

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA FACULDADE DE MEDICINA
VETERINÁRIA**

GABRIELA ZANGARI CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO FAGO M-13 QUE EXPRESSA
PEPTÍDEOS LIGANTES DE *Salmonella* TYPHIMURIUM
RECONHECER ESSE SOROVAR EM AMOSTRAS DE CARÇAÇAS DE
FRANGO**

Uberlândia

2024

GABRIELA ZANGARI CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO FAGO M-13 QUE EXPRESSA
PEPTÍDEOS LIGANTES DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM
RECONHECER ESSE SOROVAR EM AMOSTRAS DE CARÇAÇAS DE
FRANGO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca

Co-orientadora: Dra. Bruna Patricia do Couto

Uberlândia

2024

GABRIELA ZANGARI CARDOSO

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO FAGO M-13 QUE EXPRESSA
PEPTÍDEOS LIGANTES DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM
RECONHECER ESSE SOROVAR EM AMOSTRAS DE CARCAÇAS DE
FRANGO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 25 de abril de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª Belchiolina Beatriz Fonseca
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Marcus Vinícius Coutinho Cossi
Universidade Federal de Uberlândia

Dr^ª Bruna Patrícia do Couto
Doutora – Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter me guiado até esse momento.

Aos meus familiares, principalmente meus pais, Eurico Esmeraldino Cardoso e Shirley de Souza Zangari, por terem me dado todo o suporte ao longo da graduação, cuidado tão bem de mim durante toda minha vida e por serem o ombro que pude e posso chorar nos momentos mais difíceis.

Ao meu amor e companheiro de vida, Igor Antonio, por ter se tornado meu porto seguro, maior apoiador em absolutamente tudo que faço e ser meu maior confidente, saiba que para fazer você sentir o mesmo, passarei o resto da minha vida te mostrando isso todos os dias.

À minha orientadora, Prof. Bia Fonseca, obrigada por me auxiliar, me passar um pouco do seu conhecimento e acreditar em mim, até quando eu mesma não acreditei, você é um exemplo de docente que todo aluno deveria ter.

Às minhas “roomies”, Julia Fabbris Morandin e Laura Caroline Andrade Pereira, por serem meus alívios cômicos dentro de casa e me dando um lar numa cidade nova.

À minha “mãe da faculdade”, Andressa Brito, que sempre tornou tudo mais leve e com comentários cirúrgicos que sempre me fizeram gargalhar mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha outra metade do “mesmo neurônio”, Maria Mendes, que me ensina todos os dias a ser mais positiva e alegre, mesmo com quem não merece; minha amiga, eu espero que nós nos encontremos novamente para trabalhar “juntas”.

A todos os meus amigos da Associação Atlética Acadêmica Agrárias, que, dentro e fora das quadras, torceram por mim, saibam que eu também torço por vocês.

Aos amigos do Diretório Acadêmico Carlos de Almeida Wütke, que me ensinaram logo quando cheguei que a faculdade pode se tornar um lugar mais leve se você estiver com as pessoas certas.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, principalmente Luciana Fortes Guimarães, Diego Sorrentino, Daniel Masashi, Rafaela Farias, Eloá Mauro e Victória Malini que, apesar de pontuais, sempre tornam nossos encontros mais que especiais e me fazem lembrar que não existem distâncias para amizades verdadeiras.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha anjinha, que foi minha maior motivação para escolher esse curso: Mel, obrigada por ter trazido tanta felicidade para nossa casa, ser a “Yorkshire da Shopee” mais brincalhona e rebelde que

poderíamos ter, apesar de não poder te pegar no colo para comemorar essa conquista, terei sempre você no meu coração.

A todos vocês, obrigada por fazerem parte da minha história.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AUC – Área Sob a Curva
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DO – Densidade Óptica
DTHA - Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
FAMEV – Faculdade de Medicina Veterinária
LADOC - Laboratório de Doenças Infecciosas
LB - Luria Bertani
LPS - Lipopolissacarídeos
MSRV - Meio Semi Sólido Modificado Rappaport Vassiliadis
PBS - *Phosphate-buffered saline*
PCR - Reação em Cadeia de Polimerase
PEG - Polietilenoglicol
PFU – Unidade Formadora de Placa
PNSA - Programa Nacional de Sanidade Avícola
RSV - Rappaport Vassiliadis de Soja
SE – *Salmonella* Enteritidis
ST - *Salmonella* Typhimurium
SUS - Sistema Único de Saúde
UFU – Universidade Federal de Uberlândia
VB - Verde Brilhante
XLD - Xilose Lisina Desoxicolato

RESUMO

A Salmonelose é uma doença bacteriana frequente em aviários comerciais, e seu controle é essencial para que a produtividade e o bem-estar dos animais sejam mantidos. Antes, era prevalente o uso de antimicrobianos para o controle dessa bactéria; porém, atualmente, com a resistência do patógeno a esses fármacos, se faz necessário o uso de vias alternativas para controle de *Salmonella* spp.. Hoje, com a evolução científica da biotecnologia, já é possível caracterizar bacteriófagos em estudos laboratoriais para que, num futuro próximo, essas descobertas tecnológicas do uso de fagos possam ser utilizadas na produção a fim de combater diretamente a bactéria desejada. Nesse sentido, o presente trabalho buscou identificar, em carcaças de frango, se o bacteriófago M-13 com seleção de peptídeos específicos, foi capaz de reconhecer os ligantes de *Salmonella* Typhimurium na superfície da carcaça. Para isso, através da técnica de *biopanning* já realizada em estudos anteriores, foram selecionados os fagos com ligantes de *Salmonella* Typhimurium, sendo esses B4 e E6, que em seguida foram amplificados. Cepas de *Salmonella* confirmadas por PCR foram utilizadas para contaminar amostras de duas carcaças de frango. O caldo dessas amostras foi utilizado para sensibilizar a placa de ELISA, e em seguida, os fagos B4 e E6 foram adicionados, juntamente com um fago M-13 selvagem como controle, para realização do *Phage-ELISA*. A análise da reação foi feita de forma descritiva. A regressão logística foi utilizada para análise da área sob a curva (AUC) e o valor do *likelihood rate*. Como resultado, observou-se uma maior interação dos fagos B4 e E6 às amostras de carcaças contaminadas com *Salmonella* Typhimurium, sendo log-Likelihood Ratio de 21,9 ($p < 0,0001$), AUC de 92,16% ($p < 0,0001$) para B4, log-Likelihood Ratio de 15,27 ($p < 0,0001$) e AUC de 87,45% ($p < 0,0003$) para E6 e log-Likelihood Ratio de 4,225 ($p < 0,0398$) e AUC de 68,33% ($p < 0,0820$) para o fago selvagem. Adicionalmente, houve menor interação com outros sorovares de *Salmonella* spp. (Enteritidis, Dublin, Heidelberg, Gallinarum, Minnesota, Infantis, Newport, Pullorum e Salim), bem como amostras da carcaça pura (água peptonada com e sem fago). Então, concluiu-se que foi possível estabelecer uma especificidade do fago B4 para o reconhecimento de *Salmonella* Typhimurium em amostras de carcaças de frango, para que em estudos futuros essas técnicas possam ser aplicadas a fim de mitigar a presença de *Salmonella* Typhimurium na produção avícola.

Palavras-chave: bacteriófago; carcaça de frango; contaminação; ELISA; M-13; phage display.

ABSTRACT

Salmonellosis is a common bacterial disease in commercial poultry operations, and controlling it is crucial for maintaining the productivity and well-being of the animals. Previously, the use of antibiotics was prevalent for controlling such bacterium, but with the increasing resistance of the pathogen to these drugs, alternative control methods for *Salmonella* spp. are now necessary. With the scientific advancement of biotechnology, it is now possible to characterize bacteriophages in laboratory studies for potential use in production to directly combat the targeted bacteria. This study aimed to identify the ability of the M-13 bacteriophage with specific peptide selection to recognize *Salmonella* Typhimurium ligands on chicken carcass surfaces. Using the biopanning technique, bacteriophages with *Salmonella* Typhimurium ligands, namely B4 and E6, were selected and amplified. Confirmed *Salmonella* strains were used to contaminate chicken carcass samples, which were then used to sensitize an ELISA plate. The B4 and E6 bacteriophages, along with a wild-type M-13 phage as a control, were added for phage-ELISA analysis. The reaction was analyzed descriptively, and logistic regression was used to analyze the area under the curve (AUC) and the likelihood ratio. The results showed a higher interaction of bacteriophages B4 and E6 with chicken carcass samples contaminated with *Salmonella* Typhimurium, with log-Likelihood Ratio values of 21.9 ($p < 0.0001$) and 15.27 ($p < 0.0001$), respectively, and AUC values of 92.16% ($p < 0.0001$) and 87.45% ($p < 0.0003$), respectively. The wild-type M-13 phage had a lower interaction with other *Salmonella* spp. serovars (Enteritidis, Dublin, Heidelberg, Gallinarum, Minnesota, Infantis, Newport, Pullorum e Salim) and pure chicken carcass samples. Therefore, it was concluded that a specificity was established between the selected phage B4 for the recognition of *Salmonella* Typhimurium in chicken carcass samples, which can be applied in future studies to mitigate the presence of *Salmonella* Typhimurium in poultry production.

Keywords: bacteriophage; broiler; contamination; ELISA, M-13; phage display.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Aspectos Microbiológicos da <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	11
2.2. Sintomatologia das Salmoneloses.....	11
2.3. Epidemiologia das Salmoneloses.....	12
2.4. Controle e Monitoramento	13
2.4.1. Produção Avícola Nacional e Mundial	14
2.4.2. Legislação Nacional e Exportação	15
2.5. Diagnóstico.....	15
2.6. <i>Phage Display</i>	16
3. METODOLOGIA	18
3.1. Seleção de clones ligantes por <i>biopanning</i>	18
3.2. Amplificação dos fagos.....	18
3.3. Preparo de cepas de <i>Salmonella</i> spp.	18
3.4. Contaminação de carcaças de aves com <i>Salmonella</i> spp.	19
3.5. <i>Phage-ELISA</i> para avaliação da reatividade dos clones B4 e E6	19
3.6. Biossegurança	20
3.7. Análise Estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

A *Salmonella*, que teve sua nomenclatura decidida e aceita por Popoff, Bockemühl e Hickman-Brenner (1996), é uma bactéria que se encontra na família Enterobacteriaceae, gram negativa, em formato de bastonete, que pode ser flagelada ou não e que possui mais de 2700 sorovares descobertos. Dentre as espécies que colonizam galinhas, a maior parte é flagelada, com exceção dos sorovares típicos, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, que são os exclusivos de galinhas, não tendo potencial zoonótico. Quando se trata da Salmonelose, é uma doença frequente em incubatórios e aviários comerciais e demais locais de produção de produtos de origem animal, que deve ser monitorada e controlada; por isso, ao longo da produção e até antes de frangos serem enviados para o abate, são coletadas amostras para que a presença de *Salmonella* seja detectada (Brasil, 2023).

A *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium pode ser transmitida não somente por carcaças de frango, mas como por ovos e também pode causar perdas na produção (Williams; Dillard; Hall, 1968; Dar *et al.*, 2017). Segundo Ferrari *et al.* (2019), as linhagens de *S. Typhimurium* representam uma maior prevalência e disseminação mundialmente. Esse sorovar pode causar sintomas em uma gama de hospedeiros e tem potencial zoonótico (Oliveira-Barbosa, 2020).

Sendo assim, entende-se a importância para a saúde pública em identificar e controlar esse patógeno a fim de evitar DTHA (Doenças Transmitidas via Hidrícula Alimentar) (BRASIL, 2018), pois quando acomete humanos, seus sinais são entéricos como cólica, diarreia, vômito, náusea, mal estar e cansaço (BRASIL, 2024).

Considerando a transmissão da *Salmonella* em aves, Cox *et al.* (1990) entende que a transmissão vertical da bactéria é capaz de contaminar a casca do ovo e futuros frangos quando passa pelo oviduto. Em pintinhos de um dia, apenas cinco unidades de células de *Salmonella* são capazes de provocar infecções futuras na ave. Além disso, a transmissão de forma horizontal pode ocorrer por bebedouros, comedouros e contato de um animal infectado com outros saudáveis (Gast *et al.* 2019). E uma vez que a *S. Typhimurium* se instaura em um galpão ou um lote, é difícil controlá-la.

Os bacteriófagos, que também podem ser chamados de fagos, são vírus que são restritos a infectar, replicar e destruir bactérias. Sua morfologia é diversa, podendo ter diferentes tamanhos e formatos. De forma geral, seu material genético consiste em um genoma com ácido nucléico envolto por um capsídeo proteico, que protege o material genético e induz a infecção da próxima célula através de mediadores (Kutter; Sulakvelidze,

2004). O fago M-13 por sua vez, possui uma estrutura filamentosa e flexibilidade que o torna uma plataforma versátil para diversas aplicações, como biossensores e análises altamente específicas (Santos *et al.*, 2022).

Nesse sentido, o *Phage Display* é uma tecnologia molecular que apresenta grandes bibliotecas de peptídeos e proteínas na superfície de fibras filamentosas dos fagos, sendo um dos principais o M-13. Estas bibliotecas de exibição permitem alta afinidade e especificidade para alvos selecionados, com uma vantagem crucial da ligação direta entre o fenótipo experimental e seu genótipo encapsulado, permitindo a evolução otimizada do ligante (Azzazy; Highsmith-Jr, 2002).

Portanto, o objetivo do presente trabalho é entender se o fago M13 selecionado pela tecnologia do *phage display* que expressa peptídeos ligantes de *S. Typhimurium* reconhece esse sorovar em amostras de carcaça de frango.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Microbiológicos da *Salmonella* Typhimurium

A *Salmonella* Typhimurium é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa que tem característica de ser um patógeno intracelular de animais e humanos e sua patogenicidade está relacionada com sua capacidade de expressar Lipopolissacarídeos (LPS) em sua membrana (Harris *et al.*, 2013; Popoff; Bockemühl; Gheesling, 2004). Sabe-se que esse patógeno é capaz de causar gastroenterites, septicemia e febre em animais e humanos por ser capaz de se replicar em ambientes extremos como pH estomacal (Baron; Gautier; Brule, 1997; Boni, 2007). Em humanos, a bactéria é capaz de penetrar o epitélio intestinal e invadir a lâmina própria e chegar à corrente sanguínea, sendo capaz de espalhar a infecção. A *S. Typhimurium* tem alta prevalência em humanos, principalmente, por conta de sua transmissão via alimentícia, sendo os ovos e produtos cárneos derivados de aves as formas principais dessa transmissão (Andino; Hanning 2015).

Os mecanismos de contaminação dos ovos pela *S. Typhimurium* pode envolver a infecção do trato reprodutor ou gastrointestinal da matriz (Byrd *et al.*, 1998; Pande *et al.*, 2016). No primeiro tipo de infecção, ocorre uma colonização do trato gastrointestinal e em sequência há uma leve septicemia e a bactéria atinge o útero, assim a casca fica contaminada, a replicação bacteriana ocorrerá e, como existem poros na casca, conseqüentemente, todo o restante do ovo poderá estar comprometido com o patógeno. A segunda forma de infecção ocorre pela presença da bactéria na parte final do intestino, onde é excretada nas fezes e partículas patogênicas podem entrar em contato com os ovos através dos pés dos animais; dessa forma, a *Salmonella* invade as membranas da casca, sobrevive e se multiplica no albúmen e membrana vitelina, em seguida atinge a gema e tem crescimento progressivo nela (Pande *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a *Salmonella* Typhimurium foi capaz de sobreviver em camas de galpões, contribuindo para a reinfecção de animais já comprometidos e sendo capaz de acometer outros. Além disso, a variação dos subtipos desse sorovar é capaz de provocar a transmissão e sintomatologia de forma diferente em cada ave. Por fim, é consenso de que a via vertical é uma forma importante para a propagação do patógeno (Williams; Dillard; Hall, 1968; Stringfellow *et al.*, 2010).

2.2. Sintomatologia das Salmoneloses

A sintomatologia das Salmoneloses típicas em frangos são depressão, baixo

desempenho, nanismo, fraqueza, diarreia, desidratação, penas eriçadas, olhos fechados, enterite, necrose focal e lesões intestinais. Nos animais *post mortem*, os achados incluem peri-hepatite, pericardite, óvulos deformados em ovários e casos em ceco (The Poultry Site, 2019). A salmonelose paratífica, geralmente, não traz sintomatologia clínica em aves, a não ser que sejam aves jovens ou imunossuprimidas. No entanto, tem grande importância para a saúde pública (Muniz, 2014).

É uma zoonose importante e em humanos, sendo os achados clínicos notados a partir de 12 a 72 horas de contato com o patógeno, podendo ter sinais de diarreia, febre, dores abdominais, dor de cabeça, letargia, mal-estar, náusea e vômitos (WHO, 2018; National Library Of Medicine, 2023). A duração dos sintomas varia de 4 a 7 dias, sendo na maioria dos casos autolimitante, porém, pode ser mais grave e se estender em pessoas mais jovens ou imunocomprometidas, havendo até a necessidade de hospitalização e uso de antibióticos caso ocorra uma septicemia (Brasil, 2023).

2.3. Epidemiologia das Salmoneloses

A *S. Typhimurium* ainda é a segunda causadora principal de surtos alimentares na União Europeia, especialmente nos Países Baixos, República Tcheca e Bélgica (ECDC, 2021; Pinedo *et al.*, 2022). No entanto, a incidência de infecções humanas por *S. Typhimurium* tem tido uma queda, mas essa tendência estagnou nos últimos anos. Essa estagnação dos casos pode estar relacionada com a pandemia de COVID-19, por conta da queda de viagens à turismo. Além disso, a incidência de *Salmonella* spp. na Europa é maior no período do verão e outono que no inverno, além de ser mais comum em crianças de 0-4 anos e 5-14 anos que em pessoas com 60 anos ou mais (Pinedo *et al.*, 2023; ECDC, 2021)

Quando trata-se da salmonelose nas Américas, as gastroenterites causadas pelos distintos sorovares de *Salmonella* acomete em média 1,35 milhões de pessoas por ano só nos Estados Unidos. Desses casos, 26.500 necessitam de hospitalização e 420 vêm a óbito por causa desse patógeno (CDC, 2024).

No Brasil, como as gastroenterites em humanos não são avaliadas com maior intensidade pelo Sistema Único de Saúde (SUS), muitos casos são subnotificados. Isso ocorre já que o diagnóstico costuma ser terapêutico e muitas vezes os profissionais não fazem a investigação do patógeno causador, principalmente visando a contenção de gastos para o SUS (Schramm *et al.*, 2004). Sendo assim, entende-se a necessidade de futuros estudos para rastrear a epidemiologia desse patógeno, a fim de obter-se dados mais próximos da realidade.

Na produção avícola Brasileira, há uma grande importância para rastrear e controlar a contaminação de carcaças e ovos por *Salmonella* spp., a fim de conseguir aumentar a produtividade no campo e para poder proporcionar melhores produtos aos consumidores, uma vez que há um interesse econômico em exportar a carne e ovos produzidos para outros países e sua tolerância é zero perante a presença desse patógeno (Tessari; Cardoso, 2014).

2.4. Controle e Monitoramento

A implementação de medidas eficazes de biossegurança em granjas ajuda a minimizar os riscos de introdução e propagação de doenças infecciosas como a *S. Typhimurium* e outros patógenos bacterianos, virais, fúngicos e parasitários. Os principais pontos a serem destacados para o controle de patógenos numa granja, são a localização da granja, manejo de dejetos e de carcaças para descarte, cuidado com a água e alimentação fornecida às aves, manejo da ambiência para evitar estresse, controle de parasitas, controle na entrada e saída do aviário, treinamento da equipe, documentação e notificação de órgãos responsáveis (Ávila *et al.*, 2007; Delpont *et al.*, 2023).

Quando há a intenção de montar uma granja de aves, é interessante estudar o terreno, entender a disposição da natureza ao redor e se nas proximidades possuem outras granjas, tanto de aves quanto de suínos. Deve-se, também, manter distância dos focos de circulação de pessoas, como rodovias e demais fazendas. Para montar a granja é necessário haver um distanciamento e, se possível, introduzir árvores não frutíferas nas redondezas, para evitar permanência de outras aves silvestres e promover uma barreira mecânica, como está descrito no PNSA (Programa Nacional de Sanidade Avícola) (Albino; Tavernari, 2010; BRASIL, 2007).

Para o manejo de dejetos, uma forma utilizada atualmente é a separação da cama para fazer compostagem, uma vez que as excretas produzidas pelas aves são ricas em carbono e nitrogênio e, quando colocadas em um ambiente aeróbio controlado, se tornam ótimos nutrientes e fertilizantes para o solo (Palhares; Kunz, 2011). Já para o manejo de aves mortas, é importante fazê-lo de forma correta para evitar contaminação de água, solos e disseminação de doenças. Uma estratégia que pode ser adotada é a incineração, pois é uma ótima opção para o manejo sanitário; sua realização deve ser feita em temperaturas acima de 800°C e as cinzas são estéreis e ricas em nutrientes, podendo ser utilizadas em adubagem de solos (Nicoloso *et al.*, 2017)

Nos cuidados com a alimentação, hidratação e ambiências dos animais nos aviários,

deve-se atentar com a qualidade do que será fornecido, bem como onde ficarão dispostos para os animais e a facilidade do acesso, sendo de suma importância a comida não ficar em contato com a água, pois pode haver proliferação fúngica e, conseqüentemente, aumento dos níveis de toxinas produzidas por esses. Além disso, a água deve ser limpa e fresca, e muitas vezes são adicionados antibióticos e vacinas para o controle de patógenos estabelecidos pelo PNSA (Albino; Tavernari, 2010; BRASIL, 2007). Conseqüentemente, principalmente o uso de antibióticos na produção vem trazendo uma resistência bacteriana, nesse sentido, entende-se a necessidade de introduzir formas alternativas para o controle bacteriano na produção (Nhung *et al.*, 2017).

O controle parasitário de pragas dentro do aviário também é de suma importância, uma vez que, com água e alimentação dispostos à vontade para as aves, se torna muito atrativo para animais vistos como pragas, como é o caso dos ratos e camundongos. Sendo assim, é importante ter uma vedação de pontos que possam auxiliar o roedor a adentrar o galpão, como ventiladores e exaustores, e ter controle dos pontos externos ao aviário, bem como a colocação de raticidas que eliminem o animal de forma crônica (Albino; Tavernari, 2010; Berry, 2017).

Adicionalmente, para que a equipe e prestadores de serviços na granja possam contribuir para o controle microbiológico de patógenos, esses funcionários devem realizar banhos e limpeza de veículos ao adentrar na fazenda, além de outras formas de higienização, como pedilúvios e troca de roupas, para adentrar no aviário (Albino; Tavernari, 2010). Para que essas medidas de biosseguridade sejam exequíveis, é necessário que haja um treinamento adequado e intensivo com a equipe (Ávila *et al.*, 2007).

Por fim, para conseguir manter um padrão de todas as atividades de biosseguridade estabelecidas pela granja e controlar da melhor forma possível a contaminação e patógenos para as aves, é imprescindível que haja um registro e documentação de todas as medidas adotadas pela empresa, a fim de manter um padrão de qualidade e, conseqüentemente, aumentar a produtividade (Júnior; Macari, 2000).

2.4.1. Produção Avícola Nacional e Mundial

A demanda de consumo dos alimentos provenientes de aves é uma tendência, tanto em países desenvolvidos, quanto em países subdesenvolvidos (Alexandratos; Bruinsma, 2012). Atualmente, a carne de frango é a mais consumida mundialmente e tem tendências a expandir mais rápido que os demais tipos de produção agropecuária (Chai *et al.*, 2017; FAO, 2023).

Sendo assim, entende-se a importância econômica da produção de aves a nível mundial e, nesse cenário, o Brasil é protagonista, representando o segundo maior produtor e o maior exportador de carne de frango para o mundo, tendo produzido aproximadamente 14,5 milhões de toneladas em 2022 (ABPA, 2023; Martinelli *et al.*, 2020).

Por conta de seu rápido ciclo de produção, é importante fiscalizar e ressaltar como a contaminação, e eventual infecção dos animais por patógenos, é prejudicial. Em um estudo realizado por Scharff (2020), estimou-se que a condenação por *Salmonella* não tifóide em produtos de origem avícola resulta em uma perda de aproximadamente 9,5 bilhões de dólares americanos anualmente, reforçando, então, a importância de se manter um bom controle de biossegurança e formas de prevenção desse patógeno para prevenir mais perdas bilionárias para a indústria.

2.4.2. Legislação Nacional e Exportação

Quando aborda-se os produtos cárneos crus derivados de aves, a legislação que rege a quantidade máxima de *Salmonella* spp. é a Resolução N° 331 de 23 de dezembro de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), juntamente com a Instrução Normativa N°60 de 23 de dezembro de 2019 do Ministério da Saúde, sendo tolerância zero para a presença de *S. Enteritidis* e *Typhimurium* em 25 gramas de amostra de carne de frango, que são verificados através das metodologias de coleta, acondicionamento, transporte e análise de alimentos presentes no Artigo 10° da mesma resolução (BRASIL, 2019).

Ao se tratar de carne para exportação, as legislações variam de acordo com o país importador. A União Europeia, por exemplo, define em sua regulação N°2160 de 17 de novembro de 2003 a necessidade da ausência de *Salmonella* spp. em todo lote de frango destinado à alimentação humana após cinco amostragens, bem como a rastreabilidade dos produtos. A China, por sua vez, através do protocolo entre o MAPA e a Administração Geral de Aduanas da República Popular da China acordaram os requisitos sanitários e de quarentena para a comercialização de proteína animal, ficando definida a ausência de *Salmonella* spp. em amostras de 25 gramas, com o mínimo de cinco amostras (Barradas, 2019).

2.5. Diagnóstico

Além das coletas feitas pelo órgão de inspeção responsável, as granjas industriais normalmente estabelecem uma Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Dessa forma é possível ajustar correções antes que os agentes microbiológicos prejudiquem a produção. Nesse sentido, podem ser feitas coletas de amostras de fezes, carcaças e órgãos,

como baço, fígado e intestinos, conforme os achados de necropsia evidenciem alterações causadas por conta da *Salmonella* spp (Stella *et al.*, 2021).

A partir do momento da coleta, é feito um pré-enriquecimento em caldo não seletivo, onde há uma recuperação de bactérias injuriadas pela incubação entre 34 a 38°C, feitas durante um período de 18 a 20 horas em água peptonada 1% ou tamponada (Brasil, 2011; Silva, Junqueira; Silveira, 2007). Em seguida, é feito o enriquecimento seletivo para que haja o crescimento apenas de *Salmonella*, evitando, assim, o crescimento de outros microrganismos que possam estar presentes na amostra. Nesse enriquecimento, a amostra é incubada em caldo Rappaport Vassiliadis de Soja (RVS), ágar Meio Semi Sólido Modificado Rappaport Vassiliadis (MSRV) ou caldo tetracionato, incubados a 41,5°C por 24 horas. Por fim, é plaqueado em meio ágar de Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) ou Verde Brilhante (VB), incubado em estufa a 37°C por 24 horas (ISO 6579-1, 2017) e então é possível isolar a bactéria *Salmonella*, porém, não é possível identificar qual é o sorovar da amostra. Para identificar de maneira ideal o sorovar da bactéria isolada, é possível realizar o teste bioquímico seguido da sorologia, ou o teste de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (Saleh *et al.*, 2018).

As diferenças principais entre esses testes é o tempo até o resultado e diferença de custo. O teste bioquímico com sorologia possui como vantagens uma metodologia mais simples e um menor custo. Já o teste da PCR possui como vantagens a sua alta sensibilidade e alta especificidade, de forma a trazer resultados muito confiáveis e específicos, porém é um teste que depende de maquinário específico e possui um custo mais elevado (Santos *et al.*, 2022)

2.6. Phage Display

O *Phage Display* é uma técnica de laboratório para o estudo de interações proteína-proteína, proteína-peptídeo e proteína-DNA por meio da utilização de bacteriófagos, que são vírus que infectam bactérias, para conectar proteínas com a informação genética. Nesta técnica, um gene que codifica um peptídeo de interesse é inserido num gene de proteína de revestimento do bacteriófago, fazendo com que o bacteriófago exponha o peptídeo na sua superfície enquanto contém o gene para a proteína no seu interior, resultando numa ligação entre genótipo e fenótipo. Os peptídeos que os bacteriófagos estão exibindo podem então ser testados contra outras proteínas, peptídeos ou sequências de DNA, a fim de detectar a interação entre a proteína exibida e as de outras moléculas. Desta forma, grandes bibliotecas

de peptídeos podem ser testadas e amplificadas num processo chamado seleção *in vitro* (Sidhu, 2001).

Os fagos, de maneira geral, possuem um capsídeo protéico e no seu interior há DNA ou RNA no seu núcleo. Sua forma de replicação é idêntica aos vírus convencionais, onde há adsorção na célula bacteriana que será invadida, penetração do material genético e biossíntese de mais material genético do vírus e, caso o fago siga no ciclo lítico, há maturação e liberação e, caso o fago não promova sua replicação na célula, mas apenas a incorporação do seu material genético ao do hospedeiro, é chamado de ciclo lisogênico (Kasman; Porter, 2021).

Entendendo o funcionamento geral dos bacteriófagos, é possível entender sobre o M-13. Esse fago tem características lisogênicas, possui um diâmetro de seis nanômetros e 880 nanômetros de comprimento, seu genoma possui cinco capsídeos protéicos, pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX, que definem o seu comprimento (Rondot *et al.*, 2002). A partir da engenharia genética, é possível modificar esses capsídeos protéicos do fago e fazer com que ele identifique e adentre a célula hospedeira desejada e atue promovendo sua destruição (Wang *et al.*, 2023).

A técnica de *Phage-ELISA*, ou “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*” utilizando a tecnologia de display de fagos, funciona utilizando bacteriófagos para exibir proteínas ou peptídeos específicos em sua superfície. Nessa técnica, fagos que exibem a proteína de interesse são usados para detectar interações com moléculas-alvo, como anticorpos. O processo envolve imobilizar a molécula-alvo em uma superfície, como um poço de microplaca, onde fagos que exibem proteínas que se ligam à molécula-alvo irão aderir. Após a lavagem para remover fagos não ligados, os fagos ligados são eluídos e podem ser usados para infectar hospedeiros bacterianos para produzir mais fagos enriquecidos com capacidades de ligação. Esse processo, conhecido como '*panning*', permite a seleção de fagos com alta afinidade pela molécula-alvo. As sequências de DNA relevantes desses fagos podem então ser identificadas por sequenciamento, revelando as proteínas ou fragmentos de proteínas interagentes (Hagmaier; Gelderblom; Kochs, 2004).

3. METODOLOGIA

3.1. Seleção de clones ligantes por *biopanning*

A técnica de *biopanning* foi utilizada para a seleção de peptídeos expressos por bacteriófagos (fagos M13) que se liguem a antígenos de *Salmonella* Typhimurium (ST), como já estudado em trabalhos anteriores pela equipe da orientadora do presente trabalho. Os clones também foram titulados, seu DNA foi extraído e foi feito o sequenciamento de peptídeos expressos na superfície. Ao final do processo, os fagos denominados B4 e E6 mostraram melhor reatividade a ST e foram utilizados nesse estudo para posteriores testes.

3.2. Amplificação dos fagos

Os fagos selecionados B4, E6 e o selvagem M13, foram amplificados em meio Luria Bertani (LB- Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), contendo tetraciclina, com uma colônia isolada de *E. coli* da linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação a 37°C até a fase *early-log* (densidade óptica- DO 600 ~ 0,3). Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 10µl de fagos selecionados e incubado a 37°C *overnight*, sob forte agitação. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4°C a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado contendo uma solução de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril), na quantidade de 1/6 do volume do sobrenadante. A solução foi incubada por 12- 16 horas para a precipitação do fago e posteriormente, centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos para descartar o sobrenadante. O precipitado foi, então, suspenso em *Phosphate-buffered saline* (PBS) e precipitado novamente com PEG/NaCl, por 1 hora no gelo. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em 250µl de PBS, a fim de se obter o eluato amplificado, que foi posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

3.3. Preparo de cepas de *Salmonella* spp.

As cepas de *Salmonella* utilizadas nesse estudo foram isoladas de aves pelo Laboratório de Doenças Infecciosas (LADOC)–FAMEV/UFU e confirmadas por teste PCR (PCR microarray Check & Trace *Salmonella* (Bio-Rad Laboratories, Inc)). As cepas foram: ST 5837-11, ST 4597, ST 6829/10, ST 6801/11, ST 5225/11, ST 8760/10, ST 5164/11, ST 4458/10, ST 3990/11, ST 4853/11, ST 5846/11, ST 8935/10, ST 8283/10, ST 5443/11, ST, SE 7541/10, SE 3719/11, SE 1966/11, SE 2344/11, SE 1, SE 2, *S. Dublin*, *S. Heidelberg*, *S.*

Gallinarum, *S. Minnesota*, *S. Infantis*, *S. Newport*, *S. Pullorum* e *S. Salim*. As cepas estavam armazenadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) com 50% de glicerol, e em seguida foram reativadas em placas de ágar nutriente (NA) e incubadas por 24 horas a 37°C. As colônias foram coletadas com ajuda de uma alça estéril, diluídas em água ultrapura para serem utilizadas na contaminação das carcaças de aves. Para a sensibilização da microplaca no teste ELISA, as colônias foram diluídas em tampão carbonato bicarbonato (pH 8,6). Para ambos os testes, a densidade óptica (DO) foi ajustada em um espectrofotômetro até atingir aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (DO 600 ~0,5).

3.4. Contaminação de carcaças de aves com *Salmonella* spp.

Duas carcaças de aves foram obtidas na BRF SA após gotejamento. Primeiramente, 25g de carne de três regiões de cada carcaça de ave (perianal, sob a asa e pescoço) foram separadas em um saco estéril, seguindo o padrão recomendado pela NBR ISO 6579:2002 para detectar a presença/ausência de *Salmonella* em alimentos (ABNT, 2021). Em seguida, para realizar a contaminação das carcaças, 25g de carne foram separados de cada amostra, adicionados de 222,5mL de água peptonada tamponada e 2,5 ml de inóculo bacteriano na concentração $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Cada conteúdo preparado foi introduzido um sorovar bacteriano diferente. Após 10 minutos à temperatura ambiente ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) para permitir a interação do inóculo com a carne, 2 ml de fluido foram removidos de cada amostra para o teste ELISA.

3.5. Phage-ELISA para avaliação da reatividade dos clones B4 e E6

Os dois clones selecionados e o fago selvagem M13 já amplificados conforme descrito no item 3.2, foram submetidos ao ensaio de ELISA com o intuito de realizar um rastreamento quanto à reatividade dos clones B4 e E6 contra antígenos de ST e outras *Salmonella*. Placas de microtitulação foram sensibilizadas com 50µl de lavado da carcaça com cada sorovar de *Salmonella*, diluídas no tampão carbonato bicarbonato (pH 8,6) (conforme descrito no item 3.3) e posteriormente incubadas por 18h a 4°C. No dia seguinte, após uma lavagem com PBS Tween 0.1%, as placas foram bloqueadas PBS-BSA 5% por 1h a 37%. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com PBS-T 0.1%, e 50ul de cada fago diluído em PBS Tween 0.1% foram adicionados (1×10^{10} unidades formadoras de placa (PFU) /poço de cada clone). Após 1 hora de incubação a 37°C, a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T 0,1% e, posteriormente, foram adicionados 50µl do anticorpo anti-

M13 conjugado com peroxidase (diluído 1:1000 em tampão de bloqueio PBS-T 0,1%). A placa foi lavada seis vezes e após 1 hora de incubação, a reação foi revelada utilizando-se o substrato cromogênico OPD (O- Phenylenediamine dihydrochloroide – Sigma), em solução contendo H₂O₂. Posteriormente, a reação foi interrompida com a adição de 25µL de H₂SO₄ 2 N e a leitura da absorbância foi realizada em uma leitora de placas a 492 nm.

3.6. Biossegurança

Todos os procedimentos realizados neste estudo, bem como a utilização de equipamentos, seguiram as normas de biossegurança descritas por Mineo *et al.* (2005). Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Nanotecnologia prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart e no Laboratório de Doenças Infecciosas (LADOC), ambos da UFU (Universidade Federal de Uberlândia). Tais laboratórios dispuseram de todos os equipamentos para execução do estudo.

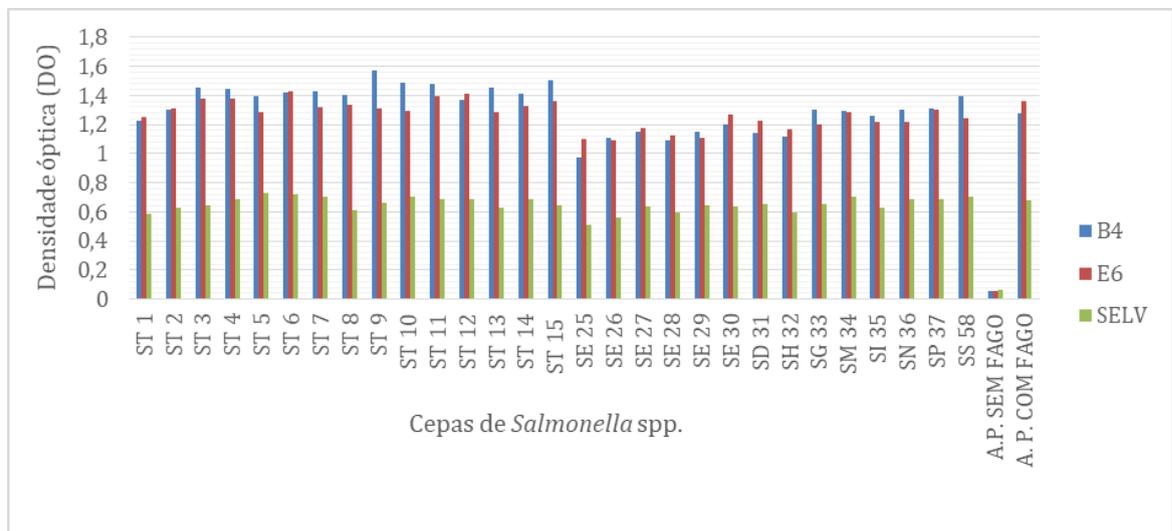
3.7. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Prism Software Inc., EUA). Para os testes de *phage*-ELISA, o fago selvagem M13 foi utilizado como controle na reação. Para cada clone, as avaliações foram realizadas em duplicatas. A análise da reação foi feita de forma descritiva. A regressão logística foi utilizada para análise da área sob a curva (AUC) e o valor do *likelihood rate*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As carcaças obtidas no item 3.4 apresentaram resultado negativo para presença de *Salmonella* spp. após a realização da metodologia estabelecida pela ISO6579:2002. A Densidade Óptica (DO) foi feita para diversos sorovares de ST, SE e outras *Salmonellas* para controle, juntamente com os dois fagos selecionados e o fago selvagem para controle, e os resultados obtidos estão expressos na Figura 1. As cepas foram enumeradas da seguinte forma: ST 5837-11 ST1, ST 4597 ST2, ST 6829/10 ST3, ST 6801/11 ST4, ST 5225/11 ST5, ST 8760/10 ST6, ST 5164/11 ST7, ST 4458/10 ST8, ST 3990/11 ST9, ST 4853/11 ST9, ST 5846/11 ST11, ST 8935/10 ST12, ST 8283/10 ST13, ST 5443/11 ST14, ST ST15, SE 7541/10 SE1, SE 3719/11 SE2, SE 1966/11 SE3, SE 2344/11 SE4, SE 1 SE5, SE 2 SE6, *S. Dublin* SD, *S. Heidelberg* SH, *S. Gallinarum* SG, *S. Minnesota* SM, *S. Infantis* SI, *S. Newport* SN, *S. Pullorum* SP e *S. Salim* SS. A ST reagiu com títulos maiores para os dois peptídeos, sendo que, de forma descritiva, o peptídeo B4 possuiu maiores relações de ligação que E6, visto que a DO foi igual ou superior em praticamente todos as derivações de ST.

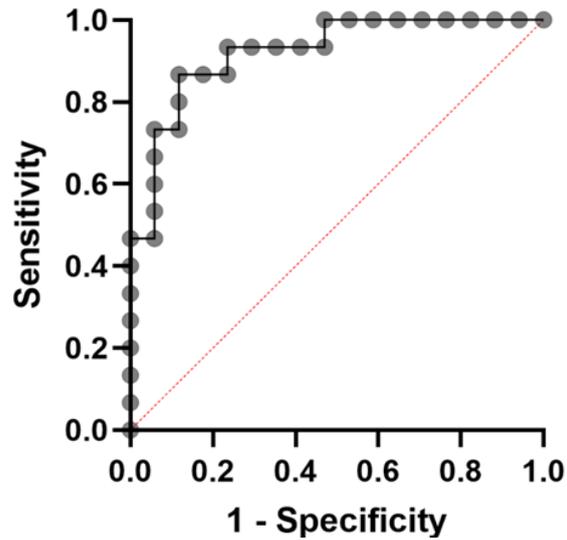
Figura 1. Média de absorbância dos clones de ligação a ST [B4 (azul) e E6 (laranja)] e clone selvagem (M13) selecionados por Phage-ELISA. Quinze cepas de *S. Typhimurium*, seis de *S. Enteritidis*, uma cepa dos sorovares Dublin, Heidelberg, Gallinarum, Minnesota, Infantis, Newport, Pullorum e Salim



Fonte: Autoria própria, 2024.

Nesse sentido, tratando-se inicialmente do fago B4, foi obtido o resultado de log-Likelihood Ratio de 21,9 ($p < 0,0001$), AUC de 92,16% ($p < 0,0001$) (Figura 2).

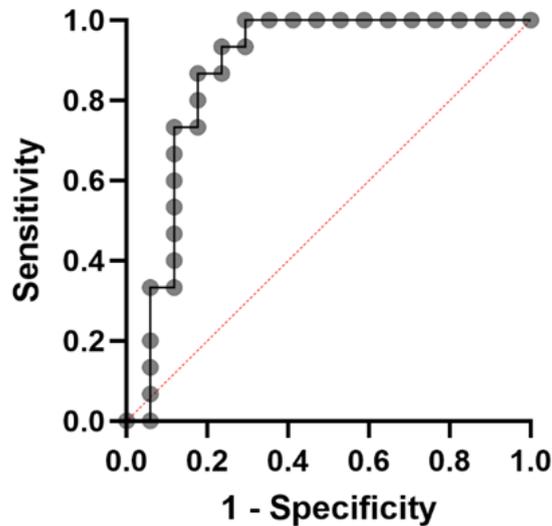
Figura 2. Curva de Receiving Operating Characteristic (ROC) que avaliou a classificação da performance do diagnóstico binário do fago B4.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Em seguida, tratando-se do fago E6, encontrou-se um Likelihood Ratio de 15,27 ($p < 0,0001$) e AUC de 87,45% ($p < 0,0003$) (Figura 3).

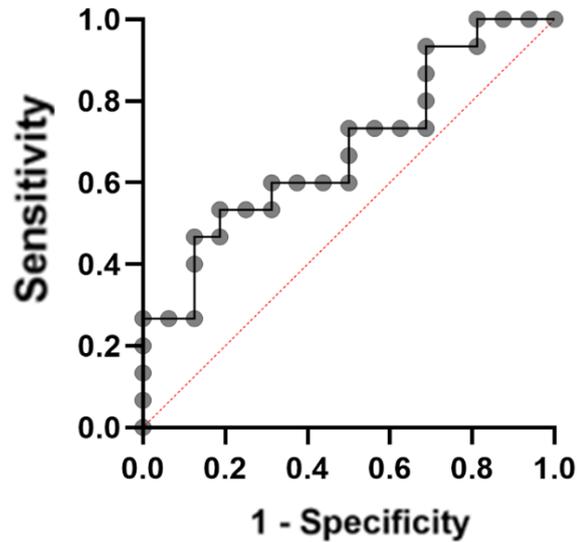
Figura 3. Curva de Receiving Operating Characteristic (ROC) que avaliou a classificação da performance do diagnóstico binário do fago E6.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Em contrapartida, o fago selvagem obteve log-Likelihood Ratio de 4,225 ($p < 0,0398$) e AUC de 68,33% ($p < 0,0820$) (Figura 4). Dessa forma, entende-se que a ligação com o antígeno do fago selvagem não é tão forte.

Figura 4. Curva de Receiving Operating Characteristic (ROC) que avaliou a classificação da performance do diagnóstico binário do fago selvagem.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Sendo assim, entende-se que o fago B4 possuiu maior ligação com o antígeno da *Salmonella* Typhimurium comparativamente ao E6, pois sua AUC obteve um valor maior, representando uma ligação mais intensa.

O *phage display* é uma importante ferramenta para seleção de peptídeos ligantes ou miméticos de patógenos. Após a seleção, os peptídeos são purificados e sequenciados para síntese que são úteis para desenvolvimento de diagnósticos, métodos vacinais ou terapêuticos (Santos *et al.*, 2022). Nesse trabalho, o invés do peptídeo purificado, a equipe explorou a técnica do phage-ELISA para detectar *S. Typhimurium* a partir da carcaça utilizando os próprios fagos. Essa abordagem pode ser interessante, já que os fagos são maiores e mais estáveis que os peptídeos, apresentando benefício durante o reconhecimento e ligação com as estruturas antigênicas.

Em um estudo realizado por Evran (2022), foi utilizado um coquetel de bacteriófagos para controlar a contaminação de *Salmonella* spp. e outros patógenos bacterianos em superfícies, como bebedouros e comedouros, como resultado o autor encontrou uma redução nos valores logarítmicos da presença bacteriana nessas superfícies. Dessa forma, entende-se que a utilização de bacteriófagos é possível trazer o controle desses patógenos, porém mais estudos precisam ser feitos para que haja um entendimento do funcionamento dos mesmos em material *in vivo*.

Os líquidos de carcaças são materiais com muitas proteínas, que podem apresentar resultado falso positivo em testes de ELISA. Mesmo com tal característica conhecida, nosso

trabalho mostrou que os fagos podem apresentar alta AUC, especialmente para o fago B4. Assim, esse fago mostra um potencial para ser usado como método preventivo ou diagnóstico da *S. Typhimurium*. Trabalhos futuros devem ser realizados para a retirada do excesso de proteínas e lipídeos da carcaça que possam comprometer os resultados do ELISA para validar o fago B4 para identificação direta de *S. Typhimurium*.

5. CONCLUSÃO

O fago B4, selecionado a partir da tecnologia do *phage display*, expressando ligantes de *S. Typhimurium*, têm potencial para ser utilizados em testes de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade, sendo os valores 86% e 82,6% respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ALBINO, L. F. T.; TAVERNARI, F. C. **Produção e manejo de frangos de corte**. Viçosa: Editora UFV, 2010.
- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. **World Agriculture towards 2030/2050: The 2012 Revision - ESA Working paper, N°12-03**. Roma: FAO Press, 2012.
- ANDINO, A.; HANNING, I., 2015. Salmonella enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars. **The Scientific World Journal**, v.40, n.1, p.220-225, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS [ABNT]. **NBR ISO6579-1 DE 04/2021**: Especifica um método horizontal para a detecção de *Salmonella*. 2021. Disponível em: <<https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/13068/abnt-nbriso6579-1-microbiologia-de-alimentos-para-consumo-humano-e-animal-metodo-horizontal-para-deteccao-enumeracao-e-sorotipagem-de-Salmonella-parte-1-deteccao-de-Salmonella-spp.>>. Acesso em: 18 jan. 2024.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL [ABPA]. **Relatório Anual de 2022**. 2023. Disponível em: <<https://abpabr.org/>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2024.
- ÁVILA, V. S.; KUNZ, A.; BELLAVAR, C.; PAIVA, D. P.; JAENISCH, F. R. F.; MAZZUCO, H.; TREVISOL, I. M.; PALHARES, J. C. P.; ABREU P. G.; ROSA, P. S. **Circular Técnica N° 51: Boas práticas de produção de frango de corte**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007.
- AZZAZY, H. M.; HIGHSMITH-JR, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical biochemistry**, v.35, n.6, p.425-445, 2002.
- BARRADAS, C. P. M. **Inspeção de aves: exigências de mercados específicos**. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/treinamento-sif-2019-aves-requisitos-especificos.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- BARON, F.; GAUTIER, M.; BRULE, G. Factors involved in the inhibition of Growth of *Salmonella enteritidis* in liquid egg white. **Journal of Food Protection**, v.60, n.11, p.1318-1323, 1997
- BERRY, J. **Rodent Control in the Poultry House**. Stillwater: Oklahoma State University Press, 2017.
- BONI, H. F. K. **Ocorrência de *Salmonella* spp. na cadeia avícola da região central de Mato Grosso do Sul**. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Instrução Normativa nº56, de 04 de dezembro de 2007. **Estabelece a lista de padrões microbiológicos em alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília. DF, Seção I, 06 de dezembro de 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N°331, de 23 de dezembro de 2019. **Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção I, 26 de dezembro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde [MS]. **Salmonelas.** 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/salmonelas>>. Acesso em: 03 mar. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde [MS]. **Salmonella (Salmonelose).** 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella>>. Acesso em: 05 fev. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde [MS]. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde [MS]. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia para investigação de surtos ou epidemias.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BYRD, J. A.; CORRIER, D. E.; DELOACH, J. R.; NISBET, D. J.; STANKER, L. H. Horizontal transmission of *Salmonella typhimurium* in broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, v.7, n1, p.75-80, 1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. **Salmonella index.** 2024. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 10 fev. 2024.

CHAI, S.; COLE, D.; NISLER, A.; MAHON, B. Poultry: The most common food in outbreaks with known pathogens, United States, 1998–2012. **Epidemiol. Infect.**, v.145, p.316–325, 2017.

COX, N. A.; BAILEY, J. S.; MAULDIN, J.M.; BLANKENSHIP, L. C. Research note: Presence and impact of *Salmonella* contamination in commercial broiler hatcheries. **Poultry science**, v.69, n.9, p.1606-1609, 1990.

DAR, M. A.; AHMAD, S. M.; BHAT, S. A.; AHMED, R.; URWAT, U.; MUMTAZ, P. T.; BHAT, S. A.; DAR, T. A.; SHAH, R. A.; GANAI, N. A. *Salmonella typhimurium* in poultry: a review. **World's poultry science journal**, v. 73, n. 2, p. 345–354, 2017

DELPONT, M.; SALAZAR, L. G.; DEWULF, J.; ZBIKOWSKI, A.; SZELESZCZUK, P.; DUFAY-LEFORT, A. C.; ROUSSET, N.; SPAANS, A.; AMALRAJ, A.; TILLI, G.; PICCIRILLO, A.; DEVESA, A.; SEVILLA-NAVARRO, S.; MEIRHAEGE, H.; KOVÁCS, L.; JÓZWIAK, A. B.; GUÉRIN, J. L.; PAU, M. C. Monitoring biosecurity in poultry production: an overview of databases reporting biosecurity compliance from seven European countries. **Frontiers in veterinary science**, v. 10, 2023.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL [ECDC]. **Salmonellosis: annual epidemiological report for 2020.** 2021. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Salmonellosis-annual-epidemiological-report-2020.pdf>>. Acesso em : 05 fev. 2024.

EVARAN, S.; TAYYARCAN, E. K.; ACAR-SOYKUT, E. A.; BOYACI, I. H. Applications of bacteriophage cocktails to reduce salmonella contamination in poultry farms. **Food and environmental virology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2022.

FERRARI, R.G.; ROSARIO, D.K.; CUNHA-NETO, A.; MANO, S.B.; FIGUEIREDO, E.E.; CONTE-JUNIOR, C.A. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis. **Applied and environmental microbiology**, v.85, n.14, p.e005910-e005919, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS [FAO]. **Countries by Commodity Ranking**. Disponível em: <<https://www.fao.org/>> Acesso em: 25 fev. 2024.

GAST, R. K.; REGMI, P.; GURAYA, R.; JONES, D. R.; ANDERSON, K. E.; KARCHER, D. M. Colonization of internal organs by *Salmonella* Enteritidis in experimentally infected laying hens of four commercial genetic lines in conventional cages and enriched colony housing. **Poultry science**, v.98, n.4, p.1785-1790, 2019.

HAGMAIER, K.; GELDERBLOM, H.R.; KOCHS, G. Functional comparison of the two gene products of Thogoto virus segment 6. **Journal of general virology**, v.85, n.12, p.3699-3708, 2004.

HARRIS, L.J.; BERRY, E.D.; BLESSINGTON, T.; ERICKSON, M.; JAY-RUSSELL, M.; JIANG, X.; KILLINGER, K.; MICHEL, F. C.; MILLNER-JR., P.; SCHNEIDER, K.; SHARMA, M.; SUSLOW, T.V.; WANG, L.; WOROBO, R. W. A framework for developing research protocols for evaluation of microbial hazards and controls during production that pertain to the application of untreated soil amendments of animal origin on land used to grow produce that may be consumed raw. **Journal of Food Protection**, v.76, n.6, p.1062–1084, 2013.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION [ISO]. **ISO 6579-1:2017**: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva: ISO Press, 2017.

JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA. p.283-300,2000.

KASMAN, L. M.; PORTER, L. D. **Bacteriophages**. St. Petersburg: Stat Pearls Publishing, 2021.

KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: Biology and applications**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2004.

MARTINELLI, G.; VOGEL, E.; DECIAN, M.; FARINHA, M.J.U.S.; BERNARDO, L.V.M.; BORGES, J.A.R.; GIMENES, R.M.T.; GARCIA, R.G.; RUVIARO, C.F. Assessing the eco-efficiency of different poultry production systems: An approach using life cycle assessment and economic value added. **Sustainable Production and Consumption**, v.24, p.181-193, 2020.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia; EDUFU, 2005.

MUNIZ, E. C. **Salmonelas paratíficas em aves: avaliação da resposta imunológica e controle por meio de probióticos**. 2014. 99f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

NICOLOSO, R. D. S.; LIMA, G. J. M. M.; KRABBE, E.; MORES, N.; OLIVEIRA, P. A. V.; KUNZ, A.; COSTA, O. A. D.; CARON, L.; ÁVILA, V. S.; BARROS, E. C.; OLIVEIRA, M. M. **Tecnologias para destinação de animais mortos na granja**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2017.

NHUNG, N. T.; CHANSIRIPORNCHAI, N.; CARRIQUE-MAS, J. J. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review. **Frontiers in veterinary science**, v. 4, 2017.

OLIVEIRA-BARBOSA, F., 2020. **Estudo da resposta imune, colonização e invasão de aves (*Gallus gallus domesticus*) por estirpes de *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* contendo deleções nos genes *clpp* e *flid***. 2020. 110f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias e Veterinárias) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2020.

PALHARES, J. C.; KUNZ, A. (eds.). **Manejo Ambiental na Avicultura**. Concórdia: Editora Embrapa Suínos e Aves, 2011.

PANDE, V. V.; DEVON, R. L.; SHARMA, P.; MCWHORTER, A. R.; CHOUSALKAR, K. K. Study of *Salmonella* Typhimurium Infection in Laying Hens. **Front. Microbiol.**, v.7, p.203-210, 2016.

PINEDO, L. C.; MUGHINI-GRAS; L.; FRANZ, E.; HALD, T.; PIRES, S. M. Sources and trends of human salmonellosis in Europe, 2015–2019: an analysis of outbreak data. **International Journal of Food Microbiology**, v.379, p.09850, 2022.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme, **Research in Microbiology**, v.155, n.7, p.1016-1020, 2004

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. Kauffmann-White Scheme. **Research in Microbiology**, v.147, p.765-769, 1996.

RONDOT, S.; KOCH, J.; BREITLING, F.; DÜBEL S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. **Nat Biotechnol.**, v.19, n.1, p.:75–78, 2002.

SALEH, Z.; AL-MUHANA, B. M.; HAMDAN, K.; JAWAD, M. S.; KLAIF, S. F. Isolation and identification of *Salmonella typhimurium* bacteria with detection of type-1 fimbriae coding gene by polymerase chain reaction (PCR) technique. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v.33, n.2, p.195-199, 2019.

SANTOS, F. D. A. A.; VALADARES-JUNIOR, E. C.; GOULART, L. R.; NUNES, P. L. F.; MENDONÇA, E. P.; GIRÃO, L. V. C.; HORA, A. S.; FERREIRA, T. B.; BASTOS, L. M.; MEDEIROS-RONCHI, A. A.; FONSECA, B. B., Alternative use of phage display: phage M13 can remain viable in the intestines of poultry without causing damage. **AMB Express**, v.12, n.1, p.64, 2022.

SCHARFF, R. L. Food attribution and economic cost estimates for meat- and poultry-related

illnesses. **Journal of Food Protection**, v.83, n.6, p.959-967, 2020.

SCHRAMM, J. M. DE A.; OLIVEIRA, A. F.; LEITE, I. DA C.; VALENTE, J. G.; GADELHA, A. M. J.; PORTELA, M. C.; CAMPOS, M. R. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. **Ciencia & saude coletiva**, v. 9, n. 4, p. 897–908, 2004.

SIDHU, S. S. Engineering M13 for phage display. **Biomolecular engineering**, v.18, n.2, p.57-63, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. A. C.; SILVEIRA, F. A. **Métodos de análises microbiológica de alimentos**. - Manual técnico. Nº14. Campinas: Editora ITAL, 2007.

STELLA, A. E.; COSTA, A. O.; VENTURA, G. F.; SCHIMMUNECH, M. S.; LIMA, D. A.; PAULA, E. M. N. Avian salmonellosis. **Research, Society & Development**, v.10, n.4, p.122-128, 2021.

STRINGFELLOW, K.; CALDWELL, D.; LEE, J.; BYRD, A.; CAREY, J.; KESSLER, K.; MCREYNOLDS, J.; BELL, A.; STIPANOVIC, R.; FARNELL, M. Pasteurization of chicken litter with steam and quicklime to reduce *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Applied Poultry Research**, v.19, n.4, p.380-386, 2010.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P. **Importância do controle de Salmonella na avicultura**. 2014. Disponível em: <<http://repositoriobiologico.com.br/jspui/handle/123456789/232>>. Acesso em: 26 mar. 2024.

THE POULTRY SITE. Salmonellosis. S. Enteritidis and S. Typhimurium infections. 2019. Disponível em: <<https://www.thepoultrysite.com/disease-guide/salmonellosis-s-enteritidis-and-s-typhimurium-infections>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

WANG, R.; LI, H. D.; CAO, Y.; WANG, Z. Y.; YANG, T.; WANG, J. H. M13 phage: a versatile building block for a highly specific analysis platform. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.415, n.18, p.3927-3944, 2023.

WILLIAMS, J. E.; DILLARD, L. H.; HALL, G. O. The penetration patterns of *Salmonella typhimurium* through the outer structures of chicken eggs. **Avian Diseases**, v.12, p.445-466, 1968.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. **Salmonella (non-typhoidal)**. 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))>. Acesso em : 02 fev. 2024.