

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

**GENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE  
BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA BIOCONTROLE DE  
*SALMONELLA ENTERICA***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Emanuele Serro Pottker**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2016**

**GENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTERIÓFAGOS  
LÍTICOS PARA BIOCONTROLE DE *SALMONELLA ENTERICA***

**Emanuele Serro Pottker**

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

**Orientadora: Profa. Laura Beatriz Rodrigues**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2016**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

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

**GENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTERIÓFAGOS  
LÍTICOS PARA BIOCONTROLE DE *SALMONELLA ENTERICA***

Elaborada por  
**Emanuele Serro Pottker**

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

**Comissão Examinadora**

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

**Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF**

**Júnia Capua de Lima Novello, Dra., UCS**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2016**

CIP – Catalogação na Publicação

---

P871g Pottker, Emanuele Serro

Genômica e caracterização fenotípica de bacteriófagos  
líticos para biocontrole de salmonella enterica / Emanuele  
Serro Pottker. – 2016.

69 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Laura Beatriz Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –  
Universidade de Passo Fundo, 2016.

1. Bactérias patogênicas – Controle biológico.  
2. Salmonela. 3. Melhoramento genético. 4. Alimentos –  
Contaminação. I. Rodrigues, Laura Beatriz, orientadora.  
II. Título.

CDU: 664:615.9

---

Catálogo: Bibliotecária Schirlei T. da Silva Vaz - CRB 10/1364

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo carinho e amizade e amor.

Ao meu marido Daniel, por me incentivar, me dando suporte, ajuda nos momentos cruciais e estando ao meu lado quando mais precisei.

À Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade de realização desse curso.

À Professora Laura Beatriz Rodrigues, minha orientadora, por sua dedicação e orientação, apoio, amizade, ombro amigo, confidente.

À Professora Luciana Ruschel dos Santos, pela ajuda, disponibilidade e amizade.

Ao Professor Raphael Lucio Andreatti, pela ajuda, treinamento e inserção neste novo mundo.

À Professora Sanna Maria Sillankorva, pela receptividade, treinamento e orientação.

Aos colegas da Universidade do Minho, em especial à Catarina e ao Luis, que não mediram esforços para que meu experimento fosse possível.

A todos os funcionários e estagiários do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Veterinário.

Aos colegas mestrandos, pelo incentivo e ajuda.

Aos bolsistas de iniciação científica pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao professor Ricardo Zanella, pelo suporte, esclarecimento e total colaboração.

À Samuel Cibulski e a Franciele Maboni Siqueira, da UFRGS/ IPVDF, pela ajuda e empenho em tornar possível esse trabalho.

Ao professor Luiz Carlos Kreutz e à Assessoria de Assuntos Internacionais da UPF, pelo apoio para o intercâmbio internacional.

À FAPERGS pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste projeto.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha avó, a estrela maior no céu, que em algum lugar continua espalhando sua alegria, e olhando por mim.

## **EPIGRAFE**

“A melhor coisa que você pode fazer por uma pessoa é inspirá-la.”

Bob Dylan

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 <i>Salmonella</i> spp.....	17
2.2 BACTERIÓFAGOS.....	19
2.3.1 Classificação dos bacteriófagos.....	20
2.3.2 Taxonomia dos bacteriófagos.....	21
2.3.3 Ciclo de replicação.....	23
2.3.4 Controle biológico com bacteriófagos.....	25
<b>3. CAPÍTULO 1. Suscetibilidade de diferentes sorovares de <i>Salmonella enterica</i> frente ao bacteriófago P22</b> .....	26
Resumo.....	27
Introdução.....	28
Materiais e Métodos.....	29
Resultados e Discussão.....	31
Conclusão.....	34
Referências.....	38
<b>4. CAPÍTULO 2. Genômica e caracterização fenotípica de bacteriófagos líticos para o biocontrole de <i>Salmonella enterica</i></b> .....	38
Resumo.....	42
Introdução.....	43
Materiais e Métodos.....	44
Resultados e Discussão.....	45
Conclusão.....	51
Referências.....	61
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	61
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	64
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	65
	66

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Quadro de classificação dos bacteriófagos

FIGURA 2. Ciclo lítico

FIGURA 3. Ciclo lisogênico

FIGURA 4. Etapas de replicação dos bacteriófagos

### 3. CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Ação lítica do bacteriófago P22 em *Salmonella enterica*

### 4. CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Morfologia da placa de lise do fago 1:2 no isolamento com *S. Brandenburg*

FIGURA 2. Morfologia da placa de lise do fago 5:2 no isolamento com *S. Bredeney*

FIGURA 3. DNA dos fagos 1:2 e 5:2

FIGURA 4. Perfil RFLP dos fagos 1:2 e 5:2

FIGURA 5. Árvore filogenética do bacteriófago *Salmonella* Phage UPF\_BP1

FIGURA 6. Resultados obtidos no BLAST Hits para o bacteriófago *Salmonella* Phage UPF\_BP1

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Taxonomia dos bacteriófagos

### 3. CAPÍTULO 1

TABELA 1. Características dos isolados de *Salmonella enterica* utilizados

TABELA 2. Ação lítica do bacteriófago P22 contra sorovares de *Salmonella enterica*

### 4. CAPÍTULO 2

TABELA 1. Caracterização das amostras de *Salmonella* hospedeiras.

TABELA 2. Eficiência de infecção

TABELA 3. Caracterização do genoma do bacteriófago 1:2, ORF, genes e atribuições da função, % homologia

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> – Coleção Americana de Tipos de Cultura
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> – Infusão Cérebro-coração
TSB	Caldo triptona de Soja
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
mL	Mililitro
UFC	Unidade formadora de colônia
UE	União Européia
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
WHO	World Health Organization – Organização mundial da saúde
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
XLD	Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato
µL	Microlitro
PRP	Programa de redução de patógenos
min.	Minutos
rpm	Rotações por Minuto
seg.	Segundos
TSA	Trypticase Soy Agar (Ágar tripticase de soja)

## RESUMO

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

### **GENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA BIOCONTROLE DE *SALMONELLA ENTERICA***

Autor: Emanuele Serro Pottker  
Orientadora: Laura Beatriz Rodrigues  
Passo Fundo, 14 de setembro de 2016

*Salmonella* spp. é um dos principais patógenos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA). É um dos agentes patogênicos de maior prevalência em produtos avícolas em diversos países, com distribuição mundial e destacada relevância em saúde pública. Não obstante, a resistência bacteriana aos antimicrobianos representa risco à saúde humana e animal, devido à dificuldade terapêutica e pela possibilidade de transmissão horizontal dos genes de resistência entre diferentes bactérias. Desta maneira, ressalta-se a necessidade de novas ferramentas para tratamento frente a estes patógenos. Dentre elas, destacam-se o controle biológico com uso de bacteriófagos, que são vírus bacterianos, intracelulares obrigatórios, hospedeiro-específico, que infectam somente procariotos. A utilização de bacteriófagos é uma alternativa à antibioticoterapia que, além da prevenção, também pode ser considerada complementar ao uso de terapias convencionais. Assim, no Capítulo 1 testamos a suscetibilidade bacteriana ao bacteriófago P22 a diferentes sorovares de *Salmonella enterica*. Verificamos que o fago P22 teve ação de lítica ao infectar cepas distintas de *Salmonella*. No Capítulo 2, selecionamos 12 sorovares de *Salmonella enterica* (*S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzengrund*, *S. Tennessee*, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028) como bactérias hospedeiras para o isolamento e caracterização fenotípica de bacteriófagos líticos com ação frente a essas bactérias. Foi isolado, caracterizado e sequenciado um novo bacteriófago, ainda não descrito, denominado *Salmonella* Phage

UPF\_BP1, que tem o genoma circular, DNA fita dupla, 39.902 pb, pertence à ordem Caudovirales e à família Podoviridae. Nenhuma das proteínas hipotéticas do *Salmonella* Phage UPF\_BP1 mostrou semelhança significativa com fatores conhecidos ou envolvidos na patogenicidade bacteriana. O novo fago confirmou ação lítica frente às cepas testadas, demonstrando ser possível utilizá-lo em futuras aplicações no biocontrole e fagoterapia de *Salmonella enterica*. Entretanto vale ressaltar que também isolamos outro bacteriófago, denominado 5:2, que está em fase de seqüenciamento genético.

**Palavras-chave:** bacteriófago, genômica, *Salmonella* Phage UPF\_BP1, controle biológico, *Salmonella enterica*.

**ABSTRACT****Master's Dissertation****Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação****Universidade de Passo Fundo****Genomics and phenotypic characterization of lytic bacteriophages for *Salmonella enterica* biocontrol**

Author: Emanuele Serro Pottker

Advisor: Laura Beatriz Rodrigues

Passo Fundo, 14 de setembro de 2016

*Salmonella* spp. it is one of the main pathogens involved in disease outbreaks foodborne (DTA). It is one of the pathogens most prevalent in poultry products in several countries, with world and highlighted important public health distribution. However, bacterial resistance to antimicrobials is a risk to human and animal health due to therapeutic difficulties and the possibility of horizontal transmission of resistance genes between different bacteria. Thus, it emphasizes the need for new tools for treatment against these pathogens. Among them, there is the biological control with the use of bacteriophages, which are bacterial viruses, intracellular binding, host-specific, infecting only prokaryotes. The use of bacteriophage is an alternative to antibiotic therapy, in addition to prevention, it can also be considered supplementary to the use of conventional therapies. Thus, in Chapter 1 we tested the bacterial susceptibility to bacteriophage P22 to different serotypes of *Salmonella enterica*. We found that the P22 phage lytic action had to infect different strains of *Salmonella*. In Chapter 2, we selected 12 serotypes of *Salmonella enterica* (*S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzengrund*, *S. Tennessee*, *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *S. Typhimurium* ATCC 14028) as host bacteria for the isolation and phenotypic characterization of bacteriophage lytic action opposite to these bacteria. It was isolated, characterized and sequenced a new bacteriophage, not yet described, called *Salmonella phage* UPF\_BP1, which has the circular genome, double-stranded DNA, 39,902 bp., Caudovirales belongs to the order and Podoviridae family. None of the hypothetical *Salmonella phage* UPF\_BP1 proteins showed significant similarity with known or factors

involved in bacterial pathogenicity. The new phage lytic action confirmed front of the strains tested, proving to be able to use it in future applications in biocontrol and phage therapy of *Salmonella enterica*. However it is noteworthy that also isolate another bacteriophage, named 5: 2, which is in genetic sequencing phase.

Keywords: bacteriophage, genomics, *Salmonella* Phage UPF\_BP1, biological control, *Salmonella enteric*.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira vem apresentando altos índices de crescimento. Tornou-se o segundo produtor mundial e líder em exportação de carne de frango, chegando a 150 países<sup>1</sup>. Presente em todo território nacional, a carne de frango tem destaque na região Sul, sendo os Estados do Paraná e Rio Grande do Sul os principais produtores. Fatores como qualidade microbiológica e físico-química, sanidade e preço contribuíram para aperfeiçoar a produtividade no setor<sup>2</sup>.

O Brasil busca modernização, e emprega instrumentos como o manejo adequado do aviário, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada com parceria entre indústria e avicultores, para excelência técnica em todas as etapas da cadeia produtiva. Esta estratégia resulta em menores custos e maior qualidade do produto, atendendo às demandas do mercado mundial. A taxa de crescimento da produção de carne de frango teve um aumento de 4,22% e das exportações de 5,62%, em 2015, sendo assim, o Brasil deverá continuar na liderança<sup>2</sup>.

A presença de microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp., afeta negativamente a indústria avícola, pois podem acarretar prejuízos econômicos. Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são causadas pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados e representam um problema global. No RS, entre os anos de 1980 a 2012, foram notificados 4.071 surtos de DTA, abrangendo 358.161 pessoas expostas às gastroenterites de origem infecciosa, com 49.451 doentes e 11 óbitos<sup>3</sup>. No Brasil, segundo os dados fornecidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde, entre os anos de 2000 a 2015, foram reportados 11.241 surtos de DTAs, 218.507 pessoas adoeceram e o número de óbitos chegou a 158 pessoas. Destes, 14,3% das ocorrências foram causadas por diferentes sorovares de *Salmonella* spp.<sup>43</sup>. Considerando que a maioria dos quadros de gastroenterites transcorre sem a necessidade de hospitalizações, e sem o isolamento do agente causal no alimento incriminado, a ocorrência das salmoneloses na população humana, transmitida por alimentos, é provavelmente subestimada. Vale salientar que a subnotificação dos surtos de origem alimentar pelos serviços de vigilância epidemiológica é uma realidade mundial<sup>4</sup>. O controle epidemiológico é de suma importância para evitar o risco de infecções por *Salmonella*, uma vez que as medidas de controle sanitárias estão cada vez mais rígidas, para evitar prejuízos devido às perdas diretas e indiretas, através de embargos econômicos impostos pelos países importadores.

Com o intuito de minimizar a incidência de *Salmonella* spp. em aves, muitas vezes se faz uso de antimicrobianos para tratamentos clínicos. No entanto, existem preocupações a respeito da seleção de bactérias resistentes aos medicamentos e da detecção de resíduos desses princípios ativos em alimentos de origem animal. Por esses motivos tem surgido o interesse em tratamentos alternativos, como o uso de bacteriófagos<sup>5</sup>.

Bacteriófagos são vírus bacterianos, hospedeiros específicos, que infectam e se replicam em procariotos. Podem infectar bactérias, se multiplicar e lisar células. Apresentam capacidade de responder rapidamente à formação de fago-resistência do hospedeiro, pelo fato de também apresentarem a capacidade de sofrer mutação. Tem recebido atenção renovada nos últimos anos, visto como uma possível alternativa em substituição à antibioticoterapia no controle de infecções bacterianas. A especificidade dos bacteriófagos os torna ideais para aplicações em alimentos durante o processo de produção, podendo ser utilizado para o biocontrole de bactérias, sem interferir na microbiota natural ou culturas em produtos fermentados<sup>6</sup>. Além dos fagos terem ação contra bactérias patogênicas, também podem ser eficientes em bactérias resistentes a antibióticos e, ao utilizá-los, reduz o risco químico, pois não deixam resíduos.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram isolar e caracterizar bacteriófagos que possam ser utilizados no controle de diferentes sorovares de *Salmonella enterica*. A presente dissertação é composta por esta introdução, uma breve revisão de literatura sobre *Salmonella* spp., bacteriófagos, terapias com bacteriófagos e, ainda, por dois artigos científicos. O Capítulo 1, **“Teste de suscetibilidade de diferentes sorovares de *Salmonella* frente ao bacteriófago P22”** teve como objetivo avaliar a eficácia de infecção do bacteriófago P22 nos sorovares de *Salmonella enterica* selecionados. O Capítulo 2, **“Genômica e caracterização fenotípica de bacteriófagos líticos para biocontrole de *Salmonella enterica*”**, teve como objetivo isolar bacteriófagos líticos com ação contra *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzengrund*, *S. Tennessee*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*; realizar a caracterização fenotípica dos bacteriófagos isolados quanto ao seu espectro lítico, eficiência de ensaio em placa e potencial de lise frente aos 12 sorovares de *Salmonella*; realizar o sequenciamento genético dos bacteriófagos isolados; com intuito de obter novos agentes que possibilitem o uso como fagoterapia ou biocontrole de *Salmonella enterica*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella*, pertencente à família Enterobacteriaceae, é uma bactéria Gram negativa, com formato de bastonetes curtos, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos. A maioria é móvel, com flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. Fermentam glicose produzindo ácido e gás, porém são incapazes de metabolizar a lactose e a sacarose. Sua temperatura ótima de multiplicação é de aproximadamente 36 °C e a temperatura mínima em torno de 5 °C. São termossensíveis, podendo ser destruídas a 60 °C por 15 a 20 min<sup>7</sup>.

A classificação da *Salmonella* inclui duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. Esta última se divide em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. O gênero *Salmonella* está amplamente distribuído no ambiente, e foi isolado e identificado pela primeira vez em 1885, por Daniel Elmer Salmon. Em 2007 o Instituto Pasteur descreveu 2.579 sorovares através do esquema Kauffmann – White - Le Minor (KWL), para caracterizar os diferentes sorotipos do gênero com base em suas fórmulas antigênicas, somáticos (O) e flagelares (H). Os sorovares devem ser escritos com a primeira letra maiúscula, ou seja, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, denominada comumente como *S. Enteritidis*<sup>7,8,9</sup>

*Salmonella* Enteritidis é um dos sorovares mais comuns em aves, depois de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. Junto com *S. Typhimurium* são os sorovares mais importantes na causa de paratifo aviário e responsáveis por infecções alimentares no homem<sup>10,11,12</sup>. Além destes, outros sorovares já foram isolados em abatedouros de aves em trabalhos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa, como *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzengrund*, *S. Tennessee*<sup>13</sup>. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, em seu programa Global Salm-Surv (GSS), todos os sorovares acima citados estão na lista entre os 15 sorovares mais sorotipificados em amostras de animais, humanos, alimentos e ambiente no Brasil<sup>14</sup>.

A avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento nas últimas três décadas e conquistado os mais exigentes mercados, tornando o Brasil o segundo produtor mundial de carne de frango e líder em exportação, chegando a 150 países compradores em 2015<sup>15</sup>. A taxa de crescimento de produção da carne de frango alcançou 4,22% e as

exportações obtiveram um crescimento de 5,62% em 2015. Sendo assim, o Brasil deverá continuar na liderança mundial<sup>16</sup>.

A presença de microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp., afeta economicamente a indústria avícola. Somente no Rio Grande do Sul, entre os anos de 1980 e 2012, foram notificados 4.071 surtos de DTA, abrangendo 358.161 pessoas expostas ao risco de adoecer por gastroenterite de origem infecciosa. *Salmonella* spp. foi responsável por aproximadamente 60% dos surtos investigados<sup>17</sup>. Nos EUA, 48 milhões de pessoas ficam doentes e outras 3.000 morrem por ano em decorrência das doenças transmitidas por alimentos. Deste total, acredita-se que 1,2 milhões dos casos sejam causados por *Salmonella*, segundo dados do *Center for Disease Control and Prevention*<sup>18</sup>.

Considerada uma bactéria cosmopolita, com distribuição em muitos países, a *Salmonella* causadora da salmonelose, uma das mais comuns e amplamente distribuídas doenças alimentares, representando um custo significativo. A sua subnotificação impede o conhecimento do número real de casos, mas milhões de pessoas são afetadas todos os anos e a doença resulta em milhares de mortes<sup>14, 19, 20</sup>.

Existem evidências que os produtos oriundos da carne de frango são uma das mais importantes fontes de infecção para seres humanos<sup>21</sup>. Considerando que a principal via de transmissão de *Salmonella* spp. está na cadeia alimentar, sua presença em animais criados com objetivo comercial faz com que esse microrganismo possa ser considerado como um dos mais incidentes e relevantes agentes causais de enfermidade entérica<sup>22</sup>.

A partir de 1994 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), com a Instrução Normativa nº 78<sup>23,24</sup>, reforçou a legislação de controle de *Salmonella* spp. nas granjas avícolas. E, com o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), enfatiza que toda granja de reprodutora de aves deve ser monitorada para detecção de *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Aliado a isso, em 2003, o Programa de Redução de Patógenos (PRP) da Instrução Normativa nº 70<sup>25</sup> conferiu controle sobre o processo de abate, com pesquisa de *Salmonella* spp. em carcaças de frango, envolvendo todos os estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), atendendo as exigências de segurança alimentar para o mercado interno e externo.

Medidas como higiene e desinfecção nas instalações são necessárias para minimizar *Salmonella* spp. em lotes de aves, assim como são necessários procedimentos de biossegurança, que incluem alojar aves livres de *Salmonella* spp., utilizar ração não contaminada e controlar todos os fatores de risco dentro do ambiente das granjas. Sendo estes: higiene e desinfecção das instalações, controle de vetores, restrição de visitas, uso de roupa e

calçado exclusivo para a granja, cloração da água, monitoramento bacteriológico periódico de ambiente, aves, rações e resíduos de incubatório, para certificar o sucesso do programa<sup>26</sup>.

O uso de antibioticoterapia em lotes de aves é comumente utilizado. Seu uso abusivo tem causado preocupação, pois são medicamentos que atuam causando a morte ou a inibição da multiplicação de microrganismos. Podem ser administrados em animais para tratar ou prevenir a ocorrência de doenças infecciosas e, também, como aditivos, neste caso visando melhorar o desempenho zootécnico de animais de produção. Ocasionalmente pode resultar em resistência bacteriana pela contínua exposição aos antibióticos, representando um grande risco para a saúde humana<sup>27</sup> em casos de infecções de difícil controle com terapia antimicrobiana ineficaz.

A resistência bacteriana pode ser classificada como natural ou intrínseca, decorrente de uma propriedade comum aos microrganismos da espécie, ou adquirida, resultante da aquisição de mecanismos de resistência. Existem três principais formas de resistência: inativação enzimática da molécula do antimicrobiano, que decorre da ação de enzimas bacterianas sobre o princípio ativo; alteração da estrutura da molécula-alvo do antimicrobiano; e mecanismos para reduzir a concentração intracelular do antimicrobiano, como bombas de efluxo<sup>28</sup>.

A possível transferência dos microrganismos resistentes a antibióticos dos animais para o homem pode trazer graves conseqüências para a saúde humana, como uma infecção de difícil controle devido a uma terapia antimicrobiana ineficaz.

Com isso, se faz necessário novos métodos de controle e prevenção para esses microrganismos, e o uso de bacteriófago surge como alternativa no combate às bactérias patogênicas.

## 2.2 BACTERIÓFAGOS

Vírus bacterianos, bacteriófagos ou fagos, são vírus específicos de procariotos. São intracelulares obrigatórios, hospedeiro-específicos, capazes de infectar espécies ou grupos dentro de uma mesma espécie<sup>29</sup>. É provavelmente o mais antigo e onipresente microrganismo na Terra. Datam de 3 bilhões de anos e estima-se que existam em média  $10^{30}$ - $10^{32}$  fagos para cada célula bacteriana, sendo fundamentais na preservação do equilíbrio em cada ecossistema onde existem bactérias<sup>30</sup>.

Os primeiros relatos datam de 1896 onde o bacteriologista britânico Ernest Hanking relatou que na Índia, nos rios Ganges e Jumna, existia uma elevada atividade

antibacteriana contra *Vibrio cholerae* que limitava a expansão das epidemias de cólera. Em 1898 o bacteriologista russo Gamaleya observou um fenômeno similar enquanto trabalhava com *Bacillus subtilis*<sup>31</sup>.

Os bacteriófagos foram descobertos em 1915 por Frederick Twort e por Felix d'Herelle. A descoberta dos fagos foi anterior aos antibióticos, gerando interesse na comunidade científica mundial. Em 1919 d'Herelle e seus colaboradores utilizaram bacteriófagos terapeuticamente, tratando quatro crianças com disenteria bacteriana. Para cada paciente foi administrada uma dose de fagos anti-disenteria, e em 24 horas os pacientes apresentaram melhora.

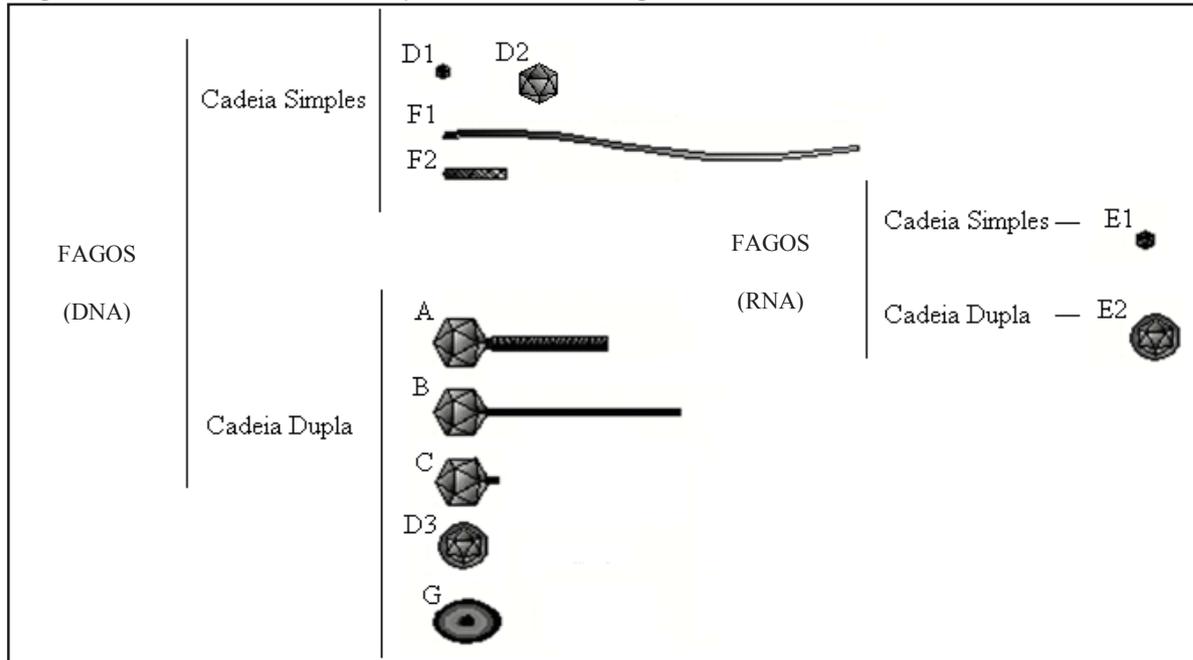
A primeira publicação relatando a eficácia de fagos no tratamento de uma doença infecciosa em humanos foi em 1921, publicado por Richard Bruynoghe e Joseph Maisin, que utilizaram bacteriófagos com sucesso para tratar infecções estafilocócicas na pele. A sua publicação foi seguida por outros pesquisadores, utilizando bacteriófagos para tratar infecções bacterianas em seres humanos e outros animais<sup>30</sup>.

Com o advento dos antibióticos, que parecia funcionar como "balas mágicas", o interesse em fagoterapia começou a declinar no Ocidente durante os anos 1940 e 1950, mas continuou sendo utilizada na União Soviética e em países do Leste Europeu<sup>30</sup>.

### **2.3.1 Classificação dos bacteriófagos**

Os bacteriófagos dividem-se em seis grupos, conforme o tipo morfológico, tipo de ácido nucléico e hospedeiro (Figura 1). Podem ser tanto de ácido desoxirribonucléico (DNA), cadeia simples (cs) ou de cadeia dupla (cd), ou de ácido ribonucléico (RNA), cadeia simples (cs) ou de cadeia dupla (cd). Os fagos com DNA cadeia dupla podem ser com cauda contrátil (A), cauda não-contrátil (B), cauda curta (C), sem cauda (D3) e pleomórficos com invólucro lipídico (G). Os fagos de DNA cadeia simples podem ser icosaédricos (D1 e D2) ou filamentosos (F1 e F2). Os do grupo E são icosaédricos com RNA cadeia simples (E1) ou dupla (E2)<sup>32</sup>.

Figura 1- Quadro de classificação dos bacteriófagos.



Fonte: Ackerman et al., 1992.

### 2.3.2 Taxonomia dos bacteriófagos

Os fagos são classificados de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), com base na sua taxonomia e no tipo de ácido nucleico que são constituídos. O ICTV reconhece, atualmente, uma ordem de treze famílias e 46 gêneros de fagos (Tabela 1). Os fagos com DNA cadeia dupla e com cauda, pertencentes à ordem Caudovirales, representam 96% de todos os fagos até hoje reportados. Podem ser divididos em três famílias: Myoviridae, Podoviridae e Siphoviridae. O genoma de um fago com cauda engloba genes que codificam o empacotamento e replicação de DNA, regulação da transcrição, lise do hospedeiro, e a formação da cabeça, cauda e fímbrias da cauda. O capsídeo tem como função a proteção da informação genética, e a cauda possui fibras e demais estruturas que estão envolvidas no reconhecimento e ligação do fago à bactéria hospedeira<sup>33</sup>.

Alguns bacteriófagos conhecidos para *Salmonella enterica* são os denominados OX174, pertencentes à família Microviridae. Também já foram identificados bacteriófagos da família Podoviridae, como o P22, relacionado ao sorovar Typhimurium. Em 1952 Zinder e Lederberg demonstraram a transferência de material genético entre uma *S. Typhimurium* e outra *S. Typhimurium* mutante que envolvia um intermediário fago. Este fago possuía um profago e era originalmente chamado PLT 22. Sendo atualmente referido como P22, vírus utilizado para investigar a genética da bactéria<sup>44</sup>. O bacteriófago T4, pertencente à família Myoviridae, é relacionado ao sorovar Enteritidis<sup>42</sup>.

Tabela 1- Taxonomia dos bacteriófagos.

Família	Características	Ácido Nucléico
Corticoviridae	sem envelope, capsídeo icosaédrico	dsDNA
Cystoviridae	com envelope, capsídeo icosaédrico	dsRNA
Fuselloviridae	com envelope, pleomórfico, sem capsídeo	dsDNA
Inoviridae	sem envelope, filamentoso	ssDNA
Leviviridae	sem envelope, capsídeo icosaédrico	ssRNA
Lipothrixviridae	com envelope, simetria helicoidal	dsDNA
Microviridae	sem envelope, capsídeo icosaédrico	ssDNA
Myoviridae	sem envelope, cauda contrátil	dsDNA
Plasmaviridae	com envelope, pleomórfico	dsDNA
Podoviridae	sem envelope, cauda curta não contrátil	dsDNA
Rudiviridae	sem envelope, simetria helicoidal	dsDNA
Siphoviridae	sem envelope, cauda longa não contrátil	dsDNA
Tectiviridae	sem envelope, cauda contrátil	dsDNA

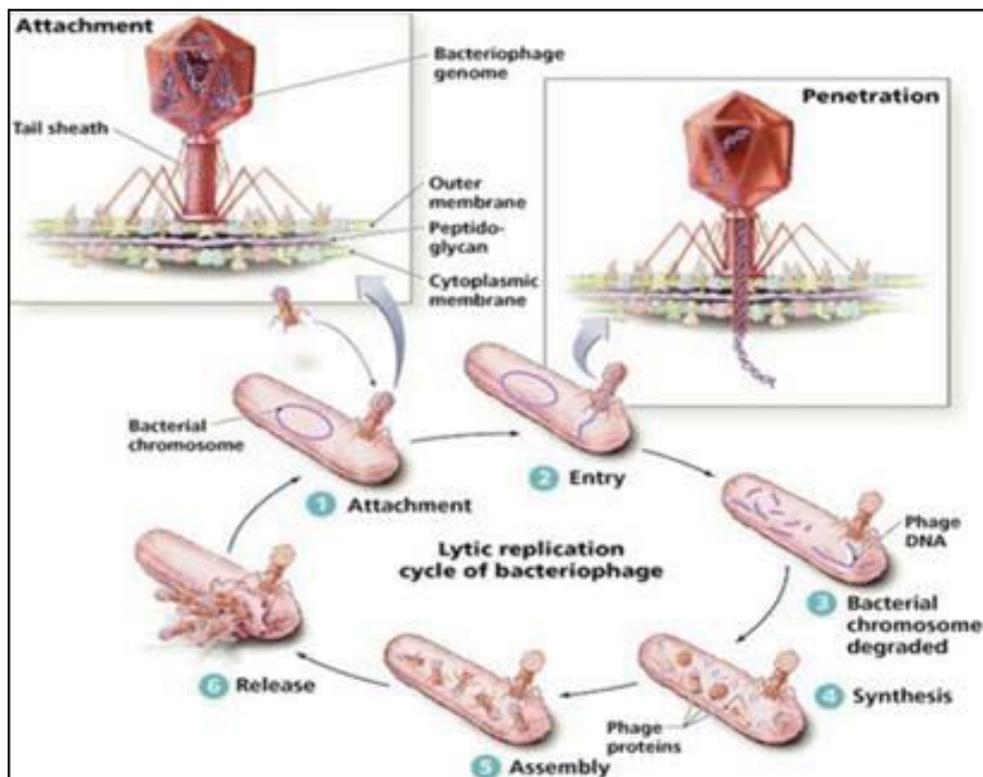
Fonte: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), 2016

Legendas: ssDNA: ácido desoxirribonucléico de cadeia simples ; dsDNA: ácido desoxirribonucléico de cadeia dupla; ssRNA: ácido ribonucléico de cadeia simples; dsRNA: ácido ribonucléico de cadeia dupla.

### 2.3.3. Ciclo de replicação

Os fagos podem possuir dois ciclos de replicação diferentes: O ciclo lítico, ou seja, a reprodução da virulência dos bacteriófagos (Figura 2), que ocorre dentro do hospedeiro e induz a lise das células que resulta na liberação de uma nova progênie de bacteriófagos, recomeçando, assim, um novo ciclo de infecção. O material genético dos fagos serve de molde para formar os RNA mensageiros que irão sintetizar as proteínas do capsídeo e obter várias cópias do ácido nucléico dos fagos. Quando há uma síntese de proteínas em quantidade suficiente começa a montagem das partículas virais, o ácido nucléico é envolto pelas proteínas do capsídeo e a bactéria é lisada, liberando novos bacteriófagos<sup>34</sup>.

Figura 2 - Ciclo lítico.

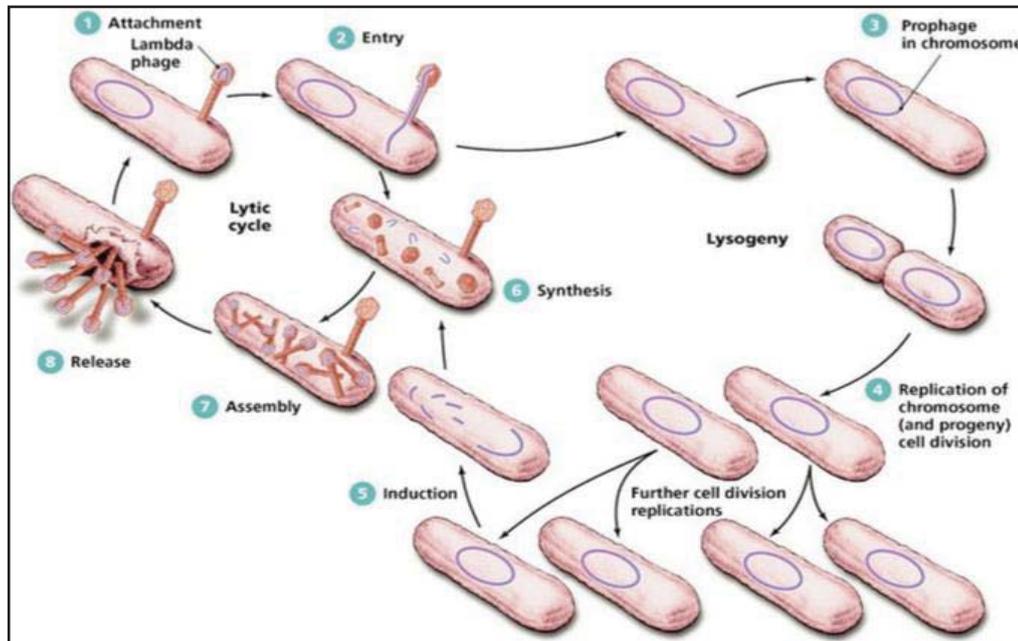


Fonte: Mota Nobre, 2015.

O ciclo lisogênico ocorre quando o fago integra seu material genético ao genoma da bactéria hospedeira, recebendo o nome de prófago, vírus atenuado ou fago temperado, e se mantém inativo. Ao replicar-se, a bactéria replica o prófago para as células filhas, evento chamado de lisogenia. Essa replicação, ou qualquer outra alteração, como exposição à

radiação ultravioleta, pode estimular o prófago a desprender-se do genoma da bactéria e iniciar um ciclo lítico<sup>34</sup>, conforme representado na Figura 3.

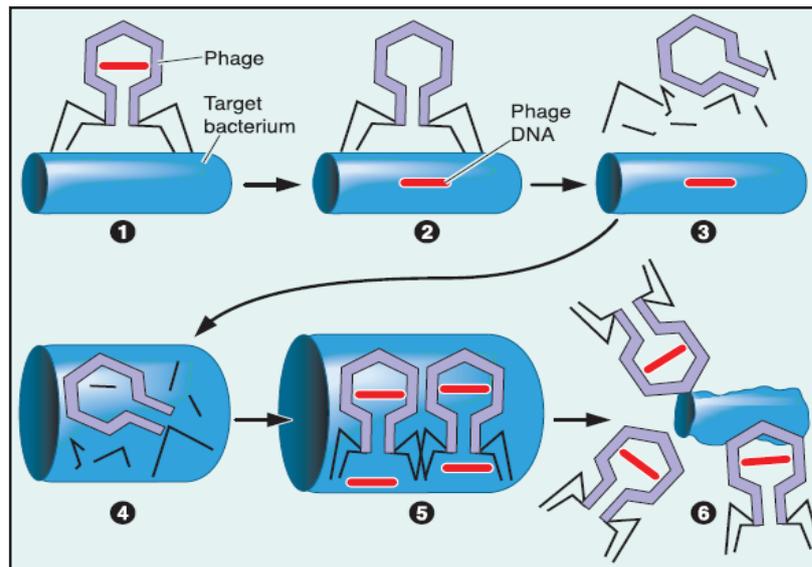
Figura 3 - Ciclo lisogênico.



Fonte: Mota Nobre, 2015.

O ciclo de replicação dos fagos passa por algumas etapas. A primeira consiste na ligação do fago à célula bacteriana. É realizada por uma ligação reversível, mediada pela cauda do fago, as quais as fibras se anexam a um receptor específico na superfície celular bacteriana. Normalmente ocorre quase instantaneamente após exposição da célula hospedeira ao fago e, logo uma ligação irreversível, ou adsorção, quando as fibras são fixadas irreversivelmente à bactéria. A segunda etapa é a injeção do material genético RNA ou DNA fágico no hospedeiro bacteriano. As etapas três e quatro referem-se à síntese de componentes, replicação do material genético e à produção de novos capsídeos. Com isso, o fago assume a maquinaria biossintética do hospedeiro e proteínas são sintetizadas. Durante a quinta etapa o ácido nucléico e proteínas estruturais são sintetizadas e novos fagos se acumulam dentro da célula bacteriana. A sexta, e última etapa, é a liberação dos fagos, o que resulta na lise bacteriana, conforme representado na Figura 4. O número de partículas fágicas libertadas por células bacterianas infectadas pode ser tão elevado quanto  $1000:1$ <sup>30</sup>.

Figura 4 - Etapas de replicação dos bacteriófagos.



Fonte: Sulakvelidze, 2011.

### 2.3.4 Controle biológico com bacteriófagos

Antes do aparecimento dos antibióticos foi sugerido que as infecções bacterianas poderiam ser prevenidas ou tratadas com a administração de fagos, proposta efetuada com sucesso por D'Herelle em 1917. Mas, com a descoberta dos antibióticos e quimioterápicos, a terapia fágica acabou sendo esquecida e usada apenas em estudos de virologia, ou com os bacteriófagos empregados para monitoramento e identificação de microrganismos<sup>35</sup>.

Fagos são considerados agentes terapêuticos potencialmente atraentes devido às diversas características que possuem, como serem extremamente hospedeiro-específicos, eficazes na lise de bactérias patogênicas, não prejudiciais para o homem e animais, e rapidamente modificáveis para combater o aparecimento de novas ameaças bacterianas. Além destas características, os fagos apenas se replicam em células bacterianas específicas, não destruindo a microbiota adjacente<sup>36</sup>.

Os bacteriófagos são ubíquos na natureza, podendo ser isolados da água, solo ou da matéria orgânica. Outro fator considerável é seu cultivo e manutenção em laboratório realizado por métodos microbiológicos tradicionais, mantendo-os em bactérias hospedeiras em igual quantidade de bacteriófagos<sup>37</sup>.

A fagoterapia tem sido testada com êxito no tratamento de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em ratos experimentais, com o

propósito de avaliar seu potencial para tratamento em humanos, mostrando que a fagoterapia pode ser eficaz contra infecções humanas causadas por bactérias resistentes a antibióticos<sup>38</sup>.

Em estudo realizado contra *Vibrio vulnificus*, que contaminam crustáceos, como ostras, e podem causar infecção alimentar em humanos, a fagoterapia mostrou-se eficaz tanto para infecções localizadas quanto sistêmicas<sup>39</sup>.

Contra os sorovares de *Salmonella* Enteritidis, S. Heidelberg e S. Typhimurium, em um estudo realizado com fagos, foi observada uma redução de 4 log<sup>10</sup> quando comparado aos controles não tratados<sup>40</sup>. Em outro estudo, utilizaram o bacteriófago P22 em ovos líquidos, bebidas energéticas, leite desnatado, suco de maçã e peito de frango inoculados com S. Typhimurium. Também se verificou diminuição de 2 log<sup>10</sup> quando comparados aos controles não tratados. Os resultados indicaram que os fagos podem ser úteis no controle de agentes patogênicos de origem alimentar<sup>41</sup>.

Além disso, com o declínio no desenvolvimento de antibióticos, em meio à emergência de bactérias resistentes a múltiplas drogas, gerou o interesse em desenvolver novos agentes antibacterianos, incluindo as aplicações utilizando bacteriófagos<sup>30</sup>.

Neste contexto, o estudo descrito no Capítulo 1, utilizou-se o bacteriófago P22, já identificado e descrito na literatura, e foi verificado que ele possui capacidade de infectar diferentes sorovares de *Salmonella* spp.. Esta etapa nos instigou a realizar o principal estudo desta dissertação, relatado no Capítulo 2, para isolar e caracterizar fenotípica e genotipicamente novos bacteriófagos líticos para serem utilizados como controle biológico de *Salmonella enterica*, como futura alternativa ao uso de antimicrobianos.

### 3. CAPÍTULO 1

## **Suscetibilidade de diferentes sorovares de *Salmonella enterica* frente ao bacteriófago P22**

**Emanuele Serro Pottker<sup>1</sup>, Bruna Webber<sup>2</sup>, Natalie Nadin Rizzo<sup>1</sup>, Karen Apellanis Borges<sup>2</sup>, Raphael Lucio Andreatti Filho<sup>3</sup>, Luciana Ruschel dos Santos<sup>1</sup>, Laura Beatriz Rodrigues<sup>1</sup>**

(Artigo submetido para *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*)

<sup>1</sup> Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil, <sup>2</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, <sup>3</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), SP.

CORRESPONDENCIA: E. Pottker [emanuelepottker@yahoo.com.br – Tel.: +55(54)9686-9737/ (54)3311-9739]. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) – UPF. BR 285, Bairro São José. CEP 99052-900 Passo Fundo, RS, Brasil.

**RESUMO** - *Salmonella* spp. é um dos principais patógenos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA). É um dos agente patogênicos de maior prevalência em produtos avícolas, possui distribuição mundial, tendo destacada relevância em saúde pública devido às características endêmicas, alta morbidade e dificuldade de adoção de medidas para seu controle. A resistência bacteriana a antimicrobianos representa risco à saúde animal e humana, devido à dificuldade terapêutica e possibilidade de transmissão horizontal dos genes de resistência entre espécies bacterianas. Assim, tem se buscado possibilidades de tratamento contra estes microrganismos. Com intuito de obter alternativas ao uso de princípios ativos antibacterianos, testamos a fagoterapia como controle biológico de *Salmonella* spp.. Bacteriófagos, ou fagos, são vírus bacterianos, intracelulares obrigatórios, que infectam somente procaríotos. Avaliamos a eficácia da utilização do bacteriófago P22 frente a *S. Enteritidis*, *S. Rissen*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Brandenburg*, *S. Anatum*, *S. Tennessee* e *S. Bredeney*, isoladas de abatedouros de aves, com algumas apresentando multirresistência, e cepas *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028, totalizando 20 amostras distintas de *S. enterica*. Após a fagotipagem, verificamos que o fago P22 mostrou-se eficaz quando confrontado com cepas distintas, mesmo sendo específico e isolado a partir de *S. Typhimurium*, com ação lítica também quando testado em cepa multirresistente de *S. Enteritidis*. Estes resultados nos fazem conjecturar a possibilidade de controle biológico contra diferentes sorovares de *S. enterica* utilizando bacteriófagos em meio ambiente, alimentos, embalagens e biofilmes.

**Palavras-chave:** Controle biológico; fagotipagem; *Salmonella* spp., bacteriófago P22.

## INTRODUÇÃO

*Salmonella* spp. é um microrganismo de distribuição mundial, sendo os seres humanos e animais seus principais reservatórios naturais. Considerado um dos principais agentes envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar em países desenvolvidos, muitas vezes está associado ao manuseio e preparo inadequado de produtos de origem animal, principalmente de produtos avícolas. Segundo estimativa da Secretaria de Vigilância em Saúde, até o ano de 2015 a maioria dos casos de surtos alimentares no Brasil ocorreram devido à ingestão de alimentos contaminados e posterior infecção por *Salmonella* spp. (Sinan/Net/SVS/MS, 2016).

A salmonelose é uma das zoonoses de maior relevância para a saúde pública em todo o mundo, devido às características endêmicas, alta morbidade e dificuldade de adoção de medidas para seu controle. Conforme dados do CDC (*Center for Disease Control and Prevention*), 48 milhões de pessoas ficam doentes e outras 3.000 morrem por ano em decorrência das DTAs apenas nos Estados Unidos (CDC, 2012; CDC, 2011). Deste total, acredita-se que 1,2 milhões dos casos sejam causados por *Salmonella* spp. (CDC, 2014b).

*S. Enteritidis* é um dos sorovares mais comuns em aves, depois de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* e, junto com a *S. Typhimurium*, são os sorovares mais importantes na causa de paratifo aviário e responsáveis por infecções alimentares no homem (Andreatti Filho *et al.*, 2007). Além destes, outros sorovares já foram isolados a partir de pontos no fluxograma de abate de aves, como *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzengrund*, *S. Tennessee* e *S. Typhimurium* (Santos *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2013). Conforme dados do CDC, os sorovares mais encontrados em aves nos Estados Unidos são *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Senftenberg* (Foley & Lynne, 2008). No Brasil, os principais sorovares encontrados, conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* e *S. Mbandaka* (BRASIL, 2008).

O aumento do número de microrganismos resistentes a antibióticos, muitas vezes pelo uso indiscriminado, acaba selecionando bactérias resistentes. Com isso, tem-se buscado tratamentos alternativos, como o controle biológico das bactérias.

Dentre eles destaca-se o uso de bacteriófagos, que são vírus que infectam bactérias específicas para o receptor que possuem.

Vírus bacterianos, ou bacteriófagos, foram descobertos em 1915, são vírus específicos de bactérias e intracelulares obrigatórios. Hospedeiro-específicos, são capazes de infectar espécies específicas ou até mesmo grupos dentro de uma mesma espécie (Goodridge & Abedon, 2003; Hagens & Loessner, 2007). A maioria dos fagos estudados possui cauda e estão divididos em três famílias distintas: Siphoviridae, com cauda longa e não contrátil; Myoviridae, com cauda longa e contrátil; e Podoviridae, de cauda curta e não contrátil. O bacteriófago P22 pertence a essa última família, com gene circular constituído por DNA de cadeia dupla (Ackerman *et al.*, 1992).

Os bacteriófagos são ubíquos na natureza, podendo ser isolados de diferentes fontes, como água, solo ou matéria orgânica. O bacteriófago P22 foi isolado a partir da bactéria hospedeira *Salmonella* Typhimurium. A semelhança entre proteínas do P22 e de outros bacteriófagos foi investigada e apontam para a hipótese de que este fago evoluiu através da troca de informação genética de recombinação com outros vírus (Byl & Kropinski, 2000). Infecta *Salmonella* por ligação ao antígeno O, parte do lipopolissacarídeo presente na membrana externa das bactérias Gram negativas. Os bacteriófagos, quando temperados, diferem dos virulentos pela capacidade de integrarem a sua informação genética no genoma bacteriano, replicando-se em sintonia com ele (Casjens & Grose, 2016; Cota *et al.*, 2015). Após o P22 na fase lítica, infectar uma célula, essa é lisada e o fago é liberado podendo infectar outras células na cultura. Ao contrário de muitos fagos, o P22 é usado benéficamente no controle biológico de *Salmonella*, sendo uma alternativa para a indústria de alimentos no controle de patógenos (Casjens & Hayden, 1988).

Os bacteriófagos podem ter um ciclo de vida lítico ou lisogênico. O ciclo lítico, ou a reprodução da virulência dos bacteriófagos, ocorre dentro do hospedeiro e induz a lise das células, resulta na liberação de uma nova progênie, recomeçando um novo ciclo de infecção. Os bacteriófagos com ciclo lisogênico integram seu material genético ao genoma da bactéria hospedeira (prófago) e se mantém inativo. Ao replicar-se, a bactéria passa o prófago para as células filhas (lisogenia), sendo que essa replicação pode estimular o prófago a desprender-se do genoma bacteriano e iniciar um ciclo lítico (Azeredo *et al.*, 2014).

A fagoterapia apresenta vantagens sobre a antibioticoterapia. É eficaz contra bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos devido à indução da bacteriólise, e difere completamente da ação destes. Por ser hospedeiro-específico não há infecção de outras bactérias, mantendo a microbiota benéfica. Apresenta capacidade de responder rapidamente à formação de fago-resistência do hospedeiro, pelo fato dos fagos também apresentarem a capacidade de sofrer mutação. Além disso, o custo de desenvolvimento de uma fagoterapia é mais barato que o de desenvolvimento de novos antimicrobianos. E, como os fagos não afetam células eucarióticas, os efeitos colaterais do seu uso são incomuns (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Com a resistência aos antibióticos generalizada, afetando negativamente a saúde humana, a procura de agentes antimicrobianos alternativos é cada vez mais incentivada. Desse modo, com intuito de obter alternativas ao uso desses princípios ativos, avaliou-se a ação lítica do bacteriófago P22 frente a diferentes sorovares de *Salmonella*, destacando sua utilização no controle deste importante patógeno de origem alimentar.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostras de *Salmonella* spp.**

Foram testadas 20 cepas de *Salmonella* proveniente de abatedouros de aves, previamente isoladas e confirmadas geneticamente, e cepas de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 (Tabela 1). As amostras estavam armazenadas congeladas em caldo Infusão cérebro e coração (BHI) 80% e com 20% de glicerol e conservadas na bacterioteca a -20 °C. Foram reativadas, utilizando meio de enriquecimento não seletivo (BHI), inoculadas em Caldo Triptona de Soja (TSB) e posteriormente incubadas a 37 °C por 24h.



### **Identificação do profago**

As amostras de *Salmonella* spp. foram testadas para a presença de prófago no seu DNA, para não resultar em falso positivo para presença de bacteriófagos. Para isso foram produzidas placas de Petri contendo uma fina camada de ágar triptona de soja (TSA) e uma sobrecamada de 5 mL de meio semi-sólido composto por caldo triptona de soja (TSB) 94% e 0,6% de agar-agar, com inóculo de 100 µL da bactéria a ser testada em fase estacionária. Pipetou-se 50 alíquotas de 10 µL do inóculo da mesma bactéria utilizada na sobre camada. As placas foram incubadas invertidas por 24 h a 37 °C ± 1°C. Posteriormente, realizou-se a leitura, na qual não deveria apresentar áreas de lise. (Sillankorva et al, 2010).

### **Amplificação do bacteriófago**

O bacteriófago P22 foi amplificado utilizando *Salmonella* Typhimurium em TSB em concentração dupla. Em uma solução contendo 5 mL de TSB, inoculou-se 2 mL da bactéria hospedeira com concentração de 10<sup>7</sup> UFC/mL. Adicionou-se 1 mL do fago, sendo posteriormente incubado por 24 h a 37 °C ± 1 °C. Após esse período a solução foi centrifugada em 8000 rpm e filtrada em seringa com filtros de 0,22 µm, transferidos para frascos estéreis, e armazenadas a 4°C, para posterior uso no teste de suscetibilidade frente ao fago P22. (Sambroo e Russel, 2001).

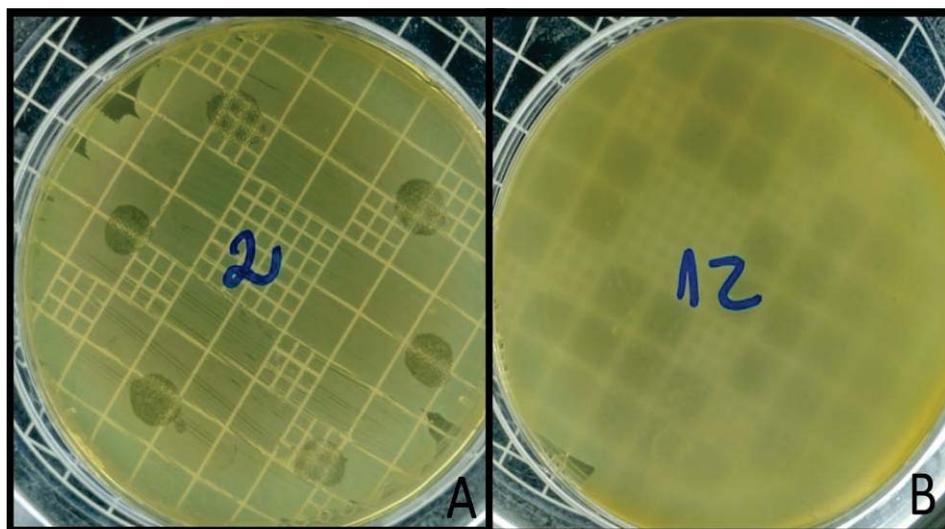
### **Teste de fagotipagem**

Para o teste de suscetibilidade foram utilizadas placas de TSA, onde foi produzida uma sobrecamada bacteriana em placas individuais com 100 µL de cada um dos 20 sorovares de *Salmonella* a serem testados, utilizando cultivo bacteriano previamente preparado, incubado por 24 h a 37 °C ± 1 °C e 5 mL de ágar semi-sólido. As placas foram identificadas com a hospedeira a ser submetida ao teste, o qual foi realizado em triplicata, resultando em 63 análises de fagotipagem. A seguir pipetou-se alíquotas de 10 µL do fago P22 sobre a camada bacteriana. Após secagem completa, as placas foram incubadas a 37 °C ± 1 °C por 24 horas. Após este período, realizou-se a leitura para verificar a suscetibilidade da bactéria hospedeira frente ao bacteriófago P22, observando as áreas de lise. Como controle negativo utilizou-se placas com sobrecamada e pipetamos TSB estéril.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes *in vitro* o bacteriófago P22 mostrou-se eficaz para o seu sorovar específico, *S. Typhimurium*, e também quando confrontado com bactérias hospedeiras de sorovares distintos, como *S. Enteritidis*, *S. Lexington*, *S. Panamá*, *S. Brandenburg*, *S. Anatum* e *S. Bredeney*, conforme observado na Figura 1 e na Tabela 2.

**Figura 1** – Ação lítica do bacteriófago P22 em *Salmonella enterica*.



Legenda: A - amostra suscetível apresentando halos de lise; B – amostra não suscetível.

Ao analisarmos os resultados da Tabela 2, observamos ação de lítica do bacteriófago P22 frente aos diferentes sorovares de *Salmonella enterica* por um período de 24 h, com capacidade de infectar 60% (12/20) dos isolados a que foi exposto.

Esses relatos são reforçados por Sharma *et al.* (2015), que obteve resultado de lise celular frente aos sorovares de *Salmonella* Enteritidis, *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium* em estudo realizado com o uso de fagos. Outro estudo, utilizando o bacteriófago P22 em diferentes matrizes de alimentos contaminados artificialmente com *Salmonella* Typhimurium, verificaram diminuição de 2 logs<sup>10</sup> quando comparado aos controles não tratados (Zinno *et al.*, 2014). Os autores incentivam ainda a combinação de fagos com outros agentes antimicrobianos naturais como, por exemplo, uso de bacteriocinas e óleos essenciais. Esses resultados indicam que os

fagos são uma ferramenta promissora no controle de agentes patogênicos de origem alimentar

**Tabela 2-** Ação lítica do bacteriófago P22 contra sorovares de *Salmonella enterica*.

Identificação	Sorovar	Ação lítica <sup>1</sup>
SE ATCC	S. Enteritidis	Suscetível
ST ATCC	S. Typhimurium	Suscetível
SE82	S. Enteritidis	Suscetível
SE170	S. Enteritidis	Suscetível
SE24	S. Enteritidis	Suscetível
SE69	S. Enteritidis	Não suscetível
SE106	S. Enteritidis	Não suscetível
SE84	S. Enteritidis	Suscetível
L001	S. Rissen	Não suscetível
L002	S. Lexington	Suscetível
L003	S. Lexington	Não suscetível
L004	S. Rissen	Não suscetível
L005	S. spp.	Suscetível
L006	S. Panamá	Suscetível
L007	S. Lexington	Não suscetível
CM2	S. Brandenburg	Suscetível
CM4	S. Anatum	Suscetível
CM5	S. Anatum	Não suscetível
CM6	S. Tennessee	Não suscetível
CM12	S. Bredeney	Suscetível

<sup>1</sup>Ação lítica: bactéria considerada suscetível quando o fago formou halos de lise nas placas; bactéria considerada não suscetível quando o fago não lisou a amostra.

O biocontrole utilizando bacteriófagos tem sido testado com êxito no tratamento de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em ratos experimentais, com o propósito de avaliar seu potencial para tratamento em humanos, mostrando que a fagoterapia pode ser eficiente contra infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos (Soothill, 1992). Além disso, pesquisas com o fago P22 de Gonçalves *et al.* (2011) confirma a eficácia da

terapia fágica no controle de *S. Typhimurium* em pintos, sendo uma alternativa no controle de *Salmonella* na avicultura a campo.

Miletic *et al.* (2016), verificaram que a proteína Gp9 presente na cauda do bacteriófago P22, permite que ele reconheça e infecte vários sorotipos de *Salmonella enterica*, incluindo *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi A* e *S. Enteritidis*. Estes dados corroboram com nosso resultado positivo na suscetibilidade frente a diferentes sorovares testados. Esse fago teria o potencial de ser usado como um agente terapêutico para controlar a contaminação de *Salmonella* em frangos, pois reduz a colonização deste patógeno no intestino, podendo ser um aditivo na alimentação antes do abate para reduzir a contaminação de *Salmonella* spp. (Waseh *et al.*, 2010).

Ressaltamos a ação de lise do fago P22 em *S. Enteritidis* (SE24), determinada como multirresistente à antibioticoterapia em trabalho anteriormente realizado (Silva *et al.*, 2014). De acordo com Silva *et al.*, foi observada a capacidade de formação de biofilme nas mesmas amostras de *Salmonella* que utilizamos. A SE24 revelou-se fortemente formadora de biofilme, e com perfil genético positivo para os genes de virulência testados (Silva *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2016). Enfatizamos o resultado positivo no teste de suscetibilidade *in vitro* frente ao fago P22 nessa amostra de *Salmonella* Enteritidis, oriunda de surto de DTA, com perfil de multirresistência e virulência.

Além disso, o fago P22 teve a capacidade de infectar outros isolados de *Salmonella* estudadas previamente por Borges *et al.* (2016), com genes de resistência relacionados à invasão celular (*invA* e *hilA*), fímbrias (*sefA*, *ipfA* e *agfA*), proteínas efetoras (*avrA*, *sopE* e *sivH*), plasmídios (*spvC*) e biofilme (*spiA*). Importante ressaltar que as bactérias patogênicas se distinguem das não patogênicas por genes que codificam seus fatores de virulência, como plasmídios, toxinas, flagelos e fímbrias. Também se destacam os fatores que abalam as defesas do hospedeiro e os genes que permitem a resistência às drogas antimicrobianas (Vieira, 2009).

Ryu *et al.* (2014) corroboram essa afirmativa, ao avaliar o efeito do bacteriófago P22 sobre a susceptibilidade, motilidade, expressão dos genes, invasão, capacidade invasiva, e sobrevivência intracelular de *Salmonella* Typhimurium, sugerindo que o fago P22 pode ser usado como uma alternativa para controlar a invasão de *Salmonella* em células epiteliais. Em contrapartida, Gonçalves

*et al.* (2015) observaram que o espectro de atividade lítica do fago, tamanho de halo em gel difusão e índice de proliferação são fatores independentes da virulência da amostra de *Salmonella* testada.

Em outros estudos de formação de biofilmes, onze dos sorovares testados frente ao bacteriófago P22 (CM2, CM4, CM5, CM6, CM12, L004, L001, L002, L003, L007 e L006) apresentaram aderência à superfície de poliestireno, em pelo menos uma condição de temperatura testada (Mandelli *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2009). Resultados reforçados por Oliveira *et al.* (2016) observou formação de biofilmes em superfícies comumente usadas na indústria de alimentos das amostras SE24 e SE69 (surto de DTA) em diferentes condições ambientais, e Webber *et al.* (2015), das amostras SE106 e SE84 (origem avícola) nas mesmas condições. Destacamos a alternativa do uso da fagoterapia em controle de biofilmes em superfícies de manipulação de alimentos de abatedouros avícolas.

Quando analisamos que o P22 é específico, e sua eficiência é maior quando aplicado na sua bactéria hospedeira de origem, a *Salmonella* Typhimurium, podemos pressupor que, se conseguirmos isolar fagos hospedeiro-específicos para determinadas bactérias, com uso de coquetéis, poderemos utilizá-los nas mais diversas formas. Existem evidências que a aplicação de fagos no controle dos hospedeiros é influenciada por diversos fatores, como a velocidade de multiplicação, temperatura e vários outros parâmetros relacionados com o hospedeiro, como o seu tamanho, taxa específica de crescimento e com as condições usadas na formação de biofilmes. Condições ótimas de fagoterapia irão depender bastante do fago a ser utilizado e do hospedeiro investigado (Sillankorva, 2008).

A fagoterapia é um método de controle de infecções conhecido há muitos anos, porém deixou-se de ser utilizada devido à praticidade do uso de antibióticos. Com o aumento mundial da resistência bacteriana, a fagoterapia ressurgiu como opção terapêutica, podendo ser usada para tratamentos alternativos, como no controle biológico de bactérias, para prevenir ou tratar doenças bacterianas, e como um complemento ou alternativa à terapia com antibióticos. Os fagos tem demonstrado eficiência e segurança quando utilizados no controle de bactérias patogênicas (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Sillankorva *et al.*, 2012). O estudo da biologia dos bacteriófagos é um fator determinante para saber manejá-los, de maneira que possam ser utilizados como tratamento ou formas de prevenção contra estes agentes (Andreatti Filho *et al.*, 2007). Assim, um dos requisitos para a utilização de

bacteriófagos como agentes antibacterianos é a caracterização do seu genoma, para desenvolvimento e posterior uso de coquetéis eficientes, com aplicações comerciais na terapia fágica contra agentes patogênicos (Bardina *et al.*, 2016).

Alguns laboratórios comerciais já desenvolveram produtos a base de bacteriófagos (Housby & Mann, 2009). No futuro podem ser utilizados diretamente em alimentos, embalagens, no controle de biofilmes e diversas outras aplicações.

Os dados obtidos podem contribuir para uma melhor compreensão do espectro de ação deste fago, o que é necessário para o desenvolvimento e para utilização de um coquetel eficiente com aplicações comerciais em terapia fágica.

## CONCLUSÃO

Atualmente, estudos fornecem evidências convincentes a respeito da segurança e eficiência do uso da fagoterapia, além do recente aparecimento de produtos comerciais à base de fagos. Nosso resultado de fagotipagem com o bacteriófago P22 frente a diferentes sorovares de *Salmonella enterica* mostrou-se eficaz, mesmo quando utilizado em cepa multirresistente de *S. Enteritidis*. Fazemos conjecturar a possibilidade de uso de controle biológico das salmoneloses com fagoterapia, realizando isolamentos de fagos específicos e os utilizando diretamente em alimentos, embalagens, controle de biofilmes, entre outras aplicações.

## REFERÊNCIAS

Ackermann HW. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Adv Virus* 1998; p 135-201.

Azeredo J, Sillankorva S; Pires DP, *Pseudomonas* bacteriophage isolation and production Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4700-057 Braga, Portugal, 2014.

Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM. Ability of Bacteriophages Isolated from Different Sources to Reduce *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis *in Vitro* and *in Vivo*. *Poultry Science* 2007; 86:1904–1909.

Bardina C, Colom J, Spricigo DA, Otero J, Osuna MS, Cortés P, Llagostera M. Genomics of Three New Bacteriophages Useful in the Biocontrol of *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology* 2016; (7):545.

Borges, KA. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Salmonella* pertencentes a diferentes sorovares isoladas de matrizes e de frangos de corte no campo, de carcaças de frango e de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose. Tese de Doutorado, PPG Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2016. Porto Alegre (RS).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. Brasília, DF, 2008; 186p.

Byl CV, Kropinski AM. Sequence of the Genome of *Salmonella* Bacteriophage P22. *J Bacteriol.* 2000; 182(22):6472-6481.

Casjens S, M Hayden. Analysis in vivo of the bacteriophage P22 headful nuclease. *J. Mol. Biol.* 1988; (199):467-474.

Casjens SR, Grose JH. Contributions of P2- and P22-like prophages to understanding the enormous diversity and abundance of tailed bacteriophages. *Virology* 2016; 496 (2016):255–276.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. 2012 [capturado 15 jul. 2014] Disponível em: [http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella\\_enteritidis](http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella_enteritidis)

CDC - Center for Disease Control. Making Food Safer to Eat: Reducing contamination from the farm to the table. 2011. [capturado 18 mar. 2013] Disponível em: <http://www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety>

CDC - Center for Disease Control. *Salmonella*. 2014b. [capturado 17 mar. 2014] Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/>

Cota I, Sánchez-Romero MA, Hernández SB, Pucciarelli MG, García-del Portillo F, Casadesús J. Epigenetic Control of *Salmonella enterica* O-Antigen Chain Length: A Tradeoff between Virulence and Bacteriophage Resistance. *PLoS Genet* 2015; 11(11):e1005667.

Foley SL, Lynne AM. Food animal associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science* 2008; 86(14):173-187.

Forsythe SJ. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre, Brasil: Artmed, p.410; 2002.

Goodridge, L; Abedon, S. Bacteriophage biocontrol and processing: Application of phage therapy to industry. V.53 n.6, 2003. Disponível em [www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/literome/0009801.pdf](http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/literome/0009801.pdf). Acesso em 13/03/2015.

Gonçalves GAM, Suehiro BYB, Costa LFZP, Pantoja JCF, Andreatti Filho RL. Análise de critérios para utilização na seleção de bacteriófagos líticos com potencial para utilização médica: Dados preliminares. *Vet. e Zootec.* 2015; 22(1): 72-82.

Gonçalves GAM, Lima ETD, Donato TC, Rocha TS, Álvarez LEC, Sequeira JL, Andreatti Filho RL. Eradication of *Salmonella* Typhimurium in broiler chicks by combined use of P22 bacteriophage and probiotic. *International Journal of Microbiology Research* 2011; 2(1):4-9.

Hagens S, Loessne MJ. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007; 76(3):513-519.

Housby JN, Mann NH. Phage therapy. *Drug Discov* 2009; 14: 536–540.

Mandelli JZA, Gehlen S, Aquino N, Bohrz D, Lima E, Rodrigues LB, Santos LR. *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros avícolas com capacidade de formar biofilmes. In: IX Simpósio de Alimentos; 2015; Passo Fundo; Rio Grande do Sul. Brasil. v. 9. p. 1/8.

Miletic S, Simpson DJ, Szymanski CM, Deyholos MK, Menassa R. A Plant-Produced Bacteriophage Tailspike Protein for the Control of *Salmonella*. *Front Plant Sci* 2015; (6):1221.

Mion L, Parizotto L, Andriva LS, Webber B, Cisco IC, Pilotto F, Rodrigues LB, Nascimento VP, Santos LR. *Salmonella* spp. Isolated by Miniaturized Most Probable Number and Conventional Microbiology in Poultry Slaughterhouses. *ACTA*, 2016

Oliveira AP. Adesão e remoção de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis provenientes de surtos de DTA em superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano. [Dissertação]. Passo Fundo (RS): Universidade de Passo Fundo; 2015.

Rodrigues LB, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP, Trenhago G, Rodegheri SC, Taglieti RM, Dickel EL, Nascimento VP. Hydrophobicity and biofilm formation on polystyrene by *Salmonella* Heidelberg isolated from a poultry slaughterhouse. *Acta Scientiae Veterinariae* 2009; 37:225-230.

Rodrigues LB, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Trenhago G, Oliveira AP, Ferreira D, Pilotto F, Nascimento VP. *Salmonella* and *Listeria* from Stainless Steel, Polyurethane and Polyethylene Surfaces in the Cutting Room of a Poultry Slaughterhouse. *Acta Scientiae Veterinary* 2013; 41:1-7.

Ryu K, Biswas D, Ahn J. Effect of bacteriophage on the susceptibility, motility, invasion, and survival of *Salmonella* Typhimurium exposed to the simulated intestinal conditions. *Archives of Microbiology* 2014; 196(3):201–208.

Sillankorva S. Use of bacteriophages to control biofilms. [Dissertação]. Braga: University of Minho; 2008.

Santos LA, Mion L, Marotzki M, Parizotto L, Rodrigues LB, Nascimento VP, Santos LR. Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte. *Pesq. Vet. Bras.* vol.35 no.3 Rio de Janeiro Mar. 2015

Sharma CS, Dhakal J, Nannapaneni R. Efficacy of Lytic Bacteriophage Preparation in Reducing *Salmonella* in Vitro, on Turkey Breast Cutlets, and on Ground Turkey. *Journal of Food Protection* 2015; (7):1250-1419.

Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J. Bacteriophages and their role in food safety. *Int. J. Microbiol.* 2012; doi: 10.1155/2012/863945

Silva CS. Padrão de resistência a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilme. [Dissertação]. Passo Fundo (RS): Universidade de Passo Fundo; 2014.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; (45):649–659.

Soothill JS. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *Journal of Medical Microbiology* 1992; (37):258-261

Vieira MAM. Ilhas de Patogenicidade. *O Mundo da Saúde* 2009; 33(4):406-414.

Waseh S, Hanifi-Moghaddam P, Coleman R, Masotti M, Ryan S, Foss M. Orally administered P22 phage tailspike protein reduces *Salmonella* colonization in chickens: prospects of a novel therapy against bacterial infections. *PLoS ONE* 2010; 5(11):e13904.

Webber B. Dinâmica de formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis sob diferentes temperaturas e o efeito de tratamentos de remoção. [Dissertação]. Passo Fundo (RS): Universidade de Passo Fundo; 2015.

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

#### 4. CAPÍTULO 2

### GENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA BIOCONTROLE DE *SALMONELLA ENTERICA*

Emanuele Serro Pottker<sup>1</sup>, Bruna webber<sup>2</sup>, Laura Beatriz Rodrigues<sup>1</sup>

(Artigo submetido para *Brazilian Journal Poultry Science*)

<sup>1</sup> Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil, <sup>2</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS,  
CORRESPONDENCIA: E. Pottker [emanuelepottker@yahoo.com.br – Tel.: +55(54)9686-9737/ (54)3311-9739]. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) – UPF. BR 285, Bairro São José. CEP 99052-900 Passo Fundo, RS, Brasil.

## RESUMO

*Salmonella* spp. é um dos principais patógenos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA). É um dos agentes patogênicos de maior prevalência em produtos avícolas em diversos países, com distribuição mundial e destacada relevância em saúde pública. Não obstante, a resistência aos antimicrobianos representa risco à saúde animal e humana, devido à dificuldade terapêutica e pela possibilidade de transmissão horizontal dos genes de resistência entre diferentes bactérias. Desta maneira, ressalta-se a necessidade de novas ferramentas para tratamento contra estes patógenos. Dentre elas, destaca-se o controle biológico com uso de bacteriófagos, que consistem em vírus bacterianos, intracelulares obrigatórios, hospedeiro-específico, que infectam somente procariotos. A utilização de bacteriófagos é uma alternativa à antibioticoterapia que, além da prevenção, também pode ser considerada complementar ao uso de terapias convencionais. Baseado nisso, selecionamos 12 diferentes sorovares de *Salmonella enterica* para serem as bactérias hospedeiras, e buscamos isolar e caracterizar bacteriófagos líticos que tenham ação contra essas bactérias patogênicas. Como fontes de isolamento foram utilizadas amostras de fezes de aves de criação extensiva e água residual proveniente do abate em frigorífico de aves. Foi isolado, caracterizado e sequenciado o genoma de um novo bacteriófago, até então não descrito, denominado *Salmonella Phage UPF\_BP1*, que tem o genoma circular, DNA fita dupla, 39.902 pb, pertence à ordem Caudovirales e à família Podoviridae. Nenhuma das proteínas hipotéticas do UPF\_BP1 mostrou semelhança significativa com fatores conhecidos ou envolvidos na patogenicidade bacteriana. O novo fago confirmou ação lítica frente às cepas testadas, demonstrando ser possível utilizá-lo em futuras aplicações no biocontrole e fagoterapia de *Salmonella enterica*. Entretanto vale ressaltar que também isolamos e caracterizado fenotipicamente um bacteriófago que está em fase de sequenciamento, este também evidenciou infectividade frente aos sorovares testados.

**Palavras-chave:** bacteriófago, genômica, *Salmonella Phage UPF\_BP1*, controle biológico, *Salmonella enterica*.

## INTRODUÇÃO

*Salmonella* spp. é a principal bactéria relacionada a doenças transmitidas por alimentos em diversos países, incluindo países da União Européia e Estados Unidos (CDC, 2011). Salmonelose em humanos é muitas vezes relacionada à ingestão de produtos de origem animal contaminados (Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention Control, 2014). *Salmonella* Enteritidis é um dos sorovares mais comuns em aves, depois de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* e, junto com *S. Typhimurium*, são os principais sorovares na causa de paratifo aviário e responsáveis por infecções alimentares no homem (ANDREATTI FILHO et al, 2007). Outros sorovares também contemplam a lista dos 15 mais sorotipificados em amostras de ambiente, alimentos, homem e animais como *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzengrund* e *S. Tennessee* (WHO, 2016). Existem evidências que os produtos alimentícios oriundos da carne de frango são uma das mais importantes fontes de infecção para humanos (HALD et al, 2004). Com o intuito de controlar *Salmonella* spp., a utilização de antibióticos em aves é comumente utilizado, o que pode resultar em resistência bacteriana, pela continua exposição aos antibióticos, representando um grande risco para a saúde humana (SPELLBERG; BARTLETT; GILBERT, 2013), uma vez que pode resultar em uma infecção de difícil controle devido a uma terapia antimicrobiana ineficaz.

Bacteriófagos são vírus que matam bactérias. Bacteriófagos líticos podem ser utilizados para tratar infecções bacterianas em humanos, assim como para melhorar a segurança alimentar. É considerado um dos mais seguros antibacterianos, pois são altamente espécie específico e não pode infectar células eucarióticas (Sulakvelidze, 2011). Antes do aparecimento dos antibióticos foi sugerido que as infecções bacterianas poderiam ser prevenidas ou tratadas com a administração de fagos (MANDILARA *et al.*, 2006). Fagos são considerados agentes terapêuticos potencialmente atraentes, pois não são prejudiciais para o homem e animais, são rapidamente mutáveis para combater o aparecimento de novos agentes patogênicos. Além destas características, os fagos apenas se replicam em células bacterianas específicas, não destruindo a microbiota adjacente (SULAKVELIDZE, 2001).

A fagoterapia tem sido testada com êxito no tratamento contra os sorovares de *Salmonella* Enteritidis, Heidelberg e Typhimurium. Em um estudo realizado com fagoterapia foi observada uma redução de 4 logs quando comparado aos controles não tratados (SHARMA et al, 2015). Em outro estudo, utilizaram fagoterapia com o bacteriófagos P22 em ovos líquidos, bebidas energéticas, leite desnatado, suco de maçã e peito de frango inoculados

com *Salmonella* Typhimurium, também se verificou uma diminuição de 2 logs quando comparados aos controles não tratados. Os resultados indicaram que os fagos podem ser úteis no controle de agentes patogênicos de origem alimentar (ZINNO P, 2014). Estes estudos corroboram com o propósito deste trabalho, onde o objetivo foi realizar o isolamento, sequenciamento e a caracterização de bacteriófagos líticos para serem utilizados no controle biológico de diferentes sorovares de *Salmonella enterica*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Amostras de *Salmonella enterica***

Foram utilizadas como bactérias hospedeiras, para o isolamento e avaliação do espectro lítico dos fagos, uma amostra de cada sorovar: *Salmonella* Anatum, *S.* Agona, *S.* Brandenburg, *S.* Bredeney, *S.* Infantis, *S.* Lexington, *S.* Panama, *S.* Rissen, *S.* Schwarzengrund, *S.* Tennessee, e as cepas *S.* Enteritidis ATCC 13076 e *S.* Typhimurium ATCC 14028. Os estoques foram reativados e a pureza confirmada através de isolamento em meio seletivo e testes bioquímicos. As características das bactérias utilizadas estão na Tabela 1.

Tabela 1: Características das amostras de *Salmonella* hospedeiras.

Sorovar	Capacidade de formação de biofilme a 36 °C <sup>3,4</sup>	Genes de virulência <sup>1, 3</sup>										Resistência a Antimicrobianos <sup>3,4</sup>	Local de isolamento	Ano			
		Invasão celular		Fímbrias			Proteínas efetoras			Plasmídeo	Biofilme						
		invA	hilA	sefA	ipfA	agfA	avrA	sopE	sivH								
1- Brandenburg <sup>2</sup>	Não	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	Carcaça após higienização	2012
2- Anatum <sup>2</sup>	Fortemente	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	Suabe de cloaca	2012
3- Teennessee <sup>2</sup>	Fraca	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	Carcaça congelada 24h	2012
4- Agona <sup>2</sup>	Fraca	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	Gaiola	2012
5- Bredney <sup>2</sup>	Moderada	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	Suabe de cloaca	2012
6-Schwarzemgrund <sup>2</sup>	Fraca	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	Suabe de cloaca	2012
7- Infantis <sup>2</sup>	Fraca	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	Gaiola	2012
8- Rissen <sup>1</sup>	Não	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	Suabe de cloaca	2013
9- Lexington <sup>1</sup>	Não	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	Esponjas antes da lavagem	2013
10- Panama <sup>1</sup>	Fraca	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	Suabe de cloaca	2013
11- SE ATCC	Moderada	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
12- ST ATCC	Moderada	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-

Legendas dos dados obtidos: <sup>1</sup> Santos, 2015; <sup>2</sup> Mion, 2016; <sup>3</sup> Borges, 2106; <sup>4</sup> Mandelli, 2016. Princípios ativos testados: Sulfonamida (SUL), Cloranfenicol (CHL), Gentamicina (GEN), Tetraciclina (TET), Ampicilina (AMP), Enrofloxacina (ENRO), Cefazidima (CAZ), Aztreonam (ATM), Amoxicilina+ác.clavulânico (AMC), Cefotaxima (CTX), Amoxicilina (AMX), Cefiofur (CF), Ciprofloxacina (CIP), Espectinomomicina (EST), Sulfafurazole (SOX), Sulfá + trimetoprim (SUT), Estreptomomicina (SPT), + possui o gene de resistência; - não possui o gene de resistência; NR: não realizado; S: Sensível a todos os princípios ativos.

### **Verificação das bactérias hospedeiras para a presença de prófagos**

As amostras de *Salmonella* spp. foram testadas para a ausência de prófago no seu DNA, para não resultar em falso positivo para presença de bacteriófagos. Para isso foram produzidas placas de Petri contendo uma fina camada de ágar triptona de soja (TSA) e uma sobrecamada de 5 mL de meio semi-sólido composto por caldo triptona de soja (TSB) 94% e 0,6% de agar-agar, com inóculo de 100  $\mu$ L da bactéria a ser testada. Pipetou-se 50 alíquotas de 10  $\mu$ L do inóculo da mesma bactéria utilizada na sobre camada. As placas foram incubadas invertidas por 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , para avaliação de áreas de lise (Sillankorva et al, 2010).

### **Enriquecimento das fontes de isolamento e bactérias hospedeiras**

As bactérias hospedeiras foram inoculadas individualmente em caldo BHI e incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Após esse período um inóculo será transferido para o caldo TSB em concentração dupla e incubado por 24 h a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , deixando-as aptas para a utilização.

Foram utilizadas duas fontes de isolamento, amostras de fezes de aves de criação extensiva e água residual proveniente do abate em frigorífico de aves.

A fim de enriquecermos a fonte de isolamento, para água residual proveniente do abate em frigorífico de aves, adicionamos 10 mL da amostra em Erlenmayer contendo 100 mL de solução salina 0,9%. Para as fezes, adicionou-se 10 g de amostra em Erlenmayer contendo 100 mL de solução salina 0,9%. Esse procedimento foi realizado individualmente para cada bactéria hospedeira. Adicionamos, em cada Erlenmayer, 50  $\mu$ L da suspensão bacteriana com cada hospedeira previamente preparada individualmente, e incubamos  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h sob agitação (120-180 rpm). Centrifugamos a 9000 rpm e filtramos em filtros de seringa de 0,22  $\mu$ m. Coletamos o sobrenadante em frascos estéreis, segundo (Sillankorva et al., 2010) com algumas modificações.

O método do ensaio de placa foi utilizado como um teste inicial para a presença do fago, procedimento baseado na técnica de sobrecamada de meio semissólido de acordo com Sillankorva et al, 2008, com ligeiras modificações. Um inóculo individual de cada bactéria hospedeira foi adicionado em tubos com 5 mL de meio semissólido, que foram utilizados para formação de uma sobrecamada em placas de Petri já preparadas com ágar TSA. Pipetamos 10 alíquotas de 10  $\mu$ L do sobrenadante (filtrado) nas placas. Incubamos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 h e realizamos a verificação de placas de lise indicativas de presença do fago.

### **Isolamento e purificação dos bacteriófagos**

A fim de isolar os fagos a partir desta zona de lise, preparamos placas de Petri com sobrecamada bacteriana, utilizando sempre a mesma bactéria hospedeira para o seu respectivo fago. Utilizamos tiras de papel estéril para embeber no filtrado contendo o fago e espalhar na placa, após a geleificação incubamos a placa a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 24 h. Analisamos a morfologia dos bacteriófagos presentes na placa checando as características fenotípicas, diferenças de tamanho de placa, aparência límpida/ turva, presença de halo em torno da placa de lise, formação de colônias bacterianas no local da lise. Selecionamos placas fágicas e, com um palito de madeira estéril, transferimos para uma nova placa de Petri previamente preparada com sobrecamada bacteriana. Inoculamos por picada inúmeras vezes, utilizamos tiras de papeis estéreis para estriar e espalhar os fagos na placa. Incubamos a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 24 h e repetimos esse procedimento até que todas as placas de bacteriófagos estivessem uniformes (Sillankorva et al., 2010).

### **Produção de bacteriófagos**

Para produzirmos os fagos, preparamos placas de Petri com sobrecamada bacteriana com a hospedeira. Selecionamos uma placa fágica com palito de madeira estéril e picamos inúmeras vezes. Utilizamos tiras de papel estéril para espalhar uniformemente os fagos na placa e garantir o máximo de replicação, segundo protocolo de Sillankorva et al., (2008), com algumas modificações. Incubamos a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 18 a 24 h. Adicionamos 5 mL de tampão SM [5,8 g NaCl, 2 g MgSO<sub>4</sub>, 50 mL Tris/HCl (pH 7,5), 1L água destilada], em cada placa e incubamos sob agitação (90 rpm) a  $4\text{ °C}$  overnight. Coletamos o líquido para Erlenmeyer e adicionamos 0,584 g de NaCl para cada 10 mL de amostra, incubamos a  $4\text{ °C}$  por 1 h, centrifugamos e adicionamos 1 g de Polyethylene Glycol 8000 (PEG8000), incubamos por 24 h a  $4\text{ °C}$  sob agitação. Centrifugamos, descartamos o sobrenadante, ressuspendemos o pellet com 4 mL de tampão SM, adicionamos 1 mL de clorofórmio, agitamos em vórtex por 1 min. Centrifugamos e coletamos o sobrenadante para frascos estéreis.

### **Titulação dos bacteriófagos**

Realizamos a diluição seriada da solução estoque dos fagos isolados em 900 µL de tampão SM, utilizando 100 µL da solução de fagos, de  $10^{-1}$  até  $10^{-10}$ , em *eppendorfs* estéreis. Deixamos imóveis por 15 min. a 30 min. para pré adsorção dos fagos. Após este tempo, adicionamos 100 µL da mesma bactéria hospedeira utilizada no isolamento, sobre

placas de Petri contendo ágar TSA previamente preparadas e identificadas e vertemos 5 mL de meio semissólido com o fago diluído, e incubamos a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 24 h (Sillankorva et al, 2008). Foram observadas placas de lise visíveis entre 6 h e 24 h, dependendo do fago. Realizamos a contagem e determinamos a titulação de acordo com a equação:

$$\text{Título de Bacteriófagos (UFP/mL)} = \frac{\text{Número de placas de lise} \times \text{Fator de diluição}}{\text{Volume da amostra de bacteriófagos (mL)}}$$

## CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS BACTERIÓFAGOS

### **Espectro lítico e eficiência de ensaio em placa frente aos diferentes sorovares de *Salmonella enterica***

Com o intuito de verificarmos a capacidade de infecção do fago na sua hospedeira, preparamos placas de Petri com ágar TSA, sobrecamada com meio semissólido e a bactéria hospedeira correspondente do fago isolado. Pipetamos 5 gotas individuais de 20  $\mu\text{L}$  dos fagos nas placas e incubamos a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 24 h. Observamos zonas de lise de acordo com o formato do halo e a capacidade do fago para infectar o hospedeiro.

A fim de verificarmos a eficiência de infecção do fago frente à hospedeira e demais sorovares, fizemos a diluição seriada do fago concentrado até  $10^{-8}$ , preparamos placas de Petri com ágar TSA e sobrecamada com 100  $\mu\text{L}$  da bactéria em meio semissólido, utilizamos a técnica de microgotas, pipetando 1 gota de 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição (Sillankorva et al, 2010). A titulação dos bacteriófagos foi ajustada para  $10^9$  PFU/mL, e a determinação da eficiência de infecção do fago em placa foi o título de fagos em relação ao sorovar de *Salmonella enterica* utilizado, em comparação com a titulação máxima observada. Classificamos a eficiência de placa em escores alta (100-10%), média (1-0,1%) e baixa (0,01-0,001%), de acordo com o título do fago para cada sorovar.

### **Extração do DNA dos bacteriófagos**

As soluções dos fagos foram tratadas com RNase (1 $\mu\text{g/mL}$ ), proteinase K (50 $\mu\text{g/mL}$ ) acrescido de dodecil sulfato de sódio-SDS (0,5%), incubados por 1 h a  $56\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . A partir desta etapa o DNA dos fagos foram extraídos utilizando o sistema fenol/clorofórmio e precipitados com etanol, segundo o protocolo de Sambrook e Russel (2001), com algumas modificações. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese, usando gel de agarose 0,7% e a concentração e pureza foram determinadas no equipamento Nanodrop

ND-1000, onde os parâmetros são A 260/280, que avalia uma possível contaminação por proteínas, e os valores devem ser  $< 1,8$ , e A260/230, que avalia possível contaminação ou resíduos de compostos orgânicos, onde os valores devem ficar entre 2.0-2.20.

### **Restriction Fragment Length Polymorphisms - RFLP**

Após a extração e a validação dos parâmetros de qualidade do DNA, foi determinado o perfil RFLP. A metodologia utiliza uma combinação de duas enzimas de restrição e digestão de ácido nucléico. As amostras foram inoculadas em gel de agarose e os fragmentos de restrição de RFLP foram separados de acordo com os seus comprimentos. A visualização foi verificada por eletroforese. Para obter resultados comparáveis dos RFLPs dos fagos foi realizada a restrição com as enzimas *HindIII* e *BanHI*, utilizando o marcador *Lane M – λ HindIII*.

### **Extração das proteínas dos bacteriófagos**

As proteínas foram extraídas a partir de alíquotas de fago purificadas. A extração foi com acetona gelada, protocolo adaptado de Sambrook e Russell (2001). Utilizamos a solução contendo fago (1 mL) e 4 mL de acetona gelada. Centrifugamos a 1.600 rpm por 20 min., descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o pellet com tampão SM (100 µL). A inoculação foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-Page 12%, corado com Coomassie e coloração de Prata. Utilizamos Protein Ladder (10-250 KDa) como marcador de peso molecular.

### **Sequenciamento**

A partir de alíquotas purificadas de DNA dos fagos isolados, foram preparadas as bibliotecas de DNA segundo o protocolo padrão da Illumina<sup>®</sup>. As bibliotecas Illumina My-Seq foram reunidas, sequenciadas com mais de 100 pb e emparelhadas (2x150nt). A partir deste sequenciamento, foi realizada a limpeza das amostras no programa SeqClean, para remoção de duplicatas PCR, contaminantes e adaptadores de sequenciamento. Também foram retiradas as bases de baixa qualidade (Parâmetro SeqClean - qualidade 0,01-0,01), deixando somente bases maiores que 120 pb (GRC\_Scripts, Seqclean). Na montagem dos genomas foi utilizado os *softwares* Newbler e Velvet, e as análises subsequentes realizadas nos *softwares* BLAST, PHAST, Virfam e Geneious.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS BACTERIÓFAGOS

#### Seleção dos fagos após enriquecimento da fonte de isolamento

Observamos placas de lise em ambas as fontes de isolamento, para as amostras de fezes de aves de criação extensiva, ocorreram placas de lise quando utilizadas as hospedeiras *S. Anatum*, *S. Tennessee*, *S. Rissen*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Já para as amostras de água residual proveniente do abate em frigorífico de aves verificamos lise nas placas contendo as hospedeiras *S. Anatum*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Schwarzengrund*, *S. Infantis*, *S. Rissen*, *S. Lexington*, *S. Panamá* e *S. Typhimurium*. Sendo assim, selecionamos fagos que apresentaram parâmetros de placas de lise, tal como a aparência turva/clara, halo e tamanho, e excluímos os que apresentaram presença de colônia bacteriana.

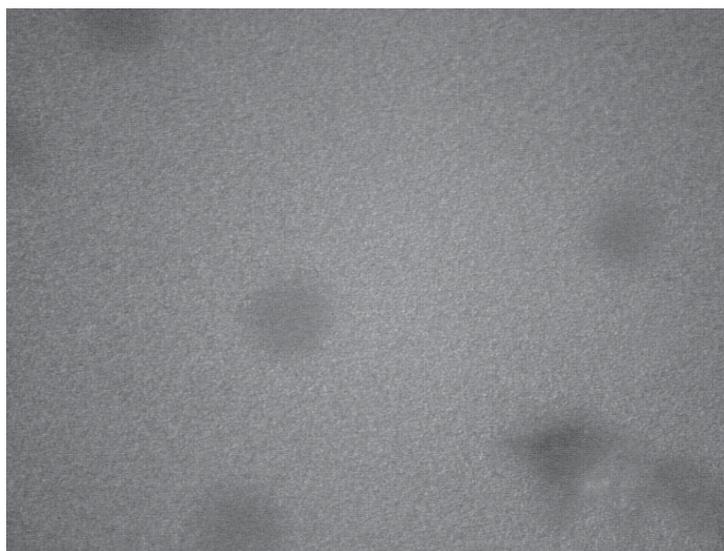
#### Isolamento, purificação e produção dos bacteriófagos

Obtivemos fagos diferentes entre si, oriundos da amostra de fezes de aves de criação extensiva como fonte de isolamento, mas de hospedeiras distintas, os quais denominamos inicialmente como fago 1:2, relacionado ao isolamento a partir da *Salmonella* *Brandenburg*, (Figura 1) e como fago 5:2, isolado utilizando *Salmonella* *Bredeney* (Figura 2).

Figura 1: Morfologia da placa de lise do fago 1:2 no isolamento com *S. Brandenburg*.



Figura 2: Morfologia da placa de lise do fago 5:2 no isolamento com *S. Bredeney*.



### Espectro lítico, eficiência de ensaio em placa e potencial de lise dos fagos isolados frente aos diferentes sorovares de *Salmonella enterica*

Testamos a capacidade do fago para infectar o seu hospedeiro, e ação contra as suas hospedeiras, mesmo quando submetidos a diluições. Para verificação da eficiência desta infecção utilizamos diluição seriada dos fagos e assim obtivemos os resultados demonstrados na Tabela 2, evidenciando que o 5:2 foi capaz de atuar em todas as cepas de *Salmonella* a que foi confrontado.

Tabela 2: Eficiência de infecção.

Amostras de <i>Salmonella enterica</i>	Fagos	
	Fago 1:2	Fago 5:2
<i>S. Brandenburg</i>	Alto	Moderado
<i>S. Anatum</i>	NI	Alto
<i>S. Tennessee</i>	Alto	Alto
<i>S. Agona</i>	Alto	Alto
<i>S. Bredeney</i>	NI	Alto
<i>S. Schwarzengrund</i>	Alto	Alto
<i>S. Infantis</i>	NI	Alto
<i>S. Rissen</i>	Alto	Alto
<i>S. Lexington</i>	Alto	Alto
<i>S. Panamá</i>	NI	Moderado
<i>S. Enteritidis</i>	NI	Alto
<i>S. Typhimurium</i>	Alto	Alto

Escores: alto (>10), moderado (0,1-1) e baixo (< 0,1%);  
NI- Não infecta o sorovar.

## PROPRIEDADES GENÔMICAS

### Extração do DNA dos bacteriófagos e perfil RFLP

Após a purificação do DNA das amostras, obtivemos para o fago 1:2 uma concentração de 109,8 ng/ $\mu$ L, a pureza ficou dentro dos parâmetros esperados ( $A_{260}/A_{280} = 1,86$  nm e  $A_{260}/A_{230} = 2,13$  nm). Para o fago 5:2 a concentração foi de 23,9 ng/ $\mu$ L e a pureza também ficou dentro dos parâmetros ( $A_{260}/A_{280} = 1,81$  nm e  $A_{260}/A_{230} = 2,02$  nm).

Ambas as amostras pode-se identificar a presença de DNA (Figura 3). Em relação ao perfil RFLP, o bacteriófago 1:2 foi fragmentado, já o fago 5:2 mostrou-se resistente às enzimas de restrição *HindIII* e *BanHI*, não sendo possível a visualização fragmentada (Figura4). Com isso sabemos que os dois fagos são diferentes entre si.

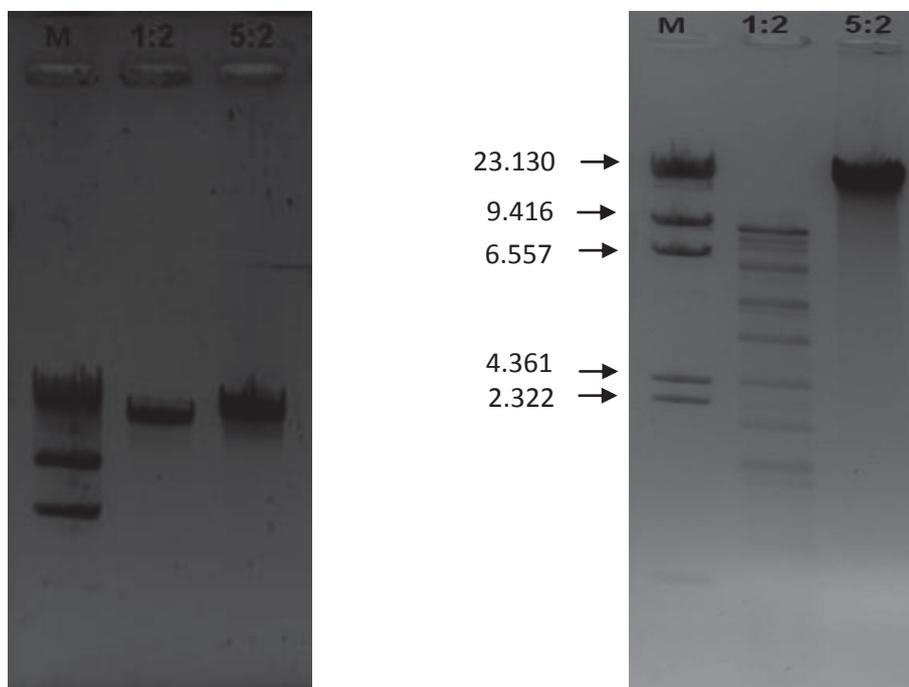


Figura 3: DNA dos fagos 1:2 e 5:2.

Figura 4: Perfil RFLP dos fagos 1:2 e 5:2.

### Sequenciamento

Neste estudo, sequenciamos o genoma e algumas características de sua biologia molecular. Notamos uma porcentagem elevada de proteínas hipotéticas encontradas em seu genoma, o que concorda com o relatado para todos os bacteriófagos sequenciados. Mais de 50% das proteínas hipotéticas previstas nos genes dos fagos, sem uma função atribuída, se deve à falta de dados experimentais. Como exemplo, temos o fago T4, um dos bacteriófagos mais extensivamente caracterizados, cujo genoma possui 168.903 pb, com cerca de 300 genes

prováveis, e quase metade deles ainda não têm uma função atribuída (Klumpp et al., 2013). Por conseguinte, a identificação das suas funções é um desafio que deve ser tratado para aumentar o conhecimento dos bacteriófagos e o nível de segurança das suas aplicações.

A este respeito, deve considerar-se que nenhuma das proteínas hipotéticas mostrou uma semelhança significativa com fatores conhecidos ou envolvidos na patogenicidade bacteriana. Portanto, é pouco provável que eles tenham um papel relevante na virulência bacteriana (Bardina et al., 2012). Muitas destas proteínas hipotéticas podem, provavelmente, estar envolvidas no reconhecimento e rompimento do metabolismo do hospedeiro. Assim, são candidatos potenciais para detecção e utilização em fagoterapias (Klumpp et al., 2013).

Análises revelaram 382 possíveis Open Reading Frames (ORFs) do fago 1:2, e destas somente 68 estão identificadas no BLAST, as quais se encontram descritas na Tabela 3. A análise da organização genética do fago 1:2 mostrou elevada homologia com o bacteriófago P22 e outros fagos de enterobactérias. Das 68 ORFs identificadas, funções foram atribuídas a 38 delas. Além disso, 7 ORFs corresponderam aos genes *ea* e *nin*. Que não são essenciais para a função de bacteriófago, pelo menos em culturas *in vitro*, mas a sua presença e manutenção sugerem que podem conferir vantagem seletiva, quer para o hospedeiro ou para o próprio bacteriófago, quando presente em outros ambientes (Hendrix, 2002).

Das 23 ORFs restantes, estas mostraram semelhança com as proteínas hipotéticas codificadas já descritas, mas suas funções não foram determinadas. A lisogenia em um fago requer a atividade da integrase, que é codificada pelo gene *int*, e esta proteína mostrou similaridades de 100% em comparação com o homólogo de bacteriófagos ST64T de *Salmonella*. O gene *cro* está diretamente relacionado na manutenção entre ciclo lítico ou lisogênico e mostrou uma similaridade de 76% com fago de *Escherichia coli*. Os codificados por *mnt*, *arco* e *ant* estão envolvidos no controle da manutenção da lisogenia (Susskind e Botstein, 1978), e mostraram alta similaridade, de 93% com o fago P22, 100% com o fago Phi75, e 85% com o fago CUS-3, respectivamente.

O gene *xis* relacionado, à excisionase, mostrou uma identidade de 100% em comparação com a proteína correspondente no P22. O gene envolvido no metabolismo do DNA *abc1*, que codifica para uma proteína com função anti-RecBCD, foi idêntico 100% ao do fago ST104. Os genes *gp12* (helicase) e *gp18* (primase) estão relacionados à replicação do

genoma e tiveram uma identidade de 100% em comparação ao fago P22 (Vander Byl e Kropinski, 2000).

Os genes envolvidos na estrutura e montagem dos fagos podem ser divididos em terminases de codificação (*gp2*, *gp3*), genes da cápsula (*gp14*), injeção de DNA (*gp7*, *gp20*, *gp16*), ou da cauda (*gp9*). Os genes *gp1*, *gp5* e *gp8* apresentaram uma identidade maior que 99% com relação ao fago P22. A terminase, codificada por *gp3*, apresentou 100% de homologia com o fago de *Salmonella* SETP1, enquanto os codificados por *gp2* apresentou 100% de homologia com o fago ST160 de *Salmonella*. O gene *gp56*, associado à proteína lisozima, teve uma similaridade de 75% em comparação ao fago Phi80.

Tabela 3: Características do genoma do bacteriófago 1:2, ORF, genes e as atribuições de função, % homologia.

ORF	Gene	Amino ácidos aa	Função	Hit mais próximo	Número de acesso GenBank	% amino ácidos identificados	Best e-value
6	cro	75	Unknown	<i>Escherichia</i> phage HK639	YP_004934081	76	1.10E-19
8	cII	99	antitermination protein	CII protein [Phage 21]	CAB39983	97	8.74E-62
10	orf48	48	Unknown	hypothetical protein P22gp50	NP_059609	100	2.20E-21
11	gp 18	271	DNA replication (primase)	hypothetical protein P22gp51	NP_059610	100	0.0
14	gp 12	458	DNA replication (helicase)	hypothetical protein P22gp52	NP_059611	100	0.0
17	0027	68	Unknown	hypothetical protein SPN9CC_0027	YP_006383866	98	5.81E-34
19	gp31	110	Unknown	hypothetical protein [Stx2-converting phage 1717]	YP_002274241	68	2.95E-28
22	00067	142	Unknown	hypothetical protein [ <i>Vibrio</i> phage jenny 12G5]	AGN51431	60	1.38E-19
24	ninX	112	Unknown	NinX [Enterobacteria phage P22]	NP_059615	100	7.95E-74
25	ninF	58	Unknown	NinF [Enterobacteria phage P22]	YP_063727	100	4.62E-30
26	ninG	203	Unknown	NinG [Enterobacteria phage P22]	YP_063728	100	4.85E-142
29	ninY	74	Unknown	NinY [Enterobacteria phage P22]	NP_059618	100	5.51E-45
32	ninH	67	Unknown	NinH [Enterobacteria phage P22]	NP_059619	100	6.91E-38
33	ninZ	59	Unknown	NinZ [Enterobacteria phage P22]	YP_063729	96	1.70E-29
34	gp63	75	Unknown	hypothetical protein [ <i>Erwinia</i> phage phiEt88]	YP_004327366	86	9.42E-27
36	gp21	204	Unknown	hypothetical protein [ <i>Cronobacter</i> phage ENT47670]	YP_007237598	96	9.45E-136
40		96	Unknown	hypothetical protein [ <i>Cronobacter</i> phage ES2]	AEM24718	52	1.66E-03
42	gp56	164	Lysozyme	lysozyme [Enterobacteria phage phi80]	YP_007947981	75	2.33E-63
45	0044	155	Endopeptidase	endopeptidase [ <i>Salmonella</i> phage SPN9CC]	YP_006383883	83	3.53E-74
46	gp69	68	Unknown	Rz1 [ <i>Salmonella</i> phage SPN3UB]	YP_007011039	91	2.24E-16
48	gp47	176	Unknown	hypothetical protein [bacteriophage SE1]	YP_002455883	92	3.87E-108
49	gp48	118	Unknown	hypothetical protein [bacteriophage SE1]	YP_002455884	94	2.85E-13
50	hkbM	80	Unknown	hypothetical protein [Enterobacteria phage HK620]	NP_112073	100	3.20E-46
51	gp71	134	Unknown	Decoracion protein [ <i>Salmonella</i> phage epsilon34]	YP_002533532	98	4.96E-85
53	gp3	162	terminase (small subunit)	Gp3 [ <i>Salmonella</i> phage SETP14]	ABN47322	100	8.87E-113

Tabela 3: (continua)

ORF	Gene	Amino ácidos aa	Função	Hit mais próximo	Número de acesso GenBank	% amino ácidos identificados	Best e-value
59	<i>gp1</i>	725	portal protein	portal protein [Enterobacteria phage P22]	YP_063735	99	0.0
63	<i>gp8</i>	303	scaffolding protein	scaffolding protein [Enterobacteria phage P22]	YP_063736	100	0.0
67	<i>gp5</i>	430	Coat protein	coat protein [Enterobacteria phage P22]	NP_059630	100	0.0
70	<i>gp6</i>	69	Unknown	hypothetical protein P22gp06 [Enterobacteria phage P22]	NP_059631	100	1.16E-36
71	<i>gp49</i>	166	DNA estabilization protein	head completion protein [Enterobacteria phage P22]	NP_059632	100	1.97E-116
72		85	head completeion	head completeion [Enterobacteria phage P22]	AAA72965	100	1.47E-48
74	<i>gp15</i>	240	Endonuclease	HNH endonuclease [Deep-sea thermophilic phage D6E]	YP_007010936	54	5.98E-23
76	<i>gp08</i>	472	DNA estabilization protein	DNA stabilization protein [Enterobacteria phage Sf101]	YP_009153082	98	0.0
79	<i>gp59</i>	233	Unknown	Gp26 [ <i>Salmonella enterica</i> bacteriophage SE1]	YP_002455895	91	4.50E-135
81	<i>gp14</i>	152	head assembly protein	head assembly protein [Enterobacteria phage IME10]	YP_007004328	100	5.07E-105
82	<i>gp7</i>	230	DNA transfer protein	DNA transfer protein [Enterobacteria phage HK620]	NP_112085	99	8.79E-152
86	<i>gp20</i>	471	injection protein	injection protein [Enterobacteria phage P22]	NP_059637	89	0.0
89	<i>gp16</i>	637	injection protein	Gp16 [ <i>Salmonella</i> phage ST160]	YP_004123819	68	0.0
97	<i>Arc</i>	74	transcriptional repressor	Arc [Enterobacteria phage Phi75]	ADM32400	100	1.85E-42
98	<i>ant</i>	307	putative antirepressor	putative antirepressor [Enterobacteria phage CUS-3]	ABQ88384	85	3.63E-168
100	<i>gp9</i>	667	tailspike protein	tailspike protein [Enterobacteria phage P22]	NP_059644	98	0.0
262	00184	62	Unknown	hypothetical protein [ <i>Vibrio</i> phage helene 12B3]	YP_007877345	63	5.04E-02
263	ST64Tp20	55	regulatory protein	hypothetical protein [Salmonella phage ST64T]	NP_720294	100	1.94E-28
264	<i>kil</i>	37	host-killing protein kil	hypothetical protein [Salmonella phage ST64T]	NP_720293	100	1.40E-13
265	ST64Tp18	66	recombination protein	hypothetical protein [Salmonella phage ST64T]	NP_720292	100	5.18E-36
266	<i>gp49</i>	235	double-strand break repair protein	gp49 [Enterobacteria phage ES18]	YP_224187	99	1.46E-169
271	<i>abc1</i>	94	AntiRec-BCDprotein	Abc1 [Enterobacteria phage ST104]	YP_006368	100	6.74E-60
272	ST64Tp15	97	anti-RecBCD	hypothetical protein [Salmonella phage ST64T]	NP_720289	100	6.28E-60
273	ST64Tp14	56	Unknown	hypothetical protein [Salmonella phage ST64T]	NP_720288	89	1.13E-21
274	<i>gp28</i>	168	Unknown	hypothetical protein [Enterobacteria phage mEpX2]	YP_007111464	78	2.35E-43

Tabela 3: (continua)

ORF	Gene	Amino ácidos aa	Função	Hit mais próximo	Número de acesso GenBank	% amino ácidos identificados	Best e-value
276	<i>sb33</i>	171	Unknown	hypothetical protein [ <i>Salmonella</i> phage ST64B]	NP_700406	95	1.16E-113
279	<i>eaD</i>	197	like protein	EaD [Enterobacteria phage P22]	YP_063721	80	3.06E-95
284	<i>gp38</i>	126	Unknown	gp38 [Enterobacteria phage ES18]	YP_224176	100	9.73E-83
285	<i>gp37</i>	186	Unknown	gp37 [Enterobacteria phage ES18]	YP_224175	86	5.25E-100
287	<i>gp36</i>	118	Unknown	gp36 [Enterobacteria phage ES18]	YP_224174	97	3.01E-61
290	25	90	Unknown	hypothetical protein [ <i>Salmonella</i> phage epsilon34]	YP_002533484	100	1.68E-30
291	<i>xis</i>	116	excision protein	Xis [Enterobacteria phage P22]	NP_059585	100	7.83E-76
293	<i>int</i>	387	Integrase	integrase [ <i>Salmonella</i> phage ST64T]	NP_720278	100	1.69E-22
294		410	O-antigen conversion protein C	[Enterobacteria phage UAB_Phi20]	ADW81954	100	1.79E-164
302	<i>mnt</i>	83	maintenance of lysogen	Mnt [Enterobacteria phage P22]	NP_059641	93	6.57E-42
346		90	Stx1 converting bacteriophage	hypothetical protein [ <i>Escherichia</i> Stx1 converting phage]	BAC77976	70	2.22E-05
375	<i>rdgA</i>	236	phage repressor protein	[ <i>Erwinia</i> phage phiEt88]	YP_004327350	73	3.62E-87
378	491	169	HNH endonuclease	HNH [ <i>Cronobacter</i> phage vB_CsaM_GAP32]	YP_006987605	70	5.09E-22
379	ST64Tp24	112	antitermination protein	[ <i>Salmonella</i> phage ST64T]	NP_720298	92	7.67E-16
380	<i>ral</i>	64	antirestriction protein	hypothetical protein [ <i>Salmonella</i> phage ST64T]	NP_720297	98	3.50E-33
381	<i>gp53</i>	282	Unknown	gp53 [Enterobacteria phage ES18]	YP_224191	77	1.58E-135

Gene conhecidos: números correspondem com a sua função prevista, seguindo da natureza da evidência da classificação funcional. Genes hipotéticos: com nenhuma previsão funcional, mas com uma significativa semelhança de sequência com genes nos databases NCBI determinados por BLASTP também são listadas.



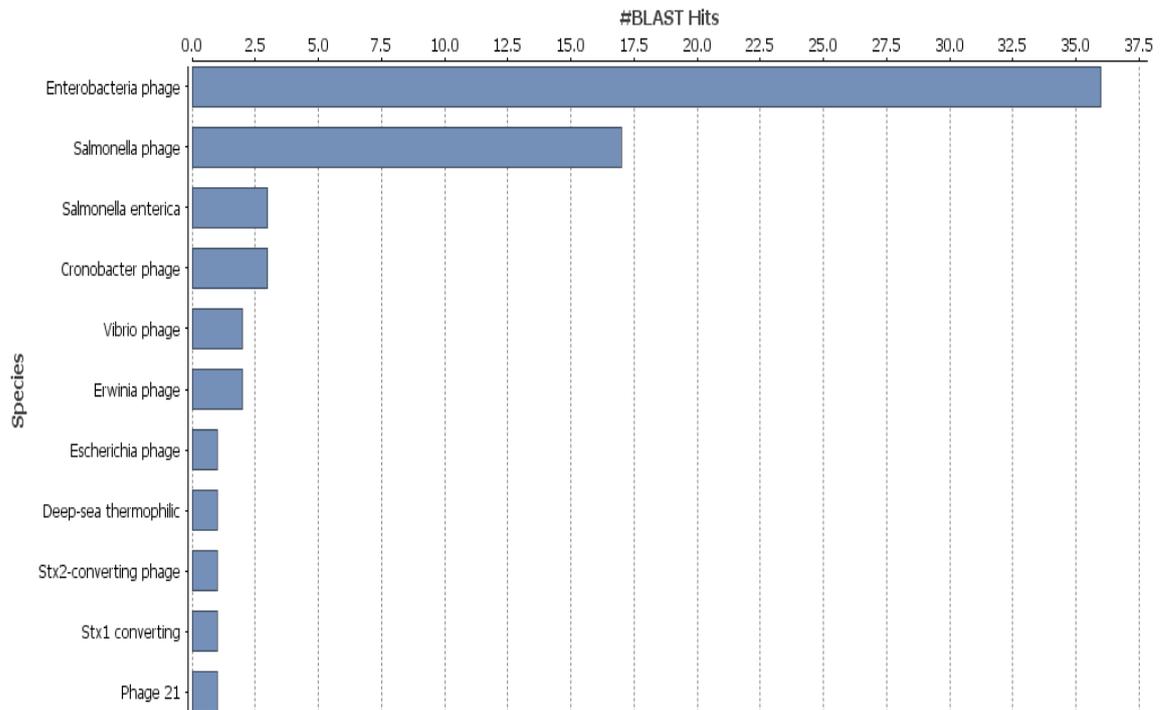


Figura 6: Resultados obtidos no BLAST\_Hits para o bacteriófago *Salmonella* Phage UPF\_BP1.

O sequenciamento do fago 5:2 está em fase de processamento. Em nossos testes evidenciou alta infectividade frente aos diferentes sorovares testados.

Neste estudo, realizamos algumas tentativas de isolamento e conseguimos diferentes fagos. Realizamos a caracterização e o sequenciamento de um novo fago, denominado *Salmonella* Phage UPF\_BP1. O uso de bacteriófagos oferece novas possibilidades para a detecção e controle de agentes bacterianos patogênicos. A especificidade com relação ao microrganismo alvo, poucos efeitos colaterais, e a relativa facilidade de produção dos fagos, os tornam ferramentas ideais para utilização como fagoterapia. No entanto, ainda se faz necessária uma melhor compreensão geral biologia dos fagos. Os recentes avanços no sequenciamento do genoma, genômica comparativa e demais estudos genômicos, sem dúvida, desempenham um papel importante no preenchimento dessa lacuna de conhecimento.

## CONCLUSÃO

O novo bacteriófago, denominado *Salmonella Phage* UPF\_BP1, e o fago 5:2, demonstraram ação lítica frente aos sorovares testados de *Salmonella enterica*, nutrindo nossas expectativas para o desenvolvimento de alternativas para o uso de antimicrobianos, sendo possíveis candidatos para utilização como biocontrole de *Salmonella enterica* em alimentos, animais e meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

- Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM. Ability of Bacteriophages Isolated from Different Sources to Reduce *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis *In Vitro* and *In Vivo*. *Poultry Science*, 2007 86:1904–1909.
- Bardina C, Colom J, Spricigo DA, Otero J, Osuna MS, Cortes P, Lagostera M. Genomics of three new bacteriophage useful in the biocontrol of *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology*, Abril 2016. Vol 7.
- BLAST- Basic local alignment search tool. Finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Borges, KA. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Salmonella* pertencentes a diferentes sorovares isoladas de matrizes e de frangos de corte no campo, de carcaças de frango e de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose. Tese de Doutorado, PPG Ciências Veterinárias - UFRGS, 2016.
- Center for Disease Control Prevention CDC. Estimates of Foodborne Illness in the United States (updated 15 April 2011). Atlanta: CDC. Available online at: <http://www.cdc.gov/features/dsfoodborneestimates>.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2014). The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 12:3547. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3547
- Hald T, Vose D, Wegener HC, Koupeev T. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal.* 2004. (24): 225-269.
- Hendrix RW. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor. Popul. Biol.* Jun 2002.
- Klumpp J, Fouts DE, Sozhamannan S. Bacteriophage functional genomics and its role in bacterial pathogen detection. *Briefings in functional genomics.* vol 12, no 4, p 354-365, 2013.

Mandelli, JZA. Formação de biofilmes e resistência à antimicrobianos de *Salmonella* spp. isoladas em abatedouros avícolas. Dissertação de Mestrado, PPGBioexperimentação - UPF, 2016.

Mandilara G, Mavridou A, Lambiri M, Vatapoulos A, Rigas F. The use of bacteriophages for monitoring the microbiological quality of sewage sludge. *Environmental Technology*, v.27, n.4, p.367-375, 2006.

Melo LDR, Sillankorva S, Ackermann HW, Kropinski AM, Azeredo J, Cerca N. Isolation and characterization of a new *Staphylococcus epidermidis* broad-spectrum bacteriophage. *Journal of General Virology*, 2014 v 95, p 506–515.

Mion L, Parizotto L, Andriva LS, Webber B, Cisco IC, Pilotto F, Rodrigues LB, Nascimento VP, Santos LR. *Salmonella* spp. Isolated by Miniaturized Most Probable Number and Conventional Microbiology in Poultry Slaughterhouses. *ACTA*.

PHAST- Phage search tool. Disponível em: <http://phast.wishartlab.com/>.

Santos LA, Mion L, Marotzki M, Parizotto L, Rodrigues LB, Nascimento VP, Santos LR. Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte. *Pesq. Vet. Bras.* vol.35 no.3 Rio de Janeiro Mar. 2015

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v 1, 2001

Sharma CS, Dhakal J, Nannapaneni R. Efficacy of Lytic Bacteriophage Preparation in Reducing *Salmonella* In Vitro, on Turkey Breast Cutlets, and on Ground Turkey. *Journal of Food Protection*, Number 7, July 2015, pp. 1250-1419, pp.1357-1362

Sillankorva S, Pleteneva E, Shaburova, Santos S, Carvalho C, Azeredo J, Krylov V. *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072, 2010. p 1175-1186.

Sillankorva S, Pleteneva Neubauer P, Azeredo J. Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens* *BMC Biotechnology*, 2008 doi:10.1186/1472-6750-8-80.

Spellberg B, Bartlett J G, Gilbert, D N. The future of antibiotics and resistance. *The New England journal of medicine*, v. 368, n. 4, p. 299–302, 2013.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JGG. *Bacteriophage therapy*. *Antim Agents and Chemother* 2001; 45:649-659.

Sulakvelidze A. Safety by Nature: Potential Bacteriophage Applications Bacteriophages offer opportunities for safely managing bacterial infections. *Microbe*, v 6, n 3, p 122-126, 2011.

Susskind MM, Botstein D. Molecular Genetics of Bacteriophage P22. Microbiological reviews, American Society for Microbiology Vol. 42, No. 2 Printed in USA. June 1978, p. 385-413.

VANDER BYL C, KROPINSKI AM. Sequence of the Genome of *Salmonella* Bacteriophage P22. Journal of bacteriology, Nov. 2000, vol. 182, p. 6472–6481.

Virfam - Remote homology detection of viral protein families. VIRFAM is dedicated to the recognition of head-neck-tail modules and of recombinase genes in phage genomes. Disponível em: <http://biodev.extra.cea.fr/virfam/>.

WHO - World Health Organization. Global Network Global Foodborne Infections Network, 2013. Global Salm Surv. [capturado 15 out. 2015] Disponível em: [http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY\\_DATA\\_SET\\_REP.show\\_parms](http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show_parms).

Zinno P, Devirgiliis C, Ercolini D, Ongeng D, Mauriello G. Bacteriophage P22 to challenge *Salmonella* in foods, 2014.

## 5. CONCLUSÕES

O uso de bacteriófagos para o controle de agentes patogênicos é cada vez mais utilizada como alternativa à terapias convencionais. Pode ter ação em casos de bactérias multirresistentes a antibióticos, de difícil eliminação e tratamento. O uso de bacteriófagos requer uma caracterização detalhada para a sua classificação e aplicação, uma vez que os fagos são capazes de incluir e modificar a combinação genética do genoma bacteriano, podendo codificar agentes patogênicos. Por este motivo a necessidade de testes *in vitro* e *in vivo* para determinar quais fagos possuem fins terapêuticos. Neste sentido, com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- a) A utilização do bacteriófagos P22 frente diferentes sorovares de *Salmonella* teve ação lítica nos testes *in vitro*, mesmo quando utilizado em cepas virulentas, com multirresistência a antimicrobianos ou fortemente produtora de biofilme.
- b) Foi isolado, caracterizado fenotipicamente e sequenciado um novo bacteriófago, nunca antes descrito, denominado *Salmonella Phage UPF\_BP1*, que pertence à ordem Caudovirales, família Podoviridae, com genoma circular, DNA fita dupla, composto por 39,902 pb, registrado no GenBank sob o número KX776161. Possui ação lítica frente a diversos sorovares de *Salmonella enterica*, incluindo algumas multirresistentes a antibióticos e com genes de virulência.
- c) Foi isolado um fago, denominado 5:2, em fase de sequenciamento, que apresentou alta infectividade frente a todos os sorovares testados.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescente número de bactérias resistentes a antibióticos e a variedade de isolados de *Salmonella enterica* identificadas em estudos anteriores nos encorajou a realizar o isolamento e caracterização de novos fagos lítico, com potencial para serem utilizados para terapêutica destes patógenos.

Os resultados descritos denotam grande relevância devido à possibilidade de utilização destes bacteriófagos como possíveis agentes no biocontrole de *Salmonella enterica*. Contribuem para uma melhor compreensão da biologia e ação destes fagos, o que é necessário para o desenvolvimento e a utilização eficaz como fagoterapia, no controle e tratamento de agentes patogênicos, assim como em biofilmes.

O fago UPF\_BP1 terá seu genoma anotado e, posteriormente, será depositado no GenBank. Ao analisarmos sua homologia no BLAST com genes de fagos já descritos, verificamos que o Query cover é menor que 60%, ou seja, não se parece com nenhum outro fago já descrito. As análises do sequenciamento passaram pelo SeqyClean, que removeu contaminantes existentes no DNA, como duplicatas de PCR, contaminantes e adaptadores. O sequenciamento apresentou uma ótima cobertura, com repetições de até 500 vezes. Para análise dos dados e montagem do genoma foram utilizados programas distintos como Velvet, Newbler, BLAST, PHAST, Virfam, com isso reforçamos a fidelidade dos dados.

O fago 5;2 encontra-se em fase de seqüenciamento e, a partir disso, poderemos caracterizá-lo.

Estudos complementares ainda são necessários para desenvolver soluções individuais ou produzir coquetéis de fagos para auxiliar no controle e prevenção de *Salmonella enterica*. Como perspectivas futuras deste trabalho estão os testes dos fagos isolados *Salmonella* Phage UPF\_BP1 e o fago 5:2 em outros sorovares de *Salmonella*, para verificação da eficiência de lise, controle e remoção de biofilmes, e testes *in vivo*, os quais podem aumentar o leque de ação destes fagos.

## 7. REFERÊNCIAS

1. ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. [capturado 18 julho 2016] Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/resumo>.
2. MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. [capturado 10 mar.2016]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>.
3. Programa de vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos – VEDTA. Relatório 2013. Divisão de Vigilância Epidemiológica/RS- Secretaria da Saúde do Estado.
4. Shinohara NKS, Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Lima Filho JL. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos - Ciênc. saúde coletiva vol.13 n.5, PP.1675-1683. Rio de Janeiro Sept./Oct. 2008.
5. Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM. Ability of Bacteriophages Isolated from Different Sources to Reduce *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis In Vitro and In Vivo. *Poultry Science*, 2007 86:1904–1909.
6. Hagens S, Loessne M J. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. September 2007, Volume 76, Issue 3, pp 513-519.
7. Forsythe, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 410 p. 2002.
8. Grimont P, Weil F. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. In World Health Organization. Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. *Institute Pasteur*. 9th ed. Paris: pp. 6-7. 2007.
9. 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.
10. Andreatti Filho RL. Paratifo Aviário. *Saúde Aviaria e Doenças*. São Paulo: Roca, 2007. p. 96-111.
11. Gast RK. Paratyphoid Infections. In: B.W. BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; MCDUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. *Diseases of poultry*. 10.ed., Ames: Iowa State University Press, 1997. p.97-121.
12. Hofer E, Silva Filho SJ, Reis, EMF. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.2, p.55-62, 1997.

13. Santos LA, Mion L, Marotzki M, Parizzoto L, Rodrigues LB, Nascimento VP, Santos LR. Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouro de frangos de corte. *Pesq. Vet. Bras.* Vol.35 n.3. Rio de Janeiro Mar. 2015.
14. WHO – World Health Organization. Global Network Global Foodborne Infections Network. Global Salm Surv. [capturado 15 out. 2015] Disponível em: [http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY\\_DATA\\_SET\\_REP.show\\_parms](http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show_parms).
15. AVISITE, Portal da Avicultura na Internet. Frango- Estatística, 2016 Disponível em: <http://www.avisite.com.br/economia/index.php?acao=exportacao>.
16. BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento, Portal Internet, 2016. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br) > Página Inicial > Animal > Espécies.
17. PROGRAMA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS – VEDTA. Programa de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos Divisão de Vigilância Epidemiológica/RS- Secretaria da Saúde do Estado. 2014.
18. 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>.
19. WHO - World Health Organization. Global Network Global Foodborne Infections Network. May 2011 Vol IV. [capturado 15 Out. 2015] Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/GFN\\_update\\_may\\_2011.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/GFN_update_may_2011.pdf?ua=1).
20. WHO - World Health Organization-*Salmonella*. [capturado 15 Out. 2015] Disponível em: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>.
21. Hald T, Vose D, Wegener HC, Koupeev T. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal.* 2004. (24): 225-269.
22. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp, 2011. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>
23. BRASIL, Ministério da Agricultura - Portaria SDA. N.126, de 06 de novembro de 1995. Diário Oficial da União, Brasília, DF. MAA. Normas para diagnóstico das Salmoneloses aviárias, 1995.
24. BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 78, de 19 de setembro de 1994. Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA).
25. BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus, 2003. Diário Oficial da União de 10 out. 2003, seção 1, p. 9.

26. Soncini RA.; Controle da *Salmonella Enteritidis* na Avicultura; Anais, 2004. Disponível em: [http://www.cnpisa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/anais0204\\_bsa\\_soncini.pdf](http://www.cnpisa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais0204_bsa_soncini.pdf)
27. Spellberg B, Bartlett J G, Gilbert, D N. The future of antibiotics and resistance. *The New England journal of medicine*, v. 368, n. 4, p. 299–302, 2013.
28. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF. Relatório de pesquisa em vigilância sanitária de alimentos, 2012
29. Hangens S, Loessner MJ. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology Biotechnology* v. 76, n. 3, p 513 – 519, 2007.
30. Sulakvelidze A. Safety by Nature: Potential Bacteriophage Applications Bacteriophages offer opportunities for safely managing bacterial infections. *Microbe*, v 6, n 3, p 122-126, 2011.
31. Abedon S T, Abedon CT, Thomas A, Mazure H. Bacteriophage prehistory Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage* v1, p 174-178; May/June 2011 © 2011 Landes Bioscience *Bacteriophage* v 1.
32. Ackermann H W, Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Adv Virus* p 135-201, 1998.
33. Cerca N, Cerca FA, Biofilmes: na saúde, no ambiente, na indústria. Porto: Publindústria, Edições Técnicas. 2012.
34. Mayer G. Microbiologia e Imunologia. University of South Carolina School of Medicine. Capítulo Sete. [capturado em 10 fev. 2016]. Disponível em: [http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter\\_7\\_bp.htm](http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter_7_bp.htm).
35. Mandilara G. Mavridou A, Lambiri M, Vatapoulos A, Rigas F. The use of bacteriophages for monitoring the microbiological quality of sewage sludge. *Environmental Technology*, v.27, n.4, p.367-375, 2006.
36. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JJG. *Bacteriophage therapy*. *Antim Agents and Chemother* 2001; 45:649-659.
37. Gonçalves GAM, Suehiro BYB, Costa LFZP, Pantoja JCF, Andreatti Filho RL. Análise de critérios para utilização na seleção de bacteriófagos líticos com potencial para utilização médica: Dados preliminares. *Revista Veterinária e Zootecnia*. Março, 2015; 22(1): 72-82.
38. Soothill JS. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *Journal of Medical Microbiology*, v.37, p.258-261, 1992.
39. Cerveny KE, Depaola A, Duckworth SH, Gulig PA. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextrantreated mice. *Infection and Immunity*, v.70, p.6251-6262, 2002.

40. Sharma CS, Dhakal J, Nannapaneni R. Efficacy of Lytic Bacteriophage Preparation in Reducing *Salmonella* In Vitro, on Turkey Breast Cutlets, and on Ground Turkey. *Journal of Food Protection*, Number 7, July 2015, pp. 1250-1419, pp.1357-1362.
41. Zinno P, Devirgiliis C, Ercolini D, Ongeng D, Mauriello G. Bacteriophage P22 to challenge *Salmonella* in foods, 2014.
42. Abedon ST. *Bacteriophage Ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*. Nova York: Cambridge University Press, 2008. 508p.
43. FOOD SAFETY BRAZIL. Segurança de alimentos. [Capturado em 06 abr. 2016]. Disponível em: <http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-janeiro-de-2016/>.
44. Byl C V, Kropinski A M. Sequence of the Genome of *Salmonella* Bacteriophage P22. *Journal of Bacteriology*. Nov. 2000 vol. 182, p 6472-6481.
45. Mota Nobre SA, Vírus. Departamento de Biologia Geral Universidade Estadual de Montes Claros.