UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS EM ASSOCIAÇÃO COM *Lactobacillus* NO CONTROLE DE *Salmonella enterica* SUBS. *enterica* SOROTIPO TYPHIMURIUM ANTIBIÓTICO-RESISTENTE EM FRANGOS DE CORTE (*Gallus gallus domesticus* - LINNAEUS, 1758).

GUILHERME AUGUSTO MARIETTO GONÇALVES

Botucatu-SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS EM ASSOCIAÇÃO COM *Lactobacillus* NO CONTROLE DE *Salmonella enterica* SUBS. *enterica* SOROTIPO TYPHIMURIUM ANTIBIÓTICO-RESISTENTE EM FRANGOS DE CORTE (*Gallus gallus domesticus* - LINNAEUS, 1758).

GUILHERME AUGUSTO MARIETTO GONÇALVES

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Doutor Raphael Lucio Andreatti Filho.

Nome do Autor: Guilherme Augusto Marietto Gonçalves.

Título: Utilização de bacteriófagos em associação com *Lactobacillus* no controle de *Salmonella enterica* subs. *enterica* sorotipo Typhimurium antibiótico-resistente em frangos de corte (*Gallus gallus domesticus* - Linnaeus, 1758).

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho.
Presidente e Orientador.
Departamento de Clínica Veterinária.
FMVZ – UNESP – Botucatu.

Prof. Dr. Júlio Lopes Sequeira.
Membro.
Departamento de Clínica Veterinária.
FMVZ – UNESP – Botucatu.

Profª.Drª. Edna Tereza de Lima.
Membro.
Curso de Medicina Veterinária – Campus Palotina.
UFPR – Palotina.

Data da Defesa: 05 de novembro de 2009.

Dedicatória

Dedico esta obra aos meus pais, *Gilberto Gonçalves* e *Dinah Marietto Gonçalves* pela educação e incentivo aos estudos, sendo responsáveis pelo meu instinto de curiosidade e “sede de saber”.
A minha filha Giovanna Maia Gonçalves, pois tudo o que construí e ainda irei conquistar ao longo da minha carreira é por ela e que futuramente ela possa entender que minha ausência foi uma necessidade que será recompensada no decorrer da vida. E dedico também ao meu amigo e orientador Professor Raphael, por ter acreditado e investido na minha capacidade, contribuindo muito na minha formação.

Obrigado a todos por terem fé em mim!

Agradecimentos

À minha mãe (em especial) e minha família que me apoiaram, tornando o sonho da graduação e pós-graduação possível.

Ao meu orientador, *Raphael Lucio Andreatti Filho*, pela paciência e por todo o conhecimento repassado.

À grande amiga *Edna Tereza de Lima*, a quem devo minha permanência em Botucatu, por sempre ter me apoiado em meus devaneios científicos, que acabaram rendendo muitos frutos na forma de contribuições técnicas e experiência metodológica, que foram muito importantes para a concretização deste projeto.

Ao médico veterinário *Sandro Roberto Del Bem* (Céu Azul Alimentos Ltda) por ter cedido às aves utilizadas nos experimentos e ao técnico agropecuário *Davis Cardoso Bonfim* (Granja Moretto) por ceder as aves utilizadas para padronização das técnicas empregadas no período pré-projeto.

À doutora *Regina Silva de Siqueira* (Embrapa Agroindústria de Alimentos), por ter gentilmente cedido a amostra do bacteriófago utilizado no projeto.

Ao doutor *José Antonio Dalanezi* (Departamento de Produção e Exploração Animal, FMVZ-UNESP) por ter formulado e gentilmente cedido a ração para as aves do meu experimento.

Aos professores *Julio Lopes Sequeira*, *Regina Kiomi Takahira*, *João Pessoa Araújo Júnior*, *Luciano Barbosa*, por todo o apoio e suporte dado ao projeto.

Aos colegas *Flávio Medeiros Paz e Silva*, *Sueli Akemi Taniwaki*, *Veridiana Fernandes da Silveira*, *Ana Paula Batista Masseno* pela paciência e disposição em terem me ajudado a padronizar as técnicas empregadas no projeto.

Aos colegas *Sandra Mara Rotter Curotto*, *Ana Angelita Sampaio Baptista*, *Adriano Sakai Okamoto*, *Anita Menconi*, *Ticiana Silva Rocha*, *Roberta Mazola*, *Tais Donato* e *Diego Amaral*, pois sem a ajuda de vocês a realização do projeto seria impossível.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia, *Maury Raul* e *Noel de Almeida Melo*, por serem prestativos e dedicados.

À equipe de funcionários da seção de pós-graduação, *José Roberto de Lalla Júnior, Maria Aparecida Dias Almeida Manoel* e *Denise Aparecida Fioravanti Garcia*. Obrigado pela paciência, compreensão e por todo o trabalho que dei.

A todo o corpo técnico da FMVZ (faxineiras, manutenção, informática), que sempre mantiveram tudo em ordem dentro das condições possíveis.

A todos os meus amigos que fiz em Botucatu que estiveram ao meu lado na hora da tristeza, alegria, dificuldades e glórias, em especial destacando: *Thiago Fernandes Martins* (Pássaro), *Roberto Badra de Lábio* (Justus*), Luciana Esgalha Carnier* (Lu), *Peres Ramos Badial* (kbrõn)*, Aruaque Lotufo Ferraz de Oliveira* (Coringa), *Luis Emiliano Cisneros Alvarez* (Cucaracha), *Lídice Araujo Campos* (Flor de mandacaru) e molecada das repúblicas “Honra ao mé” e “H-rromeu.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e auxílio pesquisa, essencial ao desenvolvimento da pesquisa e minha permanência em Botucatu.

Sumário

Lista de Tabelas..... vi
Lista de Figuras..... vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos..... viii
Resumo..... 1
Abstract..... 2
1. Introdução..... 3
2. Revisão de Literatura..... 5
2.1. A salmonelose..... 6
2.2. Fagoterapia..... 8
2.3. Exclusão competitiva e probióticos..... 11
3. Objetivo..... 15
4. Materiais e Métodos..... 17
4.1. Delineamento experimental..... 18
4.2. Cultivo e aplicação do inóculo de *Salmonella* Typhimurium..... 19
4.3. Cultivo e aplicação do inóculo de probiótico..... 20
4.4. Cultivo e aplicação do bacteriófago..... 20
4.5. Avaliação da resposta imune inata e humoral..... 21
4.5.1. Resposta imune inata..... 21
4.5.2. Resposta humoral..... 22
4.6. Avaliação do índice de massa corporal e mensuração das vilosidades intestinais..... 23
4.7. Monitoria de ST-Nal® e do P22..... 24
4.8. Análise estatística..... 25
5. Resultados..... 26
5.1. Monitoria de ST-Nal® e do P22..... 27
5.2. Avaliação da atividade de explosão respiratória heterofílica..... 27
5.3. Quantificação de IgG circulante..... 31
5.4. Índice de massa corporal..... 33
5.5. Mensuração das vilosidades intestinais..... 36
6. Discussão..... 38
7. Conclusões..... 46
8. Referências..... 48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Identificação dos grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado..... 18

Tabela 2. Detecção de *Salmonella* Typhimurium nos cecos pela técnica de PCR e por isolamento bacteriano nos diferentes tratamentos..... 27

Tabela 3. Média dos valores leucométricos das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22. Resultados expressos em células/µL. Leu.T: Leucócitos totais, Het.T: Heterófilos absolutos, NBT+: Heterófilos com grânulos de ânion superperóxido..... 28

Tabela 4. Detecção de IgG de soro sangüíneo das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22. Resultados expressos em coeficiente ELISA 32

Tabela 5. Média do peso corporal de aves desafiadas com *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22; Resultados expressos em gramas (g)..... 34

Tabela 6. Tamanho das vilosidades duodenais e criptas cecais das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22 (Valores expressos em µm). Duo: Duodeno; Cec: Ceco..... 37

Lista de Figuras

Figura 1. Média dos valores leucométricos das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22. Resultados expressos em células/µL. Leu.T: Leucócitos totais, Het.T: Heterófilos absolutos, NBT+: Heterófilos com grânulos de ânion superperóxido..... 30

Figura 2. Relação percentual da população de heterófilo normal/heterófilo reativo entre os diferentes tratamentos ao longo do experimento. Média aritmética de doze repetições por tratamento..... 31

Figura 3. Detecção de IgG do soro sangüíneo das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22..... 33

Figura 4. Média do peso corporal das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22..... 35

Figura 5. Medidas das vilosidades duodenais das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22. **B:** Medidas das criptas cecais das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22..... 36

Figura 6. Heterófilo ativado contendo grânulos preto-azulados de ânion superperóxido (seta) em seu citoplasma (GIEMSA, 1000x)..... 40

Lista de Abreviaturas e Símbolos

%	Porcentagem
°	Grau
°C	Grau Celsius
X	Vezes
>	Maior
<	Menor
P	Probabilidade
n°	Número
pH	Potencial hidrogeniônico
G	Grama
M	Molar
mM	Milimolar
ρM	Picomolar
mL	Mililitro
µL	Microlitro
Mm	Milímetro
µm	Micrômetro
ηm	Nanômetro
NaCl	Cloreto de sódio
H_2O	Óxido de hidrogênio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2S	Ácido sulfídrico
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
KCN	Cianeto de potássio
BSA	Albumina de soro bovino
RPM	Rotações por minuto
TMB	Tetrametilbenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico

Gonçalves, G.A.M. **Utilização de bacteriófagos em associação com *Lactobacillus* no controle de *Salmonella enterica* subs. *enterica* sorotipo Typhimurium antibiótico-resistente em frangos de corte (*Gallus gallus domesticus* - Linnaeus, 1758)**. Botucatu, 2009. 101p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo avaliou a eficácia da utilização do bacteriófago P22 em associação com probiótico constituído por cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius* produtoras de bacteriocinas no tratamento experimental de *Salmonella* Typhimurium (ST) em pintos de corte com um dia de idade no período de sete dias e a capacidade de proteção após uma semana do término do tratamento. Ao longo do experimento monitorou-se a presença de ST e do P22 nas fezes, duodeno e cecos utilizando-se a PCR, possíveis alterações morfométricas nas vilosidades duodenais e criptas cecais por avaliação histológica com analisador de imagem digital, bem como a resposta imune inata por meio da dosagem de imunoglobulina da classe G em soro sanguíneo pela técnica de ELISA e a quantidade de heterófilos circulantes contendo ânion superóxidos pelo teste de redução de nitro azul de tetrazólio. Os tratamentos eliminaram a ST dos intestinos das aves, tendo as aves apresentadas aumento de vilosidades duodenais, criptas cecais e também do ganho de peso, não exacerbando a resposta imune inata. Houve também atividade imunoestimuladora sistêmica por parte dos *Lactobacillus* e verificou-se que pintos de corte com um dia de idade apresentam resposta imune inata inicial incompetente com início de reatividade a partir de três dias de idade.

Palavras-chave: Fagoterapia, probiótico, *Salmonella*, saúde aviária

Gonçalves, G.A.M. **Use of bacteriophages in association with *Lactobacillus* in control *Salmonella enterica* subs. *enterica* serotype Typhimurium antibiotic-resistent in broiler chicks (*Gallus gallus domesticus* - Linnaeus, 1758)**. Botucatu, 2009. 101p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The present study evaluated the efficacy of utilizing the bacteriophage P22 in association with probiotic constituted by strains of *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* and *L. salivarius* that produce bacteriocins in experimental seven-day treatment of *Salmonella* Typhimurium (ST) in one-day-old broiler chicks and the protection capacity one week after termination of treatment. The presence of ST and P22 were monitored in feces, duodenum and cecum throughout the experiment by PCR, possible morphometric alterations in duodenal villi and cecal crypts by histology with a digital imaging analyzer, as well as innate immune response by dosing of class G immunoglobulin in blood serum by the ELISA technique and quantity of circulating heterophils containing superoxide anions by the nitro blue tetrazolium reduction test. The treatments eliminated ST from bird intestines, and increased duodenal villi, cecal crypts and weight gain without exacerbating innate immune response response. There was also systemic immunostimulative activity on the part of *Lactobacillus* and it was verified that the one-day-old broiler chicks presented an incompetent initial innate immune response with reactivity commencing at the age of three days.

Key words: Phagoterapy, probiotic, *Salmonella*, avian health. Poultry health.

Introdução

1. Introdução

A constante evolução técnica pela qual passa a avicultura industrial tem possibilitado a obtenção de produtos avícolas de baixo custo, saudáveis e altamente nutritivos (ANDREATTI FILHO *et al.*, 1999). O seu desenvolvimento ocorreu logo após a segunda guerra mundial, representando uma nova fonte alternativa de proteína animal de fácil e rápida produção (MACHADO, 2000).

Estudos recentes relatam que os antimicrobianos comerciais usados como promotores de crescimento, podem alterar a efetividade dos cultivos da exclusão competitiva (HUMBERT *et al.*, 1991), adquirindo efeito adverso sobre a eficácia da proteção em pintos recém-nascidos (NURMI & RANTALA, 1974). O uso indiscriminado destes produtos na dieta das aves, constituídos por quimioterápicos em doses sub-terapêuticas por quase toda vida do animal, apresentam algumas contra indicações devido ao desenvolvimento de populações bacterianas resistentes (MACHADO, 2000), sendo que, o aumento mundial da resistência bacteriana faz com que se procure uma alternativa para o combate das doenças, sendo a terapia bacteriofágica uma opção (SKURNIK & STRAUCH, 2006).

Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

2.1. A salmonelose

Com a grande expansão da indústria avícola, a salmonelose tornou-se fator limitante na criação de aves, adquirindo importância relevante, pois as perdas econômicas estão presentes em todas as fases, da produção ao consumidor final. Salmonelose é o termo que designa um grande grupo de doenças aviárias agudas ou crônicas, causadas por um ou mais membros do gênero *Salmonella* (GAST, 1997; ANDREATTI FILHO, 2007). As aves contaminadas tornam-se portadoras intestinais, eliminando o microrganismo via fezes por longo período de tempo. Os frangos assim contaminados introduzem a bactéria no abatedouro. As implicações epidemiológicas e econômicas das infecções alimentares em humanos podem alcançar grande magnitude. A crescente incidência se deve à ingestão de produtos de origem aviária contaminada e/ou indevidamente preparados, visto que as aves são reservatórios de *Salmonella* (GAST, 1997; TOOD, 1997).

A salmonelose é uma doença provocada por bactérias do gênero *Salmonella*, bastonete Gram negativo, medindo em média 0,7-1,5µm de largura e 2-5µm de comprimento, anaeróbia facultativa e flagelada pertencente à família *Enterobacteriaceae* com duas espécies atualmente reconhecidas, *S. bongori*, usualmente isolada de animais de sangue frio, e *S. enterica*, isolada de animais de sangue quente, que apresenta seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtanae* e *indica*), com aproximadamente 2500 sorotipos, sendo os sorotipos Pullorum e Gallinarum específicos de aves (EUZÉBY, 1999; GAST, 1997; HOLT *et al*., 1994; ANDREATTI FILHO *et al*., 2001).

É uma bactéria que apresenta um comportamento quimiorganotrófico,ou seja, com metabolismo respiratório e fermentativo, podendo catabilizar alguns carboidratos produzindo ácidos e gás. Bioquimicamente a *Salmonella* é produtora de H_2S, não hidrolisa uréia, apresenta provas de oxidase, indol e Voges-Proskauer negativa, catalase, vermelho de metila e Simmons citrato positivas,

descarboxila lisina, ornitina e arginina diidrolase (esta ultima apresenta variância entre as cepas), reduz nitrato, cresce em KCN, com utilização de malonato variável e fermenta os carboidratos L-arabinose, D-glicose (com produção e gás), maltose, D-manitol, D-manose, L-ramnose, D-sorbitol, trealose e D-xilose (MALLINSON & SNOEYEMBOS, 1989; HOLT *et al*., 1994).

A ocorrência de *Salmonella* em granjas tem sido muito comum (SILVA & DUARTE, 2002), podendo causar três doenças distintas em aves: pulorose, cujo agente é a *S*. Pullorum, tifo aviário, causado pela *S*. Gallinarum, e paratifo aviário, causado por outros sorovares (BERCHIERI JÚNIOR, 2000). Entre os anos de 1970 e 1990 os sorotipos mais prevalentes isolados no Brasil foram o Anatum e Typhimurium e entre os anos de 1991 a 1995 a *S*. Enteritidis passou a ser isolada com freqüência, principalmente em ovos, aves (matrizes) e amostras ambientais (TAUNAY *et al*., 1996; TAVECHIO *et al*., 1996). Após o ano de 1997 já era facilmente isolada (SILVA & DUARTE, 2002) tendo predominado entre todos os sorovares isolados entre 1994 e 1999 pelo Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ de Botucatu, SP (ANDREATTI FILHO *et al*., 2001).

A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium é um sorovar comum em aves. Depois de Pullorum e Gallinarum, e ao lado de Enteritidis, é o sorovar mais importante na causa de paratifo aviário. Ambos os sorotipos são atualmente os que mais causam infecções paratifóides em aves no Brasil e EUA, sendo os principais responsáveis por infecções alimentares no homem (GAST, 1997; HOFER *et al*., 1997; EUZÉBY, 1999; CENTERS FOR DISEASES AND CONTROLS, 2009). Outros sorotipos comumente isolados são Agona, Anatum, Cubana, Hadar, Heidelberg, Mbandaka, Montevideo e Senftenberg (ANDREATTI FILHO, 2007).

Em aves, infecções paratifóides são mais comuns em animais jovens, podendo ocasionalmente acometer indivíduos adultos em situações estressantes ou concomitante a outras doenças, dieta e/ou manejo inadequados. Normalmente, sorovares paratifóides colonizam o trato intestinal sem determinar qualquer sintomatologia, no entanto pode ocorrer mortalidade e retardo no crescimento. Em casos de quadro severo, a infecção paratifóide pode ser confundida com a pulorose ou mesmo com outras infecções bacterianas

causadoras de septicemia aguda (BERCHIERI JÚNIOR, 2000; ANDREATTI FILHO, 2007).

Mesmo os sorovares paratifoides sendo inespecíficos, eles podem se adaptar as aves e desta forma persistir no intestino dessas, o que possibilita uma possível futura contaminação de carcaça e ovos. Pelo fato dos produtos de origem avícola ser comumente implicados em surtos de salmonelose humana, vem-se maximizando a importância dos sorovares paratifóides no contexto amplo da avicultura industrial, pois enquanto Pullorum e Gallinarum determinam sérios prejuízos à produção avícola e não se relacionam com a doença em humanos, os paratifóides contrapõem essas características, sendo responsáveis por graves doenças em humanos (ANDREATTI FILHO, 2007).

A aceitação da avicultura industrial como fonte de alimento, oferecendo carne e ovos, faz com que sejam necessários estudos para elaboração de programas de prevenção e controle de salmonelose, evitando a enfermidade na ave e a infecção alimentar em seres humanos (BERCHIERI JÚNIOR, 2000), sendo que experimentos demonstram a efetividade da fagoterapia na redução de *S*. Enteritidis em carcaças contaminadas (GOODE *et al.*, 2003) e *S*. Enteritidis e *S*. Typhimurium em flora cecal (BERCHIERI JÚNIOR *et al.*, 1991; FIORENTIN *et al.*, 2005).

2.2. Fagoterapia

O fenômeno de bacteriofagia foi observado em 1915 por Frederick W. Twort e em 1917 por Félix d'Herelle, sendo melhor compreendido por André Gratia em 1921, pois até então não se sabia exatamente a natureza dos bacteriófagos, também chamados de fagos (BIER, 1984; DUBLANCHET & FRUCIANO, 2008). Hoje se sabe perfeitamente que os fagos são vírus que infectam bactérias, sendo conhecidos cerca de 2700 fagos, cuja morfologia varia entre as formas cúbica, filamentosa ou pleomórfica, contendo DNA de fita dupla ou RNA de fita simples em sua carga genética (BRADLEY, 1967; BIER, 1984; ACKERMANN, 1987). Os fagos são taxonomicamente organizados na ordem *Caudovirales*, vírus com presença de cauda, e distribuídos em 13 famílias com

características morfológicas e genomas distintos (NELSON, 2004; HANLON, 2007).

Bacteriófagos são predadores naturais de bactérias e comumente encontrados no meio ambiente, onde o seu uso como biocontroladores é uma boa opção para a redução de *Salmonella* (ROHWER & EDWARDS 2002; ATTERBURY *et al*., 2007). Os bacteriófagos são específicos no que concerne à célula hospedeira, sendo que para cada espécie de bactéria existem fagos específicos que só causam danos a sua própria célula hospedeira, enquanto não causam danos a outras espécies bacterianas (MAYR & GUERREIRO, 1981). A utilização terapêutica de bacteriófagos foi proposta e efetuada com sucesso por D'Herelle (BIER, 1984), mas com a descoberta dos antibióticos e quimioterápicos acabou sendo esquecida e usados apenas em estudos de virologia (MAYR & GUERREIRO, 1981) e mais recente os bacteriófagos tem sido empregados para monitoramento e identificação de microrganismos (REES & VOORHEES, 2005; MANDILARA *et al*., 2006).

Do ponto de vista de infecciosidade e das relações com o hospedeiro reconhecem-se dois tipos de fagos: o lítico, que no final do seu período de incubação causa o rompimento da célula hospedeira, e o lisogênico, que apresenta uma infecção inaparente (YOUNG, 1992; HANLON, 2007). Para ambos os tipos a infecção se inicia com a adsorção e introdução do genoma fágico no interior da bactéria hospedeira. O fago de ciclo lítico segue por um período vegetativo, período onde há a replicação genômica e o encapsulamento das progênies, seguido da lise celular, onde ocorre a liberação das progênies infectantes. Já o fago de ciclo lisogênico incorpora o seu genoma ao bacteriano (recebendo o nome de profago) e se mantém inativo. Quando a célula hospedeira se replica o profago é repassado para as células filhas (processo chamado de lisogenia) e após uma (até várias) replicação o profago pode ser estimulado desprendendo-se do genoma bacteriano e iniciando um ciclo lítico (LENSKI, 1988; HANLON, 2007).

Os primeiros passos para a infecção é a identificação e fixação do bacteriófago na superfície da célula hospedeira (BERGET & POTEETET, 1980; LENTZ, 1990). O bacteriófago P22 é um fago lambdóide parasita de *Salmonella* que, como muitos vírus animais, utiliza carboidratos de superfície como receptores para realizar a adsorção. Sua adesina é uma proteína homotrimérica

de 215kDa localizada na ponta de sua cauda, sendo que existem seis caudas de 13ηm fixadas em um único vértice do capsídeo (ISRAEL, 1978; BAXA *et al.*, 1996).

Por meio da cauda, o P22 reconhece a seqüência do antígeno somático na membrana lipopolissacarídica dos sorovares de *Salmonella* patogênicos pertencentes ao sorogrupo A, B_1 e D_1. Seus antígenos somáticos apresentam em comum uma corrente trissacarídica em cadeia de unidades repetitivas de α-D-manose-(1→4)-α–L-raminose-(1→3)-α-D-galactose-(1→4), diferindo apenas na dideoxihexose localizada no C-3 da manose (BAXA *et al.*, 1996). A cauda do P22 possui uma atividade de endoglicosidase, responsável pela clivagem, hidrolizando os polissacarídeos do antígeno somático nas ligações raminose-galactose α (1→3)-glicosídicas produzindo dímeros de unidades repetitivas do produto principal, sendo que esse sistema receptor-inativador é comum em bacteriófagos polissacarídeos-específicos (LINDBERG, 1977; BERGET & POTEETET, 1980). Uma vez realizado, esse processo é irreversível (ISRAEL, 1978).

A lise fágica é mediada por endolisinas, que podem ser de vários tipos enzimáticos (lisozimas, amidases e/ou transglicosilases). Atacam sítios glicosídicos (lisozimas e transglicosilases) ou sítios peptídicos (amidases) e, quando associados conferem maior rigidez mecânica na degradação da parede peptidoglicânica das bactérias. Estas enzimas são utilizadas tanto para a invasão na célula hospedeira como também para a liberação das progênies (YOUNG, 1992).

Em fagos lambdóides os genes responsáveis pela produção de enzimas são transcritos por um único promotor, designado P_R' (HERSKOWITZ & SIGNER, 1970). O cistron, promotor-proximal de transcrição, é constituído pelos genes de lise S, R e Rz, que também são necessários para a formação do capsídeo e da cauda (DANIELS *et al.*, 1983). O grupo gênico SRRz, contém o fragmento EcoRI-ClaI (YOUNG, 1992), usado como um cassete de lise celular em técnicas laboratorias (GARRET *et al.*, 1981; CRABTREE & CRONAN JÚNIOR, 1984; JANG *et al.*, 2007).

O gene R, codifica a transglicosilase, também conhecida como endolisina que, semelhante à lisozima, hidrolisa os receptores glicosídicos na camada

peptideoglicana da parede celular (BIENKOWSKA-SZEWCZYK *et al.*, 1981). O gene S é responsável por alterar a permeabilidade da membrana plasmática, permitindo assim que a endolisina se infiltre e atinja os receptores glicosídicos (SMITH *et al.*, 1998). Já a função do gene Rz, apesar de estar presente em quatro fagos lambdóides (λ, P22, 21 e PA-2), ainda não tem sua função claramente conhecida (ZHANG & YOUNG, 1999).

A fagoterapia apresenta muitas vantagens sobre a antibioticoterapia: (1) é eficiente contra bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos devido à indução da bacteriólise diferir completamente da ação destes; (2) por ser hospedeiro-específico não há infecção de outras bactérias; (3) apresenta a capacidade de responder rapidamente a formação de fago-resistência do hospedeiro pelo fato dos fagos também apresentarem a capacidade de sofrer mutação; (4) o custo de desenvolvimento de uma fagoterapia é mais barato que o de desenvolvimento de novos antimicrobianos; e (5) porque os fagos não afetam células eucarióticas, onde efeitos colaterais do seu uso são incomuns (MATSUZAKI *et al.*, 2005).

A fagoterapia tem sido testada com êxito no tratamento de *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (SOOTHILL, 1992), *Vibrio vulnificus* (CERVENY *et al.*, 2002), *Enterococcus faecium* (BISWAS *et al.*, 2002) e *Escherichia coli* patogênica em aves, ratos, bezerros e humanos com redução de sintomatologia e da mortalidade (BARROW *et al.*, 1998; BRÜSSOW, 2005). Vários estudos têm sido realizados na avaliação do uso de fagos para redução de *Salmonella* em aves. A ação fágica apresentou bons resultados no tratamento experimental *in vitro* em produtos como pele (GOODE *et al.*, 2003) e carcaça (HIGGINS *et al.*, 2005; BIELKE *et al.*, 2007) e também *in vivo* por via oral em pintos (FIORENTIN *et al.*, 2005; ATTERBURY *et al.*, 2007; ANDREATTI FILHO *et al.*, 2007), por aspersão (BORIE *et al.*, 2008) e em conjunto com produtos de exclusão competitiva (TORO *et al.*, 2005).

2.3. Exclusão competitiva e probióticos

A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies bacterianas que formam um sistema complexo e dinâmico responsável por

influenciar decisivamente em fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro, podendo ser modulada pela composição da dieta (TANNOCK, 1998).

O efeito protetor da microbiota intestinal contra a colonização por patógenos é conhecido há muitos anos e tem sido amplamente aceito (PARRA, 1994). Esta habilidade de proteção conhecida como exclusão competitiva, foi primeiramente descrita por Esko Nurmi na Finlândia, em 1973, relatando que dosagem oral da microflora nativa de aves adultas livres de *Salmonella* spp. podem proteger as aves contra microrganismos patogênicos (NURMI & RANTALA, 1973). O termo exclusão competitiva é a inabilidade de uma população de microrganismos em estabelecer-se no intestino, em razão da presença de outra população bacteriana. Ou uma população de microrganismos apresenta maior sucesso ao estabelecer-se em um determinado ambiente, ou ela é produtora de algum metabólito que seja tóxico para outra população microbiana (DAY, 1992).

Os produtos de exclusão competitiva basicamente são originados do cultivo integral da microbiota intestinal, já probióticos são culturas puras ou compostas de microrganismos vivos previamente identificados, que quando fornecidos ao homem ou aos animais, beneficiam o hospedeiro pelo estímulo das propriedades existentes na microbiota natural (FULLER, 1989; HAVENNAR *et al.*,1992).

As bactérias da microbiota intestinal e/ou probióticos podem produzir uma variedade de substâncias antimicrobianas. São muitas as bactérias e leveduras que podem ser usada de forma benéfica para manter uma microbiota digestiva saudável e equilibrada (COCCONCELLI, 1993). Os efeitos benéficos destes microorganismos são mediados por uma ação antagônica direta sobre alguns grupos específicos de bactérias Gram-positivas e negativas, leveduras, fungos, protozoários e até alguns vírus (AXELSON *et al.*, 1989; FULLER, 1989). O uso de probióticos na dieta de aves contribui na manutenção de um ecossistema intestinal estável, impedindo a colonização de bactérias patogênicas (SANDLER *et al.*, 1969; STUART, 1984).

Bactérias ácido-láticas como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, além de espécies como *Bacillus*, *Streptococcus* e *Escherichia coli*, podem ser selecionadas para serem utilizadas como

probiótico, em combinação ou isoladas, baseando-se na avaliação de produtos metabólicos e pelo potencial de colonização em sítios específicos (FRETER *et al.*, 1983; GIL-TURNES *et al.*, 1999).

Dentre estas bactérias *Lactobacillus* são as mais conhecidas na indústria avícola. As espécies de *Lactobacillus* apresentam vários mecanismos que inibe o crescimento e podem até matar *Salmonella*, além de várias outras espécies de bactérias. Em primeiro lugar, há a competição direta com bactérias patogênicas por sítios de adesão nas superfícies epiteliais do intestino e também por nutrientes disponíveis no lúmen intestinal (FULLER, 1989). Além disso, a eficiência do espectro de ação também é ampliada devida à produção e liberação de alguns produtos metabólicos que apresentam atividade antimicrobiana que incluem: ácidos orgânicos, como ácido lático e acético, que alteram o pH luminal a ponto de impossibilitar a sobrevivência de microrganismos patogênicos; H_2O_2, que inibe o crescimento de patógenos devido ao efeito oxidativo que lesiona as proteínas e destrói os ácidos nucléicos das células bacterianas; além de produzirem proteínas complexas denominadas bacteriocinas, um produto resultando do catabolismo do ácido lático com ação bactericida que podem inativar e até matar outras espécies bacterianas (PRICE & LEE, 1970; GILLINAND & SPECK, 1972; DAHL *et al.*, 1989; FULLER, 1989; MICHAEL *et al.*, 1997; LIMA & ANDREATTI FILHO, 2005; LIMA *et al.*, 2007).

As bacteriocinas são pequenas proteínas catiônicas heterogêneas com cerca de 30 a 60 aminoácidos, onde o espectro de ação, peso molecular, propriedades bioquímicas e produção variam entre as espécies produtoras (LIMA & ANDREATTI FILHO, 2005). O mecanismo de ação das bacteriocinas ocorre em duas fases. A primeira é a de adsorção da bacteriocina a receptores específicos e não específicos da membrana celular da bactéria alvo. A segunda fase é irreversível e envolve alterações letais na permeabilidade da membrana (MONTVILLE *et al.*, 1995). O mecanismo dessa ação é mediado por um colapso na força motriz da bomba de próton que desestabiliza a integridade da membrana citoplasmática, como um efeito detergente (BRUNO *et al.*, 1992).

Outro fator muito importante é que o tratamento com *Lactobacillus* spp. apresenta um efeito imunoestimulante na mucosa intestinal (SIMON *et al.*, 2001). A presença de *Lactobacillus* atrai linfócitos à lâmina própria intestinal

(LILLEHOJ & CHUNG, 1992; NOUJAIM *et al.*, 2008) e estimula a síntese intestinal de IgA pelo sistema imune aumentando a resistência a doenças (PULVERER *et al.*, 1990; OKAMOTO *et al.*, 2007).

Além de trazerem benefícios à saúde do hospedeiro, os produtos de exclusão competitiva e probióticos são vantajosos por não deixarem resíduos nos produtos de origem animal e não favorecem resistência às drogas (SILVA & ANDREATTI FILHO, 2000).

2.4. O heterófilo e sua ação na resposta imune inata

O heterófilo, de natureza homóloga ao neutrófilo nos mamíferos, é de formato arredondado com citoplasma transparente contento grânulos eosinofílicos e um núcleo multilobulado com agrupamentos densos de cromatina (CAMPBELL, 1995). É a célula polimorfonuclear leucocitária mais abundante em aves apresentando ação fagocitária primária na resposta inflamatória contra agentes infecciosos como bactérias e fungos (MONTALLI, 1988; CAMPBELL, 1995; MAXSWELL & ROBERTSON, 1998), podendo chegar ao local infectado após 30 minutos do estímulo inicial (KOGUT *et al.*, 1994, HE *et al.*, 2003).

A invasão da mucosa intestinal pela *Salmonella* estimula um recrutamento massivo de células polimorfonucleares nos sítios inflamatórios da lâmina própria, sendo o heterófilo atraído pelas quimiocinas resultantes da interação parasito-hospedeiro (PORTER JÚNIOR & HOLT, 1993; MCCORMICK *et al.*, 1995).

O heterófilo modula a resposta imune inata aguda realizando rápida fagocitose do agente invasor, produzindo metabólitos de oxigênio e enzimas proteolíticas, sendo importante fator no combate a infecções sistêmicas de *Salmonella* em aves recém-nascidas (KOGUT *et al.*, 2001; SWAGGERTY *et al.*, 2003; SWAGGERTY *et al.*, 2005). A capacidade de gerar metabólitos de oxigênio pelo heterófilo aviário já foi demonstrado por Desmidt *et al.* (1996), Farnell *et al.* (2003) e He *et al.* (2003). Na ação heterofílica durante a fagocitose o mecanismo bactericida é primariamente não-oxidativo, sendo mediado por lisozimas e proteínas catiônicas, principalmente β-defensina (HARMON, 1998).

Objetivo

3. Objetivo

O presente estudo verificou a eficiência de um tratamento orgânico baseado na aplicação de fagoterapia em associação com o uso diário de probiótico contra infecção experimental de *Salmonella* Typhimurium, monitorando a eliminação de *Salmonella* e bacteriófagos durante e após o tratamento, analisando a resposta imune inata e humoral, alterações do tamanho das vilosidades duodenais e criptas cecais em paralelo com alterações do índice de massa corporal das aves e a capacidade de proteção contra re-infecção.

Material e métodos

4. Material e métodos

4.1. Delineamento experimental

Utilizou-se no experimento 404 aves de corte (*Gallus gallus domesticus*) com um dia de idade, da linhagem *Avian Farm*, provenientes de matrizes não imunizadas contra *Salmonella* spp., que foram alojadas no infectório do Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP), *Campus* de Botucatu-SP, em gaiolas de metal com aquecimento controlado e constante, água e ração livres de quimioterápicos *ad libitum*., sendo contatado a ausência de Salmonella spp. por análise microbiológica prévia no início do experimento. As aves foram divididas em dois experimentos conforme os seguintes protocolos:

Experimento I:

O primeiro experimento utilizou 384 aves divididas em oito grupos de 48 indivíduos onde se realizaram as análises referentes à monitoria de *Salmonella* e bacteriófago, resposta imune inata, avaliação da recuperação do tamanho das vilosidades duodenais e criptas cecais, índice de massa corporal das aves durante os tratamentos. Os oito tratamentos foram distinguidos conforme o inóculo recebido (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado.

Tratamento	Inóculo
A	Controle*
B	*Salmonella* Typhimurium
C	Probiótico
D	Bacteriófago P22
E	*Salmonella* Typhimurium e probiótico
F	*Salmonella* Typhimurium e bacteriófago P22
G	*Salmonella* Typhimurium, probiótico e bacteriófago P22
H	Probiótico e bacteriófago P22

*Grupo que não recebeu nenhum tratamento.

No primeiro dia as aves dos tratamentos B, E, F e G foram desafiadas com inóculo de *Salmonella* por via intra-esofágica. Três horas após o inóculo de *Salmonella* os tratamentos D, F, G e H receberam o tratamento com o bacteriófago e nos tratamentos C, E, G e H um *mix* de *Lactobacillus* na concentração de 1:1:1:1 por via intra-esofágica, sendo o tratamento com Lactobacillus administrado diariamente até o sétimo dia, com intervalo de 24 horas. Os tratamentos B, F, G e H receberam um inóculo de bacteriófagos por via oral, intraventricular (com o uso de agulha de gavagem) e por via cloacal (por enema com o uso de sonda flexível) também após três horas depois do inóculo inicial de *Salmonella*.

As coletas para análise foram realizadas a cada 48 horas contadas após o início dos tratamentos, totalizando quatro coletas: I – 0 hora, II – 48 horas, III – 96 horas, IV – 144 horas. Em cada coleta foram removidas 12 aves por tratamento para colheita, processamento e avaliação dos dados experimentais, sendo as avaliações individuais por amostra coletada.

Experimento II:

Utilizou-se 20 aves, tendo-se repetido o tratamento G do experimento I, sendo que após o término dos inóculos de probiótico esperou-se sete dias, realizando-se um novo inóculo por via oral de *Salmonella*. Após 24 horas do segundo inóculo de *Salmonella* fez-se a análise microbiológica para constatar sua presença de nos cecos das aves.

4.2. Cultivo e aplicação do inoculo de *Salmonella* Typhimurium

Utilizou-se cepa de *Salmonella* Typhimurium mutante resistente a ácido nalidíxico (ST-Nal®), isolada de fígado e cecos de aves comerciais no Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, sorotipado pelo Instituto Adolfo Lutz/São Paulo-SP. Esta resistência foi desenvolvida por meio de cultivo sucessivo da amostra em ágar verde brilhante (AVB) contendo 100 µg/mL de ácido nalidíxico. A cultura foi preparada por meio do cultivo em caldo infusão de cérebro coração (BHI) e incubada a 40°C por 24 horas.

Antes do inóculo desafio quantificou-se por meio da determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de ST-Nal®, realizada com diluições decimais seriadas em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2. Destas diluições, 0,1mL foi plaqueado em placas de Petri contendo AVB acrescido de Nal na quantidade de 100 µg/mL e cultivado por 24 horas a 40°C. As aves desafiadas receberam 0,5mL da cultura desafio com 4 x 10^4 UFC/mL de ST-Nal®.

4.3. Cultivo e aplicação do inóculo de probiótico

Utilizou-se para compor o probiótico cepas de *Lactobacillus acidophilus, L. fermentum, L. reuteri* e *L. salivarius,* isoladas de inglúvio e cecos de matrizes pesadas de linhagem comercial em produção. As amostras foram identificadas pelo Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP por meio da técnica *multiplex* PCR. As cepas de *Lactobacillus* foram inicialmente incubadas em caldo DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS) em condições de anaerobiose a 37°C por 24 horas e em seguida semeadas em ágar MRS sendo re-incubadas em condições de anaerobiose a 37°C por 24 horas. Comprovou-se o efeito inibitório das cepas de *Lactobacillus* sobre a amostra de *Salmonella* utilizando-se testes "in vitro" com os métodos *Spot-on-the-lawn* e por difusão em poços, conforme Lima *et al*. (2007). Para o inóculo utilizou-se amostras frescas, ou seja, cultivavam-se as amostras todos os dias anteriores às datas dos respectivos inóculos. Cada espécie foi cultivada separadamente e realizava-se o *mix* das espécies antes de se realizar o inóculo nas aves. Sempre após a mistura das espécies realizavam-se as diluições decimais de cada uma das cepas para quantificação das UFC, tendo diferido da técnica utilizada na determinação da ST-Nal® pelo uso de ágar MRS no plaqueamento e na temperatura de cultivo (37°C). As aves receberam inóculos de 0,5mL do *mix* com média diária de 6 x 10^9 UFC/mL de *Lactobacillus*.

4.4. Cultivo e aplicação do inóculo de bacteriófago

Utilizou-se uma cepa do bacteriófago P22 (ATCC 19585-B1), cedida pela Embrapa Agroindústria de Alimentos/Rio de Janeiro-RJ. Para cultivar o bacteriófago P22 (P22) adicionou-se 1mL de caldo Nutriente acrescido de 0,5%

de NaCl contendo o P22, 3mL de pré-cultivo turvo de ST-Nal® em caldo Triptona de Soja em dupla concentração (TSB2x) a 5mL de TSB simples. Após 4 horas em cultivo a 40°C filtrou-se o caldo com microfiltro de seringas (porosidade de 0,22µm de diâmetro) e em seguida realizou-se a contagem de unidades formadoras de placa (UFP) para quantificar a concentração de P22. Primeiramente realizou-se diluição seriada de 100µL do caldo filtrado em microtubos de polipropileno contendo 0,9mL de PBS de 1^{-1} a 1^{-10} desprezando 100µL do último microtubo. Em tubo de ensaio diluiu-se 1mL de um pré-cultivo de ST-Nal® em TSB2x em 9mL de PBS. Após as diluições adicionou-se o conteúdo de cada microtubo e 100µL da ST 1:9 em tubos de ensaio contendo 3mL de ágar *Soft* (mantido em banho-maria a 50°C) e após rápida homogeneização do conteúdo este foi distribuído em placa de Petri estéril e mantido em repouso sob temperatura ambiente para solidificação. As placas de Petri foram incubadas a 40°C por 24 horas para realização da leitura e contagem das UFP, tendo os inóculos a concentração de 3 x 10^{10} UFP/mL A dosagem administrada por via oral foi de 0,5mL, a gavagem de 0,3mL e o enema de 0,2mL.

4.5. Avaliação da resposta imune inata e humoral

Para as análises colheitou-se 200µL de sangue das aves por punção venosa da veia jugular, com o uso de seringa de 1mL e agulha 0,45 x 13mm estéreis. Dividiram-se as amostras em duas alíquotas de 100µL, uma para a análise da resposta imune inata e outra para a resposta humoral.

4.5.1. Resposta imune inata

Para avaliação da resposta imune inata monitorou-se a atividade de explosão respiratória heterofílica através do teste de Nitro azul de tetrazólio (NBT) em conjunto com leucograma, conforme o procedimento adaptado de Ciarlini *et al*. (2005). Após a colheita e antes da divisão das amostras sanguíneas anteriormente citadas, fez-se esfregaço sanguíneo de cada amostra e após a aplicação de coloração rápida tipo Romanowisk realizou-se a leitura de contagem diferencial de leucócitos em microscópio ótico com aumento de 100x sob imersão. Paralelamente a realização da contagem diferencial de leucócitos, após a

realização do esfregaço sanguíneo, adicionou-se 1µL de heparina sódica à alíquota de 100µL de sangue. Após a homogeneização da alíquota de sangue heparinizado fez-se a contagem de leucócitos totais manualmente em hemocitômetro por meio de macrodiluição de 10µL de sangue a 1mL de azul de Toluidina. Para o NBT foram realizadas duas provas: estimulada e não-estimulada. Prova estimulada: em microtubo adicionou-se 12,5µL de Nitroblue Tetrazolium Chloride® (Sigma Aldrich), 0,625µL de Stimulant® (Sigma Aldrich) e 6,25µL de sangue. Após homogeneização incubou-se a amostra em banho-maria a 37°C por 10 minutos e depois o material foi mantido em repouso por mais 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram realizados três esfregaços sendo estes corados com coloração rápida tipo Romanowisk para leitura dos resultados. Prova não-estimulada: em microtubo de polipropileno adicionou-se 12,5µL de Nitroblue Tetrazolium Chloride® e 6,25µL de sangue, seguindo-se o mesmo procedimento da prova estimulada. A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem de 100 heterófilos da prova não-estimulada.

4.5.2. **Resposta humoral**

Para avaliação da resposta humoral dosou-se a quantidade de imunoglobulina G (IgG) total das aves com a aplicação da técnica de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Após a separação da alíquota sangüínea, o sangue foi centrifugado 5000rpm a 5°C por cinco minutos. Posteriormente depositou-se o soro em outro microtubo e mantido a -20°C até o processamento do ELISA. Utilizou-se o Chicken IgG ELISA Quantification kit® (Bethyl Laboratories), tendo-se trabalhado o soro das aves na diluição de 1:100.000 determinada conforme o protocolo do fabricante.

Para a sensibilização das placas, primeiramente foi determinado o número de poços a serem utilizados (sempre analisando as amostras em duplicata). Inicialmente adicionou-se 100µL em cada poço de IgG-Fc de cabra anti-galinha diluída na proporção de 1:100 em solução tampão Carbonato-Bicarbonato 0,05M (pH 9,6) e incubou-se a placa em temperatura ambiente por 60 minutos. Após descartar-se o material (vertendo a placa) lavou-se com solução de lavagem (Tris 50mM, NaCl 0,14M, Tween 20 0,05%, pH 8,0) por três vezes, secando a placa em

seguida. Bloqueou-se a placa adicionando-se 200µL da solução de bloqueio (Tris 50mM, NaCl 0,14M, BSA 1%, pH 8,0) em cada poço e incubando-se por 30 minutos, seguido pelo descarte, nova lavagem por três vezes e secagem.

Prosseguiu-se adicionando 100µL das amostras de soro em cada poço, incubando-as por 60 minutos seguindo pelo descarte, cinco lavagens e secagem. Após diluir-se o conjugado em solução diluente específica (Tris 50mM, NaCl 0,14M, BSA 1%, Tween 20 0,05%, pH 8,0) na concentração de 1:20.000, colocou-se 100µL em cada poço incubando-se por 60 minutos em câmara escura, seguindo-se pelo descarte, nova lavagem por cinco vezes e secagem. Em seguida adicionou-se 100µL do substrato enzimático TMB/H_2O_2® (Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD) incubando-se por 15 minutos e acrescentando-se mais 100µL de solução *stop* (H_2SO_4 2M) em cada poço, sendo a absorbância mensurada no comprimento de onda de 450ηm em leitora de ELISA automática TP-Reader NM (Thermoplate).

Os resultados de detecção de IgG obtidos no exame de ELISA em densidade óptica (DO) foram convertidos para coeficiente de ELISA visando eliminar possíveis variações da DO, devido a alterações na temperatura ambiente durante as análises. O coeficiente foi obtido pela média da amostra menos a média do controle negativo, dividido pela média do controle positivo menos a média do controle negativo, conforme Okamoto *et al*. (2007):

$$\textbf{Coeficiente de ELISA} = \frac{\textbf{Média amostra – Média negativo}}{\textbf{Média positiva – Média negativo}}$$

4.6. Avaliação do índice de massa corporal e mensuração das vilosidades intestinais

Para essa avaliação primeiramente as aves eram pesadas com o uso de balança digital de capacidade até 500g e em seguida eram eutanasiadas por método físico (conforme a resolução nº 714 de junho de 2002 do Conselho

Federal de Medicina Veterinária). As amostras de intestinos foram colhidas do terço médio duodenal e da porção distal do ceco ("fundo cego") para análise morfométrica. Após a remoção das porções colhidas da carcaça realizou-se lavagem do lúmen de cada fragmento com a injeção contínua de solução de Bouin para remoção de bolo intestinal. Após essa lavagem os fragmentos foram fixados também em solução de Bouin por 24 horas e em seguida realizaram-se cinco lavagens com álcool 70° e desidratadas em série crescente de alcoóis. Após a desidratação foram recortadas, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Em cada lâmina histológica foram colocados três cortes semi-seriados com 5µm de espessura. Os cortes foram corados segundo a técnica da hematoxilina de eosina. As lâminas histológicas foram analisadas em microscópico óptico modelo Axio Imager A1, ZEISS, equipado com programa de análise de imagem Axio Vision Software Rel. Versão 4.6.1 (Zeiss Vision).

4.7. Monitoria de ST-Nal® e do P22

A monitoria foi realizada com o uso da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), sendo rastreada durante o experimento a presença de ST-Nal® e do P22 em cecos e fezes. Após as análises realizou-se contraprova por isolamento microbiológico convencional. Os cecos foram colhidos no mesmo momento das demais amostras e as fezes eram recolhidas diariamente do fundo das gaiolas. Os cecos eram macerados e suspendidos com 25mL de PBS. Após "vortexagem" filtrou-se o material para remoção de partículas grosseiras e retirou-se 1mL do caldo para extração do DNA. As fezes foram coletadas de diferentes pontos do fundo das gaiolas e processadas de forma semelhante aos cecos. Tanto os cecos como as fezes foram avaliadas em *pool*.

Para extração do DNA das utilizou-se Chelex-100™ (Bio-rad). Homogeneizou-se 1mL de suspensão de fezes e de cecos em microtubo por meio de "vortexagem" e em seguida centrifugou-se o material a 3.000rpm durante 10 minutos a 5°C, removendo-se o sobrenadante e desprezando-se o *pellet*. Coletou-se alíquota de 100µL do sobrenadante e adicionaram-se 10µL de clorofórmio, sendo a solução homogeneizada manualmente sem movimentos abruptos por 30 segundos. Incubou-se o material por 10 minutos a 5°C.

Após a incubação centrifugou-se o material a 1.000rpm por 15 minutos a 5°C, retirando-se 30µL do sobrenadante e em microtubo de 0,2mL adicionaram-se mais 30µL de Chelex-100™ a 5% (obtendo-se concentração de 1:1). Incubou-se a solução em termociclador a 99°C por 10 minutos e em seguida retirou-se o sobrenadante contendo DNA livre, desprezando-se o *pellet*.

As sequências de *primers* foram sintetizadas pela Invitrogen Corporation (São Paulo-SP, Brasil) e suspendidas na concentração de 10pmol para utilização no experimento. Para o P22 utilizou-se o gene alvo sieB (iniciador 5'-ATGGTGGCAGGAGTTAATGC-3' e reverso 5'-CAAACAAATCCCGAACGACT-3) de 335pb com o seguinte programa de amplificação: 1 minuto a 94°C, 30 ciclos de amplificação (30 segundos a 90°C, 30 segundos a 58°C e 60 segundos a 72°C) e polimerização final de 8 minutos a 72°C, conforme Mikasová *et al*. (2005). Para a ST-Nal® utilizou-se o gene alvo invA (iniciador 5´-TTGTTACGGCTATTTTGACCA-3´ e reverso 5´-CTGACTGCTACCTTGCTGATG-3´) de 521pb com o seguinte programa de amplificação: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de amplificação (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60ºC e 30 segundos a 72°C) e polimeração final de 4 minutos a 72°C, conforme Swamy *et al*. (1996). As amplificações foram realizadas com 5µL de cada amostra adicionadas a 1µL de cada primer, mais 12,5µL do kit de amplificação GoTaq® Green Master Mix (Promega) e 5,5µL de água miliQ.

Para a contraprova foi realizado isolamento microbiológico semeando-se o material processado *in natura* (ceco e fezes) após maceração e suspendidos em PBS, em placas de Petri com AVB contendo 100 µg/mL de ácido nalidíxico, realizando leitura após incubação a 40°C por 24 horas.

4.8. Análise Estatística

Realizaram-se as análises dos dados obtidos por meio do programa SISVAR com o teste Scott-Knott, conforme Ferreira (2000).

Resultados

5. Resultados

5.1. Monitoria de ST-Nal® e do P22

Pesquisou-se a presença do P22 e ST-Nal® nos oito grupos experimentais e em nenhum, tanto nos cecos quanto nas fezes, re-isolou-se o P22. A ST-Nal® foi detectada apenas no tratamento B (grupo somente desafiado com ST-Nal®) nos cecos nas coletas 48 e 96 horas (Tabela 2), sem excreção fecal. A constatação foi realizada tanto no exame de PCR como na contraprova microbiológica por isolamento bacteriano convencional. No segundo experimento também não se detectou a presença de ST-Nal® após o novo desafio.

Tabela 2. Detecção de *Salmonella* Typhimurium nos cecos pela técnica de PCR e por isolamento bacteriano nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Período após desafio (horas)			
	0	48	96	144
A - Cl	-*	-	-	-
B - ST	-	+	+	-
C - Pb	-	-	-	-
D - P22	-	-	-	-
E - ST+Pb	-	-	-	-
F - ST+P22	-	-	-	-
G - ST+Pb+P22	-	-	-	-
H - Pb+P22	-	-	-	-

Cl: controle, ST: *Salmonella* Typhimurium, Pb: probiótico, P22: Bacteriófago P22.
**Pool* de doze aves por tratamento. Negativo: -. Positivo: +.

5.2. Avaliação da atividade de explosão respiratória heterofílica

Os dados da leucometria e os valores de heterófilos normais e ativados estão expressos na tabela 3 e nas figuras 1 e 2.

Tabela 3. Média dos valores leucométricos das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22. Resultados expressos em células/µL. Leu.T: Leucócitos totais, Het.T: Heterófilos absolutos, NBT+: Heterófilos com grânulos de ânion superperóxido.

Tratamento		Período após desafio (horas)*			
		0	48	96	144
A - Cl	Leu.T	5171Aa**	4599Aa	2044Aa	1553Aa
	Het.T	3023Aa	3064Aa	830Bb	345Bb
	NBT+	0Ab	93Ca	24Bb	18Bb
B - ST	Leu.T	4040Aa	2038Aa	913Ac	509Aa
	Het.T	2902Aa	1250Bb	673Bc	286Bc
	NBT+	0Ac	190Aa	100Ab	68Ab
C - Pb	Leu.T	3893Aa	4213Aa	2756Aa	1452Aa
	Het.T	1908Ba	2536Aa	1836Aa	543Ab
	NBT+	0Ac	149Ba	88Ab	36Bc
D - P22	Leu.T	4493Aa	3409Aa	1641Aa	884Aa
	Het.T	2299Ba	2099Aa	623Bb	236Bb
	NBT+	0Ab	90Ca	35Bb	15Bb
E - ST+Pb	Leu.T	3904Aa	2066Aa	1789Aa	674Aa
	Het.T	2031Ba	1347Ba	693Bb	379Bb
	NBT+	0Ab	27Da	28Bb	8Bb
F - ST+P22	Leu.T	3777	1744Aa	1312Aa	673Aa
	Het.T	2049Ba	1086Bb	704Bb	257Bb
	NBT+	0Aa	38Da	25Ba	9Ba
G - ST+Pb+P22	Leu.T	3651Aa	1676Aa	1390Aa	598Aa
	Het.T	1900Ba	1049Bb	734Bc	209Bc
	NBT+	0Aa	51Da	37Bb	9Bb
H - Pb+P22	Leu.T	4388Aa	3364Aa	2034Aa	568Aa
	Het.T	2085Ba	1251Ba	1022Bb	187Bb
	NBT+	0Ac	95Ca	77Bb	16Bc

Cl: controle, ST: *Salmonella* Typhimurium, Pb: probiótico, P22: Bacteriófago P22.
*Média aritmética de doze repetições por tratamento.
**Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos em cada coleta (coluna) e letras maiúsculas comparam as médias do período das coletas (linha). Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente (P > 0,05).

Conforme o cálculo de desvio padrão aplicado sobre os valores do grupo controle (A) obteve-se os seguintes padrões fisiológicos de normalidade (tabela 4).

Tabela 4. Desvio padrão dos valores leucométricos das aves controle (tratamento A). Resultados expressos em células/µL. Leu.T: Leucócitos totais, Het.T: Heterófilos absolutos, NBT+: Heterófilos com grânulos de ânion superperóxido.

Coleta*	Leu. T	Het. T	NBT+
0 hora	3761-6581	1892-4154	---
48 horas	2952-5912	1510-3286	22-164
96 horas	1252-2836	362-1132	6-42
144 horas	485-1372	95-595	4-32

*Média aritmética de doze repetições por tratamento;

Em um aspecto geral observou-se que em todos os tratamentos as aves apresentaram um grande número de leucócitos na coleta inicial (0 horas) com uma diminuição gradual, sendo que também não houve presença de heterófilos reativos em todos os tratamentos nesta coleta.

Conforme o parâmetro dos padrões leucométricos observou-se que o tratamento B apresentou leucopenia heterofílica na coleta 48 horas, apresentando heterofilocitose nas coletas 96 e 144 horas, sendo este o tratamento que apresentou a maior quantidade de heterófilos reativos no decorrer do experimento com diferença significativa sobre os demais grupos. O tratamento C apresentou leucocitose, heterofilia e grande quantidade de heterófilos reativos na coleta com 96 horas, sendo que na de 144 horas ainda apresentava tendência à heterofilia e um leve aumento do número de heterófilos reativos. O tratamento H também apresentou leucocitose na coleta de 96 horas, porém discreta. Os demais tratamentos (de D a G) apresentaram os valores leucométricos dentro da normalidade, sem diferença significativa.

O tratamento B foi o grupo que apresentou a maior população de heterófilos reativos ao longo do experimento chegando a ter pico de 23,7% da população heterofílica contendo grânulos de ânion superóxido no seu citoplasma na coleta com 144 horas (Figura 3). O segundo tratamento que apresentou maior quantidade de heterófilos reativos foi o H com pico de 8,5% da população heterofílica com 144 horas, seguido pelos tratamentos C e D, com 6,3 e 6,3% de pico com 144 horas.

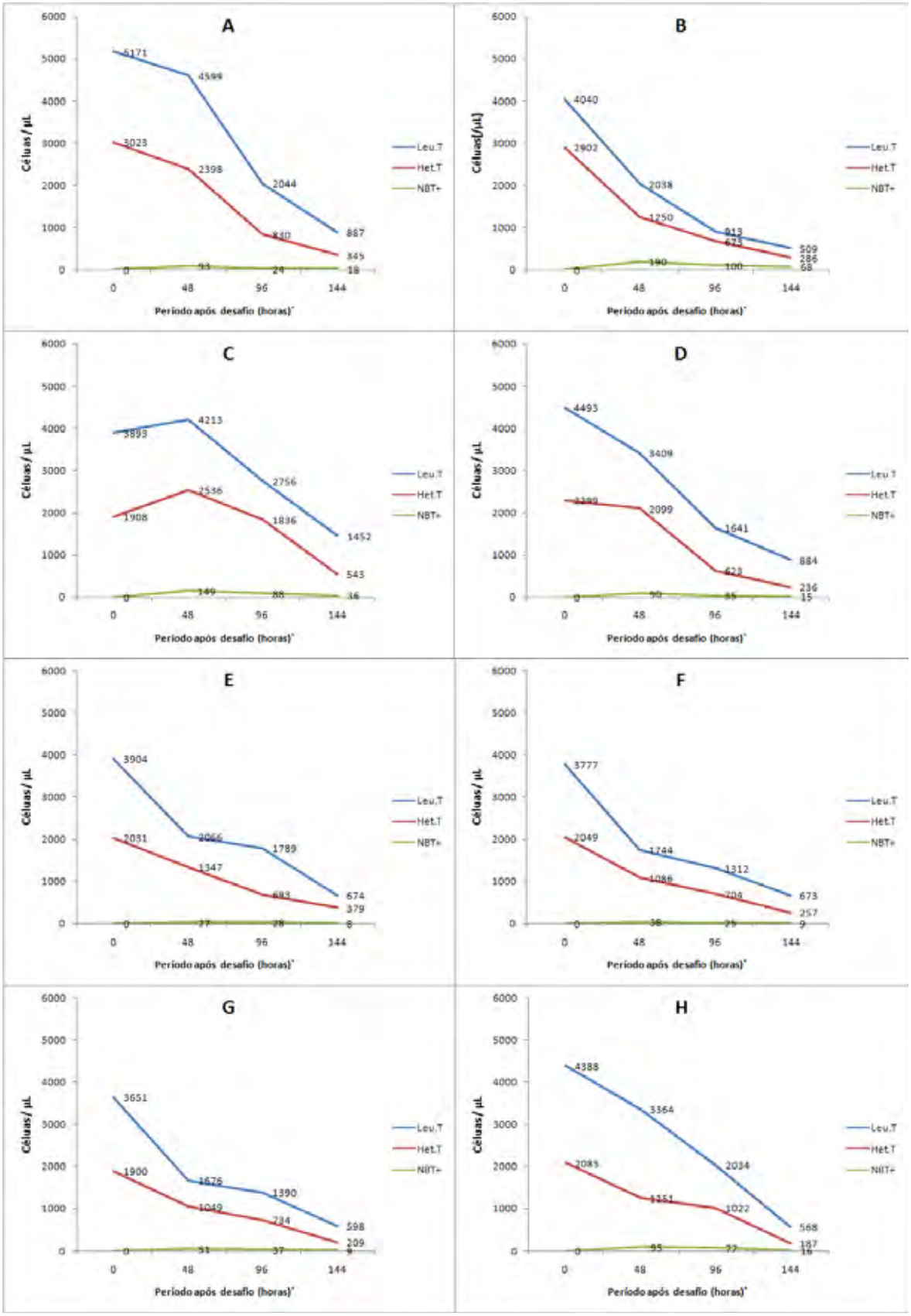

Figura 1. Média dos valores leucométricos das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22. Resultados expressos em células/µL. Leu.T: Leucócitos totais, Het.T: Heterófilos absolutos, NBT+: Heterófilos com grânulos de ânion superperóxido.

Os tratamentos A e G apresentaram um percentual semelhante ao longo do experimento, onde também não apresentaram diferença significativa entre si. O tratamento F foi o grupo que menor apresentou heterófilos reativos, tendo ficado abaixo do tratamento A por todo o experimento, tendo um pico de 4% no coleta com 96 horas.

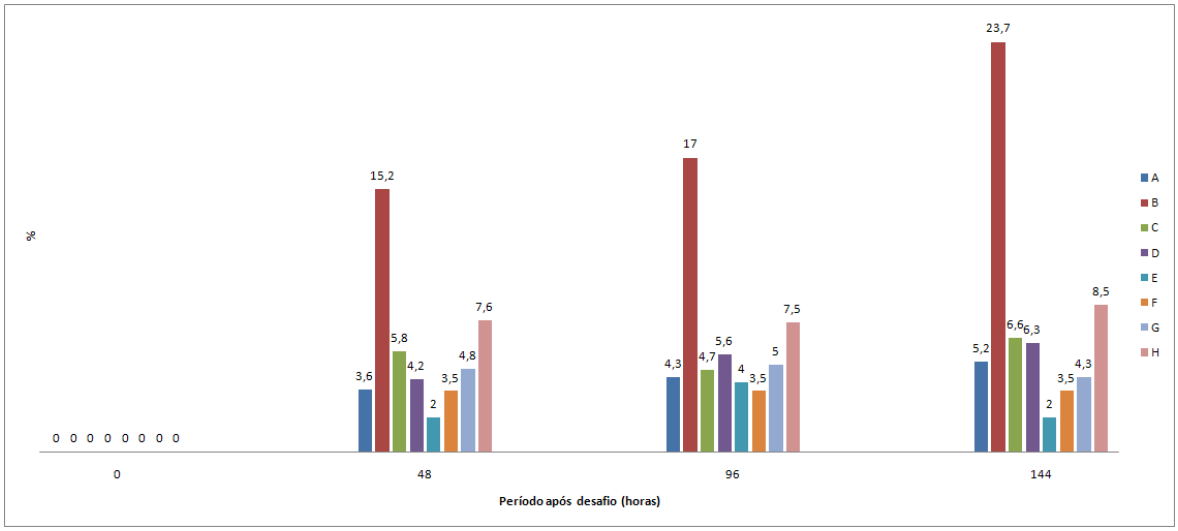

Figura 2. Relação percentual da população de heterófilo normal/heterófilo reativo entre os diferentes tratamentos ao longo do experimento. Média aritmética de doze repetições por tratamento.

5.3. Quantificação de IgG circulante

Todos os tratamentos apresentaram média crescente da produção de IgG ao longo do experimento (Tabela 6 e Figura 4), sendo que o tratamento B sobressaiu sobre os demais tratamentos seguido pelo E, que apresentou diferença significativa com $P<0,05$, quando comparado aos tratamentos F e G, que não apresentaram diferença significativa entre si ($P>0,05$), mas diferiram dos tratamentos A, C, D e H, que também não apresentaram diferença entre si.

Tabela 4. Detecção de IgG de soro sangüíneo das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22. Resultados expressos em coeficiente ELISA.

Tratamento	Período após desafio (horas)*			
	0	48	96	144
A - Cl	0.042Aa**	0.070Aa	0.271Ba	0.421Ba
B - ST	0.161Aa	0.460Bb	0.932Cb	2.534Dc
C - Pb	0.040Aa	0.133Aa	0.242Aa	0.509Ba
D - P22	0.034Aa	0.049Aa	0.187Aa	0.338Aa
E - ST+Pb	0.164Aa	0.736Bc	1.231Cc	1.316Cb
F - ST+P22	0.196Aa	0.345Aa	0.568Ba	0.649Ba
G - ST+Pb+P22	0.048Aa	0.322Ba	0.380Ba	0.564Ba
H - Pb+P22	0.041Aa	0.231Aa	0.316Aa	0.528Aa

Cl: controle, ST: *Salmonella* Typhimurium, Pb: probiótico, P22: Bacteriófago P22.
*Média aritmética de doze repetições por tratamento.
**Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos em cada coleta (coluna) e letras maiúsculas comparam as médias do período das coletas (linha). Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente (P > 0,05).

Entre as coletas apenas os tratamentos B e E apresentaram diferença significativa na produção de IgG, tendo o tratamento E apresentado maior significância nas coletas 48 e 96 horas sobre o tratamento B, com uma estabilização entre as coletas 96 e 144 horas, com isso o tratamento B superou o E na ultima coleta.

Ao longo das coletas, os tratamentos A, F e H não apresentaram diferença significativa entre a coleta 0-48 horas e 96-144 horas, só apresentando entre as coletas 48-96 horas. O tratamento C não apresentou diferença significativa entre as coletas 0-48-96 horas, com diferença entre as coletas 96-144 horas. O tratamento G apresentou diferença significativa nas coletas 48-96-144 horas sobre a coleta 0 hora, mas sem diferença entre elas. O tratamento E apresentou diferença entre a coleta 0-48 horas e das coletas 96-144 horas sobre a 48 horas, mas sem diferença significativa entre estas ultimas. O tratamento B apresentou diferença significativa entre todas as coletas, já o tratamento D não apresentou diferença entre as coletas ao longo o experimento.

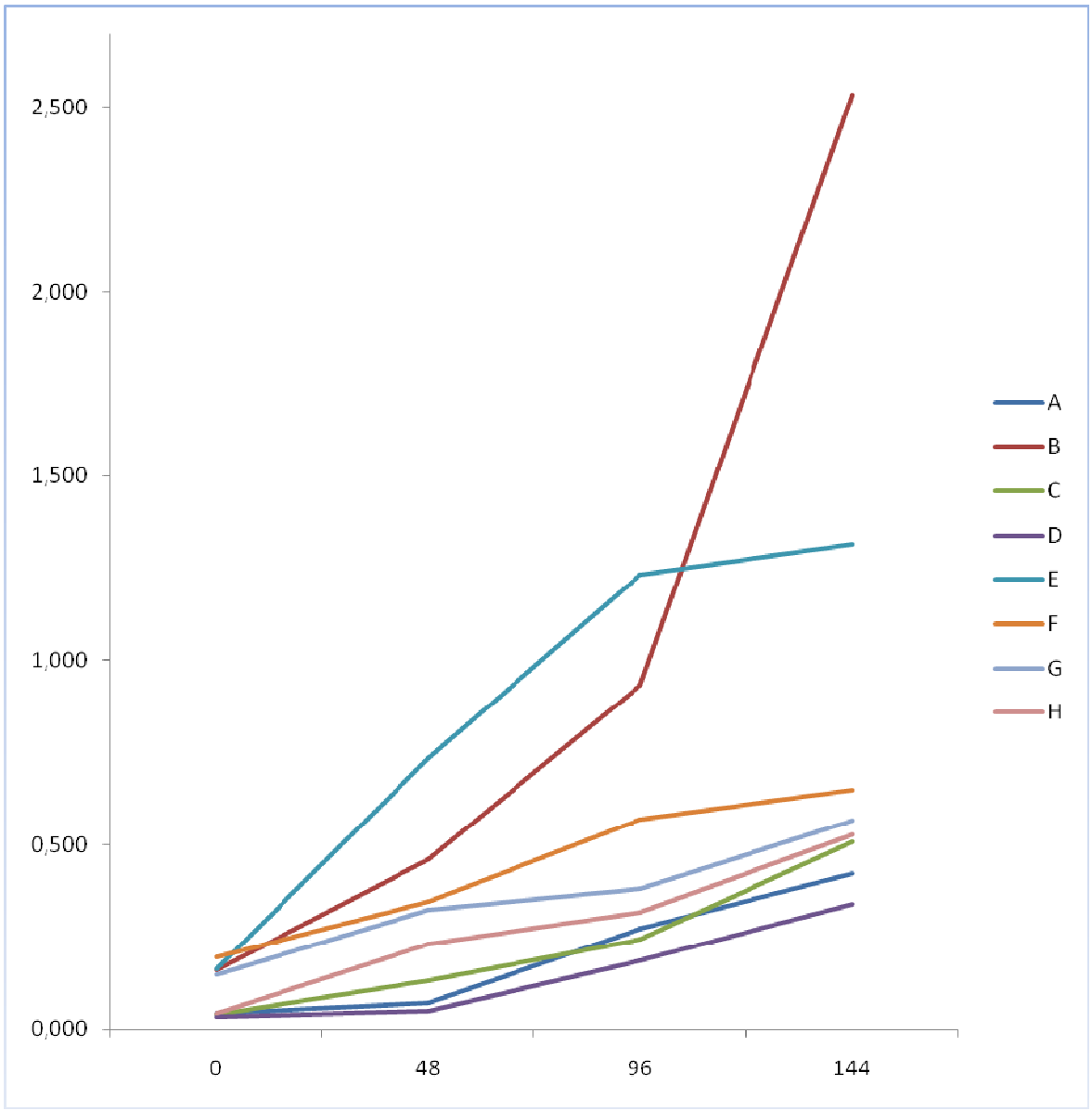

Figura 3. Detecção de IgG do soro sangüíneo das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22.

5.4. Índice de massa corporal

O índice de massa corporal dos diferentes tratamentos durante as quatro coletas está expresso na Tabela 3 e Figura 1.

Tabela 5. Média do peso corporal de aves desafiadas com *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22; Resultados expressos em gramas (g).

Tratamento	Período após desafio (horas)*			
	0	48	96	144
A - Cl	42,93Aa**	42,78Bc	65,79Cb	97,80Dc
B - ST	39,05Aa	35,39Aa	41,08Aa	60,28Ba
C - Pb	42,62Aa	47,87Bc	76,56Cc	104,98Dd
D - P22	42.45Aa	52,25Bc	67,03Cb	87,33Db
E - ST+Pb	41,23Aa	52,30Ab	80,41Bd	115,28Ce
F - ST+P22	43,25Aa	51,66Ac	73,92Bc	98,36Cb
G - ST+Pb+P22	42.37Aa	51,13Bc	74.94Cc	106.73Dd
H - Pb+P22	42.12Aa	45,22Ab	63.69Bb	94,67Cb

Cl: controle, ST: *Salmonella* Typhimurium, Pb: probiótico, P22: Bacteriófago P22.
*Média aritmética de doze repetições por tratamento.
**Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos em cada coleta (coluna) e letras maiúsculas comparam as médias do período das coletas (linha). Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente (P > 0,05).

Com exceção do tratamento B, todos os demais apresentaram ganho de peso contínuo, tendo o tratamento E sobressaído sobre os demais com diferença significativa (P<0,05), seguido pelos tratamentos A, C e G, que não apresentaram diferença significativa (P>0,05) entre si, mas apresentaram diferença em relação aos tratamentos D, F e H, que também não apresentaram diferença significativa entre si. O tratamento B não apresentou diferença significativa sobre nenhum tratamento.

Entre as coletas, os tratamentos estavam com peso semelhante com 0 horas, não apresentando diferença significativa entre si. Com 48 horas os tratamentos A, C, D, E e G aumentaram significativamente de peso sobre os tratamentos F e H, tendo o tratamento B apresentado redução de peso com diferença significativa sobre os demais tratamentos.

Na coleta com 96 horas o tratamento retornou a ganhar peso, porém sem diferença significativa sobre os demais tratamentos. Os tratamentos A, C, E e G mantiveram um ganho significativo de peso em relação aos tratamentos D, F e H, que não apresentaram diferença significativa entre si.

Com 144 horas todos os tratamentos apresentaram um ganho de peso progressivo tendo o tratamento E apresentado maior diferença significativa com P<0,05 sobre os tratamentos C e G, que não apresentaram diferença significativa entre si, mas diferiram dos tratamentos A, F e H, que também não apresentaram

diferença significativa entre si, mas prevaleceram sobre o tratamento D. O tratamento B apesar de manter a linha de ganho de peso observado na terceira coleta não apresentou diferença significativa sobre os outros tratamentos.

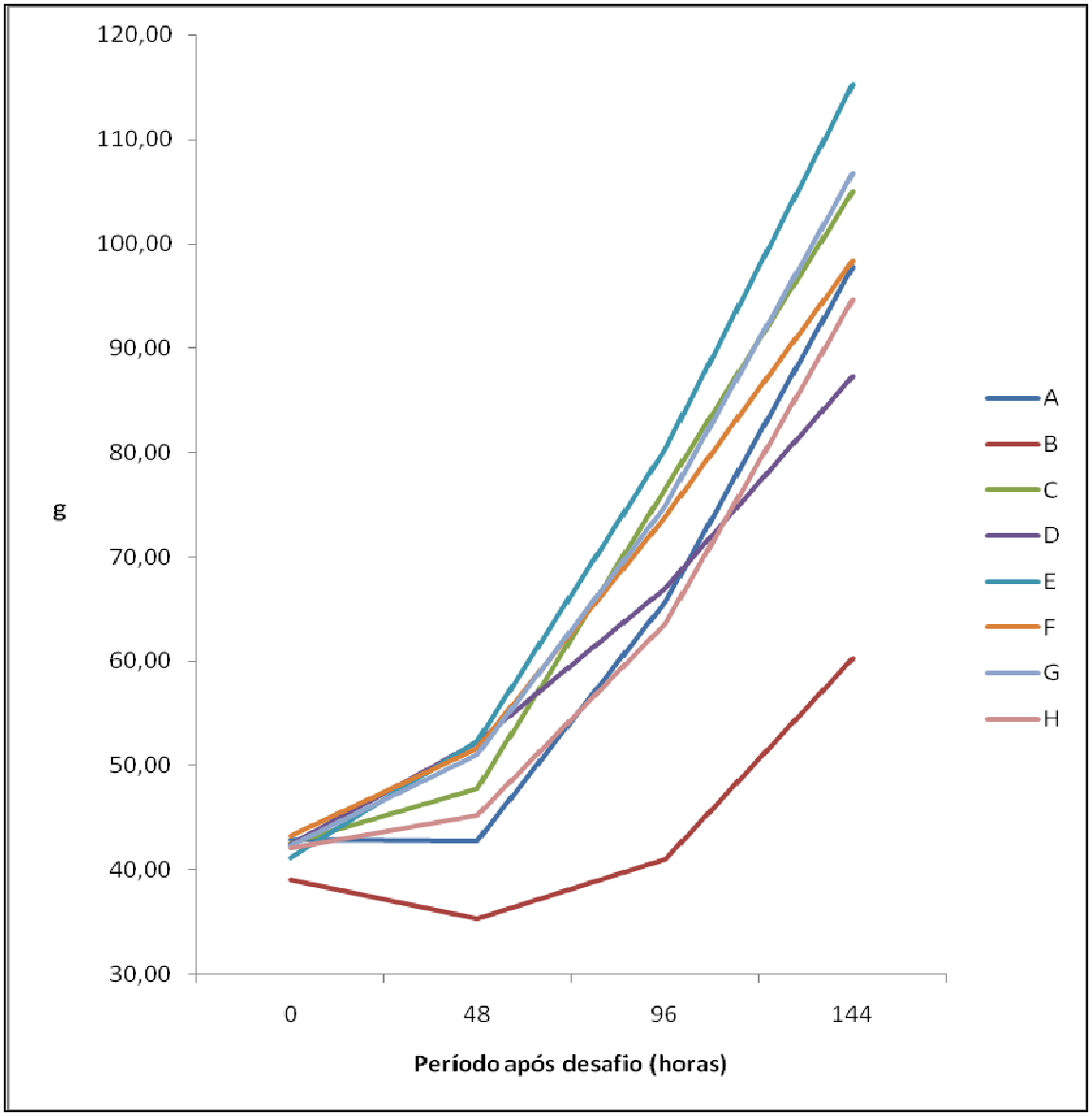

Figura 4. Média do peso corporal das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22.

Analisando o desempenho individual de cada tratamento ao longo do experimento observou-se que os tratamentos A, D, E e G apresentaram diferença significante entre as coletas 0–48–96–144 horas. O tratamento B não apresentou diferença significante entre as coletas 0–48–96 horas, deferindo apenas na coleta com 144 horas das anteriores. Já os tratamentos C, F e H não apresentaram

diferença significante entre as coletas 0–48 horas, mas apresentaram um aumento significativo progressivo a partir de 96 horas.

5.5. Mensuração das vilosidades intestinais

Os resultados da mensuração das vilosidades duodenais e das criptas cecais estão expressos na figura 5 e tabela 7.

Todos os tratamentos apresentaram média crescente no tamanho das vilosidades duodenais e criptas cecais ao longo do experimento, sendo que os tratamentos com *Lactobacillus* (C, E, G e H) sobressaíram sobre os demais com diferença significativa de P<0,05. Os tratamentos A, D e F não apresentaram diferença significativa entre si (P>0,05). Mesmo apresentando números inferiores aos demais grupos, o tratamento B também não apresentou diferença significativa nas medidas de comprimento das vilosidades duodenais dos tratamentos A, D e F, tendo diferenciado apenas no comprimento das criptas cecais, sendo o tratamento que apresentou o menor tamanho de criptas.

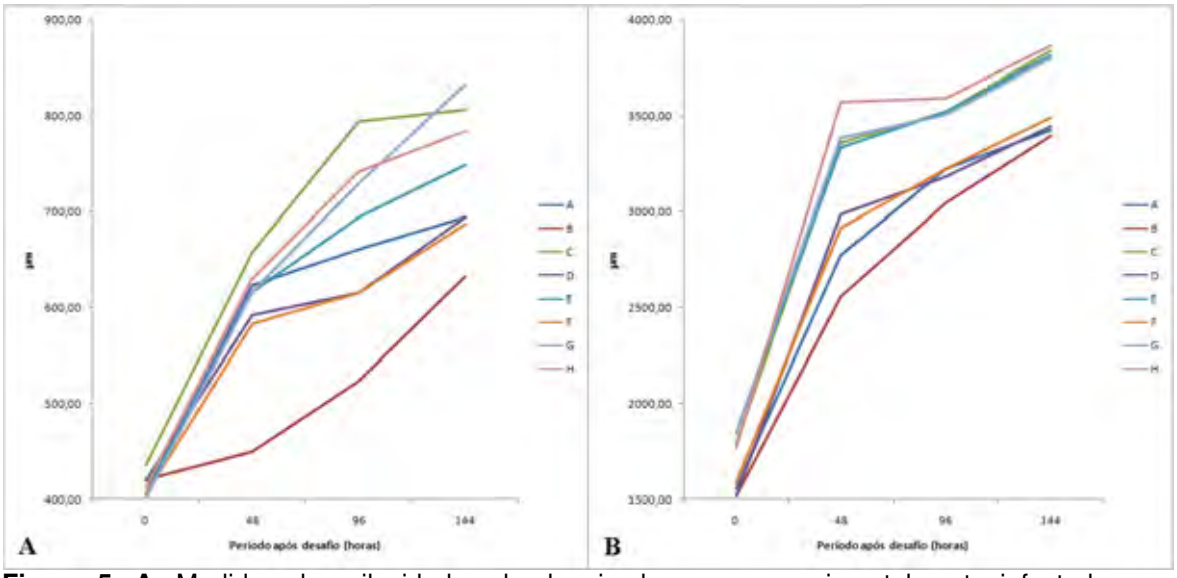

Figura 5. A: Medidas das vilosidades duodenais das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22. **B:** Medidas das criptas cecais das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22.

Ao longo do experimento não houve diferença significativa dos grupos entre as coletas (P>0,05)

Tabela 7. Tamanho das vilosidades duodenais e criptas cecais das aves experimentalmente infectadas por *Salmonella* Typhimurium e tratadas com probiótico e bacteriófago P22 (Valores expressos em µm). Duo: Duodeno; Cec: Ceco.

Tratamento	Órgão	Período após desafio (horas)*			
		0	48	96	144
A - Cl	Duodeno	1556,77Ba**	2771,74Ba	3225,26Ba	3423,45Ba
	Cecos	406,43Aa	623,26Aa	660,36Aa	694,34Aa
B - ST	Duodeno	1515,77Ba	2556,00Ba	3047,64Ba	3394,61Ba
	Cecos	419,89Aa	449,36Ba	523,38Ba	632,46Ba
C - Pb	Duodeno	1785,88Aa	3360,75Aa	3519,91Aa	3841,87Aa
	Cecos	435,68Aa	657,98Aa	793,95Aa	806,50Aa
D - P22	Duodeno	1515,52Ba	2987,30Ba	3180,79Ba	3445,91Ba
	Cecos	418,78Aa	592,10Aa	614,92Aa	694,34Aa
E - ST+Pb	Duodeno	1848,54Aa	3335,75Aa	3519,9Aa	3816,87Aa
	Cecos	405,40Aa	616,23Aa	693,95Aa	748,45Aa
F - ST+P22	Duodeno	1585,48Ba	2912,88Ba	3220,77Ba	3491,11Ba
	Cecos	405,07Aa	583,12Aa	614,92Aa	686,84Aa
G - ST+Pb+P22	Duodeno	1845,53Aa	3384,93Aa	3506,93Aa	3801,07Aa
	Cecos	401,04Aa	616,60Aa	729,14Aa	832,92Aa
H - Pb+P22	Duodeno	1766,68Aa	3570,15Aa	3593,24Aa	3866,32Aa
	Cecos	412,23Aa	630,30Aa	741,36Aa	784,28Aa

Cl: controle, ST: *Salmonella* Typhimurium, Pb: probiótico, P22: Bacteriófago P22.
*Média aritmética de doze repetições por tratamento.
**Letras minúsculas comparam as médias dos tratamentos em cada coleta (coluna) e letras maiúsculas comparam as médias do período das coletas (linha). Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente ($P > 0,05$).

Discussão

6. Discussão

Infecções paratifóides são comuns em aves jovens e dificilmente aves com mais de 14 dias de idade apresentam sinais clínicos (BERCHIERI JÚNIOR, 2000). Com exceção das aves do tratamento desafiado com ST-Nal® (B) as demais não apresentaram sintomatologia clínica de infecção durante o experimento, ou seja, apatia, penas arrepiadas, asas caídas, diarréia e mortalidade. O tratamento B apresentou diarréia discreta durante o primeiro e o segundo dia após o desafio, tendo cessado nos dias seguintes, o que corrobora com os resultados de Zhang *et al*. (2003), que descreve que inóculos de 10^4 até 10^7 UFC podem causar diarréia persistente por dois ou até oito dias pós-infecção, além de emagrecimento e retardo no ganho de peso durante os sete dias de experimento (Figura 1), sem mortalidade, corroborando com as afirmações Gast (1997) e Rampling *et al*. (1989), que relatam que a maioria dos casos de infecções paratifóides são assintomáticas, tendendo a persistir durante toda a criação, chegando até a idade de abate.

Diferentemente dos resultados encontrados por Fiorentin *et al*. (2005), Toro *et al*. (2005), Andreatti Filho *et al*. (2007) e Atterbury *et al*. (2007), que relatam uma redução na UFC de *Salmonella* em aves tratadas com fagoterapia, conseguiu-se a eliminação desta no presente estudo, visto que só se identificou a presença ST-Nal® no tratamento B. Nos estudos supracitados foram utilizados bacteriófagos isolados do meio ambiente, apresentando atividade lítica nas amostras específicas de cada estudo.

No presente estudo utilizou-se o bacteriófago P22, uma espécie muito conhecida e estudada, cujo hospedeiro específico é a *S*. Typhimurium. É possível que essa especificidade tenha contribuído para o êxito na eliminação da amostra utilizada nesse estudo, conforme observado no tratamento desafiado com ST-Nal® e tratado com P22 (F).

A ação inibitória de amostras de *Lactobacillus*, utilizadas como probióticos, na prevenção de *Salmonella* já foi demonstrada *in vivo* por Gusils *et al*. (1998), Pascual *et al*. (1999), Higgins *et al*. (2008) e Vicente *et al*. (2008). Esse efeito inibitório é mais acentuado quando se utilizam culturas puras em associação

(SARRA & BADINI, 1996). Conforme os resultados encontrados no tratamento E, verificou-se a capacidade da eliminação da ST-Nal® no intestino das aves por parte do *mix* de *Lactobacillus*, diferentemente de Revolledo *et al*. (2003), que relatou apenas a diminuição da concentração de *Salmonella* em aves tratadas com produtos de exclusão competitiva.

A ausência da detecção da amostra ST-Nal® no experimento II corrobora com as afirmações de Sandler *et al*. (1969) e Stuart (1984), onde o uso de probióticos na dieta de aves contribui na manutenção de um ecossistema intestinal estável, impedindo a colonização de bactérias patogênicas.

Diferentemente do observado por Toro *et al*. (2005) que somente reduziu a quantidade de *Salmonella* na microbiota intestinal de pintos experimentalmente infectados ao associar bacteriófagos selvagens com produtos de exclusão competitiva, a associação do P22 com o probiótico modulado nesse estudo, verificou a eliminação da ST-Nal® nas aves no tratamento G (Tabela 2).

As doses infectantes experimentais usualmente encontradas na literatura variam entre 10^2 e 10^8 UFC/ave (OKAMOTO, 2005), neste estudo utilizou-se um inoculo de 10^4 UFC/ave por via intra-esofágica, constatando-se seu sucesso pela presença da ST-Nal® verificada no tratamento B. A constatação da presença intestinal da ST-Nal® nos cecos está de acordo com outros relatos, que reportam que esta é a porção intestinal na qual a bactéria normalmente se fixa devido à presença de receptores específicos (BARROW *et al*., 1988; IMPEY & MEAD, 1989; ANDREATTI FILHO *et al*., 1993; HARGIS *et al*., 1995).

Os bacteriófagos são parasitas hospedeiro-específico que invadem somente sua célula alvo, sem capacidade de agredir outras espécies bacterianas ou mesmo células eucarióticas (LENSKI, 1988; MATSUZAKI *et al*., 2005). Durante o nosso experimento não houve recuperação do P22 nos cecos e nas fezes. No tratamento em que apenas se inoculou o P22 (D) e no que se inoculou o P22 com probiótico (H) este fato provavelmente ocorreu devido às aves não terem recebido ST-Nal® e, não encontrando sua célula alvo o P22 foi naturalmente excretado pelas fezes nas horas seguintes após terem recebido o inóculo fágico, justificando a que estes não tenham sido detectados após 24 horas. Nos tratamentos F e G a não recuperação do P22 possivelmente se deve a eliminação da ST-Nal®, seguindo-se a mesma hipótese do ocorrido nos tratamentos D e H, ou seja, o P22

foi naturalmente excretado pelas fezes nas horas seguintes, não sendo detectados após 24 horas. Toro *et al*. (2005) conseguiram recuperar as amostras de fagos utilizados, porém não houve a eliminação da amostra de *Salmonella* utilizada, apenas redução da quantidade bacteriana.

A leucopenia acompanhada de heterofilopenia seguida de heterofilocitose nas coletas seguintes, observada no tratamento B (aves apenas desafiadas com ST-Nal®), está em concordância com Anderson & Stephens (1970) e Cardoso *et al*. (2003), e ocorre devido a invasão da mucosa intestinal pela *Salmonella* estimular o recrutamento massivo de células polimorfonucleares nos sítios inflamatórios da lâmina própria (PORTER JÚNIOR & HOLT, 1993; MCCORMICK *et al*., 1995).

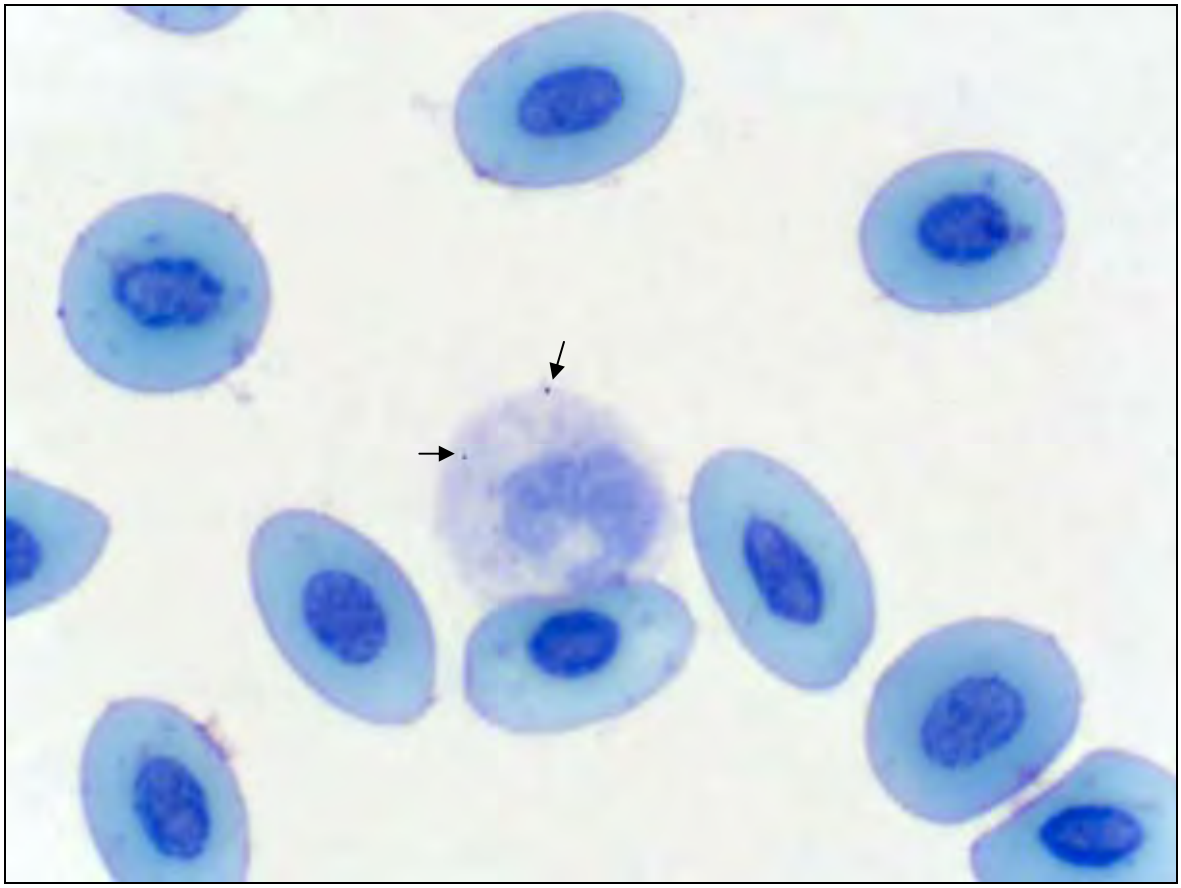

Figura 6. Heterófilo ativado contendo grânulos preto-azulados de ânion superperóxido (seta) em seu citoplasma (GIEMSA, 1000x).

O presente estudo detectou a presença de heterófilos circulantes contendo ânion superóxido (Figura 6) em todos os tratamentos experimentais a partir do

terceiro dia de experimento (período de 48 horas após o desafio), contrariando os achados de Wigley *et al*. (1999), que não observaram a produção de superóxidos pelo teste de NBT em galinhas.

A ausência de heterófilos reativos no teste de NBT nas aves com um dia de idade observada em todos os grupos confirma as afirmações de Ziprin *et al*. (1989), Kogut *et al*. (1994), Barrow (2000) e Beal *et al*. (2004) que associam a alta susceptibilidade de infecção por *Salmonella* em aves recém-nascidas a um sistema imune imaturo durante a primeira semana de vida, sendo os quatro primeiros dias de vida os mais críticos.

A maior quantidade de heterófilos reativos no tratamento B se deve ao fato da *Salmonella* estimular a atividade biológica dos heterófilos no sangue periférico das aves (KOGUT *et al*., 1995), sendo que o grau deste estimulo é dependente da patogenicidade da cepa invasora e do tempo de contato com o hospedeiro (ANDERSON & STEPHENS, 1970; ZIPRIN, 1997).

Os tratamentos C e H também apresentaram quantidade de heterófilos acima do normal na população leucocitária das aves, com a quantidade de heterófilos reativos acima do tratamento controle (A), corroborando com os achados de Farnnel *et al*. (2006).

Apesar de estar dentro dos parâmetros leucocitários e estatisticamente semelhantes ao tratamento A, os tratamentos E, F e G apresentaram valores abaixo deste. Sabendo-se que o estímulo para a resposta imune inata tem como umas das relações o tempo de exposição do hospedeiro ao agente, é provável que tanto a ação fágica, como a dos *Lactobacillus*, e ambas associadas, apresentaram um período curto para eliminar a ST-Nal® dos intestinos das aves.

O P22, por não invadir células eucarióticas e se ligar apenas a receptores específicos da parede celular da *Salmonella* (BAXA *et al*., 1996; MATSUZAKI *et al*., 2005) não atrai ou estimula a produção de leucócitos, como observado no tratamento D, sendo que o perfil apresentado por este grupo estatisticamente não diferiu do tratamento A.

O uso de ELISA para detecção de IgG no soro aviário em infecções experimentais com *Salmonella* é uma técnica bastante utilizada e confiável (HASSAN *et al*., 1990; OLIVEIRA *et al*., 2006). A IgG é a globulina mais abundante no soro sanguíneo aviário, sendo que as aves já recebem certa quantidade de IgG materna via ovo, concentrados principalmente no oócito,

incorporado ainda na fase de maturação do folículo ovariano (ROTH *et al*., 1976; TIZARD, 2002; KITAGUCHI *et al*., 2008).

Apesar de não ter apresentado diferença significativa, notou-se que na primeira coleta de soro os tratamentos que receberam o inóculo de ST-Nal® apresentaram quantidade inicial de IgG um pouco superior aos não desafiados, onde se infere que a resposta inicial de produção tenha iniciado (Figura 4). O comportamento de produção de IgG observado no tratamento B está de acordo com a literatura, que reporta o início de produção em torno de 4 dias pós-infecção e tempo médio de pico de 7 dias, coincidindo com o declínio de IgM, atingindo a quantidade máxima de IgG com 15 dias após o estímulo inicial (MOTICKA, 1975; BARROW, 1992; TIZARD, 2002; ISHOLA *et al*., 2008).

Embora estatisticamente não significativa observou-se que os tratamentos C e H apresentaram quantidade maior de IgG circulante quando comparado ao tratamento A. Essa atividade imunomoduladora por parte dos *Lactobacillus* na produção de IgG já foi demonstrando por Ogawa *et al*. (2006), sendo melhor quando se administra probiótico em conjunto com prebiótico.

O tratamento E apresentou produção crescente de IgG, maior que a do tratamento B, sendo que a partir do período de 96 horas após o desafio essa produção diminuiu, como observado por Tayeb *et al*. (2007), provavelmente devido a *Salmonella* e *Lactobacillus* competirem pelos mesmo sítios de adesão, diminuindo assim a produção de imunoglobulinas (SILLAMPÄÄ, 2001; TAYEB *et al*., 2007). A quantidade de IgG no tratamento F foi significativamente inferior quando comparado aos tratamentos B e E. Este fato, muito provavelmente, ocorreu devido ao tempo de exposição da ST-Nal® aos sítios de fixação na mucosa intestinal, compreendendo-se que a ação lítica dos fagos foi mais rápida para eliminar a *Salmonella*.

Ao observar que a quantidade de IgG do tratamento G foi inferior a dos tratamentos E e F, especula-se que a eliminação da ST-Nal® foi mais rápida e possivelmente mais eficiente (Figura 4).

Noujain *et al*. (2008) e Okamoto *et al*. (2007) relataram que o uso contínuo de *Lactobacillus* por via oral proporciona maior concentração de IgA na mucosa intestinal e de linfócitos T na lâmina própria intestinal. Conforme observado no tratamento C, a aplicação do *mix* de *Lactobacillus* aumentou a quantidade de leucócitos e de heterófilos na corrente circulatória das aves, com quantidade

significativa de heterófilos reativos. Mediante tal achado, supõe-se que o *Lactobacillus* apresenta não só uma ação imunomoduladora local, mas também imunoestimuladora sistêmica.

O P22, por não invadir células eucarióticas e se ligar apenas a receptores específicos da parede celular da *Salmonella* (BAXA *et al.*, 1996; MATSUZAKI *et al.*, 2005) não estimulou a produção de IgG, como observado no tratamento D.

O bom desempenho de ganho de peso apresentado pelas aves que receberam doses diárias de *Lactobacillus* já foi reportado por Henrique (1998), Jin *et al.* (1998), Corrêa *et al.* (2003), Kalavathy *et al.* (2003), Okamoto (2005), Ramíres Reyes *et al.* (2005) e Zacconi *et al.* (2005). Esse ganho de peso é atribuído ao fato das bactérias ácido-láticas proporcionarem a disponibilidade de nutrientes digeríveis, vitaminas e enzimas digestivas que ajudam na digestão, síntese e absorção de vitaminas e minerais, facilitando no metabolismo dos alimentos (BATT *et al.*, 1996; KALANTZOPOULOS, 1997; NIMRUZI, 1999), justificando os resultados observados nos tratamentos C, E, G e H que receberam o *mix* de *Lactobacillus* neste estudo. Colichón *et al.* (1991) reportaram que o uso oral de *Lactobacillus* nos primeiros dias de vida das aves pode aumentar até 4,65% o ganho de peso.

Semelhante ao observado por Carli (2006) os tratamentos E e G apresentaram maior peso em relação aos demais mesmo tendo recebido ST-Nal®. Isso ocorre pelo fato da infecção paratifóide não interferir decisivamente na produtividade em frangos de corte (SILVA, 1994) e muito provavelmente depois da eliminação da ST-Nal® e do estabelecimento dos *Lactobacillus* no lúmen e na mucosa intestinal, estes puderam exercer os efeitos benéficos já conhecidos e observados no tratamento C (Figura 1).

A parede epitelial intestinal constitui uma barreira que protege o organismo do ataque de patógenos luminais, sendo que a redução da proliferação das células epiteliais e/ou a atrofia da mucosa intestinal permitem a invasão de patógenos (DEITCH *et al.*, 1995; ALVERDY *et al.*, 1996). Probióticos estimulam a proliferação de células epiteliais intestinais, sendo que o estimulo é relacionado à produção de ácidos graxos de cadeia curta pelo metabolismo de bactérias fermentadoras (SAKATA, 1987; ICHIKAWA *et al.*, 1999). Neste estudo todos os tratamentos que receberam o *mix* de *Lactobacillus* (C, E, G, e H) apresentaram aumento significativo no tamanho das vilosidades duodenais e das criptas cecais

em relação aos demais grupos (Figura 5), semelhante ao observado por Sakata (1987), mas diferente de Ferreira *et al*. (2006) e Okamoto *et al*. (2009), que não observaram diferença no tamanho destas estruturas entre aves suplementadas com *Lactobacillus* e não tratadas.

O tratamento inoculado somente com ST-Nal® (B) apresentou alterações no comprimento das vilosidades duodenais e com o decorrer do tempo houve recuperação natural do tamanho destas, semelhante ao observado por Andreatti Filho *et al.* (2000) e Okamoto *et al*. (2009). A atrofia das vilosidades observada na avaliação histológica justifica a ocorrência de diarréia nos dois primeiros dias do experimento, além da alteração no equilíbrio hidrossalino da mucosa, por meio do bloqueio da absorção de cloreto de sódio pelas microvilosidades e estímulo da excreção desse sal pelas criptas celulares (ZHANG *et al*. 2003; ANDREATTI FILHO, 2007).

Conclusões

7. Conclusões

Em linhas gerais o tratamento com o bacteriófago em associação com o probiótico foi eficiente e satisfatório na eliminação da *Salmonella*, supondo-se que a atividade competitiva exercida pelas cepas de *Lactobacillus* e a parasitária do P22 foi responsável pela eliminação, sendo esta hipótese suportada pela ausência de resposta humoral e celular no tratamento G, bem como também pelo ganho de peso apresentado, promovendo também um efeito protetor contra novas infecções.

O tratamento com bacteriófago também determinou a eliminação da *Salmonella*, sem alterações sistêmicas nas aves, verificada pela ausência de ativação do sistema imune e sem influências no ganho de peso.

Já o tratamento com probiótico também apresentou a eliminação da *Salmonella,* com ganho de peso significativo, aumento da produção de IgG e ainda foi capaz de determinar uma ação imunoestimulante sistêmica nas aves.

Pintos de corte com um dia de idade apresentam uma inabilidade inicial da atividade de explosão respiratória heterofílica, senda esta atividade apresentada conforme as aves envelhecem.

O tratamento via oral utilizando o bacteriófago P22 em associação com o *mix* diário de *Lactobacillus* no controle da *Salmonella* Typhimurium intestinal foi eficiente, porém novos estudos devem ser realizados para complementar a aplicação terapêutica efetuada, bem como o melhor entendimento da dinâmica de ação dos agentes biológicos utilizados e também os efeitos imunoestimulantes determinados pelos *Lactobacillus* observados neste estudo e, também para melhor se compreender o amadurecimento da imunidade inata em aves jovens.

Referências

8. Referências

ACKERMANN, H.W. Bacteriophage taxonomy in 1987. **Microbiological Science**, n.4, v.7, p.214-218, 1987.

ALVERDY, J.C.; AOYS, E.; MOSS, G.S. Effect of commercially available chemically defined liquid diets on the intestinal microflora and bacterial translocation from the gut. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, n.1, p.1-6, 1990.

ANDERSON, E.L.; STEPHENS, J.F. Changes in the differential leucocyte count of chicks inoculed with *Salmonella*. **Applied Microbiology**, v.19, n.5, p.276-73, 1970.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; BALEN, L. Efeito da via de inoculação na patogenicidade de amostras patogênica e apatogênica de *Escherichia coli* em galinha. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, p.475-486, 1993.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SAMPAIO, H.M. Probióticos e prebióticos: realidade na avicultura industrial moderna. **Revista de Educação Continuada. Conselho Regional de Medicina Veterinária - CRMV-SP**, v.2, n.3, p.59-71, 1999.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; RIBEIRO, A.R.; KONDO, N.; CURI, P.R. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis, **Brazilian Journal Microbiology**, v.31, p.107-112, 2000.

ANDREATTI FILHO, R.L.; FERNANDES, S.A.; BORETTI, L.P.; BARROS, M.R.; DEL BEM, S.R.; FONTANA, A.; SAMPAIO, H.M.; SAVONA, E.N. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista da Educação Continuada do CRMV-SP**, v.4, n.3, p.90-101, 2001.

ANDREATTI FILHO, R.L.; HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; GAONA, G.; WOLFENDEN, A.D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in vitro and in vivo. **Poultry Science**, v.86, n.9, p.1904-1909, 2007.

ANDREATTI FILHO, R.L. Paratifo Aviário. In: ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2007. p. 96-111.

ATTERBURY, R.J.; VAN BERGEN, M.A.P.; ORTIZ, F.; LOVELL, M.A.; HARRIS, J.A.; DE BOER, A.; WAGENAAR, J.A.; ALLEN, V.M.; BARROW, P.A. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.14, p.4543-4549, 2007.

AXELSSON, L.L.C.; CHUNG, W.; DOBROGOSZ, J.; LINDGREN, S.E. Production of broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.2, n.2, p.131-136, 1989.

BARROW, P.A.; SIMPSON, J.M.; LOVELL, M.A. Intestinal colonisation in the chicken by food-poisoning *Salmonella* serotypes: microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathology**, v.17, n.3, p.571-588. 1988.

BARROW, P.A. Further observations on the serological response to experimental *Salmonella typhimurium* in chickens measured by ELISA. **Epidemiology and Infection**, v.108, n.2, p.231-41, 1992.

BARROW, P.; LOVELL, M.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.5, n.3, p.294-298, 1998.

BARROW, P.A. The paratyphoid salmonellae. **Revue Scientifique et Technique**, v.19, n.2, p.351-375, 2000.

BATT, R.M.; RUTGER H.C.; SANCAK, A.A. Enteric bacteria: friend or foe?. **Journal of Small Animal Practice**, v.37, n.6, n.261-267, 1996.

BAXA, U.; STEINBACHER, S.; MILLER, S.; WEINTRAUB, A.; HUBER, R.; SECKLER, R. Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor, *Salmonella* O-antigen polysaccharide. **Biophysical Journal**, v.71, n.4, p.2040-2048, 1996.

BEAL, R.K.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; HULME, S.D.; BARROW, P.A.; SMITH, A.L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.100, n.3, p.151-164, 2004

BERCHIERI JÚNIOR, A.; LOVELL, L.A.; BARROW, P. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. **Research in Microbiology**, v.142, n.5, p.541-549, 1991.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p.185-195.

BERGETT, P.B.; POTEETET, A.R. Structure and functions of the bacteriophage P22 tail protein. **Journal of Virology**, v.34, n.1, p.234-243, 1980.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 23º. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984. p.1234.

BIELKE, L.R.; HIGGINS, S.E.; DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Use of wide-host-range bacteriophages to reduce *Salmonella* on poultry products. **International Journal of Poultry Science**, v.6, n.10, p.754-757, 2007.

BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K.; LIPINSKA, B.; TAYLOR, A. The R gene product of bacteriophage lambda is the murein transglycosylase. **Molecular and General Genetics**, v.184, n.1, p.111-114, 1981.

BISWAS, B.; ADHYA, S.; WASHART, P.; PAUL, B.; TROSTEL, A.N.; POWELL, B.; CARLTON, R.; MERRIL, C.R. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Infection and Immunity**, v.70, n.1. p.204-210, 2002.

BORIE, C.; ALBALA, I.; SÀNCHEZ, P.; SÁNCHEZ, M.L.; RAMÍREZ, S.; NAVARRO, C.; MORALES, M.A.; RETAMALES, J.; ROBESON, J. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. **Avian Diseases**, v.52, n.1, p.64-67, 2008.

BRADLEY, D.E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. **Bacteriology Revision**, v.31, n.4, p.230-314, 1967.

BRUNO, M.E.C.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Depletion of próton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.7, p.2255-2259, 1992.

BRÜSSOW, H. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. **Microbiology**, v.151, p.2133-2140, 2005.

CAMPBELL, T.W. **Avian Hematology and Citology**. 2.ed. Ames: Iowa State University Press, 1995. 104p.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M. Estudo hematológico em aves inoculadas com *Salmonella* Gallinarum. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.1, p.35-42, 2003.

CARLI, E.M. **Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiótico para o controle de *Salmonella* spp. em frangos de corte**. Santa Maria, 2006. 76p.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

CENTERS FOR DISEASES AND CONTROLS. Investigation Update: Outbreak of *Salmonella* Typhimurium Infections, 2008–2009. Atlanta, 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium/update.html>.

CERVENY, K.E.; DEPAOLA, A.; DUCKWORTH, S.H.; GULIG, P.A. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. **Infection and Immunity**, v.70, p.6251-6262, 2002.

CIARLINI, P.C.; ANTONIO, D. B. A.; BARBIERE, F.; BONELLO, F.L.; FEITOSA, F.L.F. Efeito da vacina contra brucelose bovina sobre a capacidade neutrofílica de redução do NBT. **ARS Veterinária**, v.21, n.2, p.251-256, 2005.

COCCONCELLI, P.S. Molecular aspects of *Lactobacillus* bacteriocins. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.43, p.37-44, 1993.

COLICHÓN, A.; COLUMBUS, I.; ROZA, M.; VENEGAS, E.; PRIETO, A. Efecto de la administración oral de *Lactobacillus acidophilus* vivos sobre el peso de ponedoras comerciales. Informe preliminar de los 30 primeros días de vida. **Mundo Avícola**, v.1, n.4, p.8-10, 1991.

CORRÊA, G.S.S.; GOMES, A.V.C.; CORRÊA, A.B.; SALLES, A.S.; MATTOS, E.S. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, n.4, p.467-473, 2003.

CRABTREE, S.; CRONAN JUNIOR, J.E. Facile and gentle method for quantitative lysis of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v.158, n.1, p.354-356, 1984.

DAHL, T.A.; MIDDEN, W.R.; HARTMEAN, P.E. Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. **Journal of Bacteriology**, v.171, n.4, p.2188-2194, 1989.

DANIELS, D.L.; SCHROEDER, J.L.; SZYBALSKI, W.; SANGER, F.; BLATTNER, F.R. Appendix I: A molecular map of coliphage lambda. In: HENDRIX, R.W.; ROBERTS, J.W.; STAHL, F.W.; WEISBERG, R.A. **Lambda II**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983. p.469-517.

DAY, C.A. Compettitive exclusion in poultry: a review. **Worcestershire: Life Care Products**, 1992. p.18.

DEITCH, E.A.; XU, D.; NARUHN, M.B.; DEITCH, D.C.; LU, Q.; MARINO, A.A. Elemental diet and IV-TPN-induced bacterial translocation is associated with loss of intestinal mucosal barrier function against bacteria**. Annals of Surgery**, v. 221, n.3, p.299-307, 1995.

DESMIDT, M.; VAN NEROM, A.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; YSEBAERT, M.T. Oxygenation activity of chicken blood phagocytes as measured by luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.53, n.3, p.303-311, 1996.

DUBLANCHET, A.; FRUCIANO, E. Brève histoire de la phagothérapie. **Médicine et Maladies Infectieuses**, v.38, p.415-420, 2008.

EUZÉBY, J.P. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (*ex* Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (Approved Lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (Approved Lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an Opinion. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.927-930, 1999.

FARNELL, M.B.; HE, H.; KOGUT, M.H. Differential Activation of Signal Transduction Pathways Mediating Oxidative Burst by Chicken Heterophils in Response to Stimulation with Lipopolysaccharide and Lipoteichoic Acid. **Inflammation**, v.27, n.4, p. 225-231, 2003.

FARNELL, M.B.; DONOGHUE, A.M.; DE LOS SANTOS, F.S.; BLORE, P.J.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G.; DONOGHUE, D.J. Upregulation of oxidative burst and degranulation in chicken heterophils stimulated with probiotic bacteria. **Poultry Science**, v.85, n.11, p.1900-1906, 2006.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **In**...45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.

FERREIRA, R.N..; CAVASIN-OLIVEIRA, G.M.; ALVES, C.B.; NASCIMENTO, M.N.; OLIVEIRA, E.M. Efeito da utilização de probiótico à base de *Lactobacillus* sp. sobre o ganho de peso e desenvolvimento da mucosa intestinal de ratos (*Rattus norvergicus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.217-222, 2006.

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

FRETER, R.; STAUFFER, E.; CLEVEN, D.; HOLDEMAN, L.V.; MOORE, E.C. Continuous-flow cultures as in vitro models of the ecology of large intestinal flora. **Infection and Immunity**, v.39, n.2, p.666-675, 1983.

FULLER, R. Probiotics in mam and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

GAST, R.K. Paratyphoid Infections. In: B.W. BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; MCDOUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. 10.ed., Ames: Iowa State University Press, 1997. p.97-121.

GARRETT, J.; FUSSELMAN, R.; HISE, J.; CHIOU, L.; SMITH-GRILLO, D.; SCHULZ, J.; YOUNG, R. Cell lysis by induction of cloned lambda lysis genes. **Molecular and General Genetics**, v.182, n.2, p.326-31, 1981.

GIL-TURNES, C.; SANTOS A.F.; CRUZ, F.W.; MONTEIRO, A.V. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.30, n.1, p.11-14, 1999.

GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Interations of food starter cultures and food borne pathogens: Lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. **Journal of Milk Food Technolology**, v.35, p.307-310, 1972.

GOODE, D.; ALLEN, V.M.; BARROW, P.A. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.8, p.5032-5036, 2003.

GUSILS, C.; PEREZ CHAIA, A.; APELLA, M.C.; AMOROSO, M.J.; OLIVER, G. Antibacterial activity of *Lactobacillus animalis* isolated from chicken against *Salmonella gallinarum*. **Microbiologie, Aliments, Nutrition**, v.16, n.4, p.265-273, 1998.

HANLON, G.W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.30, p.118-128, 2007.

HARGIS, B.M.; CALDWELL, D.J.; BREWER, R.L.; CORRIER, D.E.; DELOACH, J.R. Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. **Poultry Science**, v.74, n.9, p.1548-1552, 1995.

HARMON, B.G. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. **Poultry Science**, v.77, n.6, p.972-977, 1998.

HASSAN, J O.; BARROW, P.A.; MOCKETT, A.P.; MCLEOD, S. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. **The Veterinary Record**, v.126, n.21, p.519-522, 1990.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M.J.H. Probiotics: A general view. In: WOOD, B.J.B. **Lactic acid bacteria in health and disease**.1.ed. Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1992. p.151-170.

HE, H.; FARNELL, M.B.; KOGUT, M.H. Inflammatory agonist stimulation and signal pathway of oxidative burst in neonatal chicken heterophils. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.135, n.1, p.177-184, 2003.

HENRIQUE, A.P.F. **Efeito de antibiótico, probiótico e ácidos orgânicos e suas combinações sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de cort**e. Pirassununga, 1998. 88p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1998.

HERSKOWITZ, I.; SIGNER, E.R. A site essential for expression of all late genes in bacteriophage lambda. **Journal of Molecular Biology**, v.47, n.3, p.545-556, 1970.

HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; GUENTHER, K.L.; HUFF, W.; DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J.; HARGIS, B.M. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. **Poultry Science**, v.84, n.7, p.1141-1145, 2005.

HIGGINS, S.E; HIGGINS, JP.; WOLFENDEN, A.D.; HENDERSON, S.N.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; TELLEZ, A.; HARGIS, B.M. Evaluation of a *lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella enteritidis* in neonatal broiler chicks. **Poultry Science**, v.87, n.1, p.27-31, 2008.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.55-62, 1997.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. p.787.

HUMBERT, F.; LLANDE, F.; LHOSPITALIER, R.; SALVAT, G.; BENNEJAAN, G. Effect of four antibiotic additives on the *Salmonella* contamination of chicks protected by an adult cecal flora. **Avian Pathology**, v.20, p.577-584, 1991.

IMPEY, C.S.; MEAD, G.C. Fate of salmonellas in the alimentary tract of chicks pretreated with a mature caecal microflora to increase colonization resistance. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.469-475, 1989.

ICHIKAWA, H.; KUROIWA, T.; INAGAKI, A.; SHINEHA, R.; NISHIHIRA, T.; SATOMI, S.; SAKATA, T. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v.44, n.10, p.2119-2123, 1999.

ISHOLA, O.O.; HOLT, P.S. *Salmonella* Enteritidis experimental infection in chickens: Effects of challenge dose on serum immunoglobulin G antibody response. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.20, p.3783-3787, 2008.

ISRAEL, V. A model for the adsorption of phage P22 to *Salmonella typhimurium*. **Journal of General Virology**, v.40, p.669-673, 1978.

JANG, B.; JUNG, Y.; LIM, D. Development of a simple cell lysis method for recombinant DNA using bacteriophage lambda lysis genes. **Journal of Microbiology**, v.45, n.6, p.593-596, 2007.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, v.77, n.9, p.1259-1265, 1998.

KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe**, v.3, n.2, p.185-190, 1997.

KALAVATHY, R.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y.W. Effects of Lactobacillus cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. **British Poultry Science**, v.44, n.1, 2003, p.139-144, 2003.

KITAGUCHI, K.; MINOURA, M.; NORITAKE, M.; MIZUTANI, M.; KINOSHITA, K.; HORIO, F.; MURAI, A. Determination of immunoglobulin Y concentration in yolk extract prepared by water dilution method: Comparisons among three strains of chickens**. The Journal of Poultry Science**, v.45, n.1, p.82-87, 2008.

KOGUT, M.H.; TELLEZ, G.I.; MCGRUDER, E.D.; HARGIS, B.M.; WILLIAMS, J. D.; CORRIER, D.E.; DELOACH, J.R. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. **Microbial Pathogenesis**, v.16, n.2, p.141-151, 1994.

KOGUT, M.H.; MCGRUDER, E.D.; HARGIS, B.M.; CORRIER, D.E; DELOACH, J.R. *In vivo* activation of heterophil function in chickens following injection with *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines. **Journal of Leukocyte Biology**, v.57, n.1, p.56-62, 1995.

KOGUT, M.H.; GENOVESE, K.J.; LOWRY, V.K. Differential activation of signal transduction pathways mediating phagocytosis, oxidative burst, and degranulation by chicken heterophils in response to stimulation with opsonized *Salmonella enteritidis*. **Inflammation**, v.25, n.1, p.7-15, 2001.

LENSKI, R.E. Dynamics of interations between bacteria and virulent bacteriophages. **Advances in Microbiology Ecology**, v.10, p.1-44, 1988.

LENTZ, T.L. The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. **Journal of General Virology**, v.71, n.4, p.751-766, 1990.

LILLEHOJ, H.S.; CHUNG, K.S. Postnatal development of T-lymphocyte subpopulations in the intestinal intraepithelium and lamina propria in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.31, n.3, p.347-360, 1992.

LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L. Bacteriocins: nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v.3, n.2, p.62-66, 2005.

LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S.; NOUJAIM, J.C.; BARROS, M.R.; CROCCI, A.J. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, n.2, p.103-107, 2007.

LINDBERG, A.A. Bacterial surface carbohydrates and bacteriophage adsorption. In: SUTHERLAND, I.W. **Surface Carbohydrates of the Procaryotic Cell**. London: Academic Press, 1977. p.289-356.

MCCORMICK, B.A.; HOFMAN, P.M.; KIM, J.; CARNES, D.K.; MILLER S.I.; MADARA, J.L. Surface attachment of *Salmonella typhimurium* to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils. **The Journal of Cell Biology**, v.131, n.6, p.1599-1608, 1995.

MACHADO, J.N. Tendências atuais e futuras de colonizadores bacterianos intestinais na avicultura industrial. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS AGRARIAS, 4, 2000, Campinas, **Anais**: p. 18-27.

MALLINSON, E.T.; SNOEYENBOS, G.H. Salmonellosis. In: CHAIRMAN, G.G.P.; ARP, L.H.; DOMERMUTH, C.H.; PEARSON, J.E. **A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens**. 3. ed. Iowa: The American Assotiation of Avain Pathologists, 1989. p. 3-11.

MANDILARA, G.; MAVRIDOU, A.; LAMBIRI, M.; VATAPOULOS, A.; RIGAS, F. The use of bacteriophages for monitoring the microbiological quality of sewage sludge. **Environmetal Technology**, v.27, n.4, p.367-375, 2006.

MATSUZAKI, S.; RASHEL, M.; UCHIYAMA, J.; SAKURAI, S.; UJIHARA, T.; KURODA, M.; IKEUCHI, M.; TANI, T.; FUJIEDA, M.; WAKIGUCHI, H.; IMAI, S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.11, p.211-219, 2005.

MAXWELL, M.H.; ROBERTSON, G.W. The avian heterophil leucocyte: a review. **Word's Poultry Science Journal**, v.54, p.451-453, 1998.

MAYR, A.; GUERREIRO, M.G. **Virologia Veterinária**. 2°. ed. Porto Alegre: Sulina, 1981. p.472.

MICHAEL, S.; WEI, S.; MACK, D.R. *Escherichia coli* strain 2348/69 in vitro adhrian is reduced in the presence of a *Lactobacillus* species. **Gastroenterology**, v.112 A, p.1042, 1997.

MIKASOVÁ, E.; DRAHOVSKÁ, H.; SZEMES, T.; KUCHTA, T.; KARPÍŠKOVA, R.; SÁSIK, M.; TURŇA, J. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains of veterinary origin by molecular typing methods. **Veterinary Microbiology**, v.109, n.1, p.113-120, 2005.

MONTALI, R.J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of Comparative Pathology**, v.99, n.1, p.1-26, 1988.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K; LUSDESCHER, R.D. Models and mechanisms for bacteriocin actions and applications. **International Dairy Journal**, v.5, p.797-814, 1995.

MOTICKA, E.D. Development of Immunological Competence in Chickens. **American Zoologist**, v.15, n.1, p.135-146, 1975.

NELSON, D. Phage Taxonomy: We Agree To Disagree. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.21, p.7029-7031, 2004.

NIMRUZI, R. Whey as a source of probiotics. **World Poultry-Elsevier**, v.15, n.10, p.37, 1999.

NOUJAIM, J.C.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; OKAMOTO, A.S.; AMORIM, R.L.; NETO, R.T. Detection of T lymphocytes in intestine of broiler chicks treated with *Lactobacillus* spp. and challenged with *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. **Poultry Science**, v.87, n.5, p.927-933, 2008.

NURMI, E.; RANTALA, M. Newaspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, n. 241, n.5386, p.210, 1973.

NURMI, E.; RANTALA, M. The influence of zinc bacitracin on the colonization of *Salmonella infatis* in the intestines of broiler chickens. **Research Veterinary Science**, v.17, n.2, p.24-27, 1974.

OGAWA, T.; ASAI, Y.; SAKAMOTO, H.; YASUDA, K. Oral immunoadjuvant activity of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* in dextran-fed layer chickens. **British Journal of Nutrition**, v.95, n.2, p.430-434, 2006.

OKAMOTO, A.S. **Avaliação histopatológica e imunológica da mucosa intestinal de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis**. Botucatu, 1998. 60p. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, 2005.

OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; PEREIRA, R.E.P.; MENCONI, A.; ROCHA, T.S.; MARIETTO-GONÇALVES, G.A. Immunological evaluation of the intestinal mucosa of broiler chicks treated with *Lactobacillus* spp.

and challenged with *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, n.4, p.259-262, 2007

OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; NOUJAIM, J.C. Histopatologia da mucosa intestinal de pintos tratados com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *Salmonella enterica,* subespécie *enterica,* sorotipo Enteritidis. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.568-573, 2009.

OLIVEIRA, G.H.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; MONTASSIER, H.J. Chicken serologic response to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium assessed by Elisa. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, n.1, p.51-54, 2006.

PARRA, F.E. Exclusion competitiva in Salmonellosis: Revion. In: Seminário Internacional de Patologia Aviar, v. 8, Athens, **Anais**, p.433-469, 1994.

PASCUAL, M.; HUGAS, M.; BADIOLA, J.I.; MONFORT, J.M.; GARRIGA, M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.11, p.4981-4986, 1999.

PORTER JÚNIOR, R.E.; HOLT, P.S. Effect of induced molting on the severity of intestinal lesions caused by *Salmonella enteritidis* Infection. **Avian Diseases**, v.37, n.4, p.1009-1016, 1993.

Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - 10 States, United States, 2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.55, n.14, p.392-395, 2006.

PULVERER, G.; KO, H.L.; ROSZKOWSKI, W.; BEUTH, J.; YASSIN, A.; JELJASZEWICZ, J. Digestive tract microflora liberates low molecular weight peptides with immunotriggering activity. **Zentralblatt Bakteriologie**, v.272, n.3, p.318-27, 1990.

PRICE, R.J.; LEE, J.S. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. **Milk Food Technology**, v.33, p.13-18, 1970.

RAMÍREZ REYES, B.; ZAMBRANO SANTISTEBAN, O.; RAMÍREZ PÉREZ, Y.; RODRÍGUEZ VALERA, Y.; MORALES MEDINA, Y. Evaluación del efecto probiótico del *Lactobacillus* spp. origen aviar em pollitas de inicio reemplazo de la ponedora comercial en los primeros 42 días de edad. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v.6, n.9, 2005.

RAMPLING, A.; UPSON, R.; PETERS, E.; ANDERSON, J.R.; WARD, L.R.; ROWE, B. *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection of broiler chickens: a hazard to public health. **Lancet**, v.19, n.2, p.436-438, 1989.

REES, J.C.; VOORHEES, K.J. Simultaneous detection of two bacterial pathogens using bacteriophage amplification coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.19, n.19, p.2757-2761, 2005.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, C.S.A.; FERREIRA, A.J.P. Comparison of experimental competitive-exclusion cultures for controlling *Salmonella* colonization in broiler chicks. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.4, p.354-358, 2003.

ROHWER, F.; EDWARDS, R. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.4529-4535, 2002.

ROTH, T.F.; CUTTING, J.A.; ATLAS, S.B. Protein transport: a selective membrane mechanism**. Journal of Supramolecular Structure**, v.4, n.4, p.527-548, 1976.

SAKATA, T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: A possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal tropic factors. **British Journal of Nutrition**, v. 58, p.95-103, 1987.

SANDLER, W.W.; BROWNELL, J.R.; FANELLI, M.J. Influence of age and inoculum level on shed pattern of *Salmonella* Typhimurim in chickens. **Avian Diseases**, v.13, n.4, p.793-803, 1969.

SARRA, P.G.; BADINI, C. Effetto di trattamenti probiotici ed esclusione competitiva di *Salmonella*: prove su pulcini. **Rivista di Avicoltura**, v.66, n.3, p.31-38, 1997.

SILLANPÄÄ, J. **Tissue-adherence in lactic acid bacteria: Identification and characterization of the collagen-binding S-Layer protein of *Lactobacillus crispatus*.** Helsinki, 2001. 57p. Dissertação. (Doutorado em Microbiologia) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia Geral, University of Helsinki, 2001.

SILVA, E.N. Salmoneloses em galinhas. In. Curso de Sanidade Avícola, 1994, Campinas – **Fundação Apinco de Ciências e Tecnologia Avícola**, 1994.

SILVA, E.N.; ANDREATTI FILHO, R.L. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2000, Santa Maria, RS. **Anais...** Concórdia, SC: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, v.1, p.45-55, 2000.

SILVA, E.N; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.4, n.2, p.85–100, 2002.

SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, p.5-14, 2006.

SMITH, D.L.; CHANG, C.Y.; YOUNG, R. The lambda holin accumulates beyond the lethal triggering concentration under hyperexpression conditions. **Gene Expression**, v.7, n.1, p.39-52, 1998.

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

STUART, J.C. Agricultural group zymposium. Prospects for the control *Salmonella* spp. in the poultry industry. The introducion of *Salmonella* spp. into poultry flocks. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.35, p.632-639, 1984.

SWAGGERTY, C.L.; PEVZNER, I.Y.; LOWRY, V.K.; FARNELL, M.B.; KOGUT, M.H. Functional comparison of heterophils isolated from commercial broiler chickens. **Avian Pathology**, v.32, n.1, p.95-102, 2003.

SWAGGERTY, C.L.; FERRO, P.J.; PEVZNER, I.Y.; KOGUT, M.H. Heterophils are associated with resistance to systemic *Salmonella enteritidis* infections in genetically distinct chicken lines. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.43, n.2, p.149-154, 2005.

SWAMY, S.C.; BARNHART, H.M.; LEE, M.D.; DREESEN, D.W. Virulence determinants invA and spvC in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.10, p.3768-3771, 1996.

TANNOCK, G.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotic. **International Dairy Journal**, v.8, n.5, p.527-33, 1998.

TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T. The role of Public Health Laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.2, p.119-129, 1996.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.5, p.315-322, 1996.

TAYEB, I.T.; NEHME, P.A.; JABER, L.S.; BARBOUR, E.K. Competitive exclusion against *Salmonella* Enteritidis in layer chickens by yoghurt microbiota: impact on

egg production, protection and yolk-antibody and cholesterol levels. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n.5, p.1330-1336, 2007.

TIZARD, I. The avian antibody response. **Seminars in Avian and Exotic Pets Medicine**, v.11, n.1, p.2-14, 2002.

TOOD, E.C.D. Epidemiology of the foodborne diseases: a worldwide review. **World Health Statistics Quarterly**, v.50, n.1, p.30-50, 1997.

TORO, H.; PRICE, S.B.; MCKEE, S.; HOERR, F.J.; KREHLING, J.; PERDUE, M.; BAUERMEISTER, L. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. **Avian Diseases**, v.49, n.1, p.118-124, 2005.

VICENTE, J.L.; TORRES-RODRIGUEZ, Al.; HIGGINS, S.E.; PIXLEY, C.; TELLEZ, G.; DONOGHUE, A.M.; HARGIS, B.M. Effect of a selected *Lactobacillus* spp.-based probiotic on *Salmonella* enterica serovar Enteritidis-infected broiler chicks. **Avian Diseases**, v.52, n.1, p.143-146, 2008.

ZACCONI, C.; SCOLARI, G.; SARRA, P.G. Effect of administration of *Lactobacillus salivarius* and lactic microflora in chick digestive tract. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.49, p.117-123, 1999.

ZHANG, N.; YOUNG, R. Complementation and characterization of the nested Rz and Rz1 reading frames in the genome of bacteriophage lambda. **Molecular and General Genetics**, v.262, n.4-5, p.659-667, 1999.

ZHANG, S.; KINGSLEY, R.A.; SANTOS, R.L.; ANDREWS-POLYMENIS, H.; RAFFATELLU, M.; FIGUEIREDO, J.; NUNES, J.; TSOLIS, R.M.; ADAMS, L.G. ; BÄUMLER, A.J. Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. **Infection and Immunity**, v.71, n.1, p.1-12, 2003.

ZIPRIN, R.L.; CORRIER, D.E.; ELLISSALDE, M.H. Maturation of resistance to salmonellosis in newly hatched chicks: Inhibition by cyclosporin. **Poultry Science**, v.68, n.12, p.1637-1642, 1989.

ZIPRIM, R.L. Heterophil response to intraperitoneal challenge with invasion-deficient *Salmonella enteritidis* and *Salmonella*-Immune lymphokines. **Avian Diseases*,*** v.41, n.2, p.438-441, 1997.

WIGLEY, P.; HULME, S.D.; BARROW, P.A. Phagocytic and oxidative burst activity of chicken thrombocytes to *Salmonella*, *Escherichia coli* and other bacteria. **Avian Pathology**, v.28, n.6, p.567-572, 1999.

YOUNG, R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. **Microbiological Reviews**, v.56, n.3, p.430-481, 1992.