

AUSÊNCIA DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS PARA *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM AMOSTRAS DE AMBIENTES AVÍCOLAS NO NOROESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

Guilherme Augusto Marietto Gonçalves¹
Bianca Yuri Borges Suehiro¹
Keila Carolina de Ornellas Garcia Dutka²
Luis Felipe Zuccolo Paschoal da Costa²
Raphael Lucio Andreatti Filho¹

RESUMO

Avaliou-se a presença de bacteriófagos líticos para *Salmonella* Enteritidis (SE) em granjas e abatedouros no noroeste do Estado de São Paulo. Analisou-se um total de 102 amostras obtidas de granjas de matrizes vacinadas contra SE, frango de corte com histórico de isolamento de *Salmonella spp.*, e também de abatedouros. Detectou-se a ausência de bacteriófagos líticos para SE em 100% das amostras analisadas. Os achados podem estar relacionados a práticas de biossegurança no controle de SE, inclusive o uso de vacinação contra SE em matrizes, reduzindo o agente a níveis não detectáveis por este sistema.

Palavras-chave: bacteriófagos, *Salmonella* Enteritidis, avicultura, saúde pública

ABSENCE OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS LYTIC BACTERIOPHAGES IN SAMPLES FROM POULTRY IN THE NORTHWEST REGION OF SAO PAULO STATE

ABSTRACT

This study evaluated the presence of lytic bacteriophages of *Salmonella* Enteritidis (SE) in farms and slaughterhouses in São Paulo State northwest region. One hundred two samples from vaccinated breeder hens, salmonella-positive poultry, and slaughterhouses were assessed. No lytic bacteriophages of SE were detected in the samples. We infer that the absence of bacteriophages may be caused by vaccination against SE and good biosecurity practices in field.

Keywords: bacteriophage, *Salmonella* Enteritidis, poultry, public health

AUSENCIA DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS DE ORIGEN AVIAR EN LA REGIÓN NOROESTE DE SÃO PAULO

RESUMEN

El presente estudio evaluó la presencia de bacteriófagos líticos que infectan *Salmonella* Enteritidis (SE) en granjas y rastros localizados en la región noroeste del Estado de São Paulo. Se analizaron 102 muestras obtenidas en granjas de matrices vacunadas, de pollo de carne con historia de positividad a salmonella y rastros. No fue posible identificar la presencia de bacteriófagos líticos de SE en ninguna de las muestras. Se infiere que la ausencia de

¹ FMVZ/UNESP

² Médico Veterinário Autônomo

bacteriófagos sea consecuencia de la vacunación contra SE y las buenas prácticas de bioseguridad en el campo.

Palavras chave: bacteriófagos, *Salmonella* Enteritidis, avicultura, salud publica

A *Salmonella* Enteritidis (SE) tem sido o sorovar mais frequente em aves e ambientes avícolas nos últimos anos no Brasil e no mundo, e o agente mais importante causador de infecções alimentares (1-3). Sua presença em aves é, quase sempre, subclínica, podendo ser detectado em todas as etapas da produção avícola ate na carcaça e partes prontas para o comércio (1). A detecção de bacteriófagos líticos ambientais é uma ferramenta que pode ser usada para monitorar e identificar a presença de bactérias-alvo ambientais (4, 5), por sua grande especificidade, ou seja: infectam apenas a bactéria que é seu hospedeiro habitual, e são extremamente abundantes no meio ambiente (6, 7).

A presente comunicação traz dados preliminares de estudo sobre a presença de bacteriófagos líticos em ambiente avícola em granjas e abatedouros do noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. As análises foram realizadas no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ-UNESP/Botucatu-SP).

Foram coletadas um total de 61 amostras de cama (16 de galpões de matrizes e 45 galpões de frango de corte) de três empresas distintas e 41 amostras de água (4 da área de sangria, 3 da área de depenagem, 2 da escaldagem, 25 de tanque de resfriamento, 4 da área da lavagem de caixas e 3 de lavagem de caminhão) em três abatedouros de duas empresas distintas. A presença de bacteriófagos líticos contra SE foi analisada com a técnica de suabe de arrasto em cama de matrizes vacinadas contra SE e em lotes de frangos de corte com histórico de isolamento de *Salmonella* spp. (sorovares não reportados pelas empresas) e em amostras de água de diferentes fases de processamento da linha de abate.

Nas coletas de amostras de cama, após a “varredura” dos galpões com o suabe, estes foram acondicionados em um saco coletor Whirl-Pack® (Sovereign, Taboão da Serra, SP, Brasil) contendo 250 mL de água peptonada, sendo transportados e mantidos em caixa térmica a 8°C até o processamento do material. As amostras de água coletadas diretamente dos tanques com um frasco coletor de água (Sovereign, Taboão da Serra, SP, Brasil) e após serem lacradas, também, foram transportados e mantidos em uma caixa térmica a 8°C até o processamento.

Cada material obtido das amostras de suabe primeiramente foi suspenso com um “massageamento” suave dos sacos e repassado para um becker estéril, seguido de repouso por 1 hora para decantação de material particulado (as amostras de água foram mantidas em repouso para decantação diretamente no frasco coletor). Após a decantação de material particulado as amostras foram pré-filtradas em papel filtro para remoção de material sobrenadante grosseiro. As amostras obtidas por suabe de arrasto foram ainda centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos para peletização de material suspenso fino (que foi desprezado) e recuperação do sobrenadante. Todas as amostras foram então submetidas à filtração dupla (0,4/0,22µm de porosidade) com o sistema Stericup® (Millipore, Billerica, MA, USA) e mantidos sob refrigeração a 5°C.

Para amplificar os possíveis bacteriófagos presentes nas amostras seguiu-se o protocolo conforme Marietto-Gonçalves et al. (8) onde adicionou-se 1 mL dos filtrados, 3 mL de pré-cultivo turvo de SE (amostra pertencente a bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP) em caldo triptona de soja em dupla concentração (TSB2x) a 5 mL de TSB simples. Após 12 horas em cultivo a 40°C filtrou-se o caldo com microfiltro de seringas (porosidade de 0,22 µm de diâmetro) e em seguida realizou-se a contagem de unidades formadoras de placa (UFP) para quantificar e identificar a presença de halos de inibição por ação lítica fágica. Primeiramente realizou-se diluição seriada de 100 µL do

filtrado das culturas em microtubos de polipropileno contendo 900 µL de PBS de 1⁻¹ a 1⁻¹⁰ desprezando 100 µL do último microtubo. Paralelamente, em um tubo de ensaio diluiu-se 1 mL de um pré-cultivo de SE em TSB2x em 9 mL de PBS, obtendo-se uma solução de SE 1:9.

Após as diluições adicionou-se o conteúdo de cada microtubo e 100 µL da solução SE 1:9 a tubos de ensaio contendo 3 mL de agar-*Soft* triptona de soja (mantido em banho-maria a 50°C) e, após rápida homogeneização do conteúdo, distribuiu-se em placa de Petri estéril mantido em repouso sob temperatura ambiente para solidificação. As placas de Petri foram incubadas a 40°C por 24 horas para realização da leitura. Para controle positivo da presença de bacteriófagos no estudo amplificou-se, em paralelo ao estudo principal, bacteriófagos de *Escherichia coli* (EC) em cada amostra utilizando-se uma cepa de EC K12 e verificou-se a sensibilidade da amostra de SE usada amplificando-se uma amostra de bacteriófago P22 (ATCC 19585-B1).

Das 102 amostras analisadas, não houve detecção da presença de bacteriófagos líticos para SE, resultando 100% de ausência. A análise de controle detectou a presença de bacteriófagos líticos para EC em 96 amostras, presença em 94,1% das amostras (Tabela 1). Em todas as ampliações, houve a replicação da amostra do bacteriófago P22.

Tabela 1. Resultado das análises de detecção da presença de bacteriófagos líticos em diferentes materiais de origem avícola; BF-SE – Bacteriófagos de *Salmonella Enteritidis*, BF-EC – Bacteriófagos de *Escherichia coli*.

Origem	Total de amostras	Total isolado	
		BF-SE	BF-EC
CAMA			
Matrizes	16	0/16	16/16
Frango de corte	45	0/38	38/38
ÁGUA			
Sangria	4	0/4	4/4
Escaldagem	2	0/3	0/3
Depenadeira	3	0/3	3/3
Chiller	25	0/25	22/25
Lavagem de caixas	4	0/4	4/4
Lavagem de caminhão	3	0/3	3/3

A detecção de bacteriófagos líticos de EC na grande maioria das amostras controle assegurou que os métodos empregados estão adequados. A replicação paralela do bacteriófago P22 em todas as ampliações, também, demonstrou que a cepa utilizada no estudo é sensível a atividade fágica, descartando a possibilidade de fago-resistência. Estes dados preliminares mostraram-se negativos em todas as amostras estudadas, ao contrário do que se esperava em função de resultados anteriores onde bacteriófagos líticos de SE foram facilmente isolados de ambiente avícola (9, 10).

Os achados da ausência de detecção de bacteriófagos líticos para SE podem estar relacionados a práticas de biossegurança no controle de SE, inclusive o uso de vacinação contra SE em matrizes (9, 10), reduzindo o agente a níveis não detectáveis por este sistema, nas amostras das varias etapas produtivas de frango de corte.

Assim, conclui-se que a ausência de bacteriófagos sugere, também, aparente ausência de cepas de SE nas amostras ambientais avícolas e de abatedouros analisados.

REFERÊNCIAS

1. Andreatti Filho RL. Paratifo aviário. In: Saúde aviária e doenças. São Paulo: Roca; 2007. p.96-111.
2. Berchieri Júnior A, Freitas Neto OC. Salmoneloses. In: Berchieri Júnior A, Silva EP, Di Fábio J, Sesti L, Fagnani Zuanaze MA. Doença das aves. 2a ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas; 2009. p.435-54.
3. Centers of Diseases Control and Prevention (USA). Investigation update: outbreak of Salmonella Typhimurium infections, 2008–2009 [Internet]. Atlanta; 2009 [cited 2012 Apr 09]. Available from: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium/update.html>
4. Mandilara G, Mavridou A, Lambiri M, Vatapoulos A, Rigas F. The use of bacteriophages for monitoring the microbiological quality of sewage sludge. Environ Technol. 2006;27:367-75.
5. Rees JC, Voorhees KJ. Simultaneous detection of two bacterial pathogens using bacteriophage amplification coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2005;19:2757-61.
6. Mayr A, Guerreiro MG. Virologia veterinária. 2ª ed. Porto Alegre: Sulina; 1981.
7. Rohwer F, Edwards R. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. J Bacteriol. 2002;184:4529-35.
8. Marietto-Gonçalves GA, Lima ET, Donato TC, Rocha TS, Álvarez LEC, Sequeira JL, et al. Eradication of Salmonella Typhimurium in broiler chicks by combined use of P22 bacteriophage and probiotic. Microbiol Res. 2011;3:4-9.
9. Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, et al. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce Salmonella enterica serovar Enteritidis in vitro and in vivo. Poult Sci. 2007;86:1904-9.
10. Atterbury RJ, Van Bergen MAP, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, et al. Bacteriophage therapy to reduce Salmonella colonization of broiler chickens. Appl Environ Microbiol. 2007;73:4543-9.

Recebido em: 03/05/12

Aceito em: 31/10/12