nutrientes ou por sítios de adesão, denominada exclusão competitiva (FULLER & GIBSON, 1997). Sua eficácia também tem sido atribuída à capacidade de produzir substâncias inibidoras, como as bacteriocinas, que reduzem populações patogênicas (GILLOR et al., 2008). Outro mecanismo indicado é a capacidade de estimulação do sistema imune, tanto local, no intestino, quanto sistêmico (ERICKSON & HUBBARD, 2000). A partir da observação da redução da multiplicação de *Salmonella in vitro* e *in vivo* e a estimulação do sistema imune (VAN DER WILLEN, 2002; LETELLIER et al., 2000), foi sugerido o uso potencial de probiótico contra bactérias patogênicas em suínos.

Anteriormente à descoberta aos antimicrobianos, os bacteriófagos já eram pesquisados quanto à sua eficácia no tratamento de infecções bacterianas. Porém, após a descoberta da penicilina, houve uma redução brusca nas pesquisas com fagos. Somente a algumas décadas houve a retomada das pesquisas, impulsionada pela crescente demanda de alternativas aos antimicrobianos devido ao aumento de agentes multiresistentes. Como as primeiras pesquisas apresentaram problemas de delineamento e reprodutibilidade, foram necessários estudos utilizando equipamentos e técnicas mais eficientes, para obter resultados mais consistentes. Os bacteriófagos apresentam certas características

importantes, como a sua alta capacidade de multiplicação, a sua aparente ausência de toxicidade, sua especificidade para hospedeiros bacterianos e sua abundância na natureza (GARCÍA & LÓPEZ, 2002). Neste sentido, a Embrapa Suínos e Aves tem pesquisado a aplicação de bacteriófagos líticos para o controle biológico de *Salmonella* sp., inicialmente em aves e após em suínos, com resultados animadores (FIORENTIN et al., 2004; SILVEIRA et al., 2006).

Devido às múltiplas possibilidades de contaminação, a implementação de um programa de controle de *Salmonella* deve propor alternativas para diminuir a amplificação do problema ao longo da cadeia de produção. Ou seja, o uso de intervenções isoladas, privilegiando apenas um elo da cadeia de produção, tem pouca chance de sucesso no controle de *Salmonella*. Neste caso, o controle deve ser baseado na intervenção na granja, com correção de fatores de risco e utilização de aditivos na ração que diminuam o nível de infecção e excreção nos animais, na avaliação de pontos críticos para a contaminação em fábricas de ração e linha de abate em frigorífico.

O controle de *Salmonella* na cadeia produtiva de suínos vem sendo estudada numa parceria entre a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a Embrapa Suínos e Aves. Anteriormente objetivando criar ferramentas de estudo e conhecer a amplitude e dinâmica da infecção por *Salmonella* nos rebanhos, e atualmente com uma abordagem sistemática de cada um dos elos de produção, para propor medidas de intervenção com vistas ao controle. Dentro dessa linha de pesquisa, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da administração oral de probiótico e suspensão de bacteriófagos líticos no grau de excreção fecal de *Salmonella* sp. em suínos em fase de crescimento e terminação, infectados experimentalmente.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella*: características gerais

Salmonella tem seu nome em homenagem ao cientista Daniel Elmer Salmon, que realizou seu primeiro isolamento, relacionando *Salmonella Choleraesuis* como causadora da Peste Suína Clássica (PSC). Posteriormente, a descoberta do vírus da PSC, elucidou a característica de co-infecção dos dois agentes em lesões típicas encontradas nos animais acometidos (BUREAU OF ANIMAL IND., 1889). Este gênero bacteriano está amplamente distribuído na natureza, já tendo sido isolado de todos os vertebrados (ROOF et al., 1992), sendo o homem e os animais seus reservatórios primários (CAMPOS, 2005).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, sendo um bacilo Gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo e geralmente móvel com presença de flagelos peritríquios (GRIMONT et al., 2000). As bactérias do gênero *Salmonella* são lactose e indol negativas, produzem ácido sulfídrico (H₂S) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A uréia não é hidrolisada e são capazes de descarboxilar lisina e ornitina (HOLT et al., 1994). *Salmonella* cresce em um pH ótimo entre 6,5 e 7,5, mas pode tolerar pH entre 4,5 e 9,0 (QUINN et al., 2005). Valores menores que pH 4,1 causam a inativação de *Salmonella* (TORTORA et al., 2005). Da mesma forma, multiplicam-se em um amplo intervalo de temperatura que vai de 7 a 45°C (GRIFFITH et al., 2006), porém a temperatura ótima de crescimento é 37°C (HOLT et al., 1994).

Estudos, iniciados por White (1926) e posteriormente continuados por Kauffmann (1941), caracterizando antígenos somáticos (O), representados por lipopolissacarídeos componentes da parede celular, e flagelares (H), de teor protéico, formaram a base de classificação do gênero *Salmonella* em um extenso número de sorovares (GRIMONT et al., 2007). Até hoje, essa classificação é utilizada na rotina, por meio da caracterização antigênica do Esquema de Kauffmann & White. Além dos antígenos somáticos e flagelar, *Salmonella* Thyphi, *Salmonella* Paratyphi e *Salmonella* Dublin apresentam o antígeno capsular único (Vi), o qual contribui para a identificação e para a virulência dos mesmos (D' Aoust et al., 1994).

A classificação taxonômica de *Salmonella* sofreu várias modificações ao longo dos anos e ainda não está totalmente definida. Atualmente, o gênero é dividido em três espécies, *Salmonella enterica*, *S. bongori* (CAMPOS, 2005; HOLT, et al., 1994) e *S. subterranea* (SHELOBOLINA et al., 2005). Por sua vez, *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies, *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (REEVES et al., 1989). A espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* compreende uma grande variedade de sorovares, classificados conforme sua fórmula antigênica. O nome dos sorovares é escrito após a subespécie, ou diretamente após a denominação do gênero, sem

a utilização de itálico (QUINN et al., 2005). A denominação dos sorovares é muitas vezes derivada da localização geográfica do primeiro relato de isolamento (GRIMONT, et al., 2000).

2.2 Salmonelose

A Salmonelose é considerada uma zoonose, além de se destacar como uma importante doença transmitida por alimentos (DTA). No suíno, a salmonelose pode se apresentar na forma localizada de enterocolite, ou sistêmica com sinais de septicemia, dependendo da adaptação da cepa ao hospedeiro (GRIFFITH et al., 2006). Geralmente a infecção intestinal dos suínos por sorovares não-adaptados não causam sinais clínicos. Esta condição, de portador assintomático, representa o maior risco do ponto de vista de segurança dos alimentos, por ser a principal fonte de contaminação das carcaças nos abatedouros (ALVES et al., 1994).

Na salmonelose humana, o período de incubação, para amostras não tifóides, é de 12-72 horas e os sintomas mais comuns são cefaléia, náusea, vômito, cólica abdominal, diarréia e febre moderada. A diarréia pode durar até duas semanas, porém a fase aguda ocorre na primeira semana após a infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A população de maior risco (crianças, idosos e imunodeprimidos) é relacionada como o grupo mais afetado por salmonelose, verificando-se nesse grupo a maioria dos casos de hospitalizações e letalidades nos Estados Unidos (CDC, 2009). Segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA, 2008), os principais alimentos envolvidos em surtos humanos, estão relacionados ao consumo de carnes mal cozidas e ovos crus, associados a quase 40% dos casos na Europa. No Brasil, o Ministério da Saúde (2005), relata o consumo de ovos e seus produtos, como os principais envolvidos (22,6%) nos surtos de salmonelose humana, figurando o sorovar Enteritidis como o mais isolado em alimentos envolvidos nestes surtos.

O risco de infecção por *Salmonella* em humanos pelo consumo de carne suína está relacionado com a presença de carcaças positivas no frigorífico (HURD et al., 2008). Este risco depende de múltiplos fatores: nível de infecção nas granjas (NOLLET et al., 2005); higiene durante o processamento da carcaça no frigorífico (BORCH et al., 1996); condições de estocagem e distribuição (MANN et al., 2004) e, finalmente, a manipulação, armazenamento e preparo da carne pelo consumidor (HILL et al., 2003). Entre os casos de salmonelose em humanos, foi estimado que 24% estão relacionados ao consumo de carne suína nos Estados Unidos (CDC, 2009), sendo responsável por 11% dos surtos na União Européia (ETHELBERG et al., 2008).

A apresentação clínica da salmonelose em suínos depende principalmente da patogenicidade da cepa, da pressão de infecção e da resistência do hospedeiro. Segundo Griffith et al. (2006), quanto à capacidade invasiva, a *S. Choleraesuis* adaptada ao suíno,

não necessita de uma elevada dose infectante para provocar a doença clínica. Por outro lado, *S. Typhimurium*, não adaptada, necessita de uma quantidade maior de bactéria (10^7 UFC/mL) para induzir, experimentalmente, o aparecimento de sintomas. Sendo assim, a forma localizada ou enterocolítica, causada por *S. Typhimurium*, pode cursar com diarreia aquosa, amarelada, fétida durante três a sete dias, podendo ser sanguinolenta e com a presença de estrias de tecido necrótico. O quadro pode ser acompanhado de hipertermia moderada, anorexia, desidratação e perda progressiva de peso com baixa mortalidade (SIMS & GLASTONBURY, 1996). Os sinais clínicos característicos da forma sistêmica, relacionados à infecção por *S. Choleraesuis* podem ser observados como morte súbita e animais com hipertermia ($40,5^{\circ}\text{C}$ - $41,6^{\circ}\text{C}$), relutância em se movimentar, cianose de extremidades, podendo ocorrer tosse úmida, enfraquecimento e diarreia. A mortalidade ocorre geralmente entre dois a quatro dias após o aparecimento dos sintomas (GRIFFITH et al., 2006).

2.3 Epidemiologia

No Brasil, aparentemente, não há ocorrência clínica de *S. Choleraesuis*, sendo registrados alguns casos de diarreias associadas a *S. Typhimurium* (MORES & ZANELLA, 2001). Entretanto, tem sido relatada a alta prevalência de animais portadores assintomáticos de *Salmonella* ao abate (BESSA et al., 2004; KICH et al., 2007), assim como contaminação de produtos (CASTAGNA et al., 2004; MÜRMAN et al., 2008).

Os programas de controle em suínos, principalmente na Europa, classificam as granjas por categorias de risco de introduzir *Salmonella* no frigorífico e são baseados em sorologia complementados com o isolamento do agente (CHRISTENSEN et al., 2002). Para o diagnóstico sorológico foi proposto por Nielsen et al. (1995), um teste de ELISA indireto baseado na mistura de antígenos somáticos provenientes de alguns sorovares prevalentes na Dinamarca. Ressalta-se que para ser uma boa ferramenta de diagnóstico, é necessário que o teste sorológico inclua os sorovares mais prevalentes na região onde será aplicado. A partir de estudos conduzidos experimentalmente, vários testes de ELISA comerciais foram desenvolvidos e estão disponíveis (NIELSEN et al., 1995; PROUX et al., 2000; FARZAN et al., 2007). No Brasil foi desenvolvido um teste baseado nos antígenos somáticos de *S. Typhimurium*, e que tem demonstrado um bom desempenho tanto em animais artificialmente infectados, como na validação a campo (KICH et al., 2007).

Os dados de prevalência bacteriológica e sorológica podem apresentar grande variação, de acordo com a região do estudo e o tipo de material amostrado. Segundo a EFSA (2008), em 2006-2007, foram observadas prevalências de 0 até 30% para *Salmonella* em linfonodos mesentéricos de suínos amostrados em países da União Europeia e Noruega. Por exemplo, em Portugal, Vieira-Pinto et al. (2005) observou a prevalência de

26,7% em linfonodos mesentéricos positivos entre 500 animais amostrados. Por outro lado, estimou-se a presença de 3,3% animais positivos na Alemanha (KÄSBOHER et al., 2000). Nos Estados Unidos, no estado da Carolina do Norte, foi verificada a prevalência de 24,6% de amostras de fezes positivas para *Salmonella*, sendo os sorovares mais freqüentes foram Derby, Typhimurium e Heidelberg (DAVIES et al., 1997). Em outro estudo conduzido no meio oeste dos Estados Unidos, verificou-se prevalência de 14,9% de linfonodos mesentéricos positivos para *Salmonella* sp. (BAHNSON et al., 2005).

No Brasil, pesquisa realizada por Bessa et al. (2004) no Rio Grande do Sul (RS) estimaram prevalência de 55,66% de suínos portadores em linfonodos mesentéricos e conteúdo intestinal entre 300 animais, em três matadouros-frigoríficos sob Inspeção Federal. O sorovar Typhimurium foi o mais isolado, seguido de Agona, Derby e Bredeney. Posteriormente, Schwarz et al. (2009) encontraram 71,6% de suínos portadores em linfonodos mesentéricos, na mesma região amostrada anteriormente, a partir de 800 animais. Neste estudo, os sorovares mais prevalentes foram Agona, Typhimurium e Panamá. Em Santa Catarina, a prevalência de *Salmonella* em linfonodos mesentéricos foi de 65,19 %, englobando várias granjas com um total de 1618 animais amostrados (KICH et al., 2008). Estudo no Paraná observou 17,33% de prevalência em linfonodos mesentéricos, sendo os sorovares mais isolados Derby e Typhimurium (SPOLAORE, 2007). Já no Mato Grosso foram encontradas prevalências de 19,39% em linfonodos mesentéricos, sendo os sorovares mais encontrados semelhantes aos encontrado no Paraná (SILVA et al., 2008).

Utilizando o teste de ELISA desenvolvido por Kich et al. (2007), foi verificada soroprevalência de 98% e 77,8% em suínos terminados em Santa Catarina e Rio Grande do Sul (KICH et al., 2005; SCHWARZ et al., 2009). A soroprevalência é inferior em países da Europa, onde foram relatados 18% na Holanda (SWANEBURG et al., 2001) e 15,2% na Grã-Bretanha (DAVIES et al., 2004). Nos Estados Unidos, Hurd et al. (2003) estimaram uma soroprevalência de 23,6% em suínos terminados.

As principais fontes de infecção por *Salmonella* nos rebanhos são: animais portadores e excretores de *Salmonella* (FUNK et al., 2004); ração (STÄRK et al., 2002) e água contaminadas (AMAECHI & EZERONYE, 2006); contaminação residual no ambiente da granja (BODE et al., 2008); presença de vetores e roedores (SILVA et al., 2006).

Além das fontes de transmissão propriamente ditas, estudos de fatores de risco têm elencado as condições na granja que favorecem a amplificação da infecção do rebanho. Lo Fo Wong et al. (2004) apontaram a prevalência de animais positivos na fase de creche como fator de risco para a amplificação da infecção na fase de crescimento e terminação. Uso de sistema contínuo, sem intervalos para limpeza e desinfecção (VAN DER WOLF et al., 2001), a presença de roedores, entre outras falhas de biossegurança, são fatores importante associados à alta prevalência sorológica para *Salmonella* (KICH et al., 2005). O transporte,

por misturar animais de diferentes origens e por desencadear o estresse, favorecendo a contaminação cruzada (BERENDS et al., 1996) e alimentos contaminados fornecidos aos animais também são citados (FUNK et al., 2001; BAHNSON et al., 2006). Rações peletizadas já foram relatadas como fator de risco, provavelmente devido à recontaminação durante o processo de resfriamento na fábrica (DAVIES & WRAY, 1997).

2.4 Patogenia:

O ciclo fecal-oral de infecção por *Salmonella* é o mais importante, embora já tenha sido demonstrado que o trato respiratório superior também pode servir de porta de entrada para a bactéria (FEDORKA-CRAY et al., 1995). As tonsilas e pulmão foram demonstrados como importantes sítios de invasão e disseminação de *Salmonella* (GRIFFITH et al., 2006). Porém, não está claro se isto ocorre por fatores intrínsecos do patógeno, por fatores externos, como a pouca ventilação nas granjas, ou pela combinação de ambos os fatores (EDRINGTON et al., 2003). A transmissão de *Salmonella* por via aérea em leitões lactentes, mantidos a curta distância, foi demonstrada experimentalmente (OLIVEIRA et al., 2007).

Após a ingestão, a bactéria coloniza as tonsilas do palato mole e aloja-se entre as suas criptas (FEDORKA-CRAY et al., 1995). Entretanto, não se tem informação da forma como *Salmonella* persiste no epitélio tonsilar (HORTER et al., 2003). Conforme Boyen et al., (2006) o mecanismo de colonização das tonsilas deve ser diferente daquele do epitélio intestinal. A hipótese é que a presença de baixo número de bactérias neste local levaria a uma estimulação contínua do sistema imune, porém sem sucesso na eliminação da mesma, provavelmente devido à sua localização protegida e ao microambiente tonsilar (GRAY et al., 1995).

Após a ingestão, as bactérias precisam resistir às barreiras como o suco gástrico, motilidade e microbiota do trato intestinal (CORRIER et al., 1991). Segundo Hurd et al. (2001), *Salmonella* Typhimurium pode ser encontrada em enterócitos e linfonodos mesentéricos duas horas após a ingestão, ou seja, o trato intestinal é colonizado rapidamente. A adesão e invasão ocorrem através das células M encontradas nas Placas de Peyer, concentradas no íleo, sendo as bactérias drenadas para os linfonodos por via linfática (KOHATA et al., 1986).

O ambiente estomacal de suínos pode apresentar pH 2,5 ou inferior, fazendo com que muitas bactérias em trânsito sejam eliminadas (BOYEN et al., 2008^a). Alguns fatores, como a proteção exercida pela matéria orgânica presente nas rações, permitem que *Salmonella* resista às condições estomacais (BÜNZEN, 2006). Somado a isto, as bactérias desenvolvem mecanismos de defesa, como a produção de proteínas de resistência ao choque ácido, já identificado em amostras de *Salmonella* (AUDIA et al., 2001).

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

A aderência à mucosa intestinal é descrita como a primeira etapa da infecção por *Salmonella* em suínos (MCGHIE et al., 2009). Mais de 200 fatores de virulência já foram associados à *Salmonella*, porém muitos não estão ainda completamente caracterizados (GRIFFITH et al., 2006). Os fatores de virulência estão envolvidos na adesão, invasão, citotoxicidade e persistência intracelular. Estruturas como flagelos, fímbrias, ilhas de patogenicidade, plasmídeos, lipopolissacarídeos da membrana externa, estão sendo caracterizados como importantes fatores de virulência (MCGHIE et al., 2009). Dentre estes, a fímbria tipo 1 tem sido relacionada com a atividade de adesão aos enterócitos (ALTHOUSE et al.; 2003).

Após a adesão, *Salmonella* invade o epitélio intestinal através das células M (SCHAUSER et al., 2004). Nesta fase, os genes codificadores pela Ilha de patogenicidade 1 (SPI-1) da bactéria exercem um papel importante, para a invasão e são necessários para a colonização intestinal (BRUMME et al., 2007). Após a adesão ao epitélio intestinal, genes localizados em SPI-1 e que codificam para o sistema de secreção tipo 3 (T3SS) são expressos, resultando no aparecimento de uma estrutura tipo agulha na superfície bacteriana (BOYEN et al., 2008^b). Na seqüência, a injeção de moléculas sinalizadoras para o interior da célula do hospedeiro e a indução de modificações estruturais da actina celular permite que a célula do hospedeiro englobe a bactéria.

Uma vez no citoplasma dos enterócitos, a bactéria permanece protegida no vacúolo formado durante a penetração, é transportada através do citoplasma, atravessa a membrana basal e entra na lâmina própria por exocitose (IBARRA & STEELE-MORTIMER, 2009). Durante a invasão, a bactéria induz a ativação de Interleucina 8 (IL-8) que estimula a migração de neutrófilos para o lúmen intestinal, ocorrendo uma resposta inflamatória intensa no local (VOLF et al., 2007). Esta resposta inflamatória resulta em alterações anatomo-histopatológicas, ocorrendo a perda da integridade epitelial e causando a diarreia intensa, caracterizada pela perda de água, eletrólitos e proteínas plasmáticas para o lúmen intestinal (VANNUCCI & GUEDES, 2009).

Na lâmina própria *Salmonella* é fagocitada por macrófagos e neutrófilos e migram para linfonodos por via linfática. Waterman & Holden (2003) demonstraram que a ilha de

Patogenicidade 2 (SPI-2) é um importante fator para esta sobrevivência dentro de células fagocíticas. A partir dos linfonodos, a bactéria poderá chegar à corrente sanguínea e infectar órgãos internos (MCGHIE et al., 2009).

Apesar da diferença na apresentação clínica entre sorovares adaptados e não adaptados ao hospedeiro, a rota de transmissão é muito similar em ambos os grupos (GRIFFITH et al., 2006). Segundo Paulin et al. (2007), a maior diferença residiria na capacidade de multiplicação, ou seja, o crescimento rápido da *S. Typhimurium* nos enterócitos levaria à indução de resposta inflamatória mais intensa localizada na sua porta de entrada. Ao contrário, *S. Choleraesuis* consegue ficar protegida do ataque do sistema imune, permanecendo em macrófagos e células dendríticas, atingindo a corrente sanguínea e infectando órgãos internos (DLABAC et al., 1997).

Um fator discutido na literatura como facilitador da infecção e excreção de *Salmonella* pelo hospedeiro é o estresse. Embora seu mecanismo direto não esteja totalmente esclarecido, existem algumas indicações de que catecolaminas possam ter um papel importante nessa ocorrência (BOYLE et al., 2008). Já foi demonstrado que as catecolaminas exercem efeito sobre *S. Typhimurium*, levando a um aumento na sua replicação (WILLIAMS et al., 2006). Segundo Griffith et al. (2006), as catecolaminas são liberadas em decorrência do estresse, levando à redução da produção de ácido gástrico e aumentando a motilidade intestinal. Em consequência do aumento no pH estomacal *Salmonella* poderá chegar mais facilmente ao intestino. Segundo Rostagno (2009), a dificuldade em determinar os mecanismos do estresse está relacionada à metodologia de pesquisa em animais, uma vez que os parâmetros utilizados para medir estresse apresentam baixa especificidade. Em outras palavras, é difícil determinar se o aumento da ocorrência de infecção e/ou excreção está realmente relacionado ao estresse e não a outros fatores que possam estar presentes.

2.5 Controle de *Salmonella* sp.

No Brasil não existe uma normativa para controle de *Salmonella* em suínos, porém em 2007 o MAPA emitiu a circular 130 que orienta os frigoríficos exportadores a monitorarem a contaminação das carcaças. Estes resultados devem alavancar iniciativas internas de controle deste patógeno. Comparando os relatórios da EFSA com as prevalências de *Salmonella* em linfonodos mesentéricos de suínos abatidos em frigoríficos brasileiros, constata-se a necessidade de um programa abrangente de controle.

Alguns países da União Européia instituíram programas de controle baseados em testes sorológicos de amostras de suco de carne colhidos ao abate, sendo a porcentagem de soropositivos considerada como critério para a categorização dos rebanhos em diferentes níveis de risco (EFSA, 2008). Estes critérios foram utilizados no maior programa integrado de controle de *Salmonella* na produção de suínos, implementado na Dinamarca

(MOUSING et al., 1997). O mesmo foi introduzido em 1995, identificando as granjas com alta prevalência de *Salmonella* (nível 3, soroprevalência >70%), nas quais foram intensificadas as medidas de controle e o abate dos lotes passou a ser conduzido separadamente. Após cinco anos, os resultados do programa foram avaliados e algumas alterações introduzidas. Nesta primeira avaliação, foi observada uma redução na prevalência de granjas positivas de 14,7% para 7,2% em rebanhos classificados como grandes e de 22,2% para 10,4% em pequenos (CHRISTENSEN et al., 2002). Segundo Alban et al. (2005), após sete anos do programa e com 35,2 % das granjas abaixo de 10% de soroprevalência (nível 1) as medidas direcionadas à indústria assumem uma melhor relação de custo-benefício.

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

Dentro do programa de controle, também é importante o acompanhamento bacteriológico do processo de fabricação das rações fornecida aos animais. Conforme Lo Fo Wong et al. (2002) etapas de descontaminação e o controle do processo, como o uso de temperatura e ácidos, diminuem a contaminação de rações. Em estudo recente, Pellegrini et al. (2009) avaliaram a frequência de isolamento de *Salmonella* em diversas etapas do processo da produção de ração para suínos e verificaram que áreas como armazenagem e recepção foram críticas. Entretanto, mesmo sendo observadas amostras negativas para *Salmonella* na peletização e resfriamento, foram encontradas amostras positivas no produto final, indicando ocorrência de recontaminação no final do processo.

Diversas estratégias têm sido propostas para o controle de *Salmonella*, entre elas o uso de vacinas vivas atenuadas (GIBSON et al., 1999; FOSTER et al., 2005). Uma revisão realizada por Denagamage et al. (2007), observando trabalhos relevantes publicados, concluiu que havia associação positiva entre vacinação e a diminuição da prevalência de

Salmonella em suínos de terminação. A vacinação geralmente tem sido indicada para matrizes, pois na maioria dos casos estas são carreadoras da bactéria e disseminadoras para leitões. Porém, em vários sistemas de produção a maternidade não possui um grande impacto sobre a contaminação dos animais terminados (FUNK et al., 2001; SILVA et al., 2006), uma vez que os leitões sofrem infecção na creche, tornando-se excretores e difundindo a bactéria horizontalmente na terminação. Em estudo conduzido por Kich et al. (2004) foi observada uma correlação entre lotes de leitões soropositivos e excretores de *Salmonella* no momento do alojamento nas granjas de crescimento e terminação.

Antimicrobianos têm sido freqüentemente utilizados no intuito de controlar infecções bacterianas na suinocultura. A administração de tilosina de forma subterapeutica já foi proposta para reduzir a prevalência de *Salmonella* em animais portadores (SHRYOCK et al., 1998). Entretanto, estudos posteriores demonstraram o efeito negativo do uso subterapêutico de clortetraciclina para o controle de *Salmonella* (FUNK et al., 2006; FUNK et al., 2007). Alternativas ao uso de antimicrobianos têm sido sugeridas, entre elas a utilização de produtos de exclusão competitiva como os prebióticos e probióticos (FEDORKA-CRAY et al., 2000; LETELLIER et al., 2001), e os bacteriófagos (XIE et al., 2005).

2.5.1 Probióticos

Os probióticos estão incluídos em um grupo grande de formulações denominadas “alimentos funcionais” para humanos, incluindo iogurte, bebidas, cápsulas, e suplementos alimentares, que visam restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal (O'TOOLE & COONEY, 2008).

A microbiota, em equilíbrio, atua como uma barreira de defesa, impedindo a fixação de patógenos no trato gastrointestinal. Ao contrário, condições de desequilíbrio microbiano como estresse e troca de alimentação podem criar um ambiente favorável à fixação de microorganismos patogênicos. Em resposta a essas modificações, ocorre redução no desempenho, normalmente associada a alterações histológicas e bioquímicas no intestino delgado, como atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas e, conseqüentemente, redução na capacidade de digerir e absorver nutrientes da dieta (PLUSKE et al., 1997).

O termo probiótico foi primeiramente utilizado por Lily & Stillwell, em 1965. Foram definidas como substâncias secretadas por um grupo de microorganismos que estimulam a multiplicação de outro grupo. Porém, Parker em 1974, foi o primeiro a utilizar o termo probiótico no sentido empregado atualmente: como organismos e substâncias que contribuem para o balanço microbiano intestinal. A Organização Mundial da Saúde estabeleceu que: “Probióticos são microorganismos vivos que, quando administrados adequadamente, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (WHO, 2001). Neste sentido, foram definidos como microorganismos vivos adicionados à alimentação humana ou animal,

com o intuito de reforçar ou restabelecer o equilíbrio microbiano intestinal, conferindo, conseqüentemente, saúde ao hospedeiro. Previamente ao uso comercial, microorganismos probióticos devem ser submetidos a diferentes testes para o reconhecimento de sua segurança como aditivo alimentar para humanos e animais (O'TOOLE & COONEY, 2008). Dentre as características necessárias aos probióticos, destaca-se que estes não sejam destruídos pelo suco gástrico, sendo eficazes em diferentes segmentos do sistema digestório, que possuam atividade anti-carcinogênica, estimule o sistema imune e que propiciem efeito benéfico na absorção de nutrientes (VASSALO et al., 1997). As bactérias mais comumente utilizadas em formulações probióticas são os *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Streptococcus*. Algumas espécies de leveduras também são usadas como o *Saccharomyces* (GUPTA & GARG, 2009).

A microbiota do intestino delgado de suínos é composta predominantemente por espécies anaeróbias facultativas, na qual o gênero *Lactobacillus* é o predominante, em uma densidade de 10^7 a 10^9 UFC/g de conteúdo intestinal (SCHIFFRIN & BLUM, 2002). O gênero *Bifidobacterium* também está presente ao longo do trato gastrintestinal, porém com maior densidade populacional (10^8 UFC/g) na porção distal do intestino delgado (íleo). Já na microbiota do ceco e cólon, encontram-se *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* nas mesmas proporções (JOHNSSON & CONWAY, 1992).

Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são caracterizados por serem bacilos Gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase negativos e aerotolerantes ou anaeróbios (SGORBATI et al., 1995). Atualmente, o gênero *Bifidobacterium* inclui 30 espécies, 10 das quais foram isolados de humanos, 17 de origem animal, duas encontradas em águas residuais e uma em leite fermentado. Entre as mais conhecidas constam *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. animalis* (lactis), *B. angulatum* e *B. pseudocatenulatum*, sendo organismos fermentativos, que produzem ácido acético e láctico, sem produção de CO_2 e apresentam temperatura ótima de crescimento entre 37-41 °C. O gênero *Lactobacillus* compreende 56 espécies oficialmente reconhecidas; sendo que as mais utilizadas para fins de aditivo dietético, para humanos, são *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. Estes apresentam habilidade fermentadora semelhante aos *Bifidobacterium*, produzem ácidos, e crescem em temperatura ótima de 37 a 41 °C (LESER et al., 2002).

Os *Enterococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, com temperatura ótima de crescimento de 35°C. Podem ser cultivados na presença de altas concentrações de sal (NaCl 6,5%), toleram sais biliares a 40% e podem hidrolisar a esculina (QUINN et al., 2005). Também podem ser isolados do solo e alimentos. Podem ou não levar a doença, dependendo da espécie. *Enterococcus faecium* apresenta propriedades benéficas, enquanto que *E. faecalis*, *E. avium*, *E. galinarum*, *E. raffinosus*, podem causar endocardite, meningite e

infecção urinárias em humanos (MARTINS, 2005). Em suínos, apesar de não causarem doença clínica podem ser fontes de infecção para humanos.

A habilidade de adesão ao epitélio intestinal é essencial para a permanência e colonização dos microrganismos no trato gastrointestinal, pois desta maneira evitam ser removidos com os movimentos peristálticos (SERVIN & COCONNIER, 2003). Em estudo conduzido em cobaias, biossensores foram utilizados para demonstrar que o fornecimento de probióticos altera a forma de metabolização da dieta pela microbiota endógena intestinal (SONNENBURG et al., 2006). Uma das formas dos probióticos alterarem a composição da microbiota está relacionada com a competição pelo substrato disponível, alterando a dinâmica de utilização de carboidratos. Hojo et al. (2007) evidenciaram que cepas de *Bifidobacterium* reduzem a concentração de vitamina K, através da competição com *Porphyromonas*. A prevenção da colonização do intestino por patógenos em decorrência da saturação dos sítios receptores no epitélio constitui outro mecanismo, denominado de exclusão competitiva (FEDORKA-CRAY et al., 1997). Esse mecanismo é amplamente utilizado pelas espécies probióticas (MATSUMOTO, 2008).

A competição natural entre microrganismos comensais e oportunistas pode ser mediada por mecanismos que envolva a produção de alguns metabólitos produzidos pelas bactérias fermentadoras, como a produção de bacteriocinas. Estas são caracterizadas como peptídeos biologicamente ativos que possuem propriedade bactericida de pequeno espectro (SABLON et al., 2000). Segundo González-Martínez et al. (2003) atuam destruindo a integridade da membrana citoplasmática pela formação de poros, levando à saída de íons de potássio e magnésio, o que provoca morte celular.

O efeito dos probióticos em suínos tem sido demonstrado, avaliando diferentes espécies de bactérias. Santos et al. (2003) observaram diminuição das contagens de *Clostridium* e coliformes e aumento do número de *Lactobacillus* nas fezes de leitões que haviam recebido diariamente leite fermentado com um *pool* de *Lactobacillus*. Em outro estudo realizado em suínos por Letellier et al. (2000), uma mistura de bactérias da microbiota intestinal foi administrada pela via oral a suínos, demonstrando que havia a redução do número de animais portadores de *Salmonella* sp., bem como na população dessa bactéria no intestino dos animais infectados.

Os efeitos dos probióticos sobre a microbiota intestinal de mais difícil comprovação relacionam-se àqueles que envolvem mecanismos indiretos, oriundos do hospedeiro. Está bem evidenciado que alguns probióticos podem suprimir a inflamação através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (O'HARA et al, 2006), apesar das vias moleculares para isto não estarem ainda bem esclarecidas. Mazmanian et al. (2005) demonstraram que uma molécula microbiana única (molécula polissacarídica A, PSA) exercia atividade benéfica, evitando a diarreia em cobaias. Posteriormente, dois grupos de animais foram

inoculados com uma amostra patogênica de *Bacteroides fragilis*, no primeiro grupo foram administradas bactéria que não expressavam PSA e no segundo grupo foi fornecido PSA purificado. Observaram-se sinais de diarreia e produção de citocinas pró-inflamatórias no primeiro grupo, enquanto no segundo grupo, houve a supressão de citocinas pró-inflamatórias (MAZMANIAN et al., 2008).

Quanto ao seu potencial em evitar a multiplicação de bactérias patogênicas no intestino, Gardiner et al. (2004) relataram que o número de enterobactérias foi reduzido quando duas cepas de *Lactobacillus* foram administradas concomitantemente para suínos em fase de creche. Casey et al. (2007) combinaram cinco cepas de *Lactobacillus* sp. e *Pediococcus* sp. que foram fornecidas a leitões recém-desmamados, seguida da inoculação oral de *S. Typhimurium* no sexto dia. Monitorias bacteriológicas conduzidas semanalmente até o trigésimo dia demonstraram que havia redução no número de leitões portadores de *Salmonella* sp.

A adição de probióticos na ração dos animais tem sido cada vez mais utilizada como uma forma natural e ecologicamente correta, eficaz e segura de promover a qualidade da saúde intestinal. No mercado brasileiro e mundial, apresentam-se produtos comerciais de várias composições e fórmulas, com indicações positivas para uso preventivo das infecções intestinais, no restabelecimento da microbiota intestinal e ganho de peso de animais de produção.

2.5.2 Bacteriófagos

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam e replicam-se em bactérias. Em outras palavras, são parasitas intracelulares obrigatórios que utilizam, parcial ou integralmente, a estrutura de bactérias específicas para sua replicação (MAYER, 2005). Segundo Brussow & Kutter (2005), existem aproximadamente 10^{32} bacteriófagos no planeta, sendo a forma mais abundante de vida na Terra. Por isso, são extremamente ubiqüitários, podendo ser isolados do solo, água e do organismo de humanos e animais (DABROWSKA et al., 2005). Dependem de bactérias específicas para sua multiplicação, sendo, portanto uma forma natural e autolimitante de controle, sem interferirem nas demais bactérias presentes no trato digestivo (SULAKVELIDZE et al., 2001).

Quanto a sua morfologia, exibem uma ampla variedade, podendo medir de 24 a 200 nanômetros, e podem apresentar estruturas como capsídeo (ou cabeça), constituinte genômico e cauda, parâmetros utilizados na sua taxonomia. Ao total, os bacteriófagos são subdivididos em treze famílias, sendo a *Myoviridae*, *Poviridae* e *Siphoviridae* as mais freqüentes (ACKERMANN, 2005). O capsídeo pode-se apresentar de forma icosaédrica, cúbica, filamentosas e pleomórfica, onde fornece proteção ao DNA de fita simples ou dupla, ou RNA no seu interior (ACKERMANN, 2001). Alguns apresentam uma estrutura em

forma de cauda que contêm receptores que reconhecem sítios de ligação na parede bacteriana, onde ocorre a fixação e o transporte do genoma viral para o interior da célula (MAYER, 2005). Dentro da célula bacteriana há duas possibilidades de replicação: o ciclo lítico e o ciclo lisogênico. No ciclo lítico, característico dos fagos virulentos, a replicação viral ocorre dentro da célula hospedeira, e após um ciclo de replicação, causa a lise bacteriana com liberação de novas partículas víricas. Já no ciclo lisogênico, característico dos bacteriófagos temperados, o material genético integra-se ao genoma da bactéria hospedeira e permanece integrado replicando-se de forma concomitante à duplicação genômica da bactéria (ALISKY et al., 1998).

Um dos primeiros relatos da existência dos bacteriófagos ocorreu em 1910, pelo microbiologista franco-canadense Felix d'Herelle, no Instituto de Pasteur em Paris. Em 1919, d'Herelle utilizou fagos no tratamento de um menino de 12 anos com disenteria bacilar severa (SULAKVELIDZE et al., 2001), alcançando a redução dos sintomas do paciente após uma única administração. Posteriormente, Richard Bruynoghe e Joseph Maisin empregaram bacteriófagos no tratamento de epidermite estafilocócica, observando a regressão em menos de 48 horas após a aplicação tópica dos bacteriófagos (CHERNOMORDIK, 1989). Após alguns anos, indústrias farmacêuticas começaram a produção comercial de produtos contendo fagos para tratamentos de pacientes acometidos por infecções bacterianas. Entretanto, devido à baixa eficácia do tratamento em alguns pacientes e aos erros metodológicos atribuídos a alguns estudos, os resultados obtidos passaram a ser alvo de discussão. Esse fato, somado à descoberta da penicilina em 1929, levou ao quase abandono de estudos sobre bacteriófagos como agentes terapêuticos. Apenas em países da antiga União Soviética e na Polônia houve continuidade das pesquisas durante o período em que vigorou a chamada Cortina de Ferro, o que acabou por dificultar a difusão do conhecimento gerado (SUMMERS et al., 2001). Nas últimas décadas, os bacteriófagos têm readquirido importância para a comunidade científica, principalmente em decorrência da emergência em bactérias multiresistentes (ALINSKY et al., 1998).

De acordo com Housby & Mann (2009), os bacteriófagos que desenvolvem o ciclo lítico são os que apresentam potencial para o uso como controle biológico de bactérias, pois levam à lise bacteriana. O ciclo de infecção dos bacteriófagos inicia-se pela adesão a receptores específicos presentes na superfície bacteriana, que podem ser proteínas, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, flagelos ou fímbrias (ACKERMANN, 2001). Após fixação, o material genético do bacteriófago é injetado no citosol da bactéria, por meio da contração da cauda (LEVY et al., 1994). Segue-se então a replicação viral, na qual o genoma do bacteriófago é transcrito dentro da bactéria hospedeira, redirecionando a estrutura sintética da célula para produção e formação de novas partículas víricas. Este acúmulo de vírions no citoplasma leva à ruptura da bactéria e à liberação destes devido ao

acúmulo de lisozimas e endolisinas que agem formando poros sobre a camada de peptidoglicano (SKURNIKA & STRAUCH, 2006). De acordo com Hanlon (2007), de uma única célula bacteriana são liberados em torno de 100 vírions prontos para infectar novas células.

É neste processo lítico que assenta a terapia fágica, ou seja, uma vez identificada a bactéria responsável por uma dada infecção, combatê-la naturalmente, usando para isso o fago que lhe é específico. Esse interesse é baseado em certas características como a alta capacidade de multiplicação dos bacteriófagos, a aparente ausência de toxicidade, especificidade para hospedeiros bacterianos, sem atuar na microbiota comensal e sua abundância na natureza (BARROW & SOOTHILL, 1997; GARCÍA & LÓPEZ, 2002). Os bacteriófagos podem controlar as infecções por duas maneiras: através da fagoterapia ativa, onde a maioria das bactérias são lisadas por sua extensa replicação; e a fagoterapia passiva, em que a dose inicial é suficientemente grande para eliminar toda a bactéria-alvo presente (PAYNE et al., 2000). Estudos vêm sendo realizados no intuito de estimar a dinâmica de replicação com relação ao tempo, bem como quantificar o número necessário de fagos para terapia (ABEDON, 2009; ROUCOURT & LAVIGNE, 2009). A fagoterapia pode ser empregada na redução bacteriana em diversas situações: animais pré-abate, em carcaça/produto final ou em humanos pós-infecção (ABEDON, 2009).

A partir do momento que a fagoterapia voltou a tornar-se pauta das pesquisas do ocidente, alguns pesquisadores decidiram investigar em animais, utilizando delineamentos experimentais mais coerentes. Este foi o caso dos experimentos realizados por Smith & Huggins (1979, 1982, 1983, 1987). Um de seus primeiros trabalhos, em 1982, camundongos foram inoculados com 10^7 UFC de *Escherichia coli* K1 intramuscular, posteriormente os animais foram tratados com uma dose intramuscular de fagos ou antibiótico. Os autores observaram que os bacteriófagos foram mais efetivos que as injeções de antibióticos (tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina e sulfa-trimetoprima). No trabalho seguinte, os autores utilizaram fagos no tratamento de diarreias em bezerros, leitões e cordeiros, obtendo resultados igualmente favoráveis (SMITH & HUGGINS, 1983). Soothill (1992) também verificou a proteção quando diferentes bacteriófagos foram utilizados em camundongos experimentalmente infectados com *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, porém o mesmo sucesso não foi observado quando inoculados com *Staphylococcus aureus*.

O uso da fagoterapia contra *Salmonella* também já foi avaliado principalmente em aves, onde se pode observar a redução da bactéria *in vitro* e *in vivo* (FIORENTIN et al., 2005; ANDREATTI FILHO et al., 2007). Em suínos, Lee & Harris (2005), inocularam animais experimentalmente com *S. Typhimurium* e, após, administraram 10^6 UFC/mL de suspensão de bacteriófagos. Os animais foram necropsiados após 3 horas do desafio e analisados quanto à presença de *Salmonella* em diferentes órgãos (tonsilas, fígado, baço, pulmão,

linfonodos mesentéricos e ceco). Como resultado, observou-se a redução significativa de *Salmonella* no ceco em comparação aos animais testemunhas.

Outros estudos relataram falhas na terapia com bacteriófagos, como o descrito por Reynaud et al. (1992), que não conseguiram impedir com a terapia de fagos a ocorrência de enterite causada por *E. coli* O113 em coelhos. Os pesquisadores administraram, por via oral, elevada dose de diferentes bacteriófagos ativos *in vitro* contra esse patógeno, entretanto, mesmo alcançando títulos elevados nas fezes dos animais, os fagos não foram capazes de impedir a ocorrência de diarreia. Segundo Levin & Bull (2004), o uso de bacteriófagos terapêuticamente deve ser adotado somente para reduzir o número de células infectantes a um nível em que as defesas do hospedeiro consigam eliminá-los.

No intuito de criar alternativas eficientes, a Embrapa Suínos e Aves vêm pesquisando desde 2001 a aplicação de bacteriófagos líticos para o controle biológico de *Salmonella* sp. em aves e suínos. Fiorentin et al. (2004) isolaram três bacteriófagos líticos CNPSA1, CNPSA3 e CNPSA4 de fezes de galinhas poedeiras coloniais e, para isto, foram utilizadas como alvo cepas de *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* ATCC14028. Os três fagos apresentam, mediante avaliação por microscopia eletrônica, ultraestrutura de cabeça e cauda, medindo entre 80 e 120nm. Ensaio com nuclease permitiram evidenciar que seu material genético é constituído de DNA de dupla fita (FIORENTIN et al., 2004). Avaliações de seu potencial para uso terapêutico em galinhas revelaram que uma combinação desses fagos foi capaz reduzir em até $3,5 \log_{10}$ a concentração de *S. Enteritidis* em cecos de frangos experimentalmente infectados (FIORENTIN et al., 2005).

Neste cenário, em 2006, Silveira et al. realizaram testes para avaliação da capacidade lítica destes bacteriófagos em diferentes situações. Primeiramente, avaliou-se o espectro de hospedeiros passíveis de serem infectados pelos três fagos, entre diferentes sorovares de *Salmonella*. Foram utilizadas 28 sorovares de *Salmonella* de origens distintas, onde observou-se um espectro de hospedeiro semelhante para os três bacteriófagos. Os fagos CNPSA 1 e 4 apresentaram atividade de lise sobre os sorovares *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Heidelberg*, *S. Meleagridis*, *S. Saintpaul* e *S. Typhimurium* (6/28). O fago CNPSA 3, além dos cinco sorovares citados, apresentou lise sobre as culturas de *S. Dublin* e *S. Montevideo* (8/28). Posteriormente, testou-se quanto à capacidade de ação destes bacteriófagos no trato intestinal de suínos infectados experimentalmente com *S. Typhimurium*. Neste experimento, foi administrada oralmente solução dos fagos em doses de 10^9 Unidades Formadoras de Placa (UFC) /animal, por quatro dias consecutivos após inoculação de *S. Typhimurium*. Esse protocolo de tratamento, entretanto, não se mostrou capaz de eliminar *S. Typhimurium* do trato intestinal e dos tecidos dos leitões.

O uso deste tratamento em carcaças vem se tornando uma alternativa viável no controle de patógenos que contaminam alimentos. Nesta perspectiva, pesquisas utilizando

bacteriófagos como tratamento em carcaça demonstraram uma redução significativa de *Escherichia coli* em carne bovina pré embalagem (O'FLYNN et al., 2004) e *Salmonella* em carcaça de aves (HIGGINS et al., 2005). No Brasil, estudo de Fiorentin et al. (2005), avaliaram a redução da contaminação em cortes de frangos contaminados experimentalmente com uma elevada dose de *S. Enteritidis* PT4 (10^6 UFC/mL) e posterior aplicação da preparação de três fagos. Contudo este tratamento não foi suficiente para eliminar a bactéria do produto. Em 2006, o *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos, aprovou uma preparação contendo seis bacteriófagos líticos com ação sobre *Listeria monocytogenes* para uso em alimentos prontos para consumo. Esta suspensão é relatada como efetiva contra 170 tipos de *Listeria* sp. e será utilizada em produtos cárneos antes da embalagem (PEEK & REDDY, 2006).

Do ponto de vista de segurança do uso terapêutico em humanos e animais, já foram conduzidos alguns estudos (SULAKVELIDZE & KUTTER, 2005; MERRIL, 2008), e não se tem observado reações adversas. Bruttin & Brussow (2005) realizaram teste para avaliar a segurança do uso de fagos em humanos, fornecendo água contendo fagos específicos para *E. coli* (T4) em voluntários adultos e não foram observadas reações adversas. A explicação para isto seria a ausência de atuação dos fagos e seus produtos em células eucarióticas (MATSUZAKI et al., 2005). Porém, é necessário o aprofundamento no conhecimento biológico e farmacocinético dos bacteriófagos líticos no controle de bactérias, pois ainda existem aspectos que necessitam ser esclarecidos. Ainda não se comprovou a ausência de genes de virulência carregados no genoma dos fagos que poderiam ser transferidos para bactérias-alvo (SKURNIK et al., 2007).

Há uma grande variabilidade nos resultados de pesquisas com bacteriófagos como agentes terapêuticos em animais. Além do uso dos bacteriófagos como forma terapêutica, tem se sugerido seu uso como agente de descontaminação de ambiente e equipamentos, no uso de fago-lisina, em diagnóstico, no veículo de terapias gênicas e vacinas (HOUSBY & MANN, 2009). Isso evidencia a necessidade de mais pesquisas para encontrar técnicas que melhor identifiquem o efeito benéfico dos bacteriófagos para depois desenvolver aplicações eficientes.

CAPÍTULO III – ARTIGO**Avaliação de probiótico e bacteriófagos líticos para controle de *Salmonella* sp. em suínos experimentalmente infectados**

Assessment of probiotic and lytic bacteriophages to reduce Salmonella sp. in experimentally infected pigs

Mariana Gomes Nogueira^{*a}; Juliana Cafruni Calveyra^a Jalusa Deon Kich^b; Luiza Letícia Biezus^b; Laís Berno^b; Gustavo Lima; Arlei Coldebella^b; Nelson Mores^b; Marisa R. I. Cardoso^a

^a Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 90540-000 Porto Alegre, RS, Brasil

^b Embrapa Suínos e Aves, Caixa Postal 21, CEP 89700-000, Concórdia, SC, Brasil

[* mariana_nogueira@hotmail.com](mailto:mariana_nogueira@hotmail.com)

Artigo a ser submetido.

RESUMO

Devido à limitação do uso de antimicrobianos, alternativas que seguem a linha de controle biológico, como os bacteriófagos líticos e probióticos, vêm sendo propostos para o controle de *Salmonella* sp. em animais de produção. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração oral de probiótico e bacteriófagos líticos sobre a ocorrência de infecção e excreção fecal de *Salmonella* sp. em suínos em fase de crescimento e terminação. O experimento foi realizado em dois períodos (blocos), com duração de 49 dias, em suínos com 43 dias de idade. Estes animais foram divididos em três tratamentos: T1 (controle), T2 (bacteriófagos) e T3 (probiótico), com 12 animais em cada tratamento e 10 animais controle. Após duas semanas de alojamento, os suínos foram inoculados com *Salmonella* Typhimurium (dia 0 P.I.). Os animais receberam uma suspensão de bacteriófagos líticos (CNPSA1, CNPSA3 e CNPSA4) por oito dias consecutivos, quatro dias antes e quatro dias após inoculação. O probiótico foi fornecido pela via oral nos dois primeiros dias de alojamento (10^8 Unidade Formadora de Colônia - UFC/g), posteriormente o produto (10^7 UFC/g) foi fornecido diariamente na ração na concentração de 1%. Foram realizadas colheitas de sangue (-14, 0, 7, 14, 21, 28 e 35 PI) para pesquisa de IgG anti-*Salmonella*, e de fezes (-14, -7, 0, 3, 7, 14, 21 e 28) para pesquisa e quantificação de *Salmonella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e coliformes totais. No dia 35PI os animais foram eutanasiados e fragmentos de órgãos foram coletados para pesquisa de *Salmonella*. Foram coletados segmentos do intestino delgado para análise de morfometria e pesquisa de IgA de mucosa. Os resultados indicam que o tratamento de suínos na fase de crescimento não foi capaz de impedir a infecção dos animais, e a soroconversão ocorreu a partir do dia 7PI. Não foi observada menor excreção de *Salmonella* nos grupos tratados. Não houve efeito sobre a população de *Lactobacillus*, *Enterococcus* e coliformes totais, nem diferença na morfometria de vilosidades entre grupos. O grupo tratado com probiótico apresentou uma tendência a maiores densidades óticas no teste de ELISA para pesquisa de IgA anti-*Salmonella* na mucosa intestinal. A partir disso, conclui-se que o tratamento com probiótico e fagos líticos testados de acordo com o protocolo proposto no presente estudo não influenciam a infecção e excreção de *Salmonella* sp. em suínos em fase de crescimento e terminação.

Palavras Chaves: *Salmonella*, suínos, probiótico, bacteriófagos líticos

ABSTRACT

Due to the limited use of antimicrobial, alternatives that follow the line of biological control, as lytic bacteriophages and probiotics, have been proposed for the control of *Salmonella* sp. animal production. The aim of this study was to evaluate the effect of oral administration of probiotic and lytic bacteriophages on the occurrence of infection and fecal excretion of *Salmonella* sp. in growing pigs. The experiment was conducted in two periods (blocks), lasting 49 days, in 43 days old pigs. These animals were divided into three treatments: T1 (control), T2 (bacteriophages) and T3 (probiotic), with 12 animals in each treatment and 10 control animals. After two weeks of accommodation, the pigs were inoculated with *Salmonella* Typhimurium (day 0 PI). The animals received a suspension of lytic bacteriophages (CNPSA1, CNPSA3 and CNPSA4) for eight consecutive days, four days before and four days after inoculation. The probiotic was given orally in the first two days of lodging (10^8 of Colony Forming Units - CFU/ g), then the product (10^7 CFU / g) was supplied daily in the diet at a concentration of 1%. Were collected blood (-14, 0, 7, 14, 21, 28 and 35 PI) for the detection of IgG anti-*Salmonella*, and feces (-14, -7, 0, 3, 7, 14, 21, 28) for research and quantification of *Salmonella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* and Coliforms. On 35PI the animals were euthanized and samples of organs were collected for *Salmonella*. We collected small intestinal segments for morphometric analysis and research of mucosal IgA. The results indicate that treatment of pigs in the growing phase was not able to prevent infection of animals, and seroconversion occurred on the day 7PI. There was no lower excretion of *Salmonella* in the treated groups. There was no effect on the population of *Lactobacillus*, *Enterococcus* and Coliforms, and no difference in the morphology of villi between groups. The group treated with probiotic showed a trend to higher optical densities in ELISA test for the detection of IgA anti-*Salmonella* in the intestinal mucosa. From this, it is concluded that treatment with probiotic and lytic phages tested in accordance with the protocol proposed in this study did not influence the infection and excretion of *Salmonella* sp. in growing pigs.

Keywords: *Salmonella*, pigs, probiotics, lytic bacteriophages

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população humana e a melhoria de sua condição econômica têm levado a uma demanda crescente por alimentos protéicos, os quais devem ter sua inocuidade garantida pelo sistema de produção. Nesse contexto, a presença de *Salmonella* nos alimentos representa perigo potencial à saúde pública, por ser uma das principais causas de toxiiinfecções alimentares em humanos (WHO, 2005).

Os suínos podem ser portadores de uma variedade de sorovares de *Salmonella* sem a apresentação de sinais clínicos, atuando como fonte de manutenção da bactéria ao longo da cadeia de produção, inclusive nas plantas frigoríficas. Na suinocultura existem várias possibilidades de transmissão de *Salmonella* como: a presença animais excretoras (Funk et al., 2004); ração e água contaminadas (Stärk et al., 2002); contaminação residual no ambiente da granja (Bode et al., 2008); presença de vetores e roedores (Fosse et al., 2009) e outras falhas de biossegurança (Fedorka-Cray et al., 1997). Por isto, um programa de controle de *Salmonella* deve propor alternativas integradas que diminuam a amplificação do problema ao longo da cadeia de produção, contemplando boas práticas nas fábricas de ração, granjas e frigoríficos. O programa pode associar estratégias direcionadas ao controle da *Salmonella*, como o uso de vacinas (Foster et al., 2005), de prebióticos, probióticos (Letellier et al., 2001) e produtos comerciais de exclusão competitiva (Anderson et al., 1999).

As doenças bacterianas são usualmente combatidas com o uso de antimicrobianos. Porém, na infecção assintomática por *Salmonella*, essa medida tem se mostrado ineficiente na redução de suínos portadores (Fedorka-Cray et al., 1999). Além disto, sugere-se que cepas resistentes a antimicrobianos, ao contaminar alimentos, possam ser transmitidas ao consumidor pela cadeia alimentar (Trobos et al., 2008). A múltipla resistência em isolados de *Salmonella*, originados da produção de suínos, tem sido observados na maioria dos países produtores (Gebreyes et al., 2004; Bywater et al., 2004). Nesta perspectiva, estão sendo ampliados os programas de uso prudente de antibióticos. O Brasil precisa estar alinhado a esta tendência mundial, ou seja, diminuir a infecção por bactérias patogênicas em condições restritas de uso de antimicrobianos. Algumas tecnologias seguem esta demanda, baseadas no controle biológico de patógenos, como o uso de probióticos e bacteriófagos líticos.

O uso de aditivos alimentares que promovem a saúde dos animais, beneficiando seu desenvolvimento e controlando a ação de patógenos, vem sendo adotado na produção animal (Rossi et al., 2007). Entre eles, estão os probióticos, que são constituídos por bactérias vivas que promovem a probiose. Seu principal mecanismo de ação é a exclusão competitiva, baseada na propriedade de competir por nutrientes ou por sítio de adesão, reforçando o equilíbrio da microbiota intestinal (Fuller & Gibson, 1997). Sua eficácia também

tem sido atribuída à capacidade de produzir substâncias inibidoras, como as bacteriocinas, que reduzem populações patogênicas (Klaenhammer, 1982).

O tratamento de infecções bacterianas com bacteriófagos líticos foi estudado no passado (Summers, 2001). A descoberta dos antibióticos resultou no abandono dessa terapia, entretanto a emergência da multi-resistência aos antimicrobianos nas últimas décadas tem despertado novamente o interesse na fagoterapia (Johnson et al., 2008). Os bacteriófagos líticos infectam a bactéria e replicam-se internamente, promovendo a lise celular e liberação de centenas de partículas virais (Guttman et al., 2005). Características importantes dos fagos são: a sua alta capacidade de multiplicação; a sua aparente ausência de toxicidade; sua especificidade para hospedeiros bacterianos e sua abundância na natureza (García & López, 2002). Neste sentido, a Embrapa Suínos e Aves iniciou pesquisas para isolamento de bacteriófagos líticos a partir de fezes de galinhas caipiras (Fiorentin et al., 2004) e sua aplicação no controle biológico de *Salmonella* sp., obtendo resultados promissores na diminuição de excreção fecal em aves (Fiorentin et al., 2005).

A partir disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração oral de probiótico e bacteriófagos líticos sobre a infecção por *Salmonella* sp. e a sua excreção fecal em suínos infectados experimentalmente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal aprovado pelo Comitê em Ética de Pesquisa, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, protocolado sob o número 2007962 CEP-UFRGS.

2.1 Delineamento experimental e seleção dos animais: o experimento foi realizado em dois períodos (blocos), com duração de 49 dias, utilizando 34 animais divididos em três tratamentos: T1 (controle), T2 (bacteriófagos) e T3 (probiótico), com 12 animais para cada tratamento e 10 animais no grupo controle. Previamente ao início do experimento, leitões de 43 dias de idade, foram avaliados quanto à ausência de *Salmonella* sp. A seleção dos animais foi baseada, primeiramente, no resultado da pesquisa de anticorpos IgG anti-*Salmonella* pelo teste de ELISA indireto contendo antígeno somático de *S. Typhimurium* (Kich et al., 2007). Numa segunda etapa, um grupo de 256 leitões negativos no ELISA foram submetidos à pesquisa de *Salmonella* nas fezes por isolamento convencional, conforme metodologia indicada pela ISO 6579, adaptada por Michael et al. (2003) e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tendo como alvo o gene *invA*, conforme Castagna et al. (2004). Foram incluídos no experimento apenas os animais negativos em todos os testes. Estes foram pesados e classificados (leves, médios e pesados) e distribuídos homoganeamente entre os tratamentos. Os leitões foram alojados no prédio de isolamento

do Complexo de Laboratórios de Sanidade e Genéticos Animal da Embrapa Suínos e Aves em salas separadas por tratamento. Antes do alojamento dos animais, as salas foram lavadas, desinfetadas e testadas quanto à ausência de *Salmonella* por meio de suabes de piso submetidos à isolamento bacteriológico e PCR.

2.2 Tratamentos: os animais de todos os tratamentos receberam *ad libitum* água e ração basal nutricionalmente balanceada, sem adição de antibióticos. Cada partida de ração foi testada microbiologicamente quanto à presença de *Salmonella* sp. Após o alojamento, os animais permaneceram duas semanas em adaptação, sendo introduzida gradativamente a ração basal (Anexo 1). Os tratamentos foram administrados como descrito a seguir.

T1-Controle: ração basal, produzido especialmente para o experimento.

T2-Bacteriófago: tratamento oral com 10 mL de suspensão de bacteriófagos líticos CNPSA1, CNPSA3 e CNPSA4 com o título de 10^9 Unidade Formadora de Placa (UFP)/mL, por oito dias consecutivos, quatro dias antes e quatro dias após inoculação de *Salmonella* Typhimurium. Os animais foram contidos individualmente e administrada oralmente a suspensão com o auxílio de seringa. Os bacteriófagos utilizados para o tratamento foram previamente isolados de fezes de galinhas poedeiras coloniais (Fiorentin et al., 2004). Sendo utilizado a metodologia de replicação viral descrita por Fiorentin et al., 2004.

T3-Probiótico: foi utilizado o produto Florafort®Vitafort composto por células viáveis de *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo 2). A administração foi feita de acordo com as recomendações do fabricante: 5g de pasta (10^8 Unidade Formadora de Colônia-UFC/ g de células viáveis), administrada individualmente por via oral, nos dois primeiros dias após alojamento. Posteriormente, o produto em pó (10^7 UFC/g de células viáveis) foi fornecido diariamente na ração na concentração de 1% (1kg/tonelada).

2.3 Inoculação dos animais: duas semanas após o início do experimento, cada animal foi inoculado pela via oral, com auxílio de seringa, com 10 mL de suspensão de *Salmonella* Typhimurium na dose de 10^6 UFC/mL. Esta cepa de *Salmonella* DT177 foi previamente isolada e caracterizada por Bessa et al. (2007) e mantida congelada (-20°C) na coleção de cultura do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS. Para a preparação do inóculo, a amostra foi reativada em Caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI), e confirmada sua identidade. Posteriormente, as colônias isoladas foram semeadas em caldo BHI, e incubadas à 37°C por 18 horas, sendo a concentração das culturas ajustadas com auxílio de escala de MacFarland.

2.4 Colheita de materiais: o dia da inoculação dos animais com *Salmonella* foi considerado como o dia 0 pós-inoculação (0 PI). Foram realizadas colheitas de fezes para análise microbiológica nos dias -14, -7, 0, 3, 7, 14, 21 e 28PI; sangue para pesquisa de IgG sérica nos dias -14, 0, 7, 14, 21, 28 e 35PI. No dia 35PI, os animais foram eutanasiados por aplicação de eletrochoque para insensibilização e, em seguida, foi realizada a sangria. Após, os animais foram necropsiados e avaliados macroscopicamente, sendo coletadas assepticamente, separadas individualmente em sacos estéreis, amostras de: tonsila, pulmão, fígado, baço, linfonodos mesentérico e conteúdo cecal. Para avaliação histopatológica, amostras de tonsila, pulmão, fígado, baço, linfonodos mesentérico, jejuno, cólon ascendente, ceco e reto foram fixadas em formol 10%. Realizou-se a coleta de íleo para morfometria através da ligação de fragmento de cinco centímetros situado a uma distância de 50 cm a partir da válvula íleo-cecal e posteriormente fixados em 5 mL de solução de Bouin. Para o lavado intestinal procedeu-se a ligação de fragmento do íleo com tamanho de 10 cm, à 60 cm da válvula íleo-cecal, onde foram injetados 10 mL de Tampão Fosfato Sorensen estéril. Após massagem, o líquido foi colhido com seringa e armazenado congelado em frasco estéril.

2.5 Análises Laboratoriais:

Isolamento de Salmonella sp.: foi seguido o protocolo indicado pela ISO 6579 e testado por Michael et al. (2003) (Anexo 3). As colônias típicas e suspeitas de *Salmonella* sp. foram submetidas à confirmação com soro polivalente somático O (Probac, Brasil)..

Quantificação de Salmonella sp.: as amostras de fezes foram submetidas a protocolo para quantificação de *Salmonella* pela técnica do Número mais Provável (NMP) segundo BAM (2006) e Borowsky et al. (2004) (Anexo 4). O número de placas positivas para *Salmonella* sp. foi analisado utilizando a equação publicada por BAM (2006), através do software estatístico SAS® (2002).

Quantificação de Lactobacillus, Enterococcus e Coliformes totais: utilizou-se metodologia de contagem de UFC. As amostras de fezes foram diluídas seriadamente, decimalmente, até 10^{-8} em água peptonada 0,1%. Posteriormente homogeneizadas em stomacher (Interscience) e alíquotas das diluições foram semeadas em duplicata pelo método de profundidade (Health Protection Agency, 2008) em agar Rogosa (Difco, EUA) para contagem de *Lactobacillus*; agar Bile Esculina (Himedia, Índia) para *Enterococcus* e agar Bile Vermelho Violeta (VRB, Himedia) para coliformes totais. O agar Rogosa (Difco) foi incubados em microaerofilia e os demais em aerobiose. Após incubação a 37°C por 48-72 horas, as UFCs das colônias típicas em cada meio foram contadas em placas que apresentaram entre 20 a 200 colônias. O número de colônias típicas foi multiplicado pelo

inverso da diluição para o cálculo de UFC/g de fezes e considerado como a enumeração presuntiva das respectivas bactérias.

Pesquisa de IgG sérica e IgA de mucosa ileal: as amostras de sangue (soro) e lavado intestinal, foram centrifugadas e armazenadas a -20°C individualmente. Foi utilizado o teste de ELISA constituído de antígenos lipopolissacarídeos (LPS) purificados de *Salmonella* Typhimurium desenvolvido por Kich et al. (2007). O mesmo teste foi adaptado para análise da detecção de IgA através da substituição do conjugado anti-IgG suína (Sigma, EUA) por anti-IgA suína (Bethyl Laboratories Ind., EUA), e o lavado intestinal testado sem diluições (Anexo 5).

Histopatologia e Morfometria: para avaliações das amostras para histopatologia foi seguido protocolo segundo Luna (1968). Para morfometria, amostras mantiveram-se fixadas em solução de Bouin, durante dezoito horas, processadas para obtenção de secções de cinco micras e coradas pela técnica da hematoxilina e eosina (HE). A mensuração da altura das vilosidade foi realizada em microscópio óptico Jeneval com objetiva de 12,5X com retículo, previamente calibrado com régua específica para isso. A altura da mucosa (distância em micrômetros entre a túnica muscular da submucosa até o topo de vilosidades íntegras) foi medida em três pontos de duas lâminas e em quatro pontos da terceira lâmina, totalizando dez medidas por fragmento. As médias calculadas das dez medidas foram utilizadas para a análise morfométrica.

2.6 Análise Estatística: foi utilizando-se o modelo MIXED do SAS™ (2003) de medidas repetidas, para análise dos dados de NMP das fezes, UFC para microbiota intestinal e observações de densidade ótica (DO) para níveis de IgG em soro. Dados de medidas únicas, como no caso das análises de NMP de *Salmonella* sp. para conteúdo cecal, IgA em lavado intestinal, e morfometria das vilosidades intestinais, foi utilizado o procedimento GLM do SAS™ (2003) de análise de variância. Variáveis de NMP, UFC e IgA foram ajustadas por transformação logarítma (\log_{10}).

Os dados referentes às amostras dos órgãos foram analisados quanto a sua presença ou ausência de *Salmonella* sp, em variável dicotômica por regressão logística. Utilizou-se o procedimento Logistic do SAS™ (2002) e foram estimadas as razões de chances entre as combinações de tratamentos. Após análise exploratória das lesões histopatológicas dos órgãos, aquelas de maior relevância (Anexo 6) foram analisadas pelo Teste exato de Fisher no procedimento FREQ do SAS™ (2002). Foram considerados os efeitos de bloco e tratamento e a interação entre eles em todas as análises.

3. RESULTADOS

Todos os animais utilizados no experimento foram negativos no isolamento e sorologia para *Salmonella* antes da inoculação com cepa *S. Typhimurium*. Assim como não foram isoladas *Salmonella* no piso das instalações e rações fornecida para os animais. Não foram observados sinais clínicos de salmonelose nos animais.

3.1 Excreção de *Salmonella sp.* nas fezes

Tanto o grupo controle, quanto os grupos que receberam tratamento com bacteriófago e probiótico apresentaram uma elevada frequência de excretores de *Salmonella sp.* durante todo o período do experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Frequências médias de excretores fecais (%) de *Salmonella sp.* por tratamento e dias pós-inoculação (DPI) entre os dias 3 e 28 após a inoculação oral de *Salmonella Typhimurium* em suínos sem tratamento (controle) ou tratados com suspensão de bacteriófago ou probiótico.

Bloco	DPI	Controle			Bacteriófago			Probiótico		
		Total de animais	Nº positivos	%	Total de animais	Nº positivos	%	Total de animais	Nº positivos	%
1	3	4	2	50,0	6	6	100,0	6	4	66,7
1	7	4	4	100,0	6	3	50,0	6	4	66,7
1	14	4	1	25,0	6	2	33,3	6	1	16,7
1	21	4	1	25,0	6	2	33,3	6	3	50,0
1	28	4	0	0,0	6	0	0,0	6	0	0,0
2	3	6	4	66,7	6	6	100,0	6	4	66,7
2	7	6	6	100,0	6	6	100,0	6	4	66,7
2	14	6	6	100,0	6	4	66,7	6	5	83,3
2	21	6	4	66,7	6	5	83,3	6	6	100,0
2	28	6	6	100,0	6	5	83,3	6	6	100,0

Observou-se interação entre bloco, tratamento e DPI ($p \leq 0,0021$) na quantificação de *Salmonella* nas fezes (Tabela 2). Nos dois blocos, em todos os tratamentos, foi possível quantificar *Salmonella* três dias após a inoculação, embora com diferenças entre as médias. Tanto no primeiro bloco quanto no segundo, houve um aumento significativo na excreção de *Salmonella* no grupo controle entre os dias 3PI e 7PI. O pico de excreção ocorreu no dia 7PI e foi seguida da diminuição do número de *Salmonella sp.* nas fezes partir do dia 14PI. Nos grupos tratados com bacteriófago e probiótico o pico de excreção foi observado no dia 3PI, com diferença estatística em relação ao controle no bloco 1 para os probióticos ($p=0,0075$) e no bloco 2 para o bacteriófago ($<0,0001$). A contagem de *Salmonella sp.* diminuiu do dia 3PI em diante para ambos os grupos tratados nos dois blocos, permanecendo sem diferença estatística em relação ao controle a partir do dia 14PI.

Tabela 2. Médias da quantificação de *Salmonella* (\log_{10} de NMP) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F para os dois blocos, entre os dias 3 e 28 pós-inoculação (DPI) oral com *Salmonella* Typhimurium em suínos tratados com bacteriófago e probiótico, e animais não tratados (controle).

Bloco	DPI	Controle	Bacteriófago	Probiótico	P \leq 0,05
1	3	0,23 \pm 0,23a A	1,86 \pm 0,42a	4,30 \pm 1,52b A	0,0075
1	7	4,07 \pm 1,65 B	0,49 \pm 0,22	1,76 \pm 1,33 AB	0,0843
1	14	0,25 \pm 0,25 A	0,38 \pm 0,24	0,17 \pm 0,17 B	0,9795
1	21	0,15 \pm 0,15 A	0,97 \pm 0,72	0,41 \pm 0,20 B	0,4269
1	28	0,00 \pm 0,00 A	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00 B	1,0000
P\leq0,05		0,0459	0,1646	0,0001	
2	3	0,87 \pm 0,48a A	5,66 \pm 0,73b A	1,11 \pm 0,70a	<,0001
2	7	5,05 \pm 1,51a B	1,69 \pm 0,66b B	0,67 \pm 0,32b	0,0072
2	14	2,52 \pm 1,03 A	1,75 \pm 0,67 B	3,59 \pm 1,22	0,2069
2	21	0,85 \pm 0,27 A	1,43 \pm 0,51 B	1,93 \pm 0,25	0,1933
2	28	1,65 \pm 0,20 A	1,16 \pm 0,58 B	2,02 \pm 0,40	0,1416
P\leq0,05		0,0027	<0,0001	0,1186	

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).
Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

3.2 Pesquisa de IgG sérica

Antes da inoculação com *S. Typhimurium* todos os animais eram soronegativos no teste de ELISA, sendo a soroconversão evidenciada a partir do dia 7PI (Figura 1). Nos três grupos de tratamento, a média de densidade óptica (DO) 14 dias antes da inoculação (-14PI) e no dia da inoculação (0PI) variou de 0,07 e 0,09, abaixo do ponto de corte estabelecido para o teste (KICH et al., 2007). Na primeira coleta após a inoculação (dia 7PI) foi observado aumento das DOs médias, o qual se manteve gradativo em todos os grupos até o final do experimento. Não foi observado efeito de tratamento sobre a média de densidade ótica dos grupos.

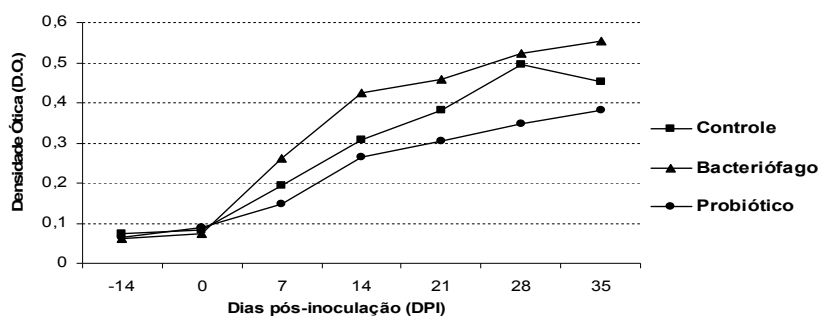


Figura 1. Médias das Densidades Óticas no teste de ELISA indireto para a detecção de IgG anti-*Salmonella* em amostras de soro entre os dias -14 e 35 após a inoculação oral com *Salmonella* Typhimurium em suínos tratados com bacteriófago ou probiótico, e animais não tratados (controle).

3.3 Pesquisa de *Salmonella* em amostras colhidas na necropsia.

Todos os animais foram positivos em pelo menos um dos tecidos colhidos na necropsia, totalizando 61,7% (126/204) de amostras positivas. (Figura 2), com frequência variando de 25% (baço em T2 e T3) a 91,67 % (tonsila em T2 e T3). Entre os tratamentos, o número de isolados variou conforme o grupo, no controle (T1) observou-se 76,6% (46/60) de positivos, enquanto que nos grupos tratados com bacteriófago e probiótico observou-se 62,5% (45/72) e 48,6% (35/72), respectivamente. Mesmo sendo observadas diferenças numéricas na frequência de amostras positivas entre os grupos, houve diferença estatística ($p=0,0383$) apenas em relação ao pulmão no grupo tratado com probiótico (T3). Na estimativa da razão de chance, pulmões dos animais do grupo controle (T1) apresentaram 12,6 vezes mais chance ($p=0,0356$) de ter isolamento de *Salmonella* sp. do que os animais tratados com probióticos (T3).

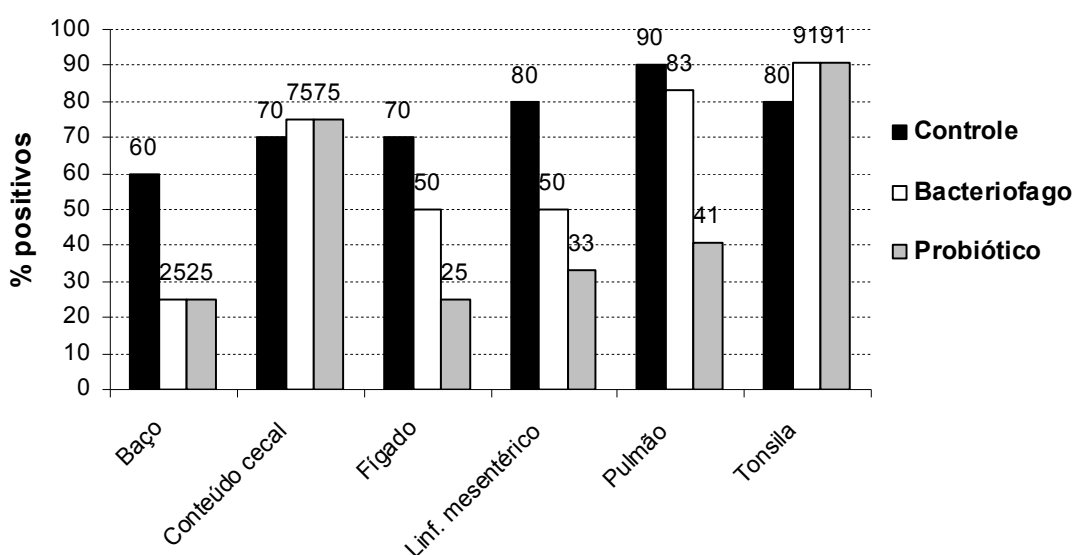


Figura 2. Frequência (%) de órgãos positivos para *Salmonella*, colhidos na necropsia de suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico ou não tratados (controle).

A presença de *Salmonella* no conteúdo cecal foi observada em 70% dos animais, considerando todos os tratamentos em conjunto. Na quantificação de *Salmonella* no conteúdo cecal (Tabela 3) foi observado interação entre bloco e tratamento ($p=0,0514$). No bloco 1, todos os grupos apresentaram um baixo isolamento a partir do conteúdo cecal, ocorrendo o inverso no segundo bloco. Não foi observado efeito de tratamento para esta variável.

Tabela 3. Média da quantificação de *Salmonella* (\log_{10} .UFC.g⁻¹) no conteúdo cecal, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco e tratamento em suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico ou não-tratado (controle).

Bloco	Controle	Bacteriófago	Probiótico	Pr > F
1	0,11 ± 0,00	1,07 ± 0,24	0,37 ± 0,17	0,1204
2	3,95 ± 0,37	3,35 ± 0,12	3,98 ± 0,62	0,3339

Alterações histopatológicas inespecíficas foram observadas nos diferentes órgãos (Anexo 6). A principal lesão, compatível com a infecção por *Salmonella* sp. encontrada neste estudo foi a pneumonia intersticial, observada em 79,1% dos animais. *Salmonella* sp. foi isolada de todos os pulmões com esse tipo de lesão no grupo controle, mas o mesmo resultado não foi encontrado nos grupos tratados (T2 e T3).

3.4 Quantificação de Coliformes totais, *Lactobacillus* sp. e *Enterococcus* sp.

Os resultados da enumeração dessas bactérias estão apresentados nas tabela 4, 5 e 6. Observa-se uma distribuição homogênea dos dados, seguindo a mesma tendência nas três leituras, embora tenha ocorrido interação entre bloco, tratamentos e DPI. As contagens de UFC do -7PI foram realizadas antes dos animais receberem os bacteriófagos e o probiótico, portanto as diferenças apresentadas entre os tratamentos representam a variação inicial dos grupos de animais.

Os coliformes totais não apresentaram diferença entre grupos após a aplicação dos tratamentos. Ao longo do tempo a população permaneceu constante ou teve tendência ao aumento (bacteriófagos no bloco 1, controle e probiótico no bloco 2).

Tabela 4. Média da quantificação de coliformes totais (\log_{10} .UFC.g⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco, tratamento em dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico, ou animais não tratados (controle).

Bloco	DPI	Controle	Bacteriófago	Probiótico	Pr > F
1	-7	6,41±0,80a	4,83±0,37b A	5,23±0,42ab	0,0480
1	14	6,58±0,26	5,75±0,26B	5,98±0,41	0,2738
1	35	5,57±0,18	6,06±0,30B	5,92±0,15	0,4219
Pr > F		0,0908	0,0371	0,2839	
2	-7	4,72±0,15aA	6,11±0,54b	5,47±0,37abA	0,0187
2	14	6,41±0,24B	6,94±0,30	6,32±0,37AB	0,3360
2	35	6,21±0,15B	6,33±0,39	6,75±0,14B	0,1792
Pr > F		<0,0001	0,2153	0,0279	

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).
Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

Para *Enterococcus* foi observado aumento na contagem apenas no bloco 1 no tratamento com bacteriófagos (T2), enquanto os demais grupos mantiveram-se constantes. Apenas esse grupo no dia 35PI apresentou uma contagem significativamente maior que o controle e o grupo tratado com probióticos.

Tabela 5. Média da quantificação de *Enterococcus* sp. (\log_{10} .UFC.g⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco, tratamento em dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico, ou animais não tratados (controle).

Bloco	DPI	Controle	Bacteriófago	Probiótico	Pr > F
1	-7	6,51±0,10	5,69±0,39A	5,48±0,37	0,1013
1	14	5,87±0,62	5,32±0,31A	5,47±0,22	0,5177
1	35	6,38±0,21a	7,42±0,41bB	6,03±0,19a	0,0069
Pr > F		0,4583	<0,0001	0,3479	
2	-7	6,25±0,17a	7,00±0,34ab	7,11±0,40b	0,0378
2	14	6,79±0,30	6,42±0,30	6,23±0,14	0,3123
2	35	6,38±0,12	6,86±0,34	6,99±0,27	0,2112
Pr > F		0,2009	0,3989	0,1019	

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).
Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

No dia 14PI, que representa 28 dias após o início dos tratamentos, observou-se diferença estatística na contagem de *Lactobacillus* no bloco 1, onde a contagem foi menor no grupo tratado com bacteriófago e os demais grupos (T1 e T3) não diferiram entre si. Ao longo do tempo, resultados contraditórios entre os blocos foram observados. No primeiro bloco houve um aumento significativo das contagens nos três tratamentos no dia 14PI, mantendo-se a população elevada no dia 35PI. No segundo bloco os animais apresentavam uma contagem de *Lactobacillus* mais elevada no dia 7 antes da inoculação e mantiveram esse perfil após o início dos tratamentos (14PI), porém no dia 35PI houve um decréscimo significativo no grupo controle (T1) e no grupo tratado com bacteriófago (T2), mantendo-se as contagens apenas no grupo tratado com probiótico.

Tabela 6. Média da quantificação de *Lactobacillus* sp. (\log_{10} .UFC.g⁻¹) nas fezes, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco, tratamento em dias após a inoculação (DPI) em suínos inoculados com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico, ou animais não tratados (controle).

Bloco	DPI	Controle	Bacteriófago	Probiótico	Pr > F
1	-7	6,62±0,10A	6,28±0,16A	6,35±0,18A	0,3982
1	14	9,30±0,14aB	7,93±0,09bB	9,15±0,19aB	0,0040
1	35	8,98±0,10B	8,37±0,13B	8,62±0,08B	0,1862
Pr > F		<0,0001	<0,0001	<0,0001	
2	-7	8,83±0,13A	9,25±0,17A	9,00±0,10	0,0988
2	14	9,13±0,33A	9,36±0,11A	8,57±0,18	0,1448
2	35	8,36±0,18B	8,22±0,31B	8,69±0,14	0,2474
Pr > F		0,0063	0,0003	0,3041	

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).
Médias seguidas de letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$).

3.5 Pesquisa de IgA

Os resultados médios de densidade ótica de IgA nas amostras de lavado de mucosa de íleo por grupo de tratamento estão ilustrados na Figura 3. A distribuição dos dados, valor mínimo, máximo e média demonstram a variabilidade dos resultados, não sendo observado efeito de tratamento.

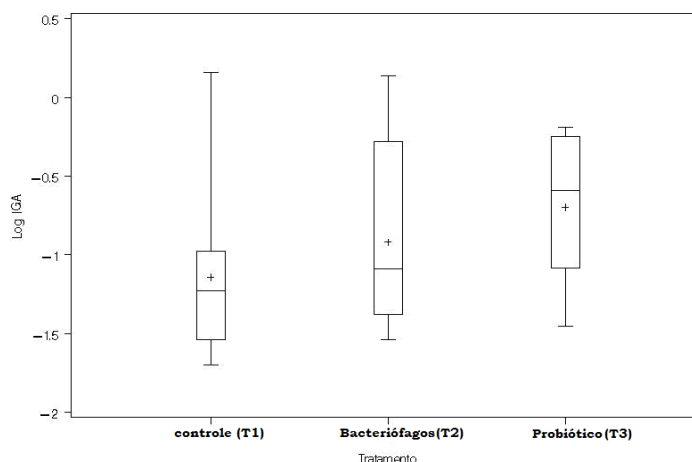


Figura 3. Distribuição das densidades óticas de IgA, média, valor mínimo e máximo 35 dias pós- inoculação (DPI) oral com *Salmonella* Typhimurium em suínos tratados com bacteriófago e probiótico, e animais não tratados (controle).

3.6 Análise morfométrica de vilosidades intestinais.

As médias dos tamanhos das vilosidades por blocos e tratamento estão apresentadas na Tabela 7. No primeiro bloco, o tamanho médio das vilosidades (336 μ m) do grupo tratado com probiótico foi significativamente ($p=0,0039$) menor do que os demais grupos. No segundo bloco o mesmo efeito não foi observado.

Tabela 7. Média da medida (micrômetros) de vilosidades intestinais, erros-padrão e níveis descritivos de probabilidade do teste F por bloco e tratamento em suínos inoculados pela via oral com *Salmonella* Typhimurium e tratados com bacteriófago, probiótico ou não tratados (controle).

Bloco	Controle	Bacteriófago	Probiótico	P > Fr
1	472 \pm 25a	417 \pm 25a	336 \pm 10b	0,0039
2	335 \pm 11	321 \pm 26	325 \pm 21	0,9111

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si pelo teste t ($p<0,05$).

4. DISCUSSÃO

Todos os grupos de tratamentos sofreram infecção por *Salmonella* sp., comprovado pelo isolamento da bactéria a partir de diferentes amostras colhidas dos animais e a ocorrência de soroconversão a partir do sétimo dia pós-infecção. A ausência de sinais clínicos de salmonelose nos animais inoculados era esperada, uma vez que a infecção por *Salmonella* Typhimurium em suínos resulta, predominantemente, em quadro subclínico e estado de portador (Nielsen et al., 1995; Kich et al., 2007). Em relação à presença de anticorpos séricos, observou-se o efeito do tempo (DPI) sobre o título de IgG com uma elevação contínua das DOs médias; todos os grupos alcançaram o status de soropositivos no dia 14PI, considerando o ponto de corte estabelecido para o teste de ELISA (Kich et al., 2007). Em geral, suínos expostos à *Salmonella* apresentam títulos de IgG a partir da segunda semana pós-infecção (Nielsen et al., 1995; Kich et al., 2007), e a soropositividade é interpretada como um indicativo da presença de portadores no lote de animais (Van der Gaag et al., 2003; Alban et al., 2005).

Os tratamentos testados não influenciaram no número de portadores nem foram capazes de diminuir a excreção de *Salmonella* nas fezes. Os maiores índices de recuperação de *Salmonella* foram a partir de tonsilas, conteúdo cecal, pulmão e linfonodos mesentéricos (Figura 2). A via fecal-oral de transmissão de *Salmonella* resulta na colonização intestinal, invasão do epitélio intestinal e disseminação para linfonodos e órgãos (Boyen et al., 2008). Porém, sítios de invasão alternativos, como as tonsilas e pulmões, podem ser igualmente importantes na infecção por *Salmonella* (Fedorka-Cray et al., 1995). Horter et al. (2003) relacionaram o tecido tonsilar como local de infecção crônica, além de porta de entrada e replicação primária de *Salmonella*. Recentemente, foi demonstrado por

Van Parys et al. (2010) a persistência e multiplicação extracelular de *Salmonella* nas criptas das tonsilas, mantendo a estimulação do sistema imune, porém dificultando sua eliminação pelo hospedeiro. A partir daí, a drenagem linfática das tonsilas permitiria a disseminação da bactéria para linfonodos regionais e corrente circulatórias, permitindo a infecção dos órgãos internos. Oliveira et al. (2007), comprovou a infecção sistêmica após inoculação estritamente aérea, observando que, entre outros órgãos, fígado e linfonodos mesentéricos foram positivos para *Salmonella*.

A presença de *Salmonella* em órgãos internos aparece rapidamente após a inoculação. Lee & Harris (2001) detectaram o sorovar Typhimurium após três horas da inoculação de suínos em amostras de tonsilas, fígado, baço, linfonodos mesentéricos e ceco. Em condições naturais de exposição à ambiente contaminado, Hurd et al. (2002) verificaram que suínos se tornaram portadores em linfonodos mesentéricos após duas horas de contato. No presente estudo o tempo necessário para a invasão não foi medido, porém foi demonstrada a persistência da *Salmonella* em órgãos até o último dia de experimento (35PI). Outros estudos encontraram resultados semelhantes ao nosso, onde *S. Typhimurium* persistiu infectando fígado, baço, pulmão e o trato gastrintestinal por todo o período de observação (Fedorka-cray et al., 1995; Coté et al., 2004; Oliveira et al., 2007). Em relação à frequência de isolamento, houve tendência de menor percentagem de isolamento de *Salmonella* a partir de baço e fígado nos grupos tratados, porém apenas para pulmão no grupo tratado com probiótico houve diferença estatisticamente significativa. Szabó et al. (2009) relataram um menor índice de isolamento em órgãos internos de suínos tratados com probiótico, porém observaram que havia uma maior frequência de tonsilas positivas nesse grupo, o que também ocorreu em nosso estudo. Uma das hipóteses levantadas seria uma estimulação da resposta humoral pelo uso dos probióticos (Wen-Hsin et al., 2007; Szabó et al., 2009), ocasionando uma resposta mais precoce, contribuindo para conter a disseminação de *Salmonella* ou para a sua eliminação de órgãos internos. No presente estudo, não foi observado efeito sobre os títulos de IgG sérica do grupo tratado com probiótico (Figura 1), porém houve uma tendência a maiores densidades óticas no teste de ELISA que pesquisou a presença de IgA anti-*Salmonella* em lavado de íleo nesse grupo (Figura 3), levando a hipótese de que houve algum tipo de estimulação de imunidade de mucosa, contribuindo para a menor invasão bacteriana. Ainda, o elevado índice de pulmões com lesão compatível com a infecção por *Salmonella* em todos os grupos, porém sem isolamento da bactéria no grupo tratado com probiótico pode contribuir para a hipótese de que houve uma eliminação da infecção mais precoce do que no grupo controle.

A persistência da *Salmonella* nos órgãos internos e no trato gastrintestinal pode ser crítica e constituir em uma forma de entrada do patógeno na linha de abate. As maiorias dos estudos relacionam a presença da *Salmonella* em intestino e linfonodos como fator de risco

para a contaminação de carcaças em frigoríficos (Botteldoorn et al., 2003; Vieira-Pinto et al., 2006). Swanenburg et al. (2001) constataram a participação do intestino, linfonodos, fígado, tonsilas e língua na contaminação cruzada de carcaças em dois frigoríficos holandeses. O papel da contaminação fecal na contaminação de carcaças e linha de abate está documentado (Alban & Stärk, 2005; Botteldoorn et al., 2003) e a presença de *Salmonella* no conteúdo intestinal de animais que excretam intermitentemente a bactéria é a principal forma de disseminação da bactéria na granja e no pré-abate, sendo por isso um alvo importante para medidas de controle.

A excreção intermitente da *Salmonella* após desafio oral ou infecção natural já foi relatada e está relacionada à dose infectiva, além de ser influenciada pela soroconversão (Nielsen et al., 1995; Funk et al., 2001; Kich et al., 2007; Österberg & Wallgren, 2008). No presente experimento, o perfil de excreção no grupo controle demonstrou a ocorrência de um pico no dia 7PI, provavelmente em decorrência da multiplicação intestinal de *Salmonella* na primeira semana, seguida de tendência após o dia 14PI à diminuição na média de bactérias excretadas (Tabela 2), sem o mesmo efeito no número de excretadores (Tabela 1). Dessa forma, o efeito do tempo e da soroconversão ocorrida no dia 14PI, não alterou o estado de excretor dos animais, mas pode ter determinado que o número de bactérias presente nas fezes dos animais que estavam excretando fosse menor.

Nos grupos que receberam bacteriófagos (T2) ou probiótico (T3), houve efeito do bloco no perfil de excreção fecal, porém em ambos os blocos, observou-se uma tendência a um pico de excreção no dia 3PI seguido de uma diminuição da média de *Salmonella* excretada a partir do dia 7PI. Entretanto, a partir das amostras fecais colhidas no dia 14PI, bem como na média de *Salmonella* encontrada no conteúdo cecal no dia 35PI não houve diferença entre os grupos. Da mesma forma, o número de animais excretando *Salmonella* não diferiu estatisticamente em nenhuma das observações, indicando que os tratamentos não tiveram o efeito esperado sobre a excreção.

Resultados de outros estudos que utilizaram a inoculação de suínos demonstraram um efeito positivo dos probióticos, tanto na atenuação de sinais clínicos como na excreção de *Salmonella* nas fezes (Fedorka-Cray et al., 1999; Casey et al., 2007). Entretanto Szabó et al. (2009) não obtiveram o mesmo sucesso, observando uma tendência contrária com maior excreção de *Salmonella* em animais tratados com uma cepa probiótica de *Enterococcus faecium*. Um aspecto a ser considerado é a idade dos animais submetidos ao tratamento. Segundo Callaway et al. (2008) os resultados são mais consistentes quando o probiótico é aplicado á neonatos, uma vez que o intestino destes animais não possui microbiota totalmente estabelecida, sendo mais fácil a colonização pelos probióticos. Close & Cole (2000) também relatam que os efeitos dos probióticos parecem ser mais consistentes e positivos em leitões mais jovens do que animais em terminação. Por tudo isso, os efeitos

mais promissores parecem estar relacionados com a prevenção de diarreia e doença clínica em animais jovens (Broom et al., 2006; Taras et al., 2006).

Outro aspecto que pode influenciar o tratamento é a variação na formulação do probiótico utilizado. Na maioria dos estudos, as formulações incluem misturas de *Lactobacillus* sp. e *Pediococcus* sp. (Andreatti Filho et al. 2007; Casey et al., 2007), ou são compostos de cepas de *Enterococcus faecium* (Broom et al., 2006; Taras et al., 2006; Szabó et al., 2009). A formulação utilizada no nosso experimento incluía além *Lactobacillus* e *Enterococcus*, *Bifidobacterium* sp. e a levedura *Sacharomyces cerevisiae*, ou seja mais complexa que a maioria dos estudos anteriores. A ação principal dos probióticos é prevenir a colonização do intestino por patógenos por meio da exclusão competitiva, ou seja pela saturação dos sítios receptores no epitélio intestinal (Fedorka-Cray et al., 1997), levando a uma alteração do perfil de bactérias encontrado no intestino. No presente estudo, o grupo tratado não apresentou uma alteração do perfil quantitativo de bactérias isoladas a partir das fezes após o tratamento dos animais (Tabelas 4 a 6), mesmo em relação aos gêneros presentes na formulação e pesquisadas em nosso estudo (*Enterococcus* sp. e *Lactobacillus* sp.). Schierack et al. (2007) também não encontraram efeitos positivos nas contagens de microorganismos autóctones e coliformes após a administração de probióticos. Casey et al. (2007) observaram aumento na população de *Lactobacillus* sp. nas fezes de suínos que receberam um cultivo em leite desnatado dessas bactérias, porém não obtiveram o mesmo resultado com animais que receberam uma suspensão de colônias dos mesmos microrganismos. Entretanto, em ambos os casos, o efeito mais proeminente foi sobre a composição das espécies de *Lactobacillus* excretadas nas fezes dos animais tratados, não na quantidade total dessas bactérias nas fezes. Em nosso estudo, a formulação utilizada fornecia as bactérias liofilizadas aos animais, o que pode ter determinado que não houvesse um pico de excreção fecal. Além disso, não foi testada a composição de espécies que compunham a microbiota excretada e que pode ter sofrido efeito do probiótico administrado. Ao lado disto, deve ser considerado que apenas uma pequena parcela da microbiota intestinal autóctone é cultivável pelos métodos de isolamento bacteriano (Leser et al., 2002), entre essas bactérias encontram-se as anaeróbias estritas que não foram pesquisadas em nosso estudo.

O incremento da integridade de vilosidade seria um efeito indireto da alteração benéfica da microbiota intestinal. No presente estudo, não foi encontrado efeito de tratamento sobre a altura das vilosidades. Estes resultados não satisfazem as expectativas de que o consumo de probiótico na ração melhora a qualidade da mucosa intestinal. Scharek et al. (2005) também não encontraram diferenças na morfologia intestinal de suínos alimentados com cepa de *Enterococcus*. Ao passo que, Jonsson & Henningson (1991) encontraram diferenças na morfologia intestinal de leitões alimentados com rações contendo

probióticos, contribuindo para a hipótese de que a utilização de estimulantes de crescimento tem melhor efeito nas fases de aleitamento e creche.

Estudos propondo o uso da fagoterapia de forma profilática ou terapêutica na era pós-antibiótica são encontrados em bovinos (Gill et al., 2006; Sheng et al., 2006); ovinos (Bach et al., 2008), aves (Huff et al., 2003; Atterbury et al., 2005) e suínos (Jamallundeen et al., 2007). Nesses estudos, resultados variáveis foram encontrados, de acordo com a bactéria testada, a via de aplicação, e a resposta obtida (cura clínica, menor excreção, prevenção da infecção). Em relação à *Salmonella* sp. resultados positivos foram obtidos em aves por Atterbury et al. (2007), concordando com o que havia observado Fiorentin et al. (2005) empregando a mesma associação de fagos testada em nosso estudo. Em suínos, ainda são poucos os estudos sobre o uso da fagoterapia para controle de *Salmonella* sp., (Lee & Harris, 2001; Wall et al., 2010). Em ambos os casos, o uso de fagos é proposto como uma estratégia para diminuir a excreção bacteriana no pré-abate. De forma geral, a fagoterapia parece ter um efeito curto e necessita de uma dose de fagos otimizada à quantidade de bactérias alvo em contato com o fago, proporção denominada de multiplicidade de infecção ou MOI (Johnson et al., 2008). Um excesso relativo de partículas de fagos (MOI elevado) pode resultar em lise da célula bacteriana antes da ocorrência de um ciclo de replicação do fago, levando ao seu desaparecimento (Payen & Jansen, 2003). Numa baixa dose de fagos (baixo MOI), pode haver a co-existência em equilíbrio, o que pode permitir a emergência de sub-populações bacterianas resistentes (Mizoguchi et al., 2003).

No presente estudo, partiu-se de um grupo de fagos previamente caracterizados quanto a sua estrutura, resistência ao pH gástrico e espectro de ação em estudos anteriores (Fiorentin et al., 2004; Fiorentin et al., 2005; Silveira, 2006). A partir da capacidade demonstrada pelos fagos CNPSA1, 3 e 4 de controlarem a excreção de *S. Enteritidis* PT4 em frangos e o fato de que esses fagos demonstraram ser capazes de resistir e replicar na presença de fezes de suínos, bem como de lisar *S. Typhimurium* "in vitro", foi proposta a avaliação de seu uso em animais infectados artificialmente. Para tanto, instituiu-se a fagoterapia quatro dias antes da inoculação dos animais e prolongou-se a administração dos fagos por quatro dias pós-infecção. Houve influência de bloco nos resultados de excreção fecal, porém verifica-se que, em ambos os casos, não ocorreu o pico de excreção observado no dia 7PI no grupo controle e houve diferença numérica na média de *Salmonella* sp. presente nas fezes do grupo tratado e controle (Tabela 2). Por outro lado, no dia 3PI, quando os animais do grupo tratado ainda estavam recebendo fagos, essa diferença não foi observada, o que também ocorreu a partir do dia 14PI e no conteúdo cecal colhido no dia 35PI. A dinâmica da excreção dos fagos CNPSA por suínos infectados por *S. Typhimurium* foi estudada por Silveira (2006), que observou que os fagos começavam a ser detectados

nas fezes no dia seguinte ao início da fagoterapia, apresentavam um pico de excreção no quarto dia e desapareciam após três dias do final do tratamento. Dessa forma, supõem-se que, no nosso estudo, no dia 3PI houvesse o maior título de fagos nas fezes, ao passo que no dia 7PI é provável que poucas partículas ainda estivessem presentes. Este fato, porém não teve correspondência com a excreção de *Salmonella* nas fezes, o que também foi encontrado por Silveira (2006) utilizando a fagoterapia em suínos infectados artificialmente. Os protocolos de fagoterapia adotados por Silveira (2006) e em nosso estudo diferem no tempo de administração do fago e no MOI empregado. Silveira (2006) iniciou a administração dos fagos (MOI 1000:1) após 48 horas da infecção por *S. Typhimurium*, prolongando o tratamento por quatro dias. Como a invasão do epitélio intestinal por *Salmonella* é muito rápida (Hurd et al., 2002), permitindo que em poucas horas a bactéria esteja em locais teoricamente a salvo da ação dos bacteriófagos, no nosso estudo optou-se por administrar um menor título de fagos (MOI 100:1) por um tempo que abrangesse quatro dias antes da inoculação de *Salmonella* e quatro dias pós-inoculação, numa tentativa de obter um título elevado de fagos no intestino. Entretanto, observa-se que não houve um efeito positivo na modificação do protocolo, sendo os resultados obtidos semelhantes aos relatados por Silveira (2006). Recentemente, Wall et al. (2010) obtiveram sucesso ao administrar uma mistura de fagos a suínos antes da exposição á ambiente contaminado por *Salmonella* sp., alcançando redução significativa na concentração da bactéria no conteúdo cecal dos animais tratados. Uma vez que a concentração de *Salmonella* sp. em ambientes contaminados costuma ser menor que as administradas em estudos que realizam a infecção experimental, é provável que o MOI alcançado tenha sido superior ao empregado em nosso estudo, podendo ser uma razão do sucesso obtido.

Em relação aos parâmetros de densidade ótica para IgA de mucosa, morfometria de vilosidades e população fecal de *Lactobacillus*, *Enterococcus* e coliformes totais não houve diferença nos resultados do grupo tratado em relação ao controle, indicando que os fagos não tem efeito sobre esses parâmetros do hospedeiro e não tem ação sobre as populações bacterianas pesquisadas. Essas observações são positivas e estão de acordo com o conceito que propõem que os fagos, por serem encontrados no trato intestinal do homem e dos animais podem ser considerados seguros, o que é suportado pelo fato que a fagoterapia já foi utilizada no passado sem efeitos adversos para os animais testados (Johnson et al., 2008). Por outro lado, a especificidade dos fagos para a população bacteriana alvo é um fator que pode influenciar no sucesso da fagoterapia, sendo que o espectro reduzido é desejável como forma de impedir possíveis prejuízos para a microbiota comensal do intestino (O'Flaherty et al. 2009).

O uso do controle biológico para diminuir a infecção por *Salmonella* sp. em suínos ainda não provou ter resultados consolidados e com repetibilidade na literatura. Isso pode

estar relacionado com a variabilidade dos microrganismos probióticos testados, bem como com fatores inerentes ao hospedeiro, como a idade. Dessa forma, a falha de obter resultados positivos indica que novas investigações, alterando os protocolos de utilização desses tratamentos precisam ser testados, antes que os probióticos ou os bacteriófagos possam ser considerados uma opção a ser incluída nos programas de controle de *Salmonella*.

5. CONCLUSÃO

Os microrganismos probióticos e associação de fagos no protocolo testado no presente estudo não foram capazes de controlar a infecção ou diminuir a excreção fecal de *Salmonella* sp. em suínos de terminação infectados artificialmente.

6. REFERÊNCIAS

- Abedon, S. Kinetics of phage-mediated biocontrol of bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6:7,807-815, 2009.
- Alban, L. et al. Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* presence in the slaughtered swine carcass effectively? *Prev. Vet. Med.* 68, 63-79, 2005.
- Alban, L. & Stärk, K.D.C. Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* prevalence in the slaughtered swine carcass effectively? *Prev. Vet. Med.* 68, 63-79, 2005.
- Anderson, R.C et al. Effect of competitive exclusion on transmission of *Salmonella Choleraesuis* between early weaned pigs. In: 3rd Safe Pork. *Anais*. Washington, 18-21, 1999.
- Andreatti Filho et al. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *in vitro* and *in vivo*. *Poult. Sci.* 86, 1904-1909, 2007.
- Atterbury, R.J. et al. Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. *App. Environ. Microb.* 71, 4885-4887, 2005.
- Atterbury, R.J. et al. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *App. Environ. Microb.* 73, 4543-4549, 2007.
- Bach, S.J. et al. Effect of bacteriophage DC22 on *Escherichia coli* O157:H7 in an artificial rumen system (Rusitec) and inoculated sheep. *Ann. Rev. Microb.* 52, 89-101, 2008.
- BAM, Bacteriological Analytical Manual. (<http://www.fda.gov>). Appendix 2: Most Probable Number Determination from Serial Dilutions, 2006.
- Bessa, M.C. et al. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul. *Res. Vet. Sc.*, 83, 302-310, 2007.
- Bode, K.; Baier, S. & Blaha, T. Successful *Salmonella* Control in 3 finish herds supplied by one sow herd. In: 20th IPVS. *Anais*. Durban, South African., 173, 2008.

- Borowsky, L. M.; Sella, A. B. & Cardoso, M. Comparação de duas metodologias de quantificação de *Salmonella* sp. em embutidos de carne suína. *Anais*. In: Simpósio de Segurança Alimentar. Porto Alegre. 1, 84-84, 2004.
- Botteldoorn, M. et al. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination. *J. Appl. Microb.*, 95, 891-903, 2003.
- Boyen, F. et al. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet. Microb.*, 130, 1-19, 2008.
- Broom, L.J. et al. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. *Res. Vet. Sci.* 80:45, 45-54, 2006.
- Bywater, R. et al. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54: 4, 744-754, 2004.
- Callaway, T.R. et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Anim. Health Res. Rev.*, 9: 2, 217-225, 2008.
- Casey, P.G. et al. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease sign in pigs challenged with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microb.*, 73:6, 1858-1863, 2007.
- Close, W. H. & Cole, D. J. Nutrition of sows and boars. Nottingham University. *Press, Nottingham*. 377 p., 2000.
- Coté, S. et al. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *Can. J. Vet. Res.*, 68, 241-248, 2004.
- Fedorka-Cray, P.J. et al. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. *Infect. Immun.*, 63, 2658-2664, 1995.
- Fedorka-Cray, P.J. et al. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. In: 2nd Safe Pork. *Anais*. 164-165, 1997.
- Fedorka-Cray, P.J. et al. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. *J. Food Prot.*, 62, 1376-1380, 1999.
- Fiorentin, L., et al. "In vitro" characterization and "in vivo" properties of *Salmonella* lytic bacteriophages isolated from free-range chickens. *Braz. J. Poult. Sci.*, 6:2, 105-112, 2004.
- Fiorentin, L.; Vieira, N.D. & Barioni Junior, W. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in cecal contents of broilers. *Avian Pathol.* 34: 3, 258-263, 2005.
- Foster, N., et al. Stimulation of gp91 phagocytic oxidase and reactive oxygen species in neutrophils by an avirulent *Salmonella* enterica serovar *infantis* strain protects gnotobiotic piglets from lethal challenge with serovar Typhimurium strain F98 without inducing intestinal pathology. *Infect. Immun.*, 73, 4539-4547, 2005.

- Fosse, J.; Seegers, H. & Magras, C. Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. *Zoonoses and Public Health*. 56, 429-454, 2009.
- Fuller, R & Gibson, G.R. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroent.*, 222, 28-31, 1997.
- Funk, J.A.; Davies, P.R. & Nichols, M.A. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Vet. Microb.*, 83, 45-60, 2001.
- Funk, J.A. et al. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *J. Swine Health Prod.*, 12 :5, 246-251, 2004.
- García, E. & López, R. Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Rev. Esp. Quim.*, 15: 4, 306-312, 2002.
- Gebreyes, W.A., et al. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs 1997–2000. *J. Antimicrob. Chemother.*, 53, 997–1003, 2004.
- Guttman B, Raya, R & Kutter, E Basic phage biology. In: Kutter E and Sulakvelidze A (eds) *Bacteriophages Biology and Applications*. Boca Raton, FL: *CRC Press*, 29–66, 2005.
- Gill, JJ et al. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrob. Agents Chemotherap.* 50, 2912–2918, 2006.
- Health Protection Agency. Aerobic colony count by pour plate method. (<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf.sops.asp>) *National Standard Method*, 4:4, 2008.
- Horter, D.C., Yoon, K.J. & Zimmerman, J.J. A review of porcine tonsils in immunity and disease. *Anim. Health Res. Rev.* 4, 143–155, 2003.
- Huff, W.E. et al. Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. *Avian Dis.* 47, 1399-1405, 2003.
- Hurd, H.S. et al. *Salmonella enterica* infection in market swine with and without transport and holding. *Appl. Environ. Microb.*, 68:5, 2376-2381, 2002.
- ISO. International Organization for Standardization. (<http://www.iso.org>) ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuff. Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and environmental samples from primary stage, 2007.
- Jamalludeen, N et al. Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet. Microb.* 124: 47–57, 2007.
- Johnson, R.P. et al. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Anim. Health. Res. Rev.* 9:2, 201-215, 2008.
- Jonsson, E. & Henningsson, S. Establishment in the piglet gut of *Lactobacilli* capable of degrading mixed-linked B-Dglucans. *J. Appl. Bact.*, 70, 512-516, 1991.
- Kich, J.D., et al. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against prevalent *Salmonella* serovars in swine in southern Brazil. *J. Vet. Diag. Invest.*, 19, 510–517, 2007.

- Klaenhammer, T.R. Microbiological considerations in selection and preparation of *Lactobacillus* strain for use as dietary adjuncts. *J. Dairy Science*, 65:7, 1339-1349, 1982.
- Lee, N. & Harris, D.L. The effect of bacteriophages treatment as a preharvest intervention strategy to reduce the rapid dissemination of *Salmonella* Typhimurium pigs. *Am. Assoc. Swine Vet. (AASV)*, Perry, IA:AASV, 555 p, 2001.
- Leser, T.D. et al. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 673-690, 2002.
- Letellier, A. et al. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Can.J. Vet. Res.* 65, 168-172, 2001.
- Luna, L.G. Manual of the histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, *New York McGraw Hill*, 1968, 258p.
- Magistrali, C. et al. Contamination of *Salmonella* spp. In a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. *Res. Vet. Science.* 85, 204-207, 2008.
- Michael, G. B. et al. Comparison of different selective enrichment steps to isolated *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. *J. Microb.*, 34, 138-142, 2003.
- Mizoguchi K et al. Co-evolution of bacteriophages PP01 and *Escherichia coli* O157:H7 in continuous culture. *App. Environ. Microb.* 69, 170–176, 2003.
- Nielsen, B. et al. The serological response to *Salmonella* serovars Typhimurium and *Infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet. Microb.* n.47, p.205-218, 1995.
- O'Flaherty, S, Ross, P. & Coffey, A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 801-819, 2009.
- Oliveira, C.J., et al. Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. *Vet. Microb.*, 125, 355–361, 2007.
- Österberg, J. & Wallgren, P. Effect of a challenge dose of *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Yoruba on the patterns of excretion and antibody responses of pigs. *Vet. Rec.*, 162, 580-586, 2008.
- Payne, R.J. & Jansen, V.A. Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. *Clin. Pharmac.* 42, 315-325, 2003.
- Rossi, A.A. et al. Uso de probiótico na prevenção de Salmonelose em frangos de corte. *Ciência Agrot.*, 31:4,1207-1211, 2007.
- SAS Institute Inc. Systems for Microsoft Windows, *Cary NC, USA*, 2002-2003 (CR-ROM).
- Scharek, L. et al. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sow and piglets. *Vet. Immun. Immunopath.*, 105,151-161, 2005.
- Schierack, P. et al. Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microb.* 153, 3830-3837, 2007.

- Sheng, H et al. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *App. Environ. Microb.* 72, 5359–5366, 2006.
- Silveira, R.H. et al. Capacidade Lítica dos Bacteriófagos CNPSA1, CNPSA3 e CNPSA4 sobre *Salmonella* Typhimurium *in vitro* e em suínos experimentalmente infectados. In: International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis. *Anais*. Ploufragan, 577-578, 2006.
- Stärk, K.D.C. et al. Differences and similarities among experts opinions on *Salmonella enterica* dynamics in swine pre-harvest. *Prev. Vet. Med.*, 53,7–20, 2002.
- Summers, W.C. et al. Bacteriophage therapy. *Ann. Rev. Microb.* 55, 437-451, 2001.
- Swanenburg, M. et al. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int. J. Food Microb.* ,243-254, 2001.
- Szabó, I. et al. Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. *Appl. Environ. Microb.*, 75:9, 2621-2628, 2009.
- Taras, D. et al. Performance, diarrhea incident, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strains to sows and piglets. *J. Anim. Sci.* 84:3, 608-617, 2006.
- Thiel, K. Old dogma, new tricks-21st century phage therapy. *Nat. Biotech.*,22:1, 31-36, 2004.
- Trobos, M. et al. Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine. *J. Antimicrob. Chemother.*, 10, 1-7, 2008.
- Van der Gaag, M.A. et al. A state-transition simulation model for the spread of *Salmonella* in the pork supply chain. *Europ. J. Op. Res.* 130, 35-42, 2003.
- Van Parys, D. et al. *Salmonella* Typhimurium resides largely as an extracellular pathogen in porcine tonsils, independently of biofilm-associated gene *csgA*, *csgD* and *adrA*. *Vet. Microb.* in press, 2010.
- Vieira-Pinto, M. et al. Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microb.*, 110,77-84, 2006.
- Wall, S.K. et al. Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infection in market weight swine. *App. Environ. Microb.* 76:1, 48-53, 2010.
- Wen-His, L. et al. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerob.*, 13, 107-113, 2007.
- WHO. World Health Organization. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/>) Food Safety and Foodborne illness. *Fact Sheet n° 139*. April, 2005.

CAPÍTULO IV – PERSPECTIVAS

Cientes do impacto econômico e relativo à saúde pública que a contaminação por *Salmonella* de produtos representa, surgiu parceria de pesquisa entre a Embrapa Suínos e Aves, a UFRGS e as agroindústrias para o desenvolvimento de ferramentas e estudos epidemiológicos que caracterizassem o problema, as fontes de contaminação e a dinâmica de infecção em rebanhos da região sul do país. Uma vez comprovado que os níveis de portadores são elevados e o manejo sanitário utilizado nas granjas não tem alcançado sucesso no controle da *Salmonella*, o grupo de pesquisa, com apoio de representantes da cadeia produtiva, foi estimulado a elaborar um novo projeto que objetivou estudar medidas específicas direcionadas ao controle do problema envolvendo os vários elos da cadeia produtiva. Estão sendo estudadas estratégias para fabricação de ração, para o manejo dos animais e do ambiente das granjas e para os procedimentos de pré-abate e industrialização.

Posteriormente, o tratamento com melhor desempenho na fase experimental será validado por teste conduzido em granjas. Neste trabalho específico, como houve uma variabilidade muito grande nos resultados como agentes terapêuticos em animais evidenciam-se a necessidade de mais pesquisas para encontrar técnicas que melhor identifiquem o efeito benéfico dos bacteriófagos e probióticos para depois desenvolver aplicações eficientes. Em relação aos probióticos, a aplicação de tratamento em animais em idade de desmame pode apresentar resultados distintos dos obtidos em animais de crescimento e terminação. Quanto aos bacteriófagos, o fato de tratar-se de uma proposta distinta das já existentes comercialmente, implica na necessidade de estudar com maior profundidade a dinâmica da infecção dos fagos nas bactérias que estão infectando o hospedeiro, bem como testar outras situações de controle como tratamento de superfícies.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABEDON, S. Kinetics of phage-mediated biocontrol of bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease* v.6, n.7, p.807-815, 2009.
- ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. *Relatórios Anuais*. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>> (Acesso em 12 de nov.2009).
- ACKERMAN, H.W. Bacteriophage classification. In: Kutter E, Sulakvelidze A, ed. *Bacteriophages: biology and applications*. Boca Raton, FL: *CRC Press*, p.67-90, 2005.
- ACKERMAN, H.W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, n.146, p.843-857, 2001.
- ALBAN, L. et al. Where should the effort be put to reduce the *Salmonella* presence in the slaughtered swine carcass effectively? *Preventive Veterinary Medicine*. v.68, p.63-79, 2005.
- ALISNKY, J, et al. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *The Journal of Infection*. v. 38, n.1, p. 5-15, 1998.
- ALTHOUSE, C., et al. Type 1 *fimbriae* of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infection and Immunity*. n.71, p.6446–6452, 2003
- ALVES, J. C. et al. *Salmonella* sp em linfonodos de suínos normais abatidos no estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. v. 16, n. 4, p.172-176, 1994.
- AMAECHI, N. & EZERONYE, O.U. Piggery environment as a source of *Salmonella* contamination for swine. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. v.5, n.2, p.102-107, 2006.
- ANDREATTI FILHO et al. 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.
- AUDIA, J.P., WEBB, C.C. & FOSTER, J.W., Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enterobacteria. *International Journal of Medical Microbiology*. n.291, p.97–106, 2001.
- BAGGESEN, D.L.; SANDVANG, D. & AARESTRUP F.M. Characterization of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. v.38, n.4, p.1581-1586, 2000.

- BAHNSON, P.B. et al. Association between on farm and slaughter plant detection of *Salmonella* in market-weight pigs. *Journal of Food Protection*. v.68, p.246-250, 2005.
- BAHNSON, P.B. et al. Herd level risk factors *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. *Preventive Veterinary Medicine*. v.76, n.4, p.249-262, 2006.
- BARROW, P.A.; SOOTHILL, J.S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in Microbiology*. n.5, p.7, 1997.
- BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food Microbiology*. n.30, p.37-53, 1996.
- BERENDS, B.R., et al Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *International Journal of Food Microbiology*. n.44, p.219–229, 1998.
- BESSA M. C. et al. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frígóricos do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.24, n.2, p.80-84, 2004.
- BODE, K.; BAIER, S. & BLAHA, T. Successful *Salmonella* Control in 3 finish herds supplied by one sow herd. In: 20th International Pig Veterinary Society Congress (IPVS). *Anais*. Durban, África do Sul. 173p., 2008.
- BORCH, E., NESBAKKEN, T. & CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. n.30, p.9–25, 1996.
- BOYEN, F., et al. *Salmonella* Typhimurium SPI-1 genes promote intestinal but not tonsillar colonization in pigs. *Microbes and Infection*. n.8, p.2899–2907, 2006.
- BOYEN, F., et al. Porcine *in vitro* and *in vivo* models to assess the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for pigs. *Lab Animal*. *in press*. 2008^a.
- BOYEN, F. et al A limited role for SsrA/Bin persistent *Salmonella* Typhimurium infections in pigs. *Veterinary Microbiology*. n.160, p.630–632, 2008^b.
- BOYLE, E.C. et al. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. *The Journal of Bacteriology*. n.189, p.1489–1495, 2008.
- BRUMME, S. et al. Impact of *Salmonella* Typhimurium DT104 virulence factors *invC* and *sseDon* the onset, clinical course, colonization patterns and immune response of porcine salmonellosis. *Veterinary Microbiology*. n.124, p.274–285, 2007.

- BRUSSOW, H. & KUTTER, E. Phage ecology. In: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. Ed. Bacteriophages: biology and applications. Boca Raton, FL: *CRC Press*, p.129-163, 2005.
- BRUTTIN, A. & BRUSSOW, H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.49, p.2874-2878, 2005.
- BUDIÑO, F.E.L. et al. Efeito da adição de probiótico e/ou prebiótico na dieta de leitões desmamados sobre a contagem de coliformes totais. In: 11º Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos (ABRAVES). *Anais*. Goiânia, Goiás. p. 311-312, 2003.
- BÜNZEN, S *Comunicado Técnico: Capacidade Tampão das Rações para Suínos. Boletim Técnico*. Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.serrana.com.br>> (Aces. 10 de nov.2009)
- BUREAU OF ANIMAL INDUSTRY. *Classical Swine Fever*. In: Hog Cholera: It's history, nature and treatment. Washington, Estados Unidos, 1889. Disponível em: <<http://www.archive.org/details/cu31924000384911>> (Acesso em 05 de dez.2009)
- BYWATER, R. et al. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.54, n.4, p.744-754, 2004.
- CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R. et al., Microbiologia. 4ªed. São Paulo, *Atheneu*, p.229 – 238, 2005.
- CASEY, P.G. et al. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*. v.73, n.6, p.1858-1863, 2007.
- CASTAGNA, S.M.F. et al. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p.141-147, 2004.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. *Investigation update: outbreak of Salmonella Typhimurium Infections, 2008-2009*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>> (Acesso em 14 dez. 2009).
- CHERNOMORDIK, A. B. Bacteriophages and their therapeutic-prophylactic use. *Medicinska Sestra*. n.6, p.44-47, 1989.
- CHRISTENSEN, J. et al. Herd prevalence of *Salmonella* spp. In Danish pigs herds after implementation of the Danish *Salmonella* Control Program with reference to a pre-implementation study. *Veterinary Microbiology*. n.88, p.175-188, 2002.

- CORRIER, D.E et al. J. Effect of colonization in chickens experimentally infected with *Salmonella* Typhimurium. *Avian Diseases*. n.37, p.19–26, 1991.
- D'AOUST, J. et al. *Salmonella* and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology*. n.24, p.11-31, 1994.
- DABROWSKA, K. et al. Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*. v.98, n.1, p.7-13, 2005.
- DAVIES, R.H. & WRAY, C. Distribution of *Salmonella* contamination in ten animal feed mills. *Veterinary Microbiology*. n.51, p.159-169, 1997.
- DAVIES, P.R. et al. Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production Systems in North Caroline, USA. *Epidemiology Infection*. v.119, p.237-244, 1997.
- DAVIES, R.H. et al. National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). *Journal of Applied Microbiology*. v.96, p.750-760, 2004.
- DENAGAMAGE, T.N. et al. Efficacy of vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in live and slaughtered swine: a systematic review of literature from 1979 to 2007. *Foodborne Pathogen Disease*. n.4,p.539-549, 2007.
- DLABAC, V. et al. Pathogenicity and protective effect of rough mutants of *Salmonella* species in germ-free piglets *Infection and Immunity*. n.65, p.5238–5243, 1997.
- EDRINGTON, T.S. et al. Examination of heat stress and stage of lactation (early versus late) on fecal shedding of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* in dairy cattle. *Foodborne Pathogens Disease*. v.1, n.2, p.114-121, 2003.
- EFSA, Journal European Food Safety Authority. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. *Part A: Salmonella prevalence estimates*. n.135, 111p, 2008.
- ERICKSON, K.L. & HUBBARD,N.E. Probiotic immunomodulation in health and disease. *The Journal of Nutrition*. v.130, (Supl.) p.403-409, 2000.
- ETHELBERG, S. et al. Large outbreaks of *Salmonella* Typhimurium infection in Denmark in 2008. *Eurosurveillance*. v.13, n.44, 3p., 2008.
- FARZAN,A.; FRIENDSHIP,R.M. & DEWEY, C.E. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test and culture for determining *Salmonella* status of a pig herd. *Epidemiology Infection*. v.135, p.238-244, 2007.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. *GRAS Notice 000218: Bacteriophage P100* Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/701456A.PDF> (Acesso em: 02 jan. 2010).

FEDORKA-CRAY, P.J. et al. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. *Infection and Immunity*. 63, 2658–2664, 1995.

FEDORKA-CRAY, P. et al. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. In: 2nd International Symposium Epidemiology Control of *Salmonella* in Pork. *Anais*. 164-165, 1997.

FEDORKA-CRAY P. J. et al. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. *Journal of Food Protection*. n.62, p.1376–1380, 1999.

FEDORKA-CRAY, P.J., GRAY, J.T. & WRAY, C. *Salmonella* infections in pigs. In: Wray, C., Wray, A. (Eds.), *Salmonella* in Domestic Animals. *CAB International*, p.191–207, 2000.

FIORENTIN, L et al. *In vitro* characterization and *in vivo* properties of *Salmonella* lytic bacteriophages isolated from free-range layers. *Brazilian Journal of Poultry Science*. v.6, n. 2, p.121-128, 2004.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D. & BARIONI JUNIOR, W. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in cecal contents of broilers. *Avian Pathology*. v.34, n.3, p.258-263, 2005.

FOSTER, N., et al. Stimulation of gp91 phagocytic oxidase and reactive oxygen species in neutrophils by an avirulent *Salmonella* enterica serovar *Infantis* strain protects gnotobiotic piglets from lethal challenge with serovar Typhimurium strain F98 without inducing intestinal pathology. *Infection and Immunity*. n.73, p.4539–4547, 2005.

FULLER, R & GIBSON, G.R. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavia Journal Gastroenterology*. n.222, p.28-31, 1997.

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

FUNK, J.A. et al. Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *Journal of Swine Health and Production*. v.12, n.5, p.246-251, 2004.

FUNK, J.A. et al. The effect of subtherapeutic chlortetracycline on antimicrobial resistance in the fecal flora of swine. *Microbial Drug Resistance*. n.12, p.210-218, 2006.

- FUNK, J.A. et al. Evaluation of stocking density and subtherapeutic chlortetracycline on *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding in growing swine. *Veterinary Microbiology*. n.124, p.202-208, 2007.
- FUNK, J.A. Control of *Salmonella* in the pork production chain. In: London Swine Conference- Facing de New Reality. *Anais*. p.73-78, 2008.
- GARCÍA, E. & LÓPEZ, R. Los bacteriófagos y sus productos génicos como agentes antimicrobianos. *Revista Española de Quimioterapia*. 15, 4, p. 306-312, 2002.
- GARDINER, G.E. et al., Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 4, pp. 1895–1906, 2004.
- GEBREYES, W.A., et al. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs 1997–2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. n.53, p.997–1003, 2004.
- GIBSON, K.J. et al. Investigation into capability of a *Salmonella* Choleraesuis live vaccine to reduce the shedding of *Salmonella* Typhimurium in swine. In: 3rd International Symposium on the epidemiology and control of *Salmonella* in pork, Washington DC. *Anais*. p. 302-304, 1999.
- GILLOR, O.; ETZION, A. & RILEY, M.A. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.81, n.4, p.591-606, 2008.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, B.E.; GÓMEZ-TREVIÑO, M. & JIMÉNEZ-SALAS, Z. Bacteriocinas de Probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. v.4, n.2, p.11-20, 2003.
- GRAY, J.T.; FEDORKA-CRAY, P.J. & ACKERMANN, M.R. Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella* Choleraesuis in swine. *Veterinary Microbiology*. v.47, p.43-59, 1995.
- GRIFFITH, SCHWARTZ & MEYERHOLZ. *Salmonella*. Disease of swine. 9^o edition, Cap. 45, 739-751, 2006.
- GRIMONT et al. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: Wray, C. & Wray, A. (ed.) *Salmonella in domestic animals*. Londres, UK, p.567-578, 2000.
- GRIMONT, P.A.D. & WEILL, F.X.. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 2007. 9th edition. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*. Institute Pasteur and World Health Organization, Paris, França, 2007.
- GUPTA, V. & GARG, R. Probiotics: review article. *Indian Journal of Medical Microbiology*. v.21, n.3, p.202-209, 2009.

- HANLON, G.W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. n.30, p.118-128, 2007.
- HIGGINS, R. et al. Use of specific bacteriophages treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poultry Science*. v.84, p.1141-1145, 2005.
- HILL, A. et al. A “farm-to-consumption” Risk Assessment for *Salmonella* Typhimurium in Pigs. *Department of Risk Research, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge*, 2003.
- HOJO, K. et al. Reduction of vitamin K concentration by salivary Bifidobacterium strains and their possible nutritional competition with Porphyromona gingivalis. *Journal of Applied Microbiology*. v.103, n.5, p.1969-1974, 2007.
- HOLT, J. G. et al. Bergey’s manual of determinative bacteriology. 9th ed. *Williams & Wilkins*, 1994. 787 p.
- HORTER, D.C., YOON, K.J. & ZIMMERMAN, J.J. A review of porcine tonsils in immunity and disease. *Animal Health Research Review*. n.4, p.143–155, 2003.
- HOUSBY, J.N. & MANN, N.H. Phage Therapy. *Drug Discovery Today*. v.14. n.11/12, p.536-540, 2009
- HURD, H.S. et al. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. *Applied and Environmental Bacteriology*. v.62, p.1194-1197, 2001.
- HURD, H.S. et al. Estimation of the *Salmonella enterica* prevalence in finishing swine. *Epidemiology and Infection*, v. 132, p.127-135, 2003.
- HURD, H.S. et al. Swine health impact on carcass contamination and human foodborne risk. *Public Health Reports*. v.123, p.343-351, 2008.
- IBARRA, J.A. & STEELE-MORTIMER, O. *Salmonella*- The ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular Microbiology*. n.11, v.11, p.1579-1586, 2009.
- JONSSON, E, & CONWAY,P. Probiotic for pigs. In: Fuller, R. (Ed.) *Probiotic-The Scientific Basis*. London, Chapman & Hall, p. 259-316, 1992.
- KÄSBOHRER, A. et al. *Salmonella* in slaughter pigs of German origin: na epidemiological study. *European Journal of Epidemiology*. V.16, p.141-146, 2000.
- KICH, J.D. et al. Soroprevalência de *Salmonella* sp. em rebanhos suínos brasileiros. 5p, 2008. Disponível em www.cnpqa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_k7n31t5q.pdf (Aces. 02 jan. 2010).

- KICH, J. et al. Excreção e soroprevalência de *Salmonella* no alojamento de leitões em granjas de terminação. In: Congresso de Latino Americano de Suinocultura. *Anais*. Foz do Iguaçu, Paraná. p n.3., 470- 471, 2004.
- KICH, J. D et al. Fatores associados com a soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos. *Ciência Rural*, v.35 n.2 p. 398-405, 2005.
- KICH, J.D. et al. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against prevalent *Salmonella* serovars in swine in southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.5, p. 510-517, 2007.
- KOHBATA et al Cytopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cells of the murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiology and Immunology* 30, 1225-1237, 1986.
- LEE, N. & HARRIS, D.L. The effect of bacteriophages treatment to reduce the rapid dissemination of *Salmonella* Typhimurium in pigs. *Iowa State University Press*. p.196-197, 2005.
- LESER, T.D. et al. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied Environmental Microbiology*. n.68, p.673-690, 2002.
- LETELLIER, A. et al. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research*. v. 65, 168-172, 2000.
- LETELLIER, A. et al. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. v. 65, p. 168-172, 2001.
- LEVIN, B.R. & BULL Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology*. n.2, p.166–173, 2004.
- LEVY, J.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. & OWENS, R.A. Bacteriophages. In:(Ed.) *Virology*. 3^a ed. *New Jersey: Prentice Hall*, sec. 8.7, p. 206-221, 1994.
- LILLY, D.M. & STILLWELL, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganism. *Science*. v.147, n.3659, p.747-748, 1965.
- LO FO WONG, D.M.A. et al. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Production Science*. n.76, p.215-222, 2002.
- LO FO WONG, D.M.A. et al. A European longitudinal study in *Salmonella* seronegative- and seropositive-classified finishing pig herds. *Epidemiology Infection*. v. 132, 903-914, 2004.
- MANN, J.E., SMITH, L. & BRASHEARS, M.M. Validation of time and temperature values as critical limits for *Salmonella* and background flora growth during the production of fresh ground and boneless pork products. *Journal of Food Protection*. n.67, p.1389–1393, 2004.

- MANNION, C. et al. Efficacy of cleaning and disinfection on pig farms in Ireland. *Veterinarian Record*. n.161, p.443-453, 2007.
- MARTINS, L.T. *Streptococcus e Enterococcus*. In: TRABULSI, L. R. et al., *Microbiologia*. 4° ed. São Paulo: *Atheneu*, p.157–170, 2005.
- MATSUMOTO, T.; et al. Oral administration of *Bifidobacterium longum* prevents gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. *Journal of Applied Microbiology*, v.104, n.3, p. 672–680, 2008.
- MATSUZAKI, S. et al. Bacteriophages therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious disease. *Journal of Infection Chemotherapy*. n.11, p.211-219, 2005.
- MAYER, G. *Bacteriophage*. In: *Microbiology and Immunology On-Line*, Columbia; University of South Carolina, 2005 part 2: Bacteriology, cap.7. Disponível em: <<http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage.htm>> (Acesso em 6 de agosto 2009).
- MAZMANIAN, S.K. et al. AM immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. n.122, p.107-118, 2005.
- MAZMANIAN, S.K.; ROUND, J.L. & KASPER, D.L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*. v.453, p.620-625, 2008.
- MCGHIE, L., et al. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current Opinion on Microbiology*. v.1, n.12, p.117–124, 2009.
- MERRIL, C.R. Interaction of bacteriophages with animals. In: *Bacteriophage ecology Cambridge University Press*. p.332-352, 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6ª Ed., Brasília, 2005.
- MORES, N. & ZANELLA, J. Perfil Sanitário da Suinocultura do Brasil. *Comunicado Técnico Embrapa Suínos e Aves*. 2001. Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br> (Acesso em 5 de abril 2009).
- MOUSING, J. et al. Nation-wide *Salmonella* entérica surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Preventive Veterinary Research*. N.29, p.247-261, 1997.
- MÜRMAN, L.; SANTOS, M. & CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. *Food Control*. v.20, p.191-195, 2008.
- NARMS. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. *Annual Report 2006- enteric bacteria*. Disponível em: < www.cdc.gov/narms> (Acesso em 5 de abril 2009).

- NIELSEN, B. et al. The serological response to *Salmonella* serovars Typhimurium and *Infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet. Microb.* n.47, p.205-218, 1995.
- NOLLET, N., et al. Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Veterinary Research.* n.36, p.545–555, 2005.
- O'FLYNN, G.R.P. et al. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O158:H7. *Appl. Environ. Microb.* v.70, p.3417-3424, 2004.
- O'HARA, A.M. et al., Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology.* v. 118, n. 2, p.202–215, 2006.
- O'TOOLE, P.W. & COONEY, J. Review Article: Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microflora. *Interdisciplinary perspectives on infectious disease*, 9p, 2008.
- OLIVEIRA, C.J., et al. Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. *Veterinary Microbiology* n.125, p.355–361, 2007.
- PARKER, R.B. Probiotic, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health*, n.29, p. 4-8, 1974.
- PAULIN, S.M. et al. Net replication of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Cholerasuis in porcine intestinal mucosa and nodes associated with their differential virulence. *Infection Immunology.* n.75, p.3950-3960, 2007.
- PAYNE, R.J.H.; PHIL, D. & JANSEN, V.A.A. Phage therap: The peculiar kinetics os self-replicating pharmaceuticals. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* v.68, n.3,225-229, 2000.
- PEEK, R. & REDDY,R. FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products. *Gastroenterology.* v.131, n.5, p.1370-1372, 2006.
- PELLEGRINI, D.C.P. et al. Freqüência de isolamento de *Salmonella* sp. e de enterobactérias em diferentes áreas de fábrica de ração para suínos. In: 14º Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos (ABRAVES) *Anais.* Uberlândia, Minas Gerais. p. 311-312, 2009.
- PLUSKE, J.R. et al.. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science.* v.51, p.215-236, 1997.
- PROUTY, A.M. & GUNN, J.S. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infection and Immunity.* n.68, p.6763–6769 , 2000.

- PROUX, K. et al. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing the detection of all infected pigs. *Veterinary Research*. n.31, p.481-490, 2000.
- QUINN P. J.; MARKEY, B. K. & CARTER, M.E.; et al. Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas, *Artmed*, Porto Alegre, 2005.
- RAJIC, A., et al. An overview of microbial food safety programs in beef, pork, and poultry from farm to processing in Canada. *Journal of Food Protection*. n.70, p.1286–1294, 2007.
- REEVES, M.W. et al. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, n. 2, p. 313-320, 1989.
- REYNAUD, A et al. Characteristics and diffusion in the rabbit for *Escherichia coli* O113. attempts to use this phage for therapy. *Veterinary Microbiology*. v. 30, p. 203-212, 1992.
- ROOF, L. et al. Characterization of *Salmonella* Cholerasuis isolate after repeated neutrophil exposure. *American Journal of Veterinary Research*. n.53, p.1328-1332, 1992.
- ROSSI, A.A. et al. Uso de probiótico na prevenção de Salmonelose em frangos de corte. *Ciência Agrotécnica*. v.31, n.4, p.1207-1211, 2007.
- ROSTAGNO, M. Can Stress in farm animals increase food safety risk? *Foodborne Pathogens and Disease*. v.6, n.7, p.767-776, 2009.
- ROUCOURT, B. & LAVIGNE, R. The role of interaction between phage and bacterial proteins within the infected cell: a diverse and puzzling interactome. *Environmental Microbiology*. v.11, n.11, p.2788-2805, 2009.
- SABLON, E.; CONTERAS, B. & VANFAMME, E. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: Mode of action, genetics and biosíntesis. In: *Advances Engineering /Biothenology. Springes-Verlang*. 2000.
- SANTOS, M.S. et al. Avaliação da suplementação de mananoligossacarídeos e acidificantes em dietas para suínos fêmeas na fase de terminação. In: 11º Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos (ABRAVES). *Anais*, Goiânia, Goiás. p. 309-310, 2003.
- SCHAUSER, K., OLSEN, J.E. & LARSSON, L.I. Immunocyto chemical studies of *Salmonella* Typhimurium invasion of porcine jejunal epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology*. n.53, p.691–695, 2004.
- SCHIFFRIN, E.J. & BLUM, S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*. n.52, suppl. 3, p.560-564, 2002.

- SCHWARZ, P. et al. *Salmonella* enterica: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.61, n.5, p.1028-1034, 2009.
- SERVIN, A.L. & COCONNIER, M. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*. v.17, n.5, p.741-754, 2003.
- SGORBATI, B.; BIAVATI, B. & PALENZONA, D. The genus Bifidobacterium. In: Wood, B.J.B. & Holzapfel, W.H. (eds.). *The Lactic Acid Bacteria. V.II, Chapman & Hall*. p.279-306, 1995.
- SHELOBOLINA, E.S. et al Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate-and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. Nov. *Applied Environmental Microbiology*. n.70, p.2959-2965, 2005.
- SHRYOCK, T.R. et al. Effect of tylosin on an experimental *Salmonella* infection in pig. *Journal of Swine Health Production*. n.6, p.211-216, 1998.
- SILVA, V.S. et al. Fatores de risco associados à contaminação residual por *Salmonella* sp em instalações de creche de suínos no período de vazio. In: III Congresso Latino-Americano de Suinocultura, Foz do Iguaçu/PR. *Anais*. Campinas, São Paulo, 2006.
- SILVA, M.C. et al. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos no estado de Mato Grosso. *Ciência Rural*, Santa Maria, p.175-189, 2008.
- SILVEIRA, R.H. et al Capacidade Lítica dos Bacteriófagos CNPSA1, CNPSA3 e CNPSA4 sobre *Salmonella* Thyphimurium *in vitro* e em suínos experimentalmente infectados. In: International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis. *Anais*. Ploufragan, França., 2006.
- SIMS, L.D. & GLASTONBURY, I.R., *Pathology of the Pig- A Diagnostic Guide*, Pig Research and Development Corporation, Australia, 1996.
- SKURNIK, M.; PAJUNEN, M. & KILJUNEN, S. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnological Letter*. n.29, p.995-1003, 2007.
- SKURNIKA, M. & STRAUCH, E. Phage Therapy: Facts and Fiction. *International Journal of Medical Microbiology*. 296, 5-14, 2006.
- SMITH, H.W.; HUGGINS, M.B Experimental infection of calves, piglets and lambs with mixture of invasive and enteropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Journal Medical Microbiology*. n.12, p.506-510, 1979.

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

SMITH, H.W.; HUGGINS, M.B. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves, piglets and lambs. *Journal of General Microbiology*. v.129, p. 2659-2675, 1983.

SMITH, H.W.; HUGGINS, M.B. & SHAW, K.M. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves by means of bacteriophages. *Journal of General Microbiology*. n.133, p.1111-1126, 1987.

SONNENBURG, J.L.; CHEN, C.T. & GORDON, J.I. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics and a model gut symbiotic and host. *PLoS Biology*. n.12, p.413, 2006.

SOOTHILL, J.S. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophage. *Journal of Medical Microbiology*. n.37, p.258-261, 1992.

SPOLAORE, A. J. G. & ALBERTON, G. C. Prevalência de *Salmonella* sp. em linfonodos mesentéricos de suínos abatidos na região oeste do Paraná e potencial de disseminação em bandejas, facas e luvas de manipuladores durante a inspeção post-mortem. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia. *Anais*. p. 102-111; 2007.

STÄRK, K.D.C.; WINGSTRAND, A.; DAHL, J. et al. Differences and similarities among experts opinions on *Salmonella enterica* dynamics in swine pre-harvest. *Preventive Veterinary Medicine*. v.53, p.7–20, 2002.

SULAKVELIDZE, A & KUTTER, E. Bacteriophage therapy in humans. In: Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (eds.) *Bacteriophages: Biology and Applications.*, CRC Press. 2005.

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

SUMMERS, W.C. Bacteriophage therapy. *Annual Review of Microbiology*, 55,437-451, 2001.

SWANENBURG, M. et al. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*. v.70, p.243-254, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. & CASE, C. L. *Introducción a la Microbiología*. Zaragoza: *Acribia*, 2005. 792 p.

TROBOS, M. et al. Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v.10, p. 1-7, 2008.

- VAN DER WIELEN, P.W.J.J. Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactate fermentans* in a Sequencing Fed-Batch Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: p.555-559, Feb. 2002
- VAN DER WOLF, P. J. *et al.* Herd level husbandry factors associated with the serological *Salmonella* prevalence in finishing pig herds in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, v.78, p. 205-219, 2001.
- VAN VELKINBURG, J.C. & GUNN, J.S. PhoP–PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infection Immunity*. n.67, p.1614–1622, 1999.
- VANNUCCI, F.A. & GUEDES, R.M.C. Fisiopatologia das diarreias em suínos. *Ciência Rural*, Santa Maria, 39, 7, 2233-2242, 2009.
- VASSALO *et al.* Probiótico para leitões dos 10 aos 30 kgs de peso vivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 26, n1, p. 131-138, 1997.
- VIEIRA-PINTO, M.; TEMUDO, P. & MARTINS, C. Occurrence of *Salmonella* in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption. *J. Vet. Med. Infect. Dis.* v.52, p.476-481, 2005.
- VOLF, J. *et al.* Cytokine response of porcine cell lines to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its *hilA* and *ssrA* mutants. *Zoonose Public Health*. n.54, p.286–293, 2007.
- WATERMAN, S.R. & HOLDEN, D.W. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell. Microbiology*. n.5, p.501–511, 2003.
- WHO. World Health Organization. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London Ontario, Canada, 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/probiotic>> (Ac. em 15 jul. 2009).
- WHO. World Health Organization. *Food Safety and Foodborne illness. Fact Sheet n° 139*. April, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>> (Acesso em 15 jul. 2009).
- WILLIAMS, P.H. *et al.* Catecholase receptor protein in *Salmonella enterica*: role in virulence and implications for vaccine development. *Vaccine*. n.24, p.3840-3844, 2006.
- XIE, H.; *et al.* Bacteriophage *Esc-A* is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51, p.159-163, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1- Dieta basal especialmente formulada para o experimento.

Ingrediente	Peso (Kg)
AÇUCAR	10,00
LACTOSE	30,30
MILHO GRAO	308,7
MILHO PRE-COZIDO	30,00
OLEO SOJA	3,18
PLASMA AP 920	12,50
SOJA FARELO (45%)	91,36
FOSFATO BICALCICO 18	1,36
CALCARIO 37	3,93
SAL COMUM	1,61
DL-METIONINA	0,75
HCL-LISINA	2,53
L-TRIPTOFANO	0,15
L-TREONINA	0,62
COLINA 60% - CLORETO	0,05
CAULIM	1,50
FITASE QUANTUM 2500XT SUINO	0,10
ANTIOXIDANTE	0,07
PX MIN SEM NADA	0,50
PX VIT SEM NADA	0,75
Total	500,0

ANEXO 2- Composição total de células viáveis, em UFC/g, presentes no probiótico Florafort®Vitafort, em pasta e pó, conforme o fabricante.

	Florafort®Vitafort - Pó	Florafort®Vitafort - Pasta
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	3,33 x 10 ⁶	3,33 x 10 ⁷
<i>Enterococcus faecium</i>	1,66 x 10 ⁶	1,66 x 10 ⁷
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3,33 x 10 ⁶	3,33 x 10 ⁷
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,66 x 10 ⁶	1,66 x 10 ⁷
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,33 x 10 ⁵	3,33 x 10 ⁵
Total de células viáveis	10⁷ UFC/g	10⁸ UFC/g

ANEXO 3- Protocolo de Isolamento de *Salmonella* segundo Michael, Cardoso e Costa (2003).

A metodologia para o isolamento de *Salmonella* sp. compreende as seguintes etapas: pré-enriquecimento no qual alíquotas de 25g do material analisado (fezes, conteúdo cecal, pulmão, fígado, tonsilas, linfonodos mesentéricos e baço) foram homogeneizados em 225mL de água peptonada tamponada e incubadas a 37° C durante 18-24h; enriquecimento seletivo em que alíquotas de 100 µL e 1 mL do pré-enriquecimento foram semeados em Caldo Rappaport-Vassiliadis e Caldo Tetracionato, respectivamente, e incubados a 42°C durante 24h; isolamento em meio sólido em que 100 µL de cada um dos meios de enriquecimento foram semeados nos meios Ágar Verde brilhante-lactose-sacarose (BPLS) e Ágar Xilose-Lisina-Tergitol 4 (XLT4). Os meios foram incubados a 37°C durante 24-48h. As bactérias isoladas com colônias típicas e suspeitas de *Salmonella* sp. foram identificadas através de suas características morfológicas e bioquímicas. As bioquímicas utilizadas foram TSI, LIA, Uréia e ONPG. As bactérias presuntivamente identificadas como do gênero *Salmonella* foram submetidas à confirmação com soro polivalente somático e encaminhadas à Fundação Instituto Oswaldo Cruz para sorotipificação.

ANEXO 4- Protocolo de quantificação de *Salmonella* segundo Borowsky, Cardoso & Schmidt (2007).

Três alíquotas de 10g de fezes serão acrescidas a 10 mL de água peptonada tamponada 1%, enquanto três alíquotas de 1 g e três alíquotas de 0,1 g foram acrescidas, individualmente, a 10 mL de água peptonada tamponada 1% e homogeneizadas. Todos os tubos serão incubados a 37°C por 18 a 24 horas. Após, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em caldo Rappaport-Vassiliadis e incubadas a 42°C. Após 24 horas, alíquotas de cada tubo foram semeadas em ágar XLT₄. Colônias típicas de *Salmonella* sp. foram confirmadas por perfil bioquímico e aglutinação com soro anti-somático. O número de placas positivas para *Salmonella* sp. no agar XLT₄ foram utilizados para o cálculo do Número Mais Provável (NMP) como descrito (BAM, 2003).

ANEXO 5- Protocolo do teste de ELISA para *Salmonella* Typhimurium, segundo Kich et al., pesquisa de IgG e adaptação para IgA.

Placas DYNEX IMMULON 2 HB foram impregnadas com 100 μ L, por cavidade, do antígeno na concentração 1:1000 em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 – 0,05M. As placas foram deixadas em repouso por 24 horas a 4° C, a seguir foram congeladas por, no mínimo, uma hora a –70°C. No momento do uso, após o descongelamento em temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes por 3 minutos com tampão fosfato, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), pH 7,4. Os soros foram diluídos 1:400 em PBS-T, contendo 1% de albumina bovina (PBS-TA) e adicionados, em triplicata, à placa teste. A placa contendo os soros foi incubada a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Após a placa foi lavada novamente como descrito acima. Em cada cavidade foram distribuídos 100 μ L do soro conjugado com peroxidase (Anti-pig) na diluição 1:25000 em PBS -TA. A seguir foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, lavadas e acrescidas de 100 μ L do revelador por cavidade. O revelador foi preparado no momento do uso, adicionando 100 μ L do substrato e 3,5 μ L de H₂O₂ e 230 μ L de NaOH 10N para cada 10 mL de tampão revelador (solução reveladora) e deixada por 15 minutos em temperatura ambiente. A intensificação da cor foi bloqueada com acréscimo de 50 μ L por cavidade de ácido sulfúrico 2M (H₂SO₄). A placa foi agitada levemente e lida em espectrofotômetro com filtro 450nm a DO correspondente (ICN -TiterteK Multiskan). A leitura foi realizada no programa ELISUAVE com padrões já definidos. Este teste de ELISA-Typhimurium foi adaptado para análise da detecção de IgA através da substituição do conjugado anti-IgG suína por anti-IgA suína, e o lavado intestinal testado sem diluir.

ANEXO 6- Percentual de presença e níveis descritivos de probabilidade do teste exato de Fisher para histopatologia de órgãos coletados na necropsia, em diferentes tratamentos e lesões para órgãos acometidos.

Variável	Controle	Bacteriófago	Probiótico	Prob
Linfonodo Mesentérico (edema)	0,0	25,0	33,3	0,1695
Linfonodo Mesentérico (hiperplasia da medula branca)	10,0	41,7	33,3	0,3192
Linfonodo Mesentérico (infiltração de cels. Mononucleares)	0,0	16,7	33,3	0,1960
Linfonodo Mesentérico (normal)	50,0	41,7	25,0	0,5566
Tonsila (presença material necrótico nas criptas)	100,0	100,0	100,0	
Baço (normal)	90,0	91,7	91,7	1,0000
Ceco (infiltrado linfóide)	10,0	8,3	8,3	1,0000
Ceco (infiltração de cels. Mononucleares)	100,0	91,7	100,0	1,0000
Ceco (infiltração de cels. Mononucleares ++ ou mais)	60,0	41,7	66,7	0,5698
Ceco (presença de folículo linfóide na submucosa)	10,0	16,7	16,7	1,0000
Ceco (presença de folículo linfóide na submucosa ++ ou mais)	10,0	8,3	8,3	1,0000
Colon (depleção linfóide)	0,0	0,0	25,0	0,0936
Colon (infiltração de cels. Mononucleares)	100,0	100,0	100,0	
Colon (infiltração de cels. Mononucleares ++ ou mais)	90,0	75,0	83,3	0,8542
Colon (presença de folículo linfóide na submucosa)	30,0	25,0	41,7	0,7374
Colon (presença de folículo linfóide na submucosa ++ ou mais)	0,0	0,0	25,0	0,0936
Fígado (fibrose)	50,0	0,0	75,0	0,0002
Fígado (infiltração de cels. Mononucleares)	30,0	50,0	33,3	0,6749
Fígado (normal)	40,0	25,0	8,3	0,2773
Fígado (proliferação de células biliares)	40,0	8,3	75,0	0,0038
Íleo (infiltração de cels. Mononucleares)	10,0	16,7	8,3	1,0000
Íleo (infiltração de eosinófilos)	100,0	83,3	100,0	0,3155
Pulmão (pneumonia intersticial)	100,0	83,3	33,3	0,0651
Reto (depleção linfóide)	20,0	0,0	16,7	0,4248
Reto (infiltração de cels. Mononucleares)	100,0	100,0	100,0	
Reto (infiltração de cels. Mononucleares ++ ou mais)	80,0	75,0	83,3	1,0000
Reto (presença de folículo linfóide na submucosa)	30,0	25,0	41,7	0,7374
Reto (presença de folículo linfóide na submucosa ++ ou mais)	20,0	0,0	16,7	0,4248