

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

***Salmonella Gallinarum* MULTIRRESISTENTES E FORMADORAS DE
BIOFILMES EM CASCAS DE OVOS SÃO SENSÍVEIS A
BACTERIÓFAGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Natalie Nadin Rizzo

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

***Salmonella* GALLINARUM MULTIRRESISTENTES E FORMADORAS DE
BIOFILMES EM CASCAS DE OVOS SÃO SENSÍVEIS A BACTERIÓFAGOS**

Natalie Nadin Rizzo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação** – Área de concentração em Higiene, inspeção, microbiologia e composição química de alimentos.

Orientadora: Profa. Laura Beatriz Rodrigues

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

CIP – Catalogação na Publicação

R627s Rizzo, Natalie Nadin
Salmonella Gallinarum multirresistentes e
formadoras de biofilmes em cascas de ovos são
sensíveis a bacteriófagos / Natalie Nadin Rizzo. –
2017.
77 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Laura Beatriz Rodrigues.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2017.

1. *Salmonella Gallinarum*. 2. Vírus - Genética.
3. Agentes antiinfecciosos. 4. Bacteriófagos.
I. Rodrigues, Laura Beatriz, orientadora. II. Título.

CDU: 664:615.9

Catalogação: Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva - CRB 10/2241

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

***Salmonella* GALLINARUM MULTIRRESISTENTES E FORMADORAS DE
BIOFILMES EM CASCAS DE OVOS SÃO SENSÍVEIS A BACTERIÓFAGOS**

Elaborada por
Natalie Nadin Rizzo

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Bioexperimentação

Comissão Examinadora


**Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF
(Orientador/Presidente)**


Fernando Pilotto, Dr., UPF


Sabrina Castilho Duarte, Dra., Embrapa

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar comigo, me conduzindo, me iluminando, me dando novas oportunidades e energia para vencer cada desafio.

Aos meus pais, Maria Inêz e Vilson Rizzo, por serem verdadeiros incentivadores e entusiastas de seus filhos, e por me orientar a sempre buscar o melhor a cada dia, além de serem o espelho de princípios e valores sólidos. Essa conquista também é de vocês.

Ao meu marido, pelo companheirismo de sempre, por me fazer melhor a cada dia com seus exemplos de caráter, princípios e valores.

À coordenação do Hospital Veterinário e à Direção da FAMV, os quais permitiram que essa oportunidade fosse abraçada e concretizada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues, por ter me apresentado e ensinado a gostar da microbiologia e da patologia aviária. Obrigada pela confiança depositada, pelas atividades a mim confiadas e por contribuir com a minha formação profissional. Com certeza estamos colhendo o que você me ensinou a plantar desde a graduação. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos, por todas as orientações e conselhos, desde o início da minha formação.

À professora Ms. Luciane Daroit, por realizar a análise estatística com muita dedicação e afinho.

À Profa. Dra. Giseli Ritterbusch, pela dedicação e disponibilidade de me auxiliar a percorrer essa dissertação. Obrigada pelos conselhos dados ao longo dessa trajetória.

A todos os professores que compõe o seletivo grupo de docentes do programa PPGBioexperimentação.

À todas minhas colegas funcionárias dos laboratórios do Hospital Veterinário, em especial à Alana Patrícia da Silva, pelo auxílio de sempre.

Às empresas Brasil Foods, em nome do Dr. João Paulo Zuffo, pela oportunidade, pela experiência adquirida, pela parceria e apoio de sempre, e por terem feito parte implacável em minha trajetória, sendo um referencial de ensinamentos técnicos e de gestão.

Às minhas colegas de mestrado Tanise e Suelen, por dividir momentos constantes de ensino-aprendizagem mútua.

À doutoranda Bruna Webber, por estar sempre ao meu lado, me auxiliando no desempenho das atividades desse projeto.

Aos bolsistas e integrantes do GEMicro, em especial Rafael e Suelen, pelo constante auxílio fazendo com que tudo estivesse organizado para execução das atividades.

EPÍGRAFE

*"Não sou obrigado a vencer, mas tenho o dever de ser verdadeiro. Não sou obrigado a ter sucesso, mas tenho o dever de corresponder aos princípios que tenho."
(Abraham Lincoln)*

Índice

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 TIFO AVIÁRIO	15
2.1.1 Transmissão de <i>Salmonella Gallinarum</i>	16
2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA	17
2.2.1 Ilhas de patogenicidade	18
2.2.2 Plasmídios	19
2.2.3 Formação de biofilmes	20
2.3 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTES.....	22
2.3.1 Resistência a antimicrobianos	22
2.3.2 Utilização de desinfetantes.....	25
2.4 UTILIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS COMO ALTERNATIVA A ANTIMICROBIANOS	26
3 CAPÍTULO 1. <i>Salmonella Gallinarum</i> multirresistentes e formadoras de biofilmes em cascas de ovos são sensíveis a bacteriófagos	30
RESUMO	31
Introdução	32
Material e Métodos	34
Resultados e Discussão	38
Conclusões	43
Referências.....	44
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
5 REFERÊNCIAS	63

LISTA DE FIGURAS**3. Capítulo 1**

Gráfico 1. Formação de biofilme em poliestireno por <i>Salmonella</i> Gallinarum.....	55
--	----

LISTA DE TABELAS**3. Capítulo 1**

Tabela 1.	Perfil de resistência e índice de resistência múltipla a antimicrobianos (IRMA) de <i>Salmonella Gallinarum</i>	53
Tabela 2.	Perfil de resistência aos bacteriófagos de <i>Salmonella Gallinarum</i>	54
Tabela 3.	Perfil dos genes de virulência detectados em <i>Salmonella Gallinarum</i>	56
Tabela 4.	Perfil fenotípico e genotípico de <i>Salmonella Gallinarum</i>	57
Tabela 5.	Formação de biofilmes em cascas de ovos por <i>Salmonella Gallinarum</i> sob diferentes temperaturas de incubação e remoção por desinfecção química.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ATB	Antibiograma
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Brain-Heart Infusion - Caldo Cérebro-Coração
CDC	Center of Disease Control and Prevention - Centro de Controle e Prevenção de Doenças
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
FDA	Food and Drug Administration
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NARMS	National Antimicrobial Resistance Monitoring System
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
RS	Rio Grande do Sul
SG	<i>Salmonella Gallinarum</i>
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island – Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>
SSTT	<i>Type Three Secretion System</i> – Sistema de Secreção do Tipo III
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFC	Unidade formadora de colônia
OIE	Organização Internacional de Epizootias
WHO	World Health Organization – Organização mundial da saúde

RESUMO

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

***Salmonella* Gallinarum multirresistentes e formadoras de biofilmes em cascas de ovos
são sensíveis a bacteriófagos**

Autor: Natalie Nadin Rizzo

Orientadora: Laura Beatriz Rodrigues

Passo Fundo, 31 de julho de 2017

O tifo aviário possui grande importância econômica em função dos altos custos com programas de controle, devido ao sacrifício sanitário das aves e descarte dos ovos nos incubatórios. A *Salmonella* Gallinarum, há algumas décadas, havia sido considerada erradicada em aves comerciais no Brasil. Porém, acredita-se que, devido às falhas nos controles, como biossegurança, insumos, monitorias e programas sanitários, associados aos mecanismos de virulência do patógeno, essa doença vem reemergindo nos últimos anos. A *S. Gallinarum* causa infecção e manifestações clínicas, com alta concentração bacteriana nos tecidos e pode ser transmitida vertical e horizontalmente. A contaminação via transovariana torna os ovos inviáveis para a produção de aves, as quais podem se tornar portadoras assintomáticas e transmitir o patógeno logo após o nascimento. A transmissão do microrganismo por via horizontal pode se caracterizar por contaminar os ovos através da casca logo após a postura, nos ninhos ou camas de aviários. Os fatores de virulência influenciam nos tratamentos com drogas antimicrobianas e no controle ambiental com a utilização de desinfetantes. É de fundamental importância o estudo desses fatores para auxiliar na análise epidemiológica dos surtos ocorridos e, também, para estabelecer estratégias de novos controles. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização fenotípica e genotípica de diferentes isolados de *S. Gallinarum*, oriundos da produção agroindustrial, através da avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos e a desinfetante, potencial de lise por bacteriófagos, pesquisa de genes de virulência, formação de biofilme em poliestireno e em cascas de ovos. Pode-se observar que as *S. Gallinarum* são multirresistentes aos antimicrobianos, sensíveis aos bacteriófagos testados, e potencialmente virulentas, de acordo com perfis genéticos obtidos. A maioria dos isolados formaram biofilme no poliestireno tanto a 22°C como a 42°C, sem diferença estatística ($p = 0.0965$) entre as temperaturas testadas. Houve maior formação de biofilme nas cascas de ovos na temperatura de 22°C ($4,656 \log_{10} \text{UFC/cm}^2$), com diferença estatística quando comparado aos biofilmes formados a 36°C e 42°C. A ação do desinfetante comercial, na concentração 1,5% e tempo 5 minutos, promoveu remoção do biofilme, estatisticamente significativa, apenas na formação a 22°C, propiciando uma redução de $3,125 \log_{10}$. A presença de genes de virulência, a multirresistência e a capacidade de formar biofilmes em diferentes superfícies e temperaturas pelas *S. Gallinarum* estudadas, isoladas de aves comerciais, nos faz supor que estes podem ser fatores relevantes para que a SG se mantenha presente nos plantéis avícolas e esteja envolvida em surtos sanitários intermitentes. Apesar do cenário preocupante, a possibilidade de controle biológico da SG por bacteriófagos nos traz uma alternativa promissora para a contenção deste microrganismo.

Palavras-chave: *Salmonella* Gallinarum, genes de virulência, antimicrobianos, bacteriófagos, desinfetantes.

ABSTRACT

**Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

***Salmonella* Gallinarum multirresistentes e formadoras de biofilmes em cascas de ovos
são sensíveis a bacteriófagos**

Author: Natalie Nadin Rizzo

Advisor: Laura Beatriz Rodrigues

Passo Fundo, July 31st, 2017

The fowl typhoid has great economic importance due to the high costs with control programs, due to the sanitary sacrifice of the birds and discard of the eggs in the hatcheries. *Salmonella* Gallinarum, a few decades ago, had been considered to be eradicated in commercial birds in Brazil. However, due to the lack of controls, such as biosecurity, inputs, monitoring and health programs, associated with the virulence mechanisms of the pathogen, this disease has been reemerging in recent years. *S. Gallinarum* causes infection and clinical manifestations, with high bacterial concentration in the tissues and can be transmitted vertically and horizontally. The contamination via transovarian renders the eggs unviable for the production of birds, which can become asymptomatic carriers and transmit the pathogen soon after the birth. Transmission of the microorganism horizontally can be characterized by contaminating the eggs through the bark soon after laying, in the nests or beds of aviaries. Virulence factors influence the treatments with antimicrobial drugs and environmental control with the use of disinfectants. It is of fundamental importance the study of these factors to assist in the epidemiological analysis of the outbreaks occurred and, also, to establish strategies of new controls. The objective of this study was to characterize the phenotypic and genotypic characteristics of different *S. Gallinarum* isolates from agroindustry production through the evaluation of antimicrobial susceptibility and disinfectant, bacteriophage lysis potential, virulence genes, biofilm formation Polystyrene and eggshells. It can be observed that the *S. Gallinarum* are multiresistant to the antimicrobials, sensitive to the bacteriophages tested, and potentially virulent, according to the genetic profiles obtained. Most of the isolates formed biofilm in polystyrene at 22°C and 42°C, with no statistical difference ($p = 0.0965$) between the temperatures tested. There was a higher biofilm formation in eggshells at 22°C (4,656 log₁₀UFC / cm²), with a statistical difference when compared to biofilms formed at 36°C and 42°C. The action of the commercial disinfectant, in the concentration 1.5% and time 5 minutes, promoted the removal of the biofilm, statistically significant, only in the formation at 22°C, leading to a reduction of 3,125 log₁₀. The presence of virulence genes, the multiresistance and the ability to form biofilms on different surfaces and temperatures by *S. Gallinarum* studied, isolated from commercial birds, makes us suppose that these can be relevant factors for the SG to remain present in poultry farms and is involved in intermittent outbreaks. Despite the worrying scenario, the possibility of biological control of SG by bacteriophages brings us a promising alternative for the containment of this microorganism.

Keywords: *Salmonella Gallinarum*, virulence genes, antimicrobials, bacteriophages, disinfectants.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira encontra-se em posição de destaque no cenário mundial de produção de alimentos, já que o Brasil ocupa a primeira posição na exportação de carnes de frango e a terceira em termos de produção de carne e derivados de frango, além de relevante avanço na produção de ovos pelo setor avícola de postura do país. Em 2016, o Brasil produziu 12,9 milhões de toneladas de carne de frango, sendo 34% desta produção destinada à exportação, chegando a 143 países do mundo e 66% destinados para o mercado interno (UBABEF, 2017).

Para a manutenção deste nível elevado de produção, a sanidade dos plantéis avícolas é um ponto fundamental, uma vez que a introdução de patógenos, de maneira geral, causam um impacto significativo em perdas econômicas no setor, relacionados à diminuição do crescimento, diminuição da qualidade e da produção de ovos, mortalidade, condenações no abate e gastos com insumos, incluindo diagnóstico, vacinas e antimicrobianos, a fim de eliminar infecções bacterianas intercorrentes (MONTASSIER, 2010; BARROW & FREITAS NETO, 2011).

Atualmente, o Brasil tem enfrentado desafios em relação ao tifo aviário, uma doença clínica severa que ocorre em aves industriais e de fundo de quintal. Seu agente, *Salmonella Gallinarum*, havia sido considerado erradicado dos plantéis avícolas brasileiros nas décadas passadas. Porém, sua ocorrência vem sendo novamente descrita tanto em aves do final da cadeia produtiva (frangos de cortes e galinhas de postura comercial) como em lotes de reprodutoras (matrizes e avós).

O motivo do tifo aviário ainda estar presente nos plantéis de aves de produção pode ser multifatorial. Os sinais clínicos e as lesões causadas pela *S. Gallinarum* nas aves são visualizados somente em casos graves e agudos, e existe uma grande dificuldade de isolamento deste sorovar pelos métodos convencionais a partir de fezes, ambiente e cama. Entretanto, destaca-se a não realização dos testes de soroaglutinação rápida em matrizes após a vacinação contra *S. Enteritidis*, e a existência de lotes falso-negativos nos monitoramentos. O diagnóstico tardio dificultou a identificação da origem dos surtos, agravados pelas medicações indiscriminadas que mascaram o quadro clínico e o diagnóstico laboratorial. E, apesar de não ser uma zoonose, a presença da *S. Gallinarum* repercute diretamente na produção de alimentos de origem avícola.

A permanência da *S. Gallinarum* em ambientes de criação das aves e em equipamentos de transporte, bem como a capacidade de transmissão entre as aves, destacando sua permanência nas cascas dos ovos, podem estar relacionados com o retorno do tifo aviário na avicultura industrial. O sucesso do controle sanitário está vinculado com a biossegurança e a vigilância epidemiológica das cepas circulantes, através do emprego de técnicas fenotípicas e moleculares que possam caracterizar linhagens entre os sorovares e as fontes de isolamento. Os fatores de virulência da *Salmonella Gallinarum*, como a resistência aos antimicrobianos, aos desinfetantes e a capacidade de formação de biofilmes são características patogênicas relevantes, e podem influenciar a ocorrência de novos surtos de tifo aviário. Com isso, foi realizada a caracterização fenotípica e genotípica de fatores de virulência de diferentes isolados de *Salmonella Gallinarum*, oriundas da produção agroindustrial, com o objetivo de avaliar a influência destes no controle biológico e químico deste sorovar na forma planctônica e em biofilmes.

A presente dissertação é composta por esta introdução, uma breve revisão de literatura sobre os temas abrangidos, e por um artigo científico, descrito no Capítulo 1, ***Salmonella Gallinarum* multirresistentes e formadoras de biofilmes em cascas de ovos são sensíveis a bacteriófagos.**

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TIFO AVIÁRIO

O tifo aviário é causado pela *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum, comumente conhecida como *Salmonella* Gallinarum (SG), sendo altamente patogênica para aves de qualquer idade, porém com maior ocorrência de sinais clínicos em aves adultas. Infecta várias espécies de aves, mas seu principal hospedeiro são as galinhas. Por apresentar uma grande similaridade quanto à evolução patogênica da febre tifóide humana, foi denominada como tifo aviário (BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009).

As espécies e subespécies de *Salmonella* são fenotipicamente classificadas de acordo com diferentes testes de crescimento bacteriano e diferenciação bioquímica, enquanto sorovares ou sorotipos são classificados com base no esquema de Kauffmann - White. Primeiramente, é determinado o antígeno "O", que é baseado em polissacarídeos que estão associados com lipopolissacarídeos (LPS). Os diferentes antígenos "O" são expressos em números. Em seguida, é expresso o antígeno "H", que é determinado com base nas proteínas flagelares. *Salmonella* Gallinarum é imóvel, porém, conserva material genético que codifica flagelos basais, que são complexos de proteínas chamadas de "FliE". Os antígenos flagelares são representados com a combinação de letras e números (TERZOLO, 2011). A diferenciação antigênica é caracterizada por pertencer ao sorogrupo D e também o antígeno somático "O". Além disso, quanto ao isolamento microbiológico apresentar um crescimento muito lento, em meios de cultivos apropriados para a espécie, e com formação de H₂S. As colônias são menores quando comparadas a colônias de outras bactérias da mesma espécie. Bioquimicamente a *Salmonella* Gallinarum se diferencia dos demais sorovares por descarboxilar a ornitina e fermentar o dulcitol (BERCHIERI JÚNIOR, 2012).

É amplamente distribuído por todo o mundo, mas têm sido controlado em aves comerciais em muitos países desenvolvidos da Europa Ocidental, nos Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Austrália e Japão (OIE, 2012). A primeira descrição da doença foi em 1889, na Inglaterra, na qual 400 aves foram acometidas e 200 aves evoluíram ao óbito (REVOLLEDO, 2009), e também foi observada em outros países da Europa, Estados Unidos, Ásia e África. Na Europa, a doença voltou a ser relatada no início da década de 1990. No Brasil, os primeiros registros de tifo aviário foram em 1919 em Minas Gerais e em 1939 em

São Paulo. Foi relatado novamente em 1980 e 1990, porém não se obteve uma completa elucidação da ocorrência pela dificuldade de informações, já que o diagnóstico pode ter sido realizado através de sinais clínicos e achados anatomopatológicos sem a confirmação microbiológica do agente envolvido (REVOLLEDO, 2009; PARVEJ et. al., 2016). A mortalidade pode variar de 40 a 80% do plantel, e que os animais adoecem e vem a óbito no período de 7 a 14 dias posterior à infecção.

2.1.1 Transmissão de *Salmonella Gallinarum*

A disseminação de *Salmonella* spp. no ambiente avícola tem como característica o fato do agente estar inserido no trato digestório, incluindo o ceco, e poder ser excretada pelas fezes e disseminar o patógeno. Uma vez infectadas, as aves eliminam a bactéria de forma intermitente e em número baixo, o que dificulta o monitoramento de contaminações. Aves destinadas à postura comercial podem permanecer infectadas até a idade de postura, produzir ovos contaminados ou disseminar o microrganismo entre as demais aves (BARANCELLI et. al., 2012; BARROW & FREITAS NETO, 2011). A transmissão de *S. Gallinarum* pode ocorrer pela via vertical, transovariana, pela produção de ovos infectados internamente, no ovário ou oviduto, pela via aerógena, que ocorre principalmente no incubatório, ou horizontal, através de alimentos, água e cama contaminados, ressaltando o contato com a SG das fezes ou cama com as cascas dos ovos (BERCHIERI JR et al., 2001).

A contaminação por via transovariana torna os ovos inviáveis para a produção de pintos de 1 dia, que já transmitem o patógeno logo após o nascimento. As aves infectadas nos primeiros dias de vida podem não manifestar sinais clínicos, mas se tornar portadoras para toda a vida (BERCHIERI JR et al., 2007). A transmissão do microrganismo por via horizontal pode se caracterizar por contaminar os ovos através da casca logo após a postura, nos ninhos ou nas camas dos aviários, nos caminhões ou no incubatório, que possui condições de umidade e temperatura favoráveis à manutenção do patógeno. A contaminação no incubatório entre as aves ocorre a partir do momento da bicagem dos ovos em eclosão, pela exposição dos pintainhos recém-eclodidos às *Salmonella* quando estão mais susceptíveis à colonização do trato intestinal (LODDI, 2001).

Para isso, a Instrução Normativa nº 18 de 22/06/2017 que consolida a Instrução Normativa nº 56 (MAPA) propõe para estabelecimentos Avícolas de Reprodução, que os ovos devem ser colhidos em intervalos frequentes, em recipientes limpos e desinfetados, após a colheita, os ovos limpos deverão ser desinfetados no mais breve espaço de tempo possível,

devendo ser armazenados em local específico e mantidos a temperatura entre 13 a 25°C, umidade relativa do ar entre 70 a 85%. Enquanto que MENDES P. M. M. et al. (2014) relatam que o armazenamento de ovos férteis é uma prática necessária e rotineiramente adotada na indústria avícola. A duração do período de armazenamento pode variar em função da capacidade das máquinas de incubação, sendo, ainda, reflexo das flutuações na produção de ovos e na demanda por pintos de um dia, está influenciada pelo mercado de frangos de corte. Tanto nas granjas produtoras como nos incubatórios, ovos férteis devem ser armazenados sob temperatura inferior ao ponto zero fisiológico, que está entre 21°C e 23°C (MENDES et al., 2014; ROMIJN & LOKHORST, 1955).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os mecanismos de virulência bacterianos conferem uma melhor habilidade de sobreviver, invadir, multiplicar e persistir dentro do hospedeiro, fazendo com que sejam elaboradas diferentes expressões de genes sob variadas condições ambientais durante o processo de infecção.

A *Salmonella* possui um importante fator de virulência constituído pelo lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular. Os lipídeos presentes no LPS, denominados endotoxinas ou lipídios A, interagem com os macrófagos de modo que se tornem resistentes aos peptídeos catiônicos, à ação endotóxica e à ação antimicrobiana das enzimas lisossomais.

A *S. Gallinarum* e a *S. Pullorum* possuem um mecanismo de infecção semelhante nas aves, realizando a invasão das células epiteliais do intestino ou tecido linfóide, atingindo as placas de Peyer e as tonsilas cecais. Através de fagócitos infectados as células bacterianas são movidas até os tecidos linfóides, como fígado, baço e medula óssea, onde ocorre a multiplicação bacteriana. Estas células bacterianas retornam ao intestino e, por um mecanismo complementar desconhecido, são eliminadas nas fezes (BARROW & FREITAS NETO, 2011).

Quanto à determinação genômica, sabe-se que a *S. Gallinarum* possui 4659 Mpb, e 309 pseudogenes (THOMSON et al., 2008). Comparando *S. Gallinarum* com *S. Pullorum*, FENG et al. (2013), revelaram que os dois biovars compartilham de 75 pseudogenes, dos quais 60 tiveram os mesmos locais de inativação e os outros 15 pseudogenes sítios de inativação diferentes. Avaliando outros sorovares, observou-se que a especificidade do hospedeiro compromete efetivamente a perda funcional de genes, resultando na formação de pseudogenes, ao invés de ocorrer deleção. O grande número de pseudogenes de sorovares

específicos propõe que não é necessária uma enorme quantidade de genes para causar infecção sistêmica em aves, e denota a importância dos pseudogenes para a especificidade do sorovar nos hospedeiros (FENG et al., 2013)

De acordo com OSMAN et al. (2009) a presença de menos genes na *S. Gallinarum* pode contribuir para sua sobrevivência no interior do fagossomo dos macrófagos, e acarretar numa infecção sistêmica mais facilmente que o desenvolvimento de uma doença do trato digestório.

2.2.1 Ilhas de patogenicidade

Para VIEIRA (2009) os fatores de virulência de *Salmonella* estão codificados e agrupados em locais denominados Ilhas de Patogenicidade (*Salmonella Pathogenicity Islands* - SPI), as quais são constituídas por grupos de genes dentro do cromossomo bacteriano, responsáveis por estabelecer interações envolvendo a codificação específica de fatores de virulência (MARCUS et al. 2000; HENSEL, 2004).

As ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPI), historicamente adquiridos através de eventos de transferência horizontal de genes, incluem grupos de genes que codificam os mecanismos através dos quais *Salmonella* spp. atua como um agente patogênico virulento. Estas ilhas genéticas estão localizadas no cromossomo bacteriano ou em plasmídios, no entanto, nem todos os sorovares possuem SPI conhecido. SPI-1 a SPI-5 são comuns a todos os sorotipos de *S. enterica*. Até 2013 foram descritas 23 SPI (HAYWARD et al., 2013), sendo Sendo a SPI-1 e SPI-2 as mais estudadas e descritas, já que possuem importante papel na infecção por *Salmonella* (JONG et al., 2012). E, embora tenham sido descritas as funções destes genes contidos dentro de cada ilha, seus mecanismos ainda não foram completamente elucidados. SPI-1 e SPI-2 são de particular importância na infecção. Os genes codificam proteínas efetoras que são translocadas diretamente em células hospedeiras através do SSTT (Type Three Secretion System – Sistema de Secreção do Tipo III), sistemas de secreção da membrana plasmática que fornecem à *Salmonella* spp. a maquinaria bioquímica para explorar este nicho intracelular. SSTTs também podem ser usadas para secretar proteínas efetoras no ambiente circundante para influenciar célula hospedeira fisiologia (HAYWARD et al., 2013; HURLEY et al., 2014).

As células bacterianas de *Salmonella* spp. iniciam a indução da resposta imune em um hospedeiro, quando através da SPI-1 translocam sua proteína efetora (SipA) para dentro da célula intestinal resultando em inflamação e o recrutamento de polimorfonucleares (PMN). Posteriormente a proteína em conjunto com citocina e IL-8, provoca quimioatração de

neutrófilos. SPI-1 também leva a NF- κ B e sinalização caspase-1 mediada por IL-1 β / IL-18. A proteína efetora SipB também é translocada pela SPI-1 para a célula do hospedeiro, agravando o processo inflamatório *in vivo*, além de ser responsável pela morte celular programada e associada com respostas antimicrobianas durante a inflamação que possui características tanto apoptóticas quanto necróticas. SipB se liga a caspase-1 (IL-1 β enzima conversora) no citosol da célula resultando na maturação de pró-inflamatória citocinas IL-1 β e IL-18 em peptídeos ativos (HURLEY et al., 2014).

Além de desencadear uma resposta imune no hospedeiro a SPI-1 possui mais de 26 genes (MIRMOMENI et al., 2008; VIEIRA, 2009; JONG et al., 2010; ÁLVAREZ, 2007) que são responsáveis pela multiplicação da *Salmonella* spp. no interior de macrófagos (*spiA*), para a sobrevivência no interior de fagossomos (*msgA*, *pagC*), captação do ferro (*iroN*) e codificar endotoxinas (*stn*, *cdtB*) (ÁLVAREZ, 2007), todos com importante papel na patogenicidade da *Salmonella* ao hospedeiro. Um fator importante para a internalização da *Salmonella* spp. é a reestruturação do citoesqueleto de actina no local de contato com a bactéria, que culmina com a formação de projeções na membrana da célula hospedeira, englobando a bactéria. Para completar a entrada e reparar o citoesqueleto das células epiteliais, a *Salmonella* spp. inicia a despolimerização da actina. Ao final do processo, a bactéria localiza-se no interior das células do hospedeiro, dentro de vesículas membranosas, chamadas de SVCs (Vacúolos que contem *Salmonella*) (SANSONETTI, 2002).

A atividade pró-inflamatória da SPI-2, é importante para a persistência intracelular e virulência sistêmica em febre tifóide, além de evadir a fagocitose, hospedam mecanismos de oxidação no fagossomo (FIGUEIRA; HOLDEN, 2013). T3SS-2 desempenha um papel importante na doença inflamatória, com destaque para o envolvimento de SPI-2 no aparecimento de enterocolite. SPI-2 permite a translocação de efetores através da membrana do vacúolo contendo *Salmonella* spp. nas células hospedeiras infectadas. Os genes que codificam SSTT-2 são controlados por dois componentes sistemas de regulação, tais como OmpR-EnvZ e o SPI-2 codificado SsrA-ssrB. Esta ilha constitui um excelente exemplo de eficácia na adaptação de um patógeno em um determinado ambiente, neste caso, dentro da célula hospedeira (ÁLVAREZ, 2007).

2.2.2 Plasmídios

Os plasmídios são elementos genéticos, dispersos no citosol, de formato circular, que se replica independentemente do cromossomo do hospedeiro. A grande importância dos

plasmídios é a sua capacidade de transferir genes e codificar fatores de virulência, como a resistência aos antimicrobianos (MADIGAM, 2010; SENGUPTA & AUSTIN, 2011; GLYCES & BOERLIN, 2014).

A transferência horizontal de plasmídios possibilita que os microrganismos adquiram genes, que podem aumentar sua virulência ou resultar em uma maior resistência. Entretanto, apenas algumas cepas de *Salmonella* spp. possuem este tipo de Plasmídio (JONG et al., 2012). O *operon spv* é comum a todos os plasmídios de virulência de *Salmonella* spp. e está relacionado à sobrevivência no interior do macrófago (ÁLVAREZ, 2007).

Apesar de os plasmídios não estarem diretamente associados à interação inicial da *Salmonella* spp. com a mucosa intestinal e à invasão de tecidos mais profundos, eles favorecem a manutenção da bactéria no interior das células, além de auxiliar no início do processo de infecção sistêmica (MADIGAM, 2010; SENGUPTA & AUSTIN, 2011; GLYCES & BOERLIN, 2014). Além do gene fimbrial *pefA*, outros dois genes de origem plasmidial (*spvB* e *spvC*) também poderão ser pesquisados.

2.2.3 Formação de biofilmes

A formação de um biofilme é um dos mecanismos que a *Salmonella* spp. utiliza para a sobrevivência em ambientes físicos e químicos inóspitos (COSTERTON et al., 1999). Um biofilme é uma comunidade de células que interagem, ligadas a superfícies bióticas ou abióticas, inseridas em sua própria matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (COSTERTON et al., 1999). Dentro do biofilme a bactéria possui maior resistência a fatores de stress ambientais, a antibióticos e desinfetantes, em comparação com homólogos planctônicos, tornando, assim a eliminação bacteriana extremamente difícil de superfícies comumente utilizados em alimentos e em ambientes de criação na avicultura industrial (JOSEPH et al., 2001, STEENACHERS et al. 2012).

As EPS sintetizadas por células microbianas variam muito na sua composição e consequentemente nas propriedades químicas e físicas. Os polissacarídeos são cadeias moleculares longas e finas que podem estar associados de diferentes formas. As EPS presentes nos biofilmes assemelham-se aos polímeros sintetizados pelas correspondentes células em suspensão e sua quantidade sintetizada nos biofilmes dependera da disponibilidade de substratos de carbono e do balanço entre carbono e outros nutrientes limitantes (SUTHERLAND, 2001). Esta matriz tem inúmeras funções como adesão inicial, retenção de água, adsorção de compostos, fonte de nutrientes, troca e armazenamento de informações

genéticas e a principal que é barreira protetora capaz de prevenir o acesso físico de certos agentes antimicrobianos e agentes sanitizantes restringindo a difusão destes para o interior dos biofilmes (ELVERS & LAPPIN-SCOTT, 2000; GILBERT & FOLEY, 1997).

Três estruturas diferentes na conformação do biofilme já foram descritas na literatura: a estrutura tridimensional do biofilme (estrutura plana e homogênea); o modelo homogêneo em mosaico (constituída por microcolônias de bactérias unidas por EPS rodeadas por uma fase líquida); e a mais comum, em forma de cogumelo (estrutura de biofilme semelhante a um cogumelo com vários canais através dos quais passa a fase líquida) (COSTERTON et al., 1995).

A habilidade de formação de biofilme é regulada por vários conjuntos de genes envolvidos na produção de EPS e adesão. A matriz extracelular de biofilmes de *Salmonella* spp. é predominantemente composta de fimbrias Curli e celulose, que promovem a ligação e interação de células bacterianas. A proteína csgD é reguladora da transcrição de LuxR da superfamília que regula positivamente a formação de biofilme associado a componentes da matriz extracelular, incluindo fimbrias curli e celulose (GERSTEL e RÖMLING 2003). A csgD estimula a produção de curli através da ativação da transcrição do *operon* csgBAC, que codifica a maior subunidade CsgA de curli, bem como proteínas nucleotídeos CsgB. O gene csgD também regula indiretamente a síntese de celulose, ativando a transcrição de *adrA*. Um membro da família de proteínas GGDEF, a AdrA, sintetiza c-di-GMP como diguanyl-ciclase, e sua transcrição é regulada por csgD (LIU et al. 2014). A BapA é a maior proteína de superfície envolvida na formação de biofilmes e a expressão de *bapA* é coordenada pelos mesmos genes que codificam as fimbrias curli e celulose, através da ação de *csgD* (WANG et al. 2016; LATASA et al., 2005).

A teoria de formação de biofilme mais conhecida, consiste de cinco etapas: I) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico. II) transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência. III) início do processo de adesão bacteriana. IV) crescimento celular, colonização e adesão irreversível e V) biofilme com alta atividade metabólica e liberação de células localizadas na periferia (CHARACKLIS, 1984). Após o contato inicial com a superfície, os microrganismos começam a produção de fibras finas, que podem ser vistas por microscopia eletrônica. A forma da matriz, se caracteriza pelo espessamento dessas fibras. Outras substâncias orgânicas, inorgânicas e material particulado podem existir juntamente com microrganismos. A produção de EPS aumenta conforme a adesão (KUMAR & ANAND, 1998).

No biofilme existe uma comunicação que envolve a síntese bacteriana e a liberação de moléculas sinalizadoras difusíveis, esse mecanismo é denominado de *quórum sensing* (QS). Estes sinais podem ser dependentes da densidade celular ou produzidos pelas bactérias em diferentes fases de crescimento, permitindo uma regulação da expressão gênica (CERCA, 2012).

Apesar de existirem estudos sobre a invasão bacteriana, a formação de biofilme sobre a superfície da casca de ovo é raramente documentada. No mundo inteiro, ovo e contaminação da casca do ovo por *Salmonella* spp. é uma grande preocupação para as indústrias avícolas e, para a sobrevivência e multiplicação bacteriana e na superfície exterior de um ovo, o microrganismo deve superar a baixa disponibilidade de nutrientes e estresse térmico (GANTOIS et al. 2009). A partir do instante que o biofilme está formado, se torna um ponto constata de contaminações, liberando fragmentos ou células planctônicas dos microrganismos, podendo alterar a composição microbiológica dos produtos (FUSTER-VALLS et al., 2008).

Sorovares de *Salmonella* spp. são capazes de formar biofilme em um grande número de superfícies abióticas, como aço inoxidável, plástico, cimento, vidro e borracha (STEENACHERS et al. 2012). O aumento da resistência aos desinfetantes e agentes antimicrobianos apresentada pelos biofilmes microbianos, dificulta o seu controle. Uma vez que a literatura relata a presença de aproximadamente quinhentas a mil vezes mais resistente do que células planctônicas, demonstrando a importância de encontrar novas alternativas para o controle de biofilmes (COSTERTON et al., 1995).

2.3 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTES

2.3.1 Resistência a antimicrobianos

O uso de antimicrobianos iniciou com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, que observou que as culturas de *Staphylococcus aureus* deixadas sobre a bancada foram contaminadas por fungos do gênero *Penicilium* o qual inibia o crescimento da bactéria em questão. A penicilina se caracterizou por ser o primeiro antibiótico a ter atividade clínica (TAVARES, 2001). Oito anos depois se observou que 68% dos *Staphylococcus aureus* já apresentavam resistência a esse antibiótico, levando a um grande problemática para os tratamentos de infecções e iniciando, a partir de então, a resistência antimicrobiana (ROSSI &

ANDREAZZI, 2005). Esse assunto voltou a ser debatido na década de 70 quando médicos foram convencidos que mesmo com uma ampla oferta de agentes antimicrobianos existentes, todas as infecções bacterianas estavam se tornando intratáveis (LOWY, 2003).

Atualmente, em um estudo publicado pela União Européia, demonstra-se o aumento da resistência de *Salmonella* spp. isoladas de humanos e de animais aos antimicrobianos mais comumente utilizados para o tratamento da salmonelose (EFSA; ECDC, 2015). Nos últimos anos tem aumentado muito o aparecimento de cepas multirresistentes (LERTWORAPREECHA; SUTTHIMUSIK; TONTIKAPONG, 2013), que apresentam uma ameaça à saúde pública (KRIETSCH, 2014). Existe uma preocupação muito pertinente com a ocorrência de surtos de salmoneloses em humanos causados por essas cepas, onerando os gastos com tratamentos e, mesmo assim, sem um prognóstico favorável (KRIETSCH, 2014).

A utilização de antimicrobianos na produção animal se tornou comum devido à necessidade do aumento da quantidade de alimento a ser produzido (KOLUMAN; DIKICI, 2013). Dados da Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration – FDA*) indicam que o uso de antimicrobianos nos animais de produção nos Estados Unidos aumentou 20% entre 2009 e 2013. De acordo com FDA, 69% dos antimicrobianos vendidos em 2013 para o uso veterinário foram destinados a tratamentos terapêuticos ou para obter ganhos na produção, 30% para uso exclusivo terapêutico e, 1% com a finalidade de incrementar os ganhos produtivos. Ainda, indicam que, de todos os antimicrobianos vendidos para o uso em produção animal, 62% correspondem aos antimicrobianos mais importantes e de eleição para o tratamento de infecções em humanos (FDA, 2015).

A escolha do antimicrobiano para ser utilizado em tratamentos de infecções deve ser feita baseada em avaliações *in vitro*, sendo uma importante ferramenta para avaliação de patógenos que possuem um mecanismo de resistência adquirido (JORGENSEN; FERRARO, 2009). O principal teste utilizado é padronizado pelo CLSI (*Clinical and Laboratorial Standards Institute*) (CLSI, 2014a), com metodologia baseada em disco-difusão, conferindo praticidade, simplicidade e baixo custo, com resultado qualitativo.

GADDET *et al.* (2017) relatam uma tendência no aumento da procura de produtos de origem animal a partir de sistemas de produção isentos de antibióticos, existe uma grande necessidade de desenvolvimento de alternativas antibióticas que possam ajudar a melhorar o desempenho e manter a saúde ótima dos animais. Deve-se ter cuidado na escolha de alternativas, de modo que elas se ajustem às necessidades do programa de produção. O seu mecanismo de ação, identificando meios para padronizar os efeitos, melhorando os métodos de administração (por exemplo, microencapsulação) para a distribuição dirigida ao local e

aumentando a sua eficácia *in vivo*. Os mesmos autores observaram que as combinações de produtos podem ser mais benéficas do que usá-los sozinhos para conseguir um efeito semelhante ao dos antibióticos. A utilização de combinações ótimas de várias alternativas juntamente com boas práticas de criação será a chave para maximizar o desempenho e produtividade, enquanto avançamos com o objetivo final de reduzir o uso de antibióticos na indústria animal.

As formas de resistência mais conhecidas são a mudança da permeabilidade da parede celular bacteriana, bombas de efluxo, modificação enzimática do antimicrobiano, degradação do antimicrobiano e aquisição de vias metabólicas alternativas (VAN HOEK et al., 2011). A maioria destes mecanismos desenvolvidos pelas bactérias para sobreviver à ação antimicrobiana é codificado por genes de resistência que podem estar presentes em algumas cepas de *Salmonella* spp. (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013), e incluem desde mutações em genes endógenos até a aquisição horizontal de genes de resistência (FRYE; JACKSON, 2013). Os cassetes gênicos, além de estar associados à integrons, podem estar associados com sequências de inserção, transposons, bacteriófagos e plasmídios, que também exercem uma função importante na transmissão destes cassetes (ÁLVAREZ, 2007; FOLEY; LYNNE, 2008; FRYE; JACKSON, 2013). Ainda não está definida uma denominação padrão para classificar cepas multirresistentes, alguns autores sugerem que a multirresistência seja estabelecida quando as bactérias são resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (SCHWARZ et al., 2010; MAGIORAKOS et al., 2012).

Dados do NARMS - National Antimicrobial Resistance Monitoring System (2015), relatam que amostras de *Salmonella* spp. isoladas de fonte avícola são resistentes à ceftriaxona, antibiótico de eleição para tratar pacientes com infecções graves. O mesmo acontece na cadeia de perus, onde as *Salmonella* spp. isoladas, também, são resistentes a ceftriaxona. A *Salmonella* spp. foi sensível à azitromicina, importante antibiótico para o tratamento de outros agentes patogênicos intestinais, e também é sensível a ciprofloxacina (pertencente ao grupo das fluorquinolonas), é um importante antibiótico para o tratamento direcionado à *Salmonella* spp.

De acordo com Palmeira *et al.* (2016) as salmonelas espécie-específicas, como *Salmonella* Gallinarum e Pullorum, estão presentes em plantéis de aves e tem uma repercussão em saúde pública uma vez que o uso de antibioticoterapia preventiva e terapêutica nos plantéis possa estar promovendo uma resistência, de outros sorovares, a antimicrobianos.

Em saúde pública e segurança alimentar a *Salmonella* spp. é muito importante devido a alta frequência de surtos relacionados a ela, mas também devido a grande resistência a antimicrobianos (TONDO & RITTER, 2012). Assim, é imprescindível a busca de alternativas

para o controle desse patógeno uma vez que a resistência a antimicrobianos podem comprometer o tratamento eficaz para salmoneloses humanas (COOK et al.2009).

Com a grande problemática de resistência a antimicrobianos, alguns estudos demonstram que a utilização de bacteriófagos no controle de patógenos, foram recentemente re-emergindo como potenciais alternativas aos antibióticos (LU TK, COLLINS JJ. 2009). Biocontrole com fagos pode ser aplicado através de alimentos, agricultura e campos da medicina (LU TK, COLLINS JJ. 2009). Alguns fagos podem mostrar virulência apenas in vitro ou apenas em concentrações elevadas (LU TK, COLLINS JJ. 2009). Há fagos podem se replicar apenas uma vez após a infecção inicial, levando a redução da eficácia antimicrobiana (Davies RH. 2005) (LU TK, COLLINS JJ. 2009). Apesar destes inconvenientes os fagos são boas alternativas aos antibióticos convencionais, especialmente para as bactérias patogênicas resistentes (Davies RH. 2005) (LU TK, COLLINS JJ. 2009) (Lu TK, Koeris MS. 2011).

2.3.2 Utilização de desinfetantes

O controle químico das instalações de acordo com KUANA (2009), para a limpeza ou lavagem do ambiente há alguns requerimentos principais, tais como: pessoal, equipamento, pré-lavagem, lavagem e enxágüe. A equipe de limpeza deve sempre utilizar equipamentos protetores impermeáveis como botas de borracha e máscaras de gás, afim de evitar qualquer acidente. Como também ter uma correta instrução de como utilizar os equipamentos para a lavagem.

O mesmo autor ainda cita a importância de uma pré-lavagem da instalação, como forma de facilitar ao máximo o processo de lavagem. Sendo que no processo de lavagem recomenda-se utilizar um detergente alcalino aplicado com máquina de pressão para facilitar a remoção das incrustações e biofilme. Para a remoção de depósitos minerais é aconselhável o uso de detergentes ácidos. Após tudo processo realizar o enxágüe, removendo todo detergente, uma vez que esta pode reduzir a eficácia da desinfecção.

Na escolha do desinfetante a ser usado deve-se priorizar um produto de amplo espectro de ação e satisfazer a atividade contra infecções nas aves, como também respeitar os requerimentos legais e de segurança. Na escolha de um desinfetante é essencial considerar a superfície a ser desinfetada, quantidade de matéria orgânica, temperatura, quantidade de água, tempo de contato, espectro de atividade, poder residual, como também avaliar o custo benefício para o uso de cada produto (KUANA, 2009).

Um dos principais fatores de virulência estudado nesse trabalho é a capacidade desse patógeno de formar biofilmes, a qual pode acontecer em algumas horas ou pode demorar até semanas. Sendo que estudos demonstram que desinfetantes comuns não são efetivos no controle de biofilmes, pois seu poder oxidativo é todo gasto antes de chegar às células dos microrganismos, evidenciando a importância da lavagem anterior a desinfecção do ambiente (BOROSKY, 2013).

Nenhum agente químico pode ser considerado melhor ou ideal, levando-se em conta a variedade de condições sob as quais os produtos podem ser utilizados. Certos tipos de compostos são particularmente eficientes em alguns casos ou mesmo sem utilidade em outras situações, devendo se considerar entre outros a concentração e o tempo de ação dos desinfetantes RUI (2011).

Em um processo de desinfecção é importante uma concentração de desinfetante eficiente. Observando que a concentração e o tempo para fazer efeitos estão ligados, pois o mesmo produto usado em concentrações baixas precisa de mais tempo para ser eficaz e realizar seu objetivo. Sendo especialmente importante em pedilúvio, rodolúvio e arco de desinfecção, cujo tempo de contato com a superfície a ser tratada é mínima. Os desinfetantes não agem instantaneamente, por isso é necessário tempo para fazer efeito. Antes de afetar o microrganismo o desinfetante precisa penetrar a parede celular (RUI, 2011).

2.4 UTILIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS COMO ALTERNATIVA A ANTIMICROBIANOS

Bacteriófagos são vírus específicos que infectam bactérias. Caracterizam-se por serem intracelulares obrigatórios, hospedeiro-específicos, capazes de infectar espécies ou grupos dentro de uma mesma espécie (HANGENS, LOENSSNER, 2007). São provavelmente os mais antigos e onipresentes microrganismos na Terra, datam de 3 bilhões de anos e estima-se que existam em média 1030-1032 fagos para cada célula bacteriana, desempenhando um papel fundamental na preservação do equilíbrio em cada ecossistema onde existem bactérias (SULAKVELIDZE, 2011).

No ano de 1986 ocorreu o primeiro relato da existência de bacteriófagos, quando o microbiologista Ernest Hanking observou a uma atividade antimicrobiana contra *Vibrio cholerae*, nos rios da Índia (SULAKVELIDZE et al., 2001; HAQ et al., 2012). Em 1915 que Frederick Twort, comprovava a hipótese de que existiam vírus capazes de inibir o crescimento

bacteriano e podiam ser cultivados em meios artificiais (SULAKVELIDZE et al., 2001; DUCKWORTH, 1976). Ainda nesse período, durante a primeira guerra mundial, D'Harelle desenvolveu, a partir de amostras de fezes, um filtrado sem a presença de bactérias, e incubou juntamente com a *Shigella* spp. Observando a inibição do crescimento dessa bactéria, e denominou esse fenômeno como placas de lise (SULAKVELIDZE et al., 2001). D'Hearelle conseguiu comprovar uma relação entre a cura da disenteria hemorrágica que ocorria nessa mesma época, com a presença desse vírus denominada de bacteriófagos (D'HÉRELLE, 2007).

Os bacteriófagos foram descobertos anteriormente aos antibióticos, gerado interesse na comunidade científica mundial. Em 1919, D'Harelle utilizaram bacteriófagos terapêuticamente tratando quatro crianças com disenteria bacteriana, para cada paciente foi administrada uma dose de fagos anti-disenteria e em 24 horas os pacientes apresentaram uma melhora (D'HÉRELLE, 2007). A primeira publicação relatando a eficácia de fagos no tratamento de uma doença infecciosa em humanos foi em 1921 publicado por Richard Bruynoghe e Joseph Maisin onde utilizaram bacteriófagos com sucesso para tratar infecções estafilocócica na pele. A sua publicação foi seguida pela centena de outros relatórios de pesquisadores utilizando bacteriófagos para tratar infecções bacterianas em seres humanos e outros animais (SULAKVELIDZE A, 2011).

D'Herelle e colaboradores inauguraram em Paris o *Laboratoire du Bacteriophage*, uma década depois da descoberta, no laboratório eram comercializados cinco coquetéis de bacteriófagos que eram efetivos para o tratamento de inúmeras infecções (SULAKVELIDZE et al., 2001; FRUCIANO & BOURNE, 2007; ABEDON et al., 2011). Como não havia nenhum ensaio clínico que comprovasse a eficácia dessa terapia, resultou em várias controvérsias acerca da utilização dos bacteriófagos como tratamento terapêutico. Com isso resulta em um forte impacto negativo juntamente com o início da era dos antibióticos fez com que o interesse na terapia com fagos começasse a decair no Ocidente durante os anos 1940 e 1950, mas seu uso continuou na União Soviética e no Leste Europeu (SULAKVELIDZE, 2011).

Os fagos são considerados agentes terapêuticos potencialmente atraentes devido às diversas características que possuem como serem extremamente hospedeiro-específicos, eficazes na lise de bactérias patogênicas, não prejudiciais para o homem e animais, e rapidamente modificáveis para combater o aparecimento de novas ameaças bacterianas. Além destas características, os fagos apenas se replicam células bacterianas específicas, não destruindo a microbiota adjacente (SULAKVELIDZE A, ALAVIDZE Z, MORRIS JJG, 2001).

Os bacteriófagos são constituídos por ácido nucléico e proteínas e dividem-se em seis grupos distintos (FERREIRA et al., 2010; GRATH & SINDEREN, 2007). O genoma viral

pode apresentar-se sob a forma de DNA ou RNA, de cadeia simples (ss) ou dupla (ds), na conformação linear, circular ou superenrolada. Os fagos com DNA cadeia dupla podem ser com cauda contráctil (A), cauda não-contráctil (B), cauda curta (C), sem cauda (D3) e pleomórficos com invólucro lipídico (G). Os fagos de DNA cadeia simples podem ser icosaédricos (D1 e D2) ou filamentosos (F1 e F2). Os do grupo E são icosaédricos com RNA cadeia simples (E1) ou dupla (E2) (ACKERMANN, 1998).

O processo de replicação dos bacteriófagos depende do metabolismo das células bacterianas hospedeiras, pois não possuem sistemas geradores de ATP e com isso não conseguem sintetizar suas próprias proteínas e seu próprio ácido nucléico (TORTORA et al., 2012).

O ciclo de infecção e replicação do bacteriófago na célula hospedeira tem início na ligação à célula bacteriana e com a injeção do seu material genético para o interior da célula. As etapas de adsorção e penetração de ácido nucléico viral referem-se à síntese de componentes, replicação do material genético e a produção de novos capsídeos, com isso o fago assume a maquinaria biossintética do hospedeiro, resultando na síntese de proteínas. As últimas etapas consistem na montagem do novo fago e na liberação onde ocorre a lise (SULAKVELIDZE, 2011).

Os fagos podem possuir dois ciclos de replicação diferentes. O ciclo lítico, ou a reprodução da virulência dos bacteriófagos, ocorre dentro do hospedeiro e induz a lise das células, resultando na liberação de uma nova progênie de bacteriófagos, recomeçando, assim, um novo ciclo de infecção. O material genético dos fagos serve de molde para formar os RNA mensageiro, que irão sintetizar as proteínas do capsídeo e obter várias cópias do ácido nucléico dos fagos. Quando há uma síntese de proteínas em quantidade suficiente começa a montagem das partículas virais, o ácido nucléico é envolto pelas proteínas do capsídeo e a bactéria é lisada, liberando novos bacteriófagos (MAYER G, 2017). O ciclo lisogênico ocorre quando o fago integra seu material genético ao genoma da bactéria hospedeira, recebendo o nome de prófago, vírus atenuado ou ainda fago temperado e se mantém inativo. Ao replicar-se, a bactéria replica o prófago para as células filhas, evento chamado de lisogenia. Essa replicação ou qualquer outra alteração, como exposição à radiação ultravioleta, pode estimular o prófago a desprender-se do genoma da bactéria e iniciar um ciclo lítico (MAYER G, 2017).

A lise bacteriana possibilita a liberação de novos bacteriófagos no local de infecção e uma pequena dose inicial é suficiente para atingir a eficácia terapêutica, ao contrário dos antibióticos que necessitam de repetidas doses superiores para que sejam mantidas as concentrações adequadas (VANDAMME, 2013; LOC-CARRILLO & ABEDON, 2011;

ABEDON & ABEDON, 2010). Assim é possível minimizar os custos da terapia bem como reduzir os efeitos adversos. Além de também terem mostrado ser eficazes no controle de biofilmes, situações em que os antibióticos são ineficazes devido à impossibilidade de chegarem ao local (ABEDON et al., 2011).

Existem diversas aplicações já relatadas na literatura de aplicação de terapia fágica e inclusive no controle biológico é caracterizada por ser um mecanismo biológico, conferindo melhor qualidade ao alimento (produto final) por não deixar resíduos na carne, ovos e também no ambiente, além de ser economicamente viável, quando comparada ao custo terapêutico dos quimioterápicos. Estes fatores associados à sua biossegurança possibilitam e asseguram este rótulo de promissor da fagoterapia para o futuro da terapêutica no controle das salmoneloses aviárias (MARIETTO-GONÇALVES G. A.; ANDREATTI F. R. L., 2012).

Ainda, podem ser utilizados para o controle de contaminantes no ambiente como GONG C., JIANG X. (2017) sugerem seu uso nas superfícies em frigoríficos pode ter mérito em reduzir a probabilidade de produtos acabados sejam re-contaminado com *Salmonella*. Porém, a otimização dos coquetéis de bacteriófagos pode ser mais eficaz para remoção de biofilmes podendo ser empregado em desinfecção na agroindústria. Em outro estudo, GRANT et al. (2017) observaram que a redução significativa de *Salmonella* spp. em carne de frango, foi dependente da água utilizada para diluir o bacteriófago, a susceptibilidade da *Salmonella* spp. ao bacteriófago e o tempo de tratamento.

Poucos estudos demonstraram os efeitos da suplementação de dietas com bacteriófagos sobre o desempenho do crescimento. Zhao et al. (2012) avaliando os efeitos em galinhas poedeiras, relataram que a incorporação de bacteriófagos em sua dieta melhorou significativamente a produção de ovos. Kim et al. (2013c) e Wang et al. (2013b) demonstraram o aumento do ganho de peso corporal e redução da conversão alimentar em frangos de corte alimentados com dietas suplementadas de bacteriófagos. No entanto, são necessárias mais pesquisas para estabelecer os efeitos de desempenho dos bacteriófagos e tornar seu uso prático em sistemas de produção avícola.

Neste contexto, é muito importante conhecer a influência dos fatores de virulência na remoção química e biológica de biofilmes formados por *Salmonella Gallinarum* em casca de ovo, pois esse importante patógeno tem reemergido nos últimos anos, causando graves prejuízos para a avicultura industrial brasileira.

3 CAPÍTULO 1

***SALMONELLA GALLINARUM* MULTIRRESISTENTES E FORMADORAS DE BIOFILMES EM CASCAS DE OVOS SÃO SENSÍVEIS A BACTERIÓFAGOS**

¹Natalie Nadin Rizzo, ²Karen Borges Furian, ²Bruna Webber, ²Emanuele Serro Pottker,
¹Rafael Levandowski, ¹Luciane Daroit, ¹Luciana Ruschel dos Santos, ¹Laura Beatriz
Rodrigues.

(Artigo será submetido para a *Avian Pathology*)

¹Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil. ²Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. CORRESPONDENCE: NN. Rizzo [natalienadinrizzo@gmail.com - Tel.: +55 (54) 996162889]. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) – UPF. BR 285, Bairro São José. CEP 99052-900 Passo Fundo, RS, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização fenotípica e genotípica de diferentes isolados de *S. Gallinarum*, oriundos da produção agroindustrial, através da avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos e a desinfetante, potencial de lise por bacteriófagos, pesquisa de genes de virulência, formação de biofilme em poliestireno e em cascas de ovos. Pode-se observar que as *S. Gallinarum* são multirresistentes aos antimicrobianos, sensíveis aos bacteriófagos testados, e potencialmente virulentas, de acordo com perfis genéticos obtidos. A maioria dos isolados formaram biofilme no poliestireno tanto a 22°C como a 42°C, sem diferença estatística ($p = 0.0965$) entre as temperaturas testadas. Houve maior formação de biofilme nas cascas de ovos na temperatura de 22°C ($4,656 \log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$), com diferença estatística quando comparado aos biofilmes formados a 36°C e 42°C. A ação do desinfetante comercial, na concentração 1,5% e tempo 5 minutos, promoveu remoção do biofilme, estatisticamente significativa, apenas na formação a 22°C, propiciando uma redução de $3,125 \log_{10}$. A presença de genes de virulência, a multirresistência e a capacidade de formar biofilmes em diferentes superfícies e temperaturas pelas *S. Gallinarum* estudadas, isoladas de aves comerciais, nos faz supor que estes podem ser fatores relevantes para que a SG se mantenha presente nos plantéis avícolas e esteja envolvida em surtos sanitários intermitentes. Apesar do cenário preocupante, a possibilidade de controle biológico da SG por bacteriófagos nos traz uma alternativa promissora para a contenção deste microrganismo.

Palavras-chave: *Salmonella Gallinarum*, genes de virulência, antimicrobianos, bacteriófagos, desinfetantes.

INTRODUÇÃO

A febre tifóide das galinhas (FT), também conhecido como tifo aviário, tem como agente causador a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG). É caracterizada por uma doença sistêmica grave observada principalmente em aves adultas (Shivaprasad & Barrow, 2013). O tifo aviário acarreta perdas econômicas significativas por diminuir a produção de ovos e causar alta mortalidade de aves, podendo atingir 80% dos lotes afetados (Shivaprasad, 2000; Barrow & Freitas Neto, 2011). Além disso, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e a Organização Internacional de Epizootias (OIE) preconizam que os plantéis avícolas sejam monitorados periodicamente afim da identificação e eliminação dos lotes positivos para SG.

Berchieri Junior *et al.* (2001) e Oliveira *et al.* (2005) demonstraram que a SG causa infecção e manifestações clínicas, com alta concentração bacteriana nos tecidos. Outros estudos, como os de Beach & Davis (1927), Beaudette (1930) e Hall *et al.* (1949), indicam a possibilidade da SG ser transmitida vertical e horizontalmente. A contaminação via transovariana torna os ovos inviáveis para a produção de pintos de 1 dia, os quais podem se tornar portadores assintomáticos e transmitir o patógeno logo após o nascimento (Berchieri Junior *et al.*, 2007). A transmissão do microrganismo por via horizontal pode se caracterizar por contaminar os ovos através da casca logo após a postura, nos ninhos ou camas de aviários. O incubatório também é um setor importante para a transmissão da SG, por possuir condições de umidade e temperatura favoráveis à manutenção do patógeno. Propicia a contaminação a partir do momento da bicagem dos ovos, expondo os pintainhos recém-eclodidos à SG quando estão mais susceptíveis à colonização do trato intestinal (Loddi, 2001).

Nos últimos anos tem ocorridos surtos esporádicos de SG no Brasil, de acordo com os dados da Organização Internacional de Epizootias. Em 2012 foram notificados 14 focos de FT e, a partir destes, foram identificados outros casos nos plantéis avícolas do país. O último surto notificado na OIE foi na Costa Rica, em 2016 (OIE, 2017). Conforme relatado por Celis-Estupiñan *et al.* (2017), as causas do ressurgimento e disseminação de FT em plantéis avícolas brasileiros ainda não está bem esclarecida. Podem ser levadas em consideração algumas hipóteses, como o fato das linhagens comerciais terem sido melhoradas geneticamente para ser resistentes ao FT e não desenvolverem doença clínica, mas possibilitando que as aves fiquem persistentemente infectadas, favorecendo a transmissão e manutenção de SG. Além disso, a antibioticoterapia em surtos de FT pode ter sido indevidamente adotada nos plantéis de reprodução, facilitando a transmissão vertical e propiciando que ovos contaminados com SG atinjam os incubatórios. Também, uma cepa SG distinta, apresentando novas características de

patogenicidade, pode ter surgido e se disseminado nos aviários do país. Além destes fatores, podemos considerar a ocorrência de surtos não notificados e a presença de SG em aves de criações não comerciais.

Dentre os fatores que promovem a prevenção de SG um dos mais importantes é a adoção de biossegurança. Em alguns países ainda pode ser utilizada a terapia antimicrobiana para o tratamento dessa enfermidade (Nonga *et al.*, 2010; Dutta *et al.*, 2015). Os agentes quimioterápicos são muito eficazes para reduzir perdas da produção, sintomatologia clínica e mortalidade das aves e, inicialmente, podem demonstrar resultados positivos. No entanto, não eliminam totalmente a SG, possibilitando a infecção do ambiente e de novas aves (Celis-Estupiñan *et al.*, 2017; Dutta *et al.*, 2015; Moore, 1948; Gordon & Tucker, 1957). Devido à capacidade de mutação genética entre as bactérias, as SG podem se tornar resistentes ao controle químico com antibióticos e desinfetantes (Kang *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2003; Madigam *et al.*, 2010; Penha Filho *et al.*, 2016), acarretando prejuízos sanitários e econômicos. A utilização de antimicrobianos na produção animal se tornou comum devido à necessidade do aumento da quantidade de alimento a ser produzido (Koluman & Dikici, 2013). Dados da Food and Drug Administration (FDA-USDA) indicam que o uso de antimicrobianos nos animais de produção nos Estados Unidos aumentou 20% entre 2009 e 2013. De acordo com a FDA (2015), 69% dos antimicrobianos vendidos em 2013 para o uso veterinário foram destinados a tratamentos terapêuticos ou para obter ganhos na produção, 30% para uso exclusivo terapêutico e, 1% com a finalidade de incrementar os ganhos produtivos. Indicam que, de todos os antimicrobianos vendidos para o uso em produção animal, 62% correspondem aos antimicrobianos mais importantes e de eleição para o tratamento de infecções em humanos (FDA, 2015).

Como forma alternativa à problemática de resistência, a utilização de bacteriófagos para controle biológico vem reemergindo com potencial para diferentes aplicações. Bacteriófagos, ou fagos, são vírus que infectam bactérias e podem ter um ciclo de vida denominado lítico, onde a reprodução da virulência ocorre dentro do microrganismo e lisa as células, ou um ciclo lisogênico (Azeredo *et al.*, 2011). Os fagos podem ser utilizados como biocontrole em alimentos e ambiente, ou como fagoterapia em animais e seres humanos (Brüssow, 2017; Malik *et al.*, 2017).

Devido à relevância do tema, a presente pesquisa avaliou o perfil genotípico e fenotípico de isolados de *Salmonella Gallinarum*, para detecção de genes de virulência, resistência a antimicrobianos e desinfetante, formação de biofilmes em poliestireno e ação lítica de

bacteriófagos. Destas, uma SG foi selecionada para avaliar a formação de biofilmes em cascas de ovos e a capacidade de remoção pela desinfecção química.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *S. Gallinarum*. Foram utilizados 46 espécimes de *S. Gallinarum* (SG) provenientes de aves comerciais criadas no Brasil, previamente isolados e confirmados através de microbiologia convencional (Brasil, 1995) e ensaios de microarranjo (Check&Trace[®]). Estavam estocadas em BHI com 20% de glicerol a -20°C, e foram reativadas e confirmada sua pureza por confirmação bioquímica e sorológica.

Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos. O ensaio de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado utilizando a metodologia de disco-difusão em gel de ágar descrita por Kirby-Bauer (1966), descrito pelo CLSI (2013). Foram utilizadas nove drogas antimicrobianas: Enrofloxacina (5 mcg), Azitromicina (15 mcg), Cloranfenicol (30 mcg), Colistina (10 mcg), Ampicilina (10 mcg), Cefazolina (30 mcg), Ciprofloxacina (5 mcg), Tetraciclina (30 mcg) e Ácido Nalidíxico (30 mcg). Os isolados foram classificados em sensíveis, intermediários ou resistentes, conforme os padrões estabelecidos pelas normas VET01-52 (CLSI, 2014b) e M100-S23 (CLSI, 2013).

Testes para avaliação da lise por bacteriófagos. Os sete bacteriófagos empregados contra as SG foram isolados e caracterizados previamente por nosso grupo de pesquisa, utilizando sorovares de *Salmonella enterica* como bactérias hospedeiras (Lima *et al.*, 2015; Pottker, 2016). Foram caracterizados de acordo com Sillankorva *et al.* (2008) e Kropinski *et al.* (2011), seguindo protocolos que envolvem genômica, proteômica e sequenciamento. O bacteriófago *Salmonella* Phage UPF_BP1 foi isolado de efluente de abate, tendo como bactéria hospedeira a *S. Brandenburg*, registrado no GenBank sob o número KX776161, pertence à ordem *Caudovirales* e à família *Podoviridae* Tipo 3. O *Salmonella* Phage UPF_BP2 teve a mesma fonte de isolamento, mas foi utilizada a *S. Bredeney* como bactéria hospedeira, está registrado no GenBank com o número KX826077, pertence à ordem *Caudovirales* e à família *Myoviridae*. Ambos possuem genoma circular e DNA de fita dupla (Pottker, 2016). Os bacteriófagos denominados 7:2, 10:2, 8:2 foram isolados de efluentes de abate e utilizando, respectivamente,

cepas de *S. Infantis*, *S. Panama* e *S. Rissen* como bactéria hospedeira. Os bacteriófagos 8:1 e 11:1 foram isolados de fezes de aves e tiveram como hospedeiras *S. Rissen* e *S. Enteritidis*, nesta ordem. O sequenciamento está em fase de processamento (Pottker, 2016).

As 46 amostras de *Salmonella Gallinarum* foram testadas para a presença de prófago no seu DNA, para não resultar em falso positivo para presença de bacteriófago. Os bacteriófagos UPF_BP1; UPF_BP2; 7:2; 8:1; 8:2; 10:2 e 11:1 foram amplificados utilizando a *Salmonella* hospedeira, e avaliada a qualidade lítica para verificação da viabilidade. Para avaliar a ação lítica, os isolados de SG foram incubados em BHI a $37\pm 1^\circ\text{C}$ até a cultura atingir a fase exponencial (*over night*). Inoculou-se 100 μL da suspensão bacteriana em placa de Tryptic soy agar (TSA), e foi vertido e homogeneizado sobre a superfície meio semi-sólido (Tryptic soy broth – TSB, com 0,6% de agar-agar) para formar sobrecamada. Após solidificação foi inoculado 10 μL de cada fago em triplicata. Incubou-se por 4 a 6 horas e, realizou-se a leitura buscando a presença de halos de lise que caracterizam as unidades formadoras de placas (UFP). Como controle negativo foi utilizado 10 μL de TSB estéril.

Determinação dos isolados formadores de biofilmes. O método foi baseado nas técnicas descritas por Rodrigues *et al.* (2009) e Stepanovic *et al.* (2000; 2007), com modificações. As cepas de SG foram cultivadas caldo TSB sem glicose, sob 24 horas a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Foi utilizado como controle positivo uma cepa de *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) sabidamente formadora de biofilmes e como controle negativo caldo TSB sem glicose estéril. Posteriormente, foi realizada a diluição da suspensão bacteriana, de modo que corresponda a escala 1 de MacFarland. Foram inoculadas 200 μL de cada suspensão, em triplicata, em placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços, estéreis e de fundo plano (KASVI[®]), incubadas a $22\pm 1^\circ\text{C}$ e $42\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas em condição atmosférica ambiente (aerobiose). Após período de incubação, a suspensão bacteriana de todos os poços foi aspirada, e cada poço lavado três vezes com 250 μL de solução de cloreto de sódio estéril a 0,9% (Synth[®]). O biofilme foi fixado com 200 μL de metanol (Neon[®]) por 15 minutos, as placas secas à temperatura ambiente, coradas com 200 μL de solução de cristal violeta de Hucker (Vetec[®]) a 2% por 5 minutos, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Após, a absorbância foi lida em leitor de placas de ELISA (Rosys Anthos[®]2010) a 550 nm. Foram realizadas duas repetições deste experimento. Para a interpretação dos resultados, foram avaliadas as densidades ópticas (DOa) de cada uma das cepas, obtidas através da média aritmética da absorbância dos poços, e o valor comparado com a absorbância média dos controles negativos (DOcn), utilizando a seguinte classificação para determinar a formação de biofilme: não formação de biofilme (DOa \leq

DOcn), fraca formação de biofilme ($DOcn < DOa \leq 2 \cdot DOcn$), moderada formação de biofilme ($2 \cdot DOcn < DOa \leq 4 \cdot DOcn$) e forte formação de biofilme ($4 \cdot DOcn < DOa$).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios, foram selecionados 15 isolados, classificados fenotipicamente como multirresistentes a antimicrobianos, com capacidade de formar biofilme, e sensíveis à ação lítica dos bacteriófagos, para determinação da sensibilidade a desinfetantes em células planctônicas e detecção dos genes de virulência

Teste de eficácia de desinfetantes em células planctônicas. Foi avaliada a resistência individual de 15 *S. Gallinarum*, em fase planctônica, frente a um desinfetante comercial (composição: sulfato hidrogenado de potássio, dodecil benzeno sulfonato de sódio, monopersulfato de potássio, sulfato de potássio, ácido sulfâmico), seguindo metodologia de diluição com células planctônicas em suspensão, da Portaria nº 101 (BRASIL, 1993). O desinfetante foi testado nas concentrações 1%, 1,5% e 2%. Como matéria orgânica interferente foi utilizada uma solução de carne de frango estéril com concentração final de 0,43 mg/mL de matéria orgânica a ser adicionada nos tubos com solução desinfetante. Os tempos de contato da bactéria com o desinfetante avaliados foram 2, 5 e 10 minutos. Para avaliar a sobrevivência bacteriana foi utilizado caldo BHI com solução neutralizante (Tween 80, Neon[®]; lecitina de soja e tiosulfato de sódio, Dinâmica[®]), incubados por 96 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram considerados positivos os tubos com turvação, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo. As cepas testadas foram classificadas como resistentes ou sensíveis à ação do desinfetante.

Detecção de genes de virulência. A caracterização molecular foi realizada através da pesquisa de 27 genes associados à virulência (*invA*, *hilA*, *lpfA*, *lpfC*, *sefA*, *agfA*, *spvC*, *spvB*, *pefA*, *sopE*, *avrA*, *sivH*, *orgA*, *prgH*, *psaN*, *tolC*, *sipB*, *sitC*, *pagC*, *msgA*, *spiA*, *iroN*, *sopB*, *cdtB*, *sifA*, *sseL*, *stn*) utilizando a técnica de PCR. A extração do DNA foi realizada através do tratamento térmico, adaptado de Borsoi *et al.* (2009). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Swift MaxPro (Esco; Singapura), onde as amostras foram submetidas a ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Após a amplificação, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. A análise dos produtos amplificados foi feita através da visualização das bandas correspondentes em transluminador de luz ultravioleta MacroVue (Pharmacia LKB Biotechnologies; Uppsala, Suécia). A sequência dos *primers* que foram utilizados para a detecção dos genes de virulência estão descritos na Tabela 1. A concentração dos reagentes do *mix* e as condições de amplificação no termociclador foram

adaptadas a partir de trabalhos já realizados (Skyberg; Logue & Nolan, 2006; Peterson *et al.*, 2010; Borges *et al.*, 2013).

Com base no perfil fenotípico e genotípico detectado foi selecionada uma amostra (SG 18) para avaliar a formação de biofilmes em cascas de ovos e a capacidade de remoção pela desinfecção química.

Formação de biofilme em casca de ovos e remoção química. A metodologia utilizada foi a de Spricigo *et al.* (2013), com algumas modificações. O ensaio foi realizado utilizando ovos cedidos por incubatório de matrizes comerciais, previamente higienizados com álcool 70% e deixados secar em temperatura ambiente em capela de fluxo laminar. Foram utilizados 10 ovos para cada temperatura de incubação ($22\pm 1^\circ\text{C}$, $36\pm 1^\circ\text{C}$ e $42\pm 1^\circ\text{C}$), ou seja, cinco repetições em cada tratamento, sendo 5 ovos para avaliação da formação de biofilmes antes da desinfecção, e 5 para verificar a remoção do biofilme pelo uso do desinfetante, além dos controles negativos. Os ovos foram imergidos individualmente em uma suspensão bacteriana de 10^7 UFC/mL de SG18 por 30 minutos e deixados secar em temperatura ambiente em capela de fluxo laminar por 1 hora. Após, foram incubados nas temperaturas de $36\pm 1^\circ\text{C}$, $22\pm 1^\circ\text{C}$ e $42\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, em saquetas homogeneizadoras de amostras estéreis. Após, 5 ovos de cada tratamento sofreram remoção das células planctônicas por enxágue com água peptonada 0,1% (HiMedia[®]) estéril, foram acondicionados em novas saquetas estéreis homogeneizadoras de amostras com 30 mL de água peptonada 0,1% (HiMedia[®]) previamente esterilizada, sonicados por 10 minutos em banho de ultrassom (frequência de 40 kHz e potência de 81 W) para desadesão de células sésseis (Webber, 2015; Scherba *et al.*, 1991). Diluições apropriadas foram transferidas para placas de Petri contendo agar PCA (PCA, HiMedia[®]) para quantificação utilizando o método de contagem em gota (drop plate), inoculando cinco gotas de 10 μL de cada diluição, com leitura após 24 horas de incubação a 37°C .

O desinfetante comercial (sulfato hidrogenado de potássio, dodecil benzeno sulfonato de sódio, monopersulfato de potássio, sulfato de potássio, ácido sulfâmico), na concentração de 1,5%, foi dispensado cerca de 10 mL em 5 ovos de cada temperatura utilizando um borrifador, de forma a ser completamente banhado, e agiu pelo tempo de 5 minutos. Para remoção das células planctônicas, e cessar a atividade desinfetante, foi utilizada água peptonada 0,1% suplementada com agentes neutralizantes (Joseph *et al.* 2001; ISO 18593:2012). Após esta etapa, o procedimento para quantificação foi semelhante ao descrito anteriormente, para verificar a formação de biofilmes nos ovos antes da desinfecção.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados com auxílio dos programas Microsoft Excel, para determinação de frequências absolutas e relativas, e Assistat versão 7.7 beta (SILVA 2014) para ANOVA, teste Tukey e Qui-quadrado, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil de resistência aos antimicrobianos

Das amostras de SG testadas, 45/46 (97,8%) foram resistentes à azitromicina (macrolídeos) e ácido nalidíxico (quinolonas). Destas, 11/46 (23,9%) sendo caracterizadas com resistência múltipla (multirresistentes), por apresentarem resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (Lertworapreecha *et al.*, 2012; Schwarz *et al.*, 2010; Magiorakos *et al.*, 2012; NARMS, 2012). Outra interpretação proposta na literatura é a caracterização da multirresistência através da análise do IRMA, conforme a Tabela 2. Segundo Krumperman (1983), o $IRMA \geq 0,2$ é um dos indicadores relacionados ao fenômeno da múltipla resistência, indicando um risco para saúde animal e humana, pois o tratamento de enfermidades fica dificultado. Nestas amostras de SG, 45/46 (97,8%) apresentaram $IRMA \geq 0,2$.

Destacam-se as SG com IRMA 0,5, que tiveram resistência a cinco dos antimicrobianos testados, pois muitos destes princípios ativos são comumente indicados para os tratamentos convencionais da SG, denotando a importância da busca de alternativas para o controle deste microrganismo. Entretanto, observou-se que todas as SG testadas apresentaram sensibilidade à colistina (polimixina B) e ao cloranfenicol, resultado relevante para a saúde da população, já que a estes são antibióticos de primeira escolha para o tratamento de diversas infecções (Jayol *et al.*, 2017; Chiou *et al.*, 2017).

Nos periódicos buscados não foram encontrados relatos de um perfil de multirresistência em SG, conforme observado no presente estudo. Porém, a resistência às quinolonas já foi relatada em cepas de *S. Typhimurium* (Yaun & Guo, 2017). Em outro estudo identificaram um perfil de resistência a eritromicina e a estreptomicina, ao compararem cepas de SG 9R (vacinal) e de isolados de campo (Lee *et al.*, 2013). Estes dados sugerem a busca de novas estratégias para a determinação e compreensão de novos padrões de resistências. Deste modo, a utilização

de bacteriófagos pode ser uma excelente alternativa à antibioticoterapia, e para complementar e/ou substituir terapias convencionais.

Potencial de lise dos bacteriófagos

Quanto à ação lítica de bacteriófagos contra a SG, apenas 7/46 (15,22%) apresentaram resistência a todos os fagos testados para o biocontrole (Tabela 3). Observou-se que a maioria das SG sofreu lise por pelo menos um fago, e que 58,70% foram lisadas pelos sete fagos avaliados, demonstrando a eficácia da infecção fágica. Dentre os fagos testados, três deles (UPF_BP1; 10:2; 11:1) apresentaram melhor potencial de lise das SG, com ação em 38 isolados. O menor desempenho foi do bacteriófago 7:2, o qual demonstrou um potencial de lise sobre 31/46 (67,39%) das cepas testadas, que ainda significa um bom desempenho quando nos referimos ao biocontrole com fagos como alternativa a resistência a antimicrobianos.

O bacteriófago UPF_BP1, em trabalho anterior (Pottker, 2016), demonstrou um bom desempenho contra outros sorovares de *Salmonella enterica*, como *S. Brandenburg*, *S. Tennessee*, *S. Agona*, *S. Schwarzengrund*, *S. Rissen*, *S. Lexington* e *S. Typhimurium*. O bacteriófago UPF_BP2 demonstrou um bom desempenho nos sorovares de *S. Brandenburg*, *S. Anatum*, *S. Tennessee*, *S. Agona*, *S. Bredeney*, *S. Schwarzengrund*, *S. Infantis*, *S. Rissen*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

Em estudos filogenéticos, os bacteriófagos UPF_BP1 e UPF_BP2 são muito semelhantes ao fago P22 (Pottker, 2016). Zino *et al.* (2014) utilizaram o bacteriófago P22 como controle biológico contra *S. Typhimurium* em ovos líquidos, bebidas energéticas, leite desnatado, suco de maçã e peito de frango, e houve diminuição de 2 logs quando comparados aos controles não tratados, indicando que os fagos podem ser úteis no controle de agentes patogênicos de origem alimentar. Sharma *et al.* (2015) realizaram um estudo com fagoterapia, frente aos sorovares *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium*, que demonstrou uma redução de 4 logs quando comparado aos controles não tratados. Os bacteriófagos utilizados nesse estudo podem ser utilizados como uma alternativa eficaz para o controle do tifo aviário, conforme já proposto por Hong *et al.* (2013) que demonstraram esta eficácia em estudo com utilização de bacteriófagos para o controle de SG *in vivo*.

Formação de biofilmes em placas de microtitulação de poliestireno

Os resultados de formação de biofilme podem ser visualizados no Gráfico 1. Não houve diferença estatística ($p = 0.0965$) entre a formação de biofilmes nas duas temperaturas testadas, com a maioria dos isolados formando biofilmes. Entretanto, mais amostras de SG (37/46 -

80,4%) formaram biofilmes a $42\pm 1^\circ\text{C}$, com 4 sendo considerados fortemente formadores, enquanto a $22\pm 1^\circ\text{C}$ 28/46 das SG formaram biofilmes em poliestireno, e 2/46 (4,3%) foram fortemente aderentes. Duas amostras de SG (4,34%) não formam biofilme em nenhuma das temperaturas testadas.

Os ensaios de formação de biofilmes, perfil de resistência a antimicrobianos e suscetibilidade aos bacteriófagos foram utilizados para selecionar 15 SG para determinação dos genes de virulência e da sensibilidade ao desinfetante em células planctônicas.

Eficácia de desinfetantes em células planctônicas

O desinfetante comercial foi eficaz, inibindo o desenvolvimento das células planctônicas das SG, somente na concentração de 1,5%, no tempo de 5 minutos. Nos demais tempos e concentrações foram observadas variações nos resultados obtidos, explicado possivelmente devido à ação da matéria orgânica, a qual pode englobar as bactérias e dificultar a homogeneização com a solução desinfetante (Jaenisch et al., 2010).

O resultado obtido neste teste foi utilizado para determinação do tempo e concentração utilizados para remoção de células sésseis de SG em casca de ovos.

Genes de virulência

O perfil dos genes de virulência detectado nas 15 SG selecionadas está descrito na Tabela 4. Os genes pesquisados nas SG também foram avaliados por Skyberg; Logue & Nolan (2006); Peterson *et al.* (2010); Akiyama *et al.* (2011); Zou *et al.* (2011); Derakhshandeh; Firouzi; Khoshbakht (2013); Elemfareji; Thong (2013); Galdino *et al.* (2013); Mezal, Stefanova; Khan (2013); Ben-Abdallah *et al.* (2014); Mezal *et al.* (2014); Krawiec *et al.* (2015), em diferentes sorovares de *Salmonella* spp., isolados de várias fontes, demonstrando que estes genes de virulência estão amplamente distribuídos.

Os genes *agfA*, *sefA*, *lpfA*, *lpfC*, *pefA* são codificadores da fimbria agregativa e está associado à adesão bacteriana a diversas superfícies inertes, incluindo aquelas utilizadas na cadeia de produção animal e alimentos, sendo considerado um gene importante para a produção de biofilmes (Austin *et al.*, 1998). Todas as SG testadas apresentaram um ou mais desses genes. Porém nenhuma delas expressou o gene *pefA*, o qual pode estar ausente em algumas estirpes de salmonela por ser de origem plasmidial (Skyberg; Logue; Nolan, 2006).

São codificadores do Sistema de Secreção Tipo III (TTSS) os genes *sipB*, *invA*, *orgA*, *prgH* e *spaN*, e estão envolvidos com a estrutura bacteriana (Skyberg; Logue; Nolan, 2006). Todas as amostras analisadas apresentaram os genes *orgA* e *prgH*, porém 2/15 (13,33%) não

apresentaram o gene *spaN*, e outras 2/15 (13,33%) não apresentaram o gene *sipB*. O gene *invA*, associado à estrutura dos TTSS, está presente em todas as *Salmonella* spp. e é considerado o principal gene-alvo para a detecção deste gênero através da técnica de PCR (Oliveira *et al.*, 2003; Campioni; Bergamini; Falcão, 2012; Craciunas *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2013).

Os genes codificadores de proteínas efetoras e proteínas reguladoras secretadas pelo TTSS, como *sifA*, *avrA*, *sopE*, *sopB*, *sivH* e *hilA* foram detectados em quase todas as SG. O *hilA* é encontrado em todas as *Salmonella* spp., também sendo considerado um gene-alvo para a detecção do gênero (Campioni; Bergamini; Falcão, 2012; Craciunas *et al.*, 2012).

Após a invasão a *Salmonella* necessita, além de se manter dentro da célula do hospedeiro, também de se replicar intracelularmente (Peterson *et al.*, 2010). Todas as SG testadas possuem os genes *pagC*, *sipA*, *msgA*, *sseL*, *tolC*, que se caracterizam por conferir sobrevivência no interior de células, inclusive em macrófagos (BORGES *et al.*, 2013).

Os genes de origem plasmidial *spvB* e *spvC* também foram pesquisados e, apesar dos mesmos estarem associados à invasão e as interações iniciais da *Salmonella* spp. com a mucosa intestinal, proporcionam a manutenção e a sobrevivência bacteriana no interior das células (Rotger; Casadesús, 1999; Castilla *et al.*, 2006). O gene *spvB* foi detectado em 12/15 das amostras, enquanto 3/15 possuem o gene *spvC*. Duas amostras não apresentam nenhum desses genes.

Para sobreviver dentro da célula hospedeira a bactéria precisa obter alguns mecanismos para a aquisição de ferro (Zhou; Hardt; Galán, 1999; Zaraté-Bonilla *et al.*, 2014). Para isso, pesquisamos a presença dos genes *sitC* e *iroN*, que codifica uma proteína associada a captação de ferro (Zhou; Hardt; Galán, 1999; Skyberg; Logue; Nolan, 2006). Das SG testadas 2/15 apresentaram o gene *iroN* e 10/15 o gene *sitC*.

Após a invasão, sobrevivência e multiplicação intracelular pela *Salmonella* spp., ela pode utilizar o gene *cdtB*, que codifica toxinas associadas à indução da apoptose das células infectadas (Mezal; Bae; Khan, 2014). Dentre as SG testadas nenhuma possui esse gene. Segundo Skyberg; Logue; Nolan (2006), é provável que o *cdtB* esteja restrito a alguns sorovares de *Salmonella* spp. Já o gene codificador de enterotoxina, o *stn*, foi encontrado em todas as SG avaliadas, e pode estar relacionado com a ocorrência de diarreia em hospedeiros infectados (Chaudhary *et al.*, 2015).

Na busca por estudos sobre genes de virulência de SG, até o momento, não encontramos nenhuma publicação específica para a bactéria em questão. Desta forma, o presente estudo denota-se muito importante, pois possibilita definir um perfil genotípico de amostras isoladas

de campo, circulantes nos plantéis de aves e, com isso, auxiliar no entendimento do comportamento do patógeno.

Formação de biofilmes por *Salmonella Gallinarum* em cascas de ovos e remoção por desinfecção química

Avaliando o perfil fenotípico e genotípico das *S. Gallinarum* (Tabela 5) selecionou-se o isolado denominado SG 18 para os ensaios de formação de biofilme em cascas de ovos. Esta escolha deveu-se ao fato da SG 18 possuir 25 genes de virulência, ser multirresistente a antimicrobianos e formadora de biofilmes a 22 °C e 42°C. Além disso, a SG 18 foi suscetível a maioria dos bacteriófagos testados, apresentando resistência somente ao fago 7:2.

Houve maior formação de biofilme nas cascas de ovos pela SG 18 na temperatura de 22°C ($4,656 \log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$), com diferença estatística quando comparado aos biofilmes formados a 36°C e 42°C. As salas de ovos de incubatórios e granjas de reprodutores permanecem nesta faixa de temperatura, cerca de 22°C, para evitar o início do desenvolvimento embrionário. A temperatura abaixo de 26°C torna a divisão celular mais lenta, e abaixo de 21°C cessa completamente, retardando o desenvolvimento embrionário (Gomes, 2013). A ação do desinfetante comercial, na concentração 1,5% e tempo 5 minutos, promoveu remoção do biofilme, estatisticamente significativa, apenas na formação a 22°C, propiciando uma redução de $3,125 \log_{10}$ (Tabela 6).

A maior formação de biofilme na temperatura de 22°C pode estar relacionada a capacidade de adaptação da SG a esta temperatura, uma vez que, estando em condições inóspitas, a capacidade de formação de biofilme pode ser a melhor alternativa para garantir sua sobrevivência no ambiente (Fuster-Valls, 2008; Webber, 2015). À temperatura de 42°C não haveria necessidade da SG deixar a forma planctônica para a sésil, por ser esta a temperatura corpórea da ave, podendo este ser um dos fatores que levaram à menor formação de biofilmes nesta condição.

Uma vez que a SG pode ser transmitida tanto por via vertical como horizontal, o conhecimento sobre a capacidade de formação de biofilme em cascas de ovos é muito relevante, pois a contaminação microbiana pode ser carregada para dentro dos incubatórios, e ocorrer a transmissão para o pintainho no momento da eclosão (bicagem), ou se as aves entrarem em contato com as cascas dentro do nascedouro. Ressaltamos que, até o momento, não foram encontrados outros estudos publicados avaliando a formação de biofilme por SG em cascas de ovos.

As razões pelas quais obtivemos uma maior contagem de UFCs, após a utilização do desinfetante, podem estar vinculadas a muitos fatores, mas principalmente a forma de agitação (banho de ultra-som), a composição da substância polimérica extracelular (EPS), à ação do desinfetante rompendo as moléculas do EPS. E, ainda pode ser espiculado o desprendendo as células bacterianas e oportunizando assim o início da sua multiplicação.

Os isolados de *Salmonella* Gallinarum estudados, as quais foram estavam circulantes nos plantéis avícolas, possuem habilidade de formação de biofilme em diferentes superfícies, incluindo cascas de ovos, fato relevante por possibilitar a disseminação da bactéria aderida a caixas, caminhões e outros materiais. O perfil genotípico, traçado no presente estudo, reforça a importância dos resultados obtidos, e contribuiu para que possamos conhecer o potencial de virulência da SG. As SG são multirresistentes às drogas antimicrobianas, nos reservando um futuro cenário preocupante, uma vez que temos poucas alternativas para o controle desse patógeno e, também, pela possibilidade de recombinação gênica com outras bactérias. Entretanto, obteve-se um resultado bastante relevante, pois as SG sofreram a ação lítica por bacteriófagos, nos direcionando a um próspero caminho para o controle sanitário, ao termos esta alternativa biológica para o controle químico deste microrganismo.

CONCLUSÕES

A presença de genes de virulência, a multirresistência e a capacidade de formar biofilmes em diferentes superfícies e temperaturas pelas *S. Gallinarum* estudadas, isoladas de aves comerciais, nos faz supor que estes podem ser fatores relevantes para que a SG se mantenha presente nos plantéis avícolas e esteja envolvida em surtos sanitários intermitentes. A possibilidade de controle biológico da SG por bacteriófagos traz uma alternativa promissora para a contenção deste microrganismo.

REFERÊNCIAS

- Akiyama, T., Khan, A.A, Cheng, C.M., Stefanova R., (2011). Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul isolated from imported seafood, pepper, environmental and clinical samples. *Food Microbiology*, 28, 1124-1128.
- Amini, K., Salehi, T.Z, Nikbakht, G., Ranjbar, R., Amini, J., Ashrafganjooei S.B. (2010). Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 2202-2210.
- Andrade, N.J. (2008). *Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos* (pp.78-125). São Paulo: Varela.
- Austin, J.W., Sanders, G., Kay, W.W., Collinson, S.K. (1998). Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 162, 295-301.
- Azevedo, J., Henrique, M., Novello, J. (2011). Adesão microbianas a superfícies bióticas e abióticas. In: AZEVEDO, N.F.; CERCA, N. (Eds.) *Biofilmes - na saúde, no ambiente, na indústria*. Porto: Publindustria Ltda, in press.
- Barrow, P.A. & Freitas Neto, O.C. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid – new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathology*, 40, 1-13.
- Bäumler, A.J., Norris T.L., Lasco T., Voight W., Reissbrodt R., Rabsch W., Heffron F. (1998). IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 180, 1446-1453.
- Beach, J.R. & Davis, D.E. (1927). Acute infection in chicks and chronic infection of the ovaries of hens caused by the fowl typhoid organisms. *Hilgardia*, 2, 411-424.
- Beaudette, F.R. (1930). Fowl typhoid and bacillary white diarrhea. *Proceedings of the 11th International Veterinary Congress*, (pp.705–723). London, England.
- Ben, A.F., Lagha, R., Said, K., Kallel, H., Gharbi, J. (2014). Detection of cell surface hydrophobicity, biofilm and fimbriae genes in *Salmonella* isolated from tunisian clinical and poultry meat. *Iranian Journal of Public Health*, 43, 423-431.

Berchieri, JR., A., Murphy, C.K., Marston, K. & Barrow, P.A. (2001). Observation on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathology*, 30, 221-231.

Berchieri, JR., A., Oliviera, G.H., Pinheiro, L.A.S. & Barrow, P.A. (2000) Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 50-52.

Berchieri, JR, A., Freitas Neto, O.C. (2009). Salmoneloses. In: Berchieri, JR, A., Silva, E.M., Fábio, J.D, Sesti, L., Zuanaze, M.A.F. (2009). *Doenças das aves*, 2 edição. São Paulo: Campinas.

Borges, K.A., Furian, T.Q., Borsoi, A., Moraes, H.L.S., Salle, C.T.P., Nascimento, V.P. (2013). Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33, 1416-1422.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 126. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 nov. 1995.

Brüssow, H. (2017). Infection therapy: the problem of drug resistance - and possible solutions. *Microb Biotechnol.*

Campioni, F., Bergamini, A.M.M., Falcão, J.P. (2012) Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiology*, 32, 254-264.

Castilla, K.S., Ferreira, C.S.A., Moreno, A.M., Nunes, I.A., Ferreira, A.J.P.(2006). Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* e *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 135-139.

Celis-Estupiñan, A.L.P., Batista, D.F.A., Cardozo, M.V., Souza, A.I.S., Alves, L.B.R., Almeida A.M., Barrow, P.A., Berchieri JR., A. & Freitas Neto, O.C. (2017). Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil. *Avian Pathology*.

Chaudhary J.H., Nayak J.B., Brahmabhatt M.N., Makwana P.P. (2015). Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. *Veterinary World*, 8, 121-124.

Chiou C.S., Chen Y.T., Wang Y.W., Liu Y.Y., Kuo H.C., Tu Y.H., Lin A.C., Liao Y.S., Hong Y.P. (2017). Dissemination of *mcr-1*-Carrying plasmids among colistin-resistant salmonella strains from humans and food-producing animals in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother*, 61:7.

CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests – Twenty-Third information supplement. M100-S23, v.33, n.1, 2013, 205p.

Craciunas, C., Keul, A.L., Flonta, M., Cristea, M. (2012). DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hilA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. *Journal of Environmental Management*, 95, 15-18.

Derakhshandeh, A.; Firouzi, R.; Khoshbakh, R. (2013). Association of Three Plasmid-Encoded *spv* genes among different *Salmonella* Serotypes Isolated from Different Origins. *Indian Journal of Microbiology*, 53, 106-111.

Doran, J.L, Collinson, SK,, Burian, J., Sarlós, G., Todd, E.C., Munro, C.K., Kay, C.M., Banser, P.A., Peterkin, PI., Kay, WW.(1993). DNA-based diagnostic test for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2263-2273.

Dutta, P., Borah, M.K., Gangil, R. & Singathia, R. (2015). Gross/histopathological impact of *Salmonella* Gallinarum isolated from layer chickens in Jaipur and their antibiograma assay. *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology*, 4, 153-159.

Elemfareji, O.I.; Thong, K.L. (2013). Comparative virulotyping of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Enteritidis. *Indian Journal of Microbiology*, 53, 410-417.

EMBL-EBI. *Salmonella* invasion protein InvJ (IPRO003060). **InterPro**. 2016. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPRO003060>>. Acesso em: 15 fev.2016.

Ezema, W.S., Onuoha, E. & Chah, K.F. (2009). Observations on an outbreak of fowl typhoid in commercial laying birds in Udi, South Eastern Nigeria. *Comparative Clinical Pathology*, 18, 395-398.

Foley, S.L.; Lynne, A.M. (2008). Food animal associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, 86, 173-187.

Freitas Neto, O.C., Arroyave, W., Alessi, A.C., Fagliari, J.J. & Berchieri JR., A. (2007). Infection of comercial laying hens with *Salmonella* Gallinarum: Clinical anatomopathological and haematological studies. *Poultry Science*, 9, 133-141.

Fuster-Valls N. (2008). Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, 19(3): 308-314.

Galdino, V.M.C.A., Melo R.T., Oliveira R.P., Mendonça E.P., Nalevaiko P.C., Rossi D.A. (2013). Virulência de *Salmonella* spp. de origem avícola e resistência a antimicrobianos. *Bioscience Journal*, 29, 932-939.

Gordon, R.F. & Tucker, J.F. (1957). The treatment of chronic carriers of *Salmonella* Pullorum with furazolidone. *The British Veterinary Journal*, 113, 99-111.

Hong S.S., Jeong J., Lee J., Kim S., Min W., Myung H. (2013). therapeutic effects of bacteriophages against *Salmonella* Gallinarum infection in chickens. *J. Microbiol. Biotechnol*, 23(10), 1478–1483.

Hopkins, K.L.; Threlfall, E.J. (2004). Frequency and polymorphism of *sopE* in isolates of *Salmonella enterica* belonging to the ten most prevalent serotypes in England and Wales. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 539–543.

ISO 18593:2012. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. p.8.

Jaenisch, F.R.F., Kuchiishi S.S., Coldebella A. (2010). Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. *Ciência Rural*, 40, 1678-4596.

Jayol A., Nordmann P., Lehours P., Poirel L., Dubois V. (2017). Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*.

Jong, H.K., Parry, C.M., Van Der Poll, T., Wiersinga, W.J. (2012). Host-pathogen interactions in invasive Salmonellosis. *PloS Pathogens*, 8, 1-5.

Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 367-372.

Klein, J.R.; Fahlen, T.F.; Jones, B.D. (2000). Transcriptional organization and function of invasion genes within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Pathogenicity Island 1, including the *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *orgA*, *orgB*, and *orgC* genes. *Infection and Immunity*, 68, 3368–3376.

Krawiec, M., Kuczkowski, M., Kruszewicz, A.G., Wieliczko, A. (2015). Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. *BMC Veterinary Research*, 31, 11-15.

Krumperman, P.H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1), 165-70.

Lima, E.S., De, Pottker, E.S., Rizzo, N.N., Webber, B., Milho, C., Melo, L.D.R., Orsato, J., Santos, L.R., Rodrigues, L.B., Nascimento, V.P. (2015). Isolamento e caracterização de novos bacteriófagos associados a diferentes sorovares de *Salmonella*. *Anais: Semana do Conhecimento*.

Ling, J.M. (2009). Rapid detection of food-borne pathogens in clinical specimens, food and environmental samples. *Hong Kong Medical Journal*, 15, 26-29.

Lee, S.K., Chon J.W., Song K.Y., Hyeon J.Y., Moon J.S., Seo K.H. (2013). Prevalence, characterization, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Gallinarum isolated from eggs produced in conventional or organic farms in South Korea. *Poultry Science*, 92 (10): 2789-2797.

Madigam, M.T., Martinko J.M., Dunlap, P.V., Clark D.P. (2010). *Microbiologia de Brock*. 12^a ed. Porto Alegre: Artemed.

Magiorakos, A.P. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug bacteria: in a international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiological Infection*, 18, 268-281.

Malika D.J., Sokolova I.J., Vinnera G.K., Mancuso F., Cinquerrua S., Vladislavljevica G.T., Clokieb J.M.R, Gartonb N.J., Stapleya F.A.G., Kirpichnikovac A. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*.

Mezal, E.H., Bae, D., Khan, A.A. (2014). Detection and functionality of the CdtB, PltA, and PltB from *Salmonella enterica* serovar Javiana. *Pathogens and Disease*, 72, 95-103.

Mezal, E.H., Stefanova, R., Khan, A.A. (2013) Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* sorovar Javiana from food, environmental and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 164, 113-118.

Moore, E.N. (1948). The efficacy of recently developed sulfonamides against fowl typhoid. *Poultry Science*, 25, 307-311.

National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). 2012. Strategic Plan 2012-2016.

Nonga, H.E., Simon, C., Karimuribo, E.D. & Mdegela, R.H. (2010). Assessment of antimicrobial usage and residues in commercial chicken eggs from smallholder poultry keepers in Morogoro municipality, Tanzania. *Zoonoses and Public Health*, 57, 339-344.

OIE. World Organization for Animal Health. Disease information. (2017). Available at: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail. Acessado em 20 de maio de 2017.

Oliveira, G., Berchieri A. & Fernandes A. (2005). Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 51-56.

Oliveira, S.D., Rodenbusch, C.R., Michael, G.B., Cardoso, M.I.R., Canal, W.C., Brandelli, A. (2003). Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 123-124.

Peterson, G., Gerdes, B., Berges, J., Nagaraja, T.G., Frye, G.J., Boyle D.S., Narayanan S. (2010). Development of microarray and multiplex polymerase chain reaction assays for identification of serovars and virulence genes in *Salmonella enterica* of human or animal origin. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 559-569.

Pomeroy, B.S. Fowl Typhoid. In: Hofstad, M.S., Calnek, B.W., Helmbolt, C.F, Reid, W.M. & Yoder, JR., H.W. (1978). *Diseases of poultry* 7th ed, (pp. 100-116). Ames: Iowa State Press.

Pottker, E.S. (2016). Genômica e caracterização fenotípica de bacteriófagos líticos para biocontrole de *Salmonella enterica*. 70 f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

Prager, R., Miroid, S., Tietze, E., Strutz, U., Knüppel, B., Rabsch, W., Hardt, W.D., Tschäpe, H. (2000). Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 290, 605-17.

Rodrigues, L.B. (2009) Avaliação da formação de biofilmes e das condições higiênico-sanitárias em superfícies de contato com alimentos em sala de cortes de matadouro de aves. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias com ênfase em Sanidade Avícola). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Rotger, R., Casadesús, J. (1999). The virulence plasmids of *Salmonella*. *International Microbiology*, 2, 177-184.

Scherba, G., Eigel, R.M., O'brien, W.D. (1991). Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2079-2084.

Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., Van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W. (2010). Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 601- 604.

Sharma, C.S., Dhakal, J., Nannapaneni, R. (2015). Efficacy of lytic bacteriophage preparation in reducing *Salmonella* in vitro, on turkey breast cutlets, and on ground turkey. *Journal of Food Protection*, 7, 1250-1419.

Shivaprasad, H.L. & Barrow, P.A. (2013). *Pullorum* Disease and Fowl Typhoid. In: Swayne, DE. *Disease of Poultry*, 13th edn (pp. 678-693). Ames: Iowa State Press.

Shivaprasad, H.L. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Review Scientifique et Technique*, 19, 405-424.

Sillankorva, S., Neubauer, P., Azeredo, J. (2008). Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Biotechnonology*, 8:80, 1-11.

Skyberg, J.A., Logue, C.M., Nolan, L.K. (2006). Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Diseases*, 50, 77–81.

Spricigo D.A., Bardina C., Cortés P., Llagostera M. (2013). Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 169-174.

Stepanovic, S., Irkovic, I.C., Ranin, L., Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 428–432.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal Microbiology Methods*, 40, 175-179.

Yaun, J., Guo, W. (2017). Mechanisms of resistance to quinolones in *Salmonella* Typhimurium from patients with infectious diarrhea. *Microbiol Immunol*, 61, 138-143.

Webber, B., Oliveira, A.P., Pottker E.S., Daroit L., Santos L.R, Rodrigues L.B.(2015) Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis sob diferentes temperaturas e efeito de tratamentos de remoção. *Acta Scientiae Veterinariae*, 43, 1-6.

Zárate-Bonilla, L.J., Portillo, P., Sáenz-Suárez, H., Gonzáles-Santos, J., Barreto-Sampaio, G.E., Poutou-Piñales, R.A., Rey, A.F., Rey, J.G. (2014). Computational modeling

and preliminary *iroN*, *fepA*, and *cirA* gene expression in *Salmonella* Enteritidis under iron-deficiency-induced conditions. *Poultry Science*, 93, 221-230.

Zhou, D., Hardt, W.D., Galan, J.E. (1999). *Salmonella* Typhimurium encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infection and Immunity*, 67, 1974-1981.

Zinno, P., Devirgiliis, C., Ercolini, D., Ongeng, D., Mauriello, G. (2014). Bacteriophage P22 to challenge *Salmonella* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 69-74.

Zou, W., Al-Khaldi, S.F., Branham, W.S., Han, T., Fuscoe, J.C., Han, J., Foley, S.L., Xu, J., Fang, H., Cerniglia, C.E., Nayak, R. (2011). Microarray analysis of virulence gene profiles in *Salmonella* serovars from food/food animal environment. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5, 94-105.

Tabela 1. *Primers* utilizados para a amplificação dos genes de virulência.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Base pair	Reference
<i>lpfA</i>	CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTTAACAGAAACCAGT	250	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>agfA</i>	TCCACAATGGGGCGGCGGCG CCTGACGCACCATTACGCTG	350	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>sefA</i>	GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC	488	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>invA</i>	GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>hilA</i>	CTGCCGCAGTGTTAAGGATA CTGTGCGCCTTAATCGCATGT	497	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>avrA</i>	GTTATGGACGGAACGACATCGG ATTCTGCTTCCC GCCGCC	385	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>sopE</i>	ACACACTTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	398	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>sivH</i>	CAGAATGCGAATCCTTCGCAC GTATGCGAACAAGCGTAACAC	763	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>spvC</i>	CGGAAATACCATCTACAAATA CCCAAACCCATACTTACTCTG	669	Borges <i>et al.</i> 2013
<i>lpfC</i>	GCCCCGCCTGAAGCCTGTGTTGC AGGTCGCCGCTGTTTGAGGTTGGATA	641	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>spvB</i>	CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	717	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>pefA</i>	GCGCCGCTCAGCCGAACCAG GCAGCAGAAGCCCAGGAAACAGTG	157	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>orgA</i>	CAGCGCTGGGGATTACCGTTTTG TTTTTGCAATGCATCAGGGAACA	255	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>prgH</i>	GCCCGAGCAGCCTGAGAAGTTAGAAA TGAAATGAGCGCCCCTTGAGCCAGTC	756	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>spaN</i>	AAAAGCCGTGGAATCCGTTAGTGAAGT CAGCGCTGGGGATTACCGTTTTG	504	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>tolC</i>	TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC	161	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>sipB</i>	GGACGCCGCCCGGGAAAACTCTC AACTCCCGTCGCCGCCTTCACAA	875	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>sitC</i>	CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC CGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768	Skyberg; Logue; Nolan, 2006

<i>pagC</i>	CGCCTTTTCCGTGGGGTATGC GAAGCCGTTTATTTTTGTAGAGGAGATGTT	454	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>msgA</i>	GCCAGGCGCACGCGAAATCATCC GCGACCAGCCACATATCAGCCTCTTCAAAC	189	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>spiA</i>	CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG CGCGTAAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	550	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>iroN</i>	CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC ACTGGCACGGCTCGCTGTCGCTCTAT	1205	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>sopB</i>	CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGATT	220	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>cdtB</i>	ACA ACTGTCGCATCTCGCCCCGTCATT CAATTTGCGTGGGTTCTGTAGGTGCGAGT	268	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>sifA</i>	TTTGCCGAACGCGCCCCCACACG GTTGCCTTTTCTTGCGCTTTCACCCATCT	449	Skyberg; Logue; Nolan, 2006
<i>sseL</i>	TTCCGCGACAACCGACCTTTCTAA TTCTTGAACCAGACCTTGCGTTGC	169	Peterson <i>et al.</i> , 2010
<i>stn</i>	TTGTGTCGCTATCACTGG CAACC ATTCGTAACCCGCTCTCGTCC	619	Borges <i>et al.</i> 2013

Tabela 2. Perfil de resistência e índice de resistência múltipla a antimicrobianos (IRMA) de *Salmonella Gallinarum*.

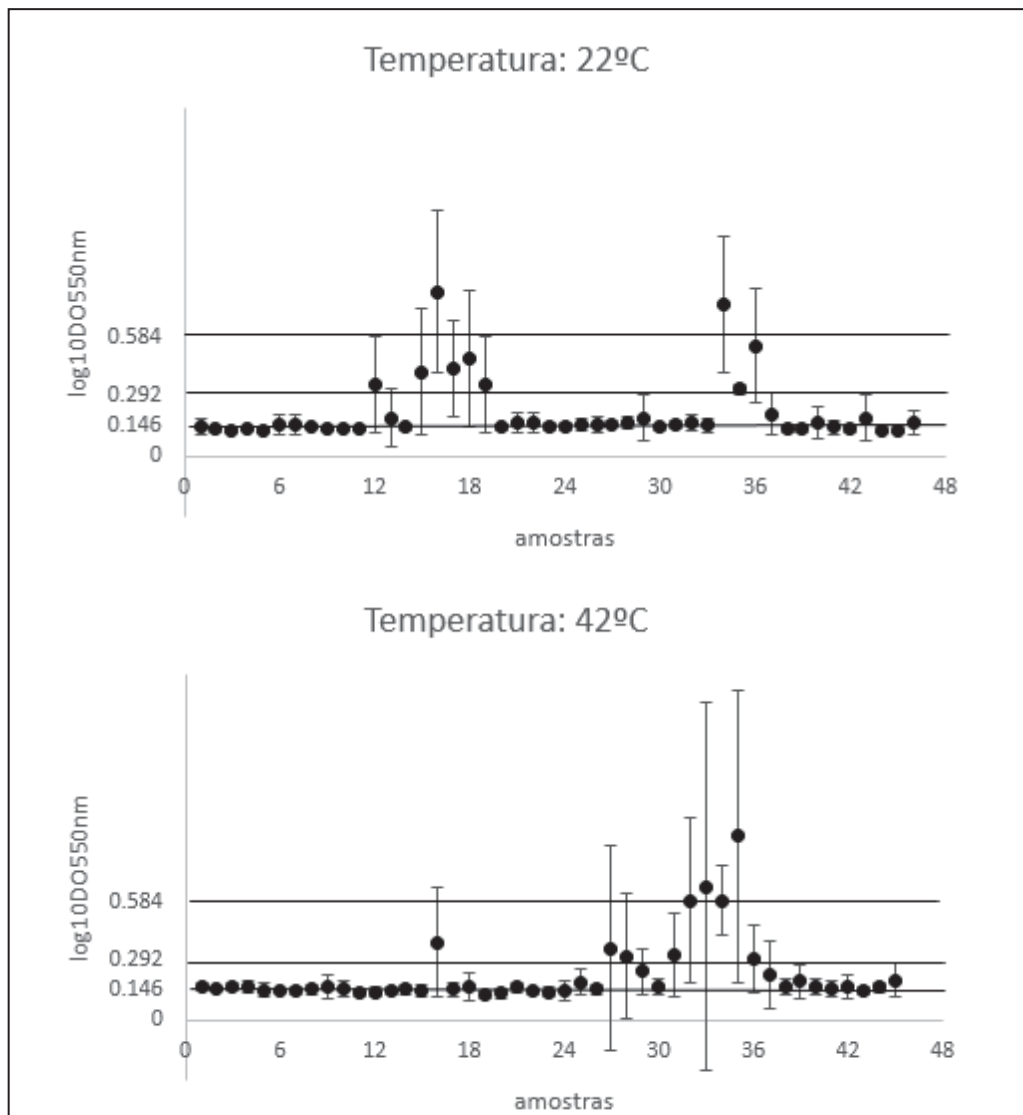
Perfil de resistência	Padrão de resistência aos antimicrobianos	Amostras de SG (n=46)	IRMA
1	Azi, Nal, Amp, Tet, Cfz*	1	0,5
2	Azi, Nal, Amp, Tet, ENO*	1	0,5
3	Azi, Nal, Cfz, ENO, Cip*	1	0,5
4	Azi, Nal, Tet, Amp*	2	0,4
5	Azi, Nal, Cfz, ENO*	2	0,4
6	Azi, Nal, ENO	4	0,3
7	Azi, Nal, Cfz*	2	0,3
8	Azi, Nal, Cip	2	0,3
9	Azi, Nal, Amp*	1	0,3
10	Azi, Nal, Tet*	1	0,3
11	Azi, Nal	28	0,2
12	Nal	1	0,1

Legendas: Quinolonas: Cip = ciprofloxacina 5 µg, Nal = ácido nalidíxico 30 µg, ENO = enrofloxacina 5 µg; Macrolídeos: Azi = azitromicina 15 µg; Fenicóis: Clo = cloranfenicol 30 µg; Polimixinas: Col = colistina 10 µg; β-Lactâmicos: Amp = ampicilina 10 µg, Cfz = cefazolina 30 µg; Tetraciclina: Tet = tetraciclina 30 µg.

*: multirresistência (resistência a três ou mais classes de antimicrobianos).

Tabela 3. Perfil de resistência aos bacteriófagos de *Salmonella Gallinarum*.

Perfil de resistência a bacteriófagos	Padrão de resistência aos bacteriófagos	Amostras de SG (n=46)	Porcentagem (%)
1	UPF_BP1; UPF_BP2; 7:2; 8:1; 8:2; 10:2 e 11:1	7	15,22
2	UPF_BP1; UPF_BP2; 7:2; 8:1; 8:2; 10:2	1	2,17
3	UPF_BP2; 7:2; 11:1	1	2,17
4	UPF_BP2; 7:2; 8:1	1	2,17
5	7:2; 8:2	1	2,17
6	7:2; 8:1	2	4,36
7	UPF_BP2; 8:1	1	2,17
8	7:2	2	4,36
9	UPF_BP2	1	2,17
10	UPF_BP1	1	2,17
11	8:1	1	2,17
12	-	27	58,70

Gráfico 1. Formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella Gallinarum*.

Legendas: Não formadoras de biofilme: $D.Oa \leq 0,146$; fracamente formadoras: $0,146 \leq D.Oa \leq 0,292$; moderadamente formadoras: $0,292 \leq D.Oa \leq 0,584$; fortemente formadoras: $D.Oa \geq 0,584$.

Tabela 4. Perfil dos genes de virulência detectados em *Salmonella Gallinarum*.

Perfil genotípico	Genes de virulência detectados	Amostras de SG (n=15)	Porcentagem (%)
1	<i>invA, hilA, avrA, sefA, lpfA, agfA, sopE, spvC, sivH, spvB, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, iron, sitC, lpfC, sifA, sopB, sseL, stn</i>	2	13,33
2	<i>invA, hilA, avrA, sefA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spvB, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, sitC, lpfC, sifA, sopB, sseL, stn</i>	6	40,00
3	<i>invA, hilA, avrA, sefA, lpfA, agfA, sopE, spvC, sivH, spvB, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, lpfC, sifA, sopB, sseL, STN</i>	1	6,67
4	<i>invA, hilA, avrA, sefA, lpfA, agfA, sivH, spvB, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, spaN, orgA, tolC, sitC, lpfC, sifA, sopB, sseL, stn</i>	1	6,67
5	<i>invA, hilA, avrA, sefA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spvB, spiA, pagC, msgA, sipB, prgH, orgA, tolC, sitC, lpfC, sifA, sopB, sseL, stn</i>	1	6,67
6	<i>invA, hilA, avrA, sefA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spvB, spiA, pagC, msgA, prgH, orgA, tolC, lpfC, sifA, sopB, sseL, stn</i>	1	6,67
7	<i>invA, hilA, avrA, sefA, lpfA, agfA, sopE, sivH, spiA, pagC, msgA, prgH, orgA, tolC, lpfC, sifA, sopB, sseL, stn</i>	1	6,67
8	<i>invA, hilA, avrA, sefA, lpfA, agfA, spvC, sivH, spiA, pagC, msgA, prgH, orgA, tolC, sifA, sopB, sseL, stn</i>	1	6,67
9	<i>invA, hilA, avrA, sefA, lpfA, agfA, sivH, spiA, pagC, msgA, prgH, orgA, tolC, sifA, sopB, sseL, stn</i>	1	6,67

Tabela 5. Perfil fenotípico e genotípico de *Salmonella Gallinarum*.

Isolados	Perfil genotípico ¹	Perfil fenotípico			
		Perfil de resistência a bacteriófagos ²	Perfil de resistência a antimicrobianos ³	Formação de biofilmes ⁴	
				22±1°C	42±1°C
SG 12	2	12	11	MD	NA
SG 15	3	12	11	MD	NA
SG 16	6	1	5	FO	MD
SG 17	2	12	11	MD	FR
SG 18	1	8	5	MD	FR
SG 27	4	11	11	FR	MD
SG 28	8	12	11	FR	MD
SG 29	2	12	11	FR	FR
SG 31	7	12	1	FR	MD
SG 32	2	12	4	FR	FO
SG 33	9	12	2	FR	FO
SG 34	2	1	11	FO	FO
SG 36	2	12	6	MD	MD
SG 45	5	12	11	NA	FR
SG 46	1	12	10	FR	FR

Legendas: FO: fortemente formadora; MD: moderadamente formadora; FR: fracamente formadora; NA: não formadora de biofilme; ¹: dados na Tabela 3; ²: dados na Tabela 2; ³: dados na Tabela 1; ⁴: dados no Gráfico 1.

Tabela 6. Formação de biofilmes em cascas de ovos por *Salmonella Gallinarum* sob diferentes temperaturas de incubação e remoção por desinfecção química.

Tratamentos	Formação de biofilme		
	(log₁₀UFC/cm²)		
	22°C	36 °C	42°C
Antes da desinfecção	4,656 aA	2,726 bA	0,451 cA
Após desinfetante comercial	1,531 aB	3,714 bA	0,939 aA

As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, e das mesmas letras maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados atingidos são de grande relevância, uma vez que existem poucos estudos com *Salmonella Gallinarum*, principalmente com isolados de plantéis avícolas, e pelo tifo aviário ser uma enfermidade com impactos econômicos devido a grandes perdas de produção, condenação de carcaças e restrições de exportação.

Este trabalho nos esclarece algumas hipóteses sobre a disseminação da SG e a ocorrência de surtos sanitários, principalmente pela confirmação da habilidade dos isolados formarem biofilmes em diferentes superfícies e temperaturas. Sobretudo, pela adesão em cascas de ovos de reprodutoras, uma vez que ainda não havia sido relatada essa habilidade da SG em periódicos buscados. Além disso, observamos uma certa dificuldade na remoção química das células sésseis das cascas de ovos, pois houve redução em um dos tratamentos, mas não eliminação dos microrganismos aderidos, demonstrando a relevância do estudo para diferentes níveis da cadeia produtiva, e indicando que pode existir essa lacuna a ser controlada pelo sistema de produção. Soma-se a estes dados a importância da detecção de genes de virulência nestas amostras, caracterizando esse trabalho como inédito, uma vez que há poucos registros na literatura de perfil genotípico em SG. Deste modo, pode-se contribuir no conhecimento do potencial de virulência deste biovar, auxiliando na compreensão do comportamento deste patógeno em episódios sanitários, bem como no controle e prevenção de surtos.

A expressão de multirresistência a drogas antimicrobianas, uma preocupação de todos os seguimentos de saúde humana e animal, faz-nos cogitar a possibilidade deste resultado ser reflexo de tratamentos inadequados com antibióticos contra SG nos plantéis avícolas, levando a uma pressão de seleção e resistência a diferentes princípios ativos. Principalmente se avaliarmos que reprodutores infectados não podem ser tratados, mas sim ter os lotes de aves e ovos eliminados. Embora a SG não tenha repercussão em saúde pública, a saúde humana pode ser afetada, pois o uso inadequado de drogas antimicrobianas em animais de produção repercute diretamente na resistência a estes princípios ativos, devido às possibilidades de transferência de genes entre diferentes espécies bacterianas, não apenas causadoras de doenças em animais mas, também, em seres humanos.

Este trabalho mostra que necessitamos de alternativas assertivas para o tratamento e controle desta enfermidade em plantéis de animais de produção, e demonstrar que a oportunidade de aplicação de biocontrole utilizando bacteriófagos contra as SG se mostrou efetivo nos testes realizados. Assim, com esse estudo, identificamos a oportunidade de novas

pesquisas para a viabilização da utilização de bacteriófagos no controle deste importante patógeno.

5 REFERÊNCIAS

ABEDON ST, KUHL S.J, BLASDEL BG, KUTTER EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011. vol. 1, no. 2, pp. 66–85.

ABEDON ST, THOMAS-ABEDON C. Phage therapy pharmacology. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010 vol. 11, no. 1, pp. 28–47.

ACKERMANN HW. *Bacteriophage Taxonomy, Microbiology Australia*. 2011, pp. 90-94.

ACKERMANN HW. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Adv Virus* 1998. p 135-201.

ALTMAYER RM, McNERN JK, BOSSIO JC, ROSENSHINE I, FINLAY BB, GALAN JE. Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. *Molecular Microbiology*. Salem, 1993 v.7, p.89–98.

ÁLVAREZ NM. Virulencia, resistência y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. 2007. 156 f. Tese (Doutorado em Biología Funcional) - Universidad de Oviedo, Oviedo, 2007.

WEBBER B, OLIVEIRA AP, POTTKER ES, DAROIT L, SANTOS LR, RODRIGUES LB. Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis sob diferentes temperaturas e efeito de tratamentos de remoção. *Acta Scientiae Veterinariae* 2015.

BARANCELLI GV, MARTIN JGP, PORTO E. *Salmonella* em ovos: relação entre produção e consumo seguro. *Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas*. 2012, v 19, n 2, p 73-82.

BARROW PA, FREITAS NETO OC. Pullorum disease and fowl typhoid - new thoughts on old diseases: a review. *Avian pathology: journal of the W.V.P.A, Londres*, 2011. v.40, n.1, p.1-13.

BARROW PA, JONES M, THOMSON N. *Salmonella*. In: GYLES CL, PRESCOTT JF, SONGER G, THOEN CO. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. Cap. 14, p 231- 257.

BASNET HB, KWON HJ, CHO SH, KIM SJ, YOO HS, PARK YH. Reproduction of fowl typhoid by respiratory challenge with *Salmonella Gallinarum*. *Avian Dis*. 2008. 52: 156-159.

BÄUMLER AJ, HEFFRON F. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. *Jornal of Bacteriology*. Apr. 1995, v.177, n. 8, p. 2087-2097.

BECEIRO A, TOMÁS M, BOU G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinical Microbiological Reviews*, Apr. 2013, v. 26, n. 2, p. 185-230.

BERCHIERI A, SILVA PL. *Revista do Avisite*, Campinas, mar. 2015. Disponível em: <http://avisite.com.br/EncarteEspecialSG/EE1-baixa3.pdf>. acesso em: 21/05/2016.

BERCHIERI JÚNIOR A, MURPHY CK, MARSTON K, BARROW PA. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* sorovares Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathology*, Huntingdon. 2010, v. 30, n. 3, p. 221 - 231.

BERCHIERI JÚNIOR A, OLIVEIRA GH. Salmoneloses Aviárias. In: ANDREATTI FILHO, R. L. *Saúde Aviária e Doenças*. 2007, 1 ed., São Paulo, Editora Roca, p. 84-106.

BERCHIERI JÚNIOR A. Controle de salmoneloses mostra resultados no combate ao tifo aviário. *Informativo Técnico Avícola - Biovet*, 2012, n 42.

BERCHIERI JÚNIOR A, WIGLEY P, PAGE K, MURPHY CK, BARROW PA. Further studies on vertical transmission and persistence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 in chickens. *Avian Pathology* 2001, 30, 297-310.

BERCHIERI JÚNIOR A, FREITAS NETO OC. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. *Doenças das aves*, 2009, 2 edição, Ed. FACTA, Campinas.

BOROSKY JC. Qualidade de água de bebida e biofilmes na linha de água para animais de produção. *Informativo técnico*, n. 129, 2013. Disponível em: <http://www.sossuinos.com.br/Tecnicos/info129.htm>.

BORSOI A, SANTIN E, SANTOS LR, SALLE CT, MORAES HL, NASCIMENTO VP. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed

field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. *Poultry Science*, Apr. 2009, v. 88, n. 4, p. 750-758.

BORSOI A, FRANÇA JM, GONSALVES CC. *Salmonella* na avicultura e sua importância em saúde pública. *Revista eletrônica: biociências, biotecnologia e saúde*, jan/abr. 2011, n. 1.

Brasil. Agência de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em enterococos e *Salmonella* isoladas de carcaças de frangos congeladas e comercializadas no Brasil. Brasília, 2008. 188p

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. Monitoramento da prevalência e do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em enterococos e *Salmonella* isolados de carcaças de frangos congeladas comercializadas no Brasil. Brasília, 2012. 171p.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº08. Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes PNCRC/2010. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 abr. 2010.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 09. Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso de princípios ativos cloranfenicol, nitrofuranos e os produtos que contenham esses princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jun. 2003.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11. Proibir a fabricação, a importação, a comercialização e o uso da substância química olaquinox, como aditivo promotor de crescimento em animais produtores de alimentos. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 nov. 2004.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14. Proíbe em todo território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mai. 2012.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 18. Estabelecer os Procedimentos para Registro, Fiscalização e Controle de Estabelecimentos Avícolas de Reprodução, Comerciais e de Ensino ou Pesquisa. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 jun. 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26. Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 jul. 2009.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 35. Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso de produtos destinados à alimentação animal contendo a substância química denominada carbadox. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 nov. 2005.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 56. Estabelece os Procedimentos para Registro, Fiscalização e Controle de Estabelecimentos Avícolas de Reprodução e Comerciais. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 dez. 2007.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 nov. 1998.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 101. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 ago. 1993.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 126. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 nov. 1995.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 ago. 2003.

CERCA N. Biofilmes: na saúde, no ambiente, na indústria. Porto: Publindústria, Edições Técnicas. 2012.

CHARACKLIS WG. Biofilm development: A process analysis. In: Microbial Adhesion and Aggregation. 1984. Ed. K. C. Marshall, Sprig Verlag, New York.

CHU C, FENG Y, CHIEN AC, HU S, CHU CH, CHIU CH. Evolution of genes on the *Salmonella* virulence plasmid phylogeny revealed from sequencing of the virulence plasmids of *S. enterica* serotype Dublin and comparative analysis. Genomics. 2008; 92: 339–343.

CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests – Twenty-Third information suplemente. M100-S23, v. 33, n. 1, 2013, 205p.

CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests for bacteria isolated from animals. VET01-A4, v. 33, n. 7, 2014a. 94p.

CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests for bacteria isolated from animals – Second information supplement. VET01-S2, v. 33, n. 8, 2014b. 74p.

COLLISON SK, EMÖDY L, TRUST TJ, KAY WW. Thin aggregative fimbriae from diarrheagenic *Escherichia Coli*. Journal of Bacteriology, July 1992, v. 174, n. 13, p. 4490-4495.

COOK A, REID-SMITH R, IRWIN R, MCEWEN SA, VALDIVIESO-GARCÍA A, RIBBLE C. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* isolated from retail turkey meat from Southern Ontario, Canada. Journal of Food Protection, 2009 v. 72, p. 473–481.

COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science, 1999. 284:1318-1322.

COSTERTON JW, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPIN-SCOTT HM. Microbial biofilmes. Annual Review of Microbiology. 1995. v.49. p.711-745.

COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science. 1999, v.284, p.1318-1322.

DAVIES RH. 2005. Pathogen populations on poultry farms, pp. 101-135. In Mead G (ed.). Food Safety Control in the Poultry Industry. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.

D'HÉRELLE F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Research in microbiology*, 2007, v. 158, n. 7, p. 553.

DUCKWORTH DH. Who discovered bacteriophage? *Bacteriol. Rev*, 1976., vol. 40, no. 4, p.793–802.

EFSA (European Food Safety Authority). *Salmonella*. EFSA Topics. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/Salmonella>. Acesso em: 23 maio 2016.

EFSA (European Food Safety Authority); ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*, v. 13, n. 2, s. 4036, 178p. 2015.

ELVERS KE, LAPPIN-SCOTT HM. Biofilms and biofouling. *Encyclop of Microbiol*. 2000, v.1, p.478-485.

FDA (Food and Drug Administration) Department of Health and Human Services. 57p. Apr.2015.

FDA (Food and Drug Administration). 2013 Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals.

FERREIRA WFC, SOUSA JC, LIMA N. *Microbiologia*. Lisboa: Lidel, 2010.

FIGUEIRA R, HOLDEN DW. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI- 2) type III secretion system effectors. *Microbiology* (2012) 158 (Pt5): 1147–61.

FOLEY SL, LYNNE AM. Food animal associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, Apr. 2008, v. 86, n. 14, p. 173-187.

FRUCIANO DE, BOURNE S. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis. In: WEST., CAN. *J. Infect. Dis. Med. Microbiol*. 2007. vol. 18, no. 1, pp. 19–26.

FRYE JG, JACKSON CR. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Frontiers in Microbiology*, May 2013, v. 4, p. 1-22.

FUSTER-VALLS N, MARÍN-DE-MATEO M, RODRIGUEZ-JEREZ J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*. 2008, v.19, n.3, p.308-314.

GADDET U, KIM WH, OH ST, LILLEHOJ HS. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal Health Research Reviews*. 2017. p.1-20.

GANTOIS I, DUCATELLE R, PASMANS F, HAESEBROUCK F, GAST R, HUMPHREY TJ, VAN IMMERSSEEL F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev*. 2009; 33:718-738.

GARCÍA-QUINTANILLA M, CASADESÚS J. Virulence plasmid interchange between strains ATCC 14028, LT2, and SL1344 of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Plasmid. 2011; 65: 169–175.

GERSTEL U, RÖMLING U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. *Res Microbiol*. 2003; 154:659-667.

GILBERT P, FOLEY J. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*. 1997, v.11, p.160-167.

GONG C, JIANG X. Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces. *Poultry Science*. 2017.

GRANT AQ, PARVEEN S, SCHWARZ J, HASHEM F, VIMINI B. Reduction of *Salmonella* in ground chicken using a bacteriophage. *Poultry Science*. 2017. 0:1–8.

GUO X, CHEN J, BEUCHAT LR, BRACKETT RE PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hliA*. *Applied and Environmental Microbiology*. Dec 200; v.66, n.12, p. 5248-5252.

GYLES C1, BOERLIN P. Horizontally transferred genetic elements and their role in pathogenesis of bacterial disease. *Vet Pathol*. 2014 Mar; 51(2):328-40.

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

HAQ U, CHAUDHRY WN, AKHTAR MN, ANDLEEB S, QADRI I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Viol. J.* 2012; vol. 9, no. 1, p. 9.

HAYWARD MR, JANSEN VAA, WOODWARD MJ. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka, two prevalent serovars associated with different livestock species in the UK. *BMC Genomics.* 2013; 14(1):365.

HENSEL M. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology.* 2000; v. 36, n. 5, p. 1015-23.

HONG SS, JEONG J, LEE J, KIM S, MIN W, MYUNG H. Therapeutic effects of bacteriophages against *Salmonella* Gallinarum infection in chickens. (2013) *J. Microbiol. Biotechnol.* 23(10), 1478–1483.

HURLEY D, MCCUSKER MP, FANNING S, MARTINS M. *Salmonella*–host interactions – modulation of the host innate immune system. *Frontiers in Immunology* REVIEW ARTICLE. 2014.

JEONG JH, SONG M, PARK SI, CHO KO, RHEE JH, CHOY HE. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells. *Journal of Bacteriology*, Washington. 2008; v. 190, n. 19, p. 6340- 6350.

JONES FT, RICHARDSON KE. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poultry Science.*2004; 83, 384-91.

JONES MA, WIGLEY P, PAGE KL, HULME SD & BARROW PA. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. *Infection and Immunity.* 2001; v 69, p 5471- 5476.

JONG HK, PARRY CM, POLL TVD, WIERSINGA WJ. Host-pathogen interactions in invasive *Salmonellosis*. *PLOS Pathogens.* 2010; v.8, n.10, p:1-9.

JORGENSEN JH, FERRARO MJ. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Disease.* 2009; v. 49, n. 11, p. 1749-1755.

JOSEPH B, OTTA SK, KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol.* 2001; 64:367-372.

KIM SC, KIM JW, KIM JU, KIM IH. Effects of dietary supplementation of bacteriophage on growth performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and fecal microflora in broilers. *Korean Journal of Poultry Science.* 2013; 40: 75–81.

KOLUMAN A, DIKICI A. Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: Status quo and global trends. *Critical Reviews in Microbiology.* Feb. 2013; v. 39, n. 1, p. 57-69.

KRIETSCH K. Emerging pathogens: antibiotic resistance slowly growing in *Salmonella*. *Food Safety.* Disponível em: < <http://www.foodsafetynews.com/2013/09/antibiotic-resistance-slowly-growing-in-Salmonella>. Acesso em: 25 mai. 2016.

KROPINSKI A M, LAVIGNE R, SANTOS SB, VILLEGAS A. Genomic and proteomic characterization of the broad-host-range *Salmonella* Phage PVP-SE1: creation of a new phage genus. *Journal of virology.* 2011. p. 11265–11273.

KUANA SL. Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. In: JÚNIOR AB, SILVA EM, FÁBIO JÚNIOR DI, SESTI L, ZUANAZE MAA. *Doenças das aves.* 2ª ed. Campinas: Facta, 2009. 1.104 p.

KUMAR CG, ANAND SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology.* Amsterdam. 1998, v.42, n.1/2, p.9-27.

LATASA C, ROUX A, TOLEDO-ARANA A, GHIGO JM, GAMAZO C, PENADÉS JR, LASA I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol.* 2005; 58:1322-1339.

LERTWORAPREECHA M, SUTTHIMUSIK S, TONTIKAPONG K. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolated from chicken, and vegetables in Southern Thailand. *Jundishapur Journal of Microbiology.* 2013; v. 6, n. 11, p. 36-41.

LIU Z, NIU H, WU S, HUANG R. CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. *Emerg Microbes Infect.* 2014; 3(1):e1.

LOC-CARRILLO C, ABEDON ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 2011. vol. 1, no. 2, pp. 111–114.

LODDI MM. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. *Revista CFMV*, Brasília, 2001, ano VII, Nº 23, p.51-56.

LOWY FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. Division of Infectious Diseases, Departments of Medicine and Pathology, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York, USA. *J. Clin. Invest.* 2003. v.111, p.1265–1273.

LU TK, COLLINS JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 4629-4634.

LU TK, KOERIS MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr. Opin. Microbiol.* 2011; 14: 524-531.

MADIGAM MT, MARTINKO JM, DUNLAP PV, CLARK DP. *Microbiologia de Brock*. 12^a ed. Porto Alegre: Artemed; 2010.

MAGIORAKOS AP. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiological Infection*. Mar. 2012, v. 18, n. 3, p. 268-281.

MARCUS SL, BRUMELL JH, PFEIFER CG, FINLAY BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* 2000; v 2, p 145–156.

MARIETTO-GONÇALVES GA, ANDREATTI FRL. Fagoterapia: uma opção de controle biológico para a salmonelose aviária. *Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP*, São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária. 2012. v. 10, n. 1 (2012), p. 06–13.

MAYER G. *Microbiologia e Imunologia*. University of South Carolina School of Medicine. Capítulo Sete. [capturado em 14 mai. 2017]. Disponível em: http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter_7_bp.htm.

MENDES PMM, BAIÃO NC, LARA LJC, BARBOSA VM, ROCHA JSR., POMPEU MA, BATISTA JVMDSP, CLIMACO WLDS. Influência do aquecimento artificial de ovos de

matrizes pesadas sobre o rendimento de incubação. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2014, v.66, n.3, p.919-926.

MIRMOMENI MH, KIANI S, SISAKHTNEZHAD S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2008, v.11, n.11, p.1497- 1501.

MONTASSIER MFS, BRENTANO L, RICHTZENHAIN LJ, MONTASSIER HJ. Diversity in relevant epitopes of S1 glycoprotein and nucleocapsid (N) protein of Brazilian variants of infectious bronchitis virus. Virus Reviews and Research. 2010, v. 15, p. 196.

NAKANO M, YAMASAKI E, ICHINOSE A, SHIMOHATA T, TAKAHASHI A, AKADA JK, NAKAMURA K, MOSS J, HIRAYAMA T, KURAZONO H. *Salmonella* enterotoxin (Stn) regulates membrane composition and integrity. Disease Models & Mechanisms. July 2012, v. 5, n. 4, p. 515-521.

OIE. (2010). World Animal Health Information Database (WAHID) interface. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis/public.php>.

OIE. World Animal Health Information Database. Fowl typhoid and Pullorum disease. In: OIE (Ed.). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th Ed. Paris: 2012. p. 538-548.

OLIVEIRA SD. Detection and identification of *Salmonella* from poultry-related samples by PCR. Veterinary Microbiology. June 2002, v. 87, n. 1, p.25-35.

PALMEIRA A, SANTOS LR., BORSOI A, RODRIGUES LB, CALASANS M, NASCIMENTO VP. Serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. Isolated from turkey and broiler carcasses in southern brazil between 2004 and 2006. *Re. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 2016

PARVEJ MS, NAZIR K, RAHMAN MB, JAHAN M, KHAN MFR, RAHMAN M. Prevalence and characterization of multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum and Gallinarum from chicken, Veterinary World. 2016; 9(1): 65-70.

PETERSON G, GERDES B, BERGES J, NAGARAJA TG, FRYE JG, BOYLE DS, NARAYANAN S. Development of microarray and multiplex polymerase chain reaction assays

for identification of serovars and virulence genes in *Salmonella enterica* of human or animal origin. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. July 2010, v. 22, n. 4, p. 559-569.

QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER, ME, DONNELLY WJ, LEONARD FC. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

REVOLLEDO L, PIANTINO AJF. *Patologia Aviária*. Barueri, São Paulo, 2009.

ROMIJN C, LOKHORST W. Chemical heat regulation in the chicken embryo. *Poult. Sci.* 1955, v.34, p.649-654.

ROSSI F, ANDREAZZI D B. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. São Paulo: Atheneu; 2005.

RUI BR, ANGRIMANI DSR, CRUZ LV, MACHADO TL, LOPES HC. Principais métodos de desinfecção e desinfetantes utilizados na avicultura: Revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*. Garça – SP. 2011, Ano IX, n. 16.

SANSONETTI P. Host pathogenes interaction: The seduction of molecular cross talk. *Gut*. 2002. V.50, p.1112-8.

SCHERBA G, EIGEL RM, O'BRIEN WD. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991; 57:2079-2084.

SCHWARZ S, SILLEY P, SIMJEE S, WOODFORD N, VAN DUIJKEREN E, JOHNSON AP, GAASTRA W. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Feb. 2010, v. 65, n. 4, p. 601- 604.

SCHWARZ S, KEHRENBERG C, WALSH TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*. June 2001, v. 17, n. 6, p. 431-437.

SENGUPTA M, AUSTIN S. Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. *Infect Immun*. 2011;79:2502–2509.

SHAH DH, LEE MJ, PARK JH, LEE JH, EO SK, KWON JT, CHAE JS. Identification of *Salmonella* Gallinarum virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Microbiology*, London. 2005, v.151, p.3957–3968.

SHIVAPRASAD HL. Fowl typhoid and Pullorum disease. Rev. Sci. Tech. 2000; 19: 405-424.

SHIVAPRASAD HL, BARROW PA. Pullorum disease and fowl typhoid. In: SAIF YM, FADLY AM, GLISSON JR, McDOUGALD LR, NOLAN LK. In: 22 SWAYNE D.E. Diseases of Poultry, 12 edição, Arnes: Iowa State Press, p. 620- 634.

SILVA EN. Tifo aviário em alerta vermelho. 2010. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/tifo-aviario-alerta-vermelhot292/165-p0.htm>

SKYBERG JA, LOGUE CM, NOLAN LK. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. Avian Diseases, Mar. 2006, v.50, n.1, p. 77-81.

SOUZA W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade de Microscopia Eletrônica, 1998. 179 p.

STEENACKERS H, HERMANS K, VANDERLEYDEN J, DE KEERSMAECKER SC. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Res Int. 2012; 45:502-531

SULAKVELIDZE A, ALAVIDZE Z, MORRIS JJG. Bacteriophage therapy. Antim Agents and Chemother. 2001; 45:649-659.

SULAKVELIDZE A. Safety by nature: Potential bacteriophage applications. Bacteriophages offer opportunities for safely managing bacterial infections. Microbe, 2011. v 6, n 3, p 122-126.

SULAKVELIDZE A, ALAVIDZE Z, GLENN J, JR M. Bacteriophage Therapy Minireview 2001. vol.45, n. 3.

SULAKVELIDZE. The challenges of bacteriophage therapy. Microbe, 2006. pp. p.20–24.

SUTHERLAND IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology. 2001,v.147, p.3-9

SWAMY SC, BARNHART HM, LEE MD, DREESEN DW. Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* isolated from poultry products, wastewater and human sources. Applied Environmental Microbiology. Oct. 1996, v.62, n. 10, p. 3768-3771.

SWITT AM, RANIERI M, BAKKER HC, PETERS J, DEGORICIJA L, CUMMINGS CA, GOVONI G, BOLCHACOVA E, FURTADO MR, WIEDMANN M. Cornell University, 2013. Disponível em: www.appliedbiosystems.com. Acesso em: 19 set. 2013.

TAVARES W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos, 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

TONDO EC, RITTER AC. *Salmonella* and Salmonellosis in Southern Brazil: a review of the last decade. In: MONTES, A.S.; SANTOS, P.E. (Eds.). *Salmonella: classification, genetics and disease outbreaks*. 1.ed. Nova Science Publishers, 2012. p.175-191.

TORTORA GJ, FUNCKE BR, CASE CL. Microbiologia. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. Microbiologia. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2000; p. 827.

UBABEF. (2017) Relatório anual de 2017. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf. Acessado em 28/07/2017

VAN HOEK AH, MEVIUS D, GUERRA B, MULLANY P, ROBERTS AP, AARTS HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*, Sep. 2011. v. 2, n. 203, p. 1-27.

VAN SINDEREN D. Bacteriophage, Genetics and Molecular Biology. 2007.

VANDAMME E. New phage therapy. January, pp. 38–41, 2013.

VIEIRA AR, JENSEN AR, PIRES SM, KARLSMOSE S, WEGENER HC, WONG DLF. A resource to link human and non-human sources of *Salmonella*. WHO Global Foodborne Infections Network Country Databank. In: ISVEE Conference. Durban, South Africa: 2009.

VIEIRA MAM. Ilhas de patogenicidade. *O mundo da saúde*, São Paulo. 2009. v 33, p 406- 414.

WANG H, DONG Y, WANG G, XU X, ZHOU G. Effect of growth media on gene expression levels in *Salmonella* Typhimurium biofilm formed on stainless steel surface. *Food Control*. 2016; 59:546-552.

WANG JP, YAN L, LEE JH, KIM IH. Evaluation of bacteriophage supplementation on growth performance, blood characteristics, relative organ weight, breast muscle characteristics and

excreta microbial shedding in broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2013; 26: 573–578.

ZHAO PY, BAEK HY, KIM IH. Effects of bacteriophage supplementation on egg performance, egg quality, excreta microflora, and moisture content in laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2012; 25: 1015–1020.