

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS NO CONTROLE BIOLÓGICO  
DE *SALMONELLA ENTERICA***

**Tese de Doutorado**

**Emanuele Serro Pottker**

**PORTO ALEGRE**

**2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**UTILIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS NO CONTROLE BIOLÓGICO  
DE *SALMONELLA ENTERICA***

**Autora: Emanuele Serro Pottker**

**Tese apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutora em  
Ciências Veterinárias na Área de Sanidade  
Avícola.**

**Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento**  
**Coorientadora: Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues**

**PORTO ALEGRE**

**2021**

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

Pottker, Emanuele Serro  
UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS NO CONTROLE BIOLÓGICO  
DE SALMONELLA ENTERICA / Emanuele Serro Pottker. --  
2021.  
110 f.  
Orientador: Vladimir Pinheiro Nascimento.

Coorientador: Laura Beatriz Rodrigues.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2021.

1. Utilização de bacteriófagos no controle  
biológico de Salmonella enterica formadoras de  
biofilmes em indústria de alimentos . 2. Sequência  
completa do genoma de três novos bacteriófagos líticos  
isolado de Salmonella Infantis e Salmonella Rissen. I.  
Nascimento, Vladimir Pinheiro, orient. II. Rodrigues,  
Laura Beatriz, coorient. III. Título.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

EMANUELE SERRO POTTKER

UTILIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE  
*SALMONELLA ENTERICA*

Aprovada em 16 de Julho 2021.

APROVADO POR:

---

Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento  
Orientador e Presidente da comissão

---

Dra. Karen Apellanis Borges  
Membro da Comissão

---

Dra. Luciana Ruschel dos Santos  
Membro da Comissão

---

Dra. Simone Ulrich Picoli  
Membro da Comissão

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Maria Elisa Serro (*in memoriam*),  
a pessoa mais iluminada que conheci na vida.

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe (*in memoriam*), pelo incentivo e orgulho em dizer que filha seria doutora e que neste dia ela estaria na primeira fila, tenho certeza que está.

Ao meu marido Daniel, pelo carinho e apoio nessa e em todas as caminhadas.

Ao meu filho Luca, pela alegria, ensinamentos de priorização e amor.

Agradeço ao meu orientador, professor Vladimir Pinheiro do Nascimento, pela oportunidade, confiança, amparo e carinho em todos os momentos.

À Professora Laura Beatriz Rodrigues, coorientadora deste projeto, pela orientação, carinho e amizade de uma vida toda.

À professora Luciana Ruschel, pela orientação, apoio e amizade.

Ao professor Ricardo Zanella, pelos ensinamentos e ajuda valiosa.

À Professora Luciane Daroit, pelo apoio na análise estatística da Tese.

A Professora Karen pela orientação e carinho.

A professora Junia, pelo carinho, amizade e orientação.

Ao professor Samuel Cibulski pela ajuda, colaboração e orientação.

A todos os colegas e amigos do CDPA - UFRGS e Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário da UPF.

À UFRGS, professores e servidores, agradeço pelo acolhimento.

À Universidade de Passo Fundo pela disponibilidade, apoio e infraestrutura para realização deste projeto.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração do projeto.

A CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O aparecimento de bactérias multirresistentes a antimicrobianos e a agentes químicos utilizados para o controle de bactérias patogênicas como *Salmonella*, tem incentivado a busca por meios que garantam a inocuidade e a segurança alimentar, uma vez que esses patógenos, quando presentes, são responsáveis por perdas econômicas e alterações na qualidade dos produtos. *Salmonella* é uma das espécies bacterianas enteropatogênicas mais presentes no mundo e está comumente envolvida em surtos de doenças transmitidas por alimentos. Algumas cepas, podem ser altamente virulentas, resistente a antimicrobianos e capazes de formar biofilmes. A adesão microbiana nas superfícies é o passo inicial para a formação de biofilmes e isso tem consequências negativas na saúde, na indústria e no ambiente, pois podem ser pontos de contaminação contínua, causando impactos negativos inclusive no setor avícola. Ambientes industriais são propícios à formação de biofilmes, devido à constante presença de microrganismos e às condições favoráveis para o seu desenvolvimento. As altas concentrações dos agentes químicos empregados para o controle de biofilmes geram impactos ambientais negativos e controle ineficiente dos patógenos, uma vez que é crescente o número de bactérias resistentes a esses agentes. Devido a estes fatores, tem surgido o interesse de buscar alternativas para eliminação e controle de biofilmes, utilizando agentes biológicos, tais como os bacteriófagos. Bacteriófagos são vírus específicos de procariotos, são intracelulares obrigatórios, hospedeiro-específicos, capazes de infectar espécies ou grupos dentro de uma mesma espécie. Estima-se que os bacteriófagos sejam as entidades mais abundantes da terra e existam aproximadamente  $10^{30}$  fagos para cada célula bacteriana. Neste contexto, verificou-se a capacidade de biocontrole de sete fagos distintos, testados em 12 sorovares de *Salmonella*, dentre elas, *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzengrund*, *S. Typhimurium* e *S. Tennessee*. Foram realizados ensaios de susceptibilidade, eficiência de plaqueamento, prevenção e remoção de biofilmes de *Salmonella*. Para tanto, foi sequenciado o genoma de três dos sete fagos selecionados, a fim de verificarmos se eram fagos líticos aptos para utilização como biocontrole. Os ensaios foram realizados de duas maneiras, os fagos foram testados individualmente para determinação da susceptibilidade bacteriana e para verificação de eficiência de plaqueamento, com intuito de certificar a origem de progênie fágica e, testados na forma de coquetel, para o controle de biofilmes. No ensaio de prevenção e remoção de biofilmes de *Salmonella* em superfície de poliestireno, utilizamos os tempos de 3, 6 e 9 horas de ação, onde os resultados demonstraram inibição de formação de biofilme em até 89 %, e remoção do biofilme pré-formado em até 76,1%. Sugere-se que a utilização de combinações de fagos na forma de coquetéis, aumenta o sinergismo e potencializa a inibição da formação de biofilmes, bem como o uso no condicionamento das superfícies é mais eficiente do que quando utilizado em biofilmes pré-formados.

Palavras-chave: bacteriófagos, biocontrole, biofilme, eficiência de infecção.

## ABSTRACT

*The appearance of multi-resistant bacteria to antimicrobials and chemical agents used to control pathogenic bacteria such as Salmonella, has encouraged the search for means that guarantee food safety and innocuousness, since these pathogens, when present, are responsible for economic losses. and changes in product quality. Salmonella is one of the most ubiquitous enteropathogenic bacterial species in the world and commonly involved in foodborne disease outbreaks. Some strains can be highly virulent, resistant to antimicrobials and capable of forming biofilms, and microbial adhesion on surfaces is the initial step for the formation of biofilms and this has negative consequences on health, industry and the environment, as they can be points of continuous contamination, causing negative impacts even in the poultry sector. Industrial environments are conducive to the formation of biofilms, due to the constant presence of microorganisms and favorable conditions for their development. The high concentrations of chemical agents used to control biofilms generate negative environmental impacts and inefficient control of pathogens, since the number of bacteria resistant to these agents is increasing. Due to these factors, there has been an interest in seeking alternatives for the elimination and control of biofilms, using biological agents, such as bacteriophages. Bacteriophages are prokaryotic-specific viruses, are obligatory, host-specific intracellular cells, capable of infecting species or groups within the same species. Bacteriophages are estimated to be the most abundant entities on earth and there are approximately  $10^{30}$  phages for each bacterial cell. In this context, the biocontrol capacity of 7 distinct phages was verified, tested in 12 Salmonella serovars, among them, S. Anatum, S. Agona, S. Brandenburg, S. Bredeney, S. Enteritidis, S. Heidelberg, S. Infantis, S. Panama, S. Rissen, S. Schwarzengrund, S. Typhimurium and S. Tennessee. Tests of susceptibility, EOP - efficiency of plating, prevention and removal of Salmonella biofilms were carried out. For this purpose, was sequenced the genome of 3 of the seven selected phages, in order to verify if they were lytic phages suitable for use as biocontrol. The tests were performed in two ways, the phages were individually tested to determine bacterial susceptibility and to verify the efficiency of plating, in order to certify the origin of phage progeny and, tested in the form of cocktail, for the control of biofilms. In the Salmonella biofilm prevention and removal test on a polystyrene surface, we used the times of 3, 6 and 9 hours of action, where the results demonstrated inhibition of biofilm formation by up to 89%, and removal of the preformed biofilm in up to 76.1%. It is suggested that the use of phage combinations in the form of cocktails, increases synergism and enhances the inhibition of biofilm formation, as well as the use in surface conditioning is more efficient than when used in preformed biofilms.*

*Keywords: bacteriophages, biocontrol, biofilm, efficiency of plating*



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Classificação taxonômica dos bacteriófagos.....	32
<b>Tabela 2 -</b>	Características das cepas de <i>Salmonella</i> quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos .....	47
<b>Tabela 3 -</b>	Características das cepas de <i>Salmonella</i> quanto aos genes de virulência .....	48
<b>Tabela 4 -</b>	Pesquisa de genes associados à virulência e patogenicidade .....	49
<b>Tabela 5 -</b>	Informações dos fagos isolados.....	51
<b>Tabela 6 -</b>	Classificação das cepas de <i>Salmonella</i> conforme capacidade de formação de biofilme a 36° C .....	56
<b>Tabela 7 -</b>	Caracterização genômica do <i>Salmonella Phage</i> UPF_BP5 .....	61
<b>Tabela 8 -</b>	Caracterização genômica do <i>Salmonella Phage</i> UPF_BP4 .....	65
<b>Tabela 9 -</b>	Caracterização genômica do <i>Salmonella Phage</i> UPF_BP6 .....	67
<b>Tabela 10 -</b>	Suscetibilidade das cepas de <i>Salmonella</i> aos bacteriófagos conforme lise em placa .....	70
<b>Tabela 11 -</b>	Classificação da eficiência de plaqueamento do coquetel .....	73
<b>Tabela 12 -</b>	Classificação da eficiência do coquetel de bacteriófagos .....	77

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Percentual de inibição de formação de biofilme pela ação lítica do coquetel de bacteriófagos .....	80
<b>Gráfico 2</b>	Percentual de redução de biofilme pela ação lítica do coquetel de bacteriófagos com ação em 3, 6 e 9 horas .....	81

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Classificação dos bacteriófagos com base na morfologia e ácido nucléico.....	31
<b>Figura 2</b>	Etapas de replicação dos bacteriófagos.....	35
<b>Figura 3</b>	Ciclos de Replicação dos bacteriófagos.....	37
<b>Figura 4</b>	Controle de biofilme utilizando bacteriófagos.....	44
<b>Equação 1</b>	Titulação dos bacteriófagos.....	53
<b>Figura 5</b>	Ensaio de titulação dos bacteriófagos .....	53
<b>Figura 6</b>	Organograma com as etapas desenvolvidas neste projeto .....	54
<b>Figura 7</b>	Distribuição das densidades ópticas das cepas de <i>Salmonella</i> formadoras de biofilmes .....	56
<b>Figura 8</b>	Referências de halos fágicos utilizados para classificação de lise .....	69
<b>Figura 9</b>	Ensaio de eficiência de plaqueamento.....	73
<b>Equação 2</b>	Cálculo percentual de inibição e remoção de biofilmes.....	80
<b>Figura 10</b>	Interação fago e biofilme .....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de Tipos de Cultura)
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> (Caldo cérebro – coração)
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle de Prevenção de Doenças dos Estados Unidos)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Doença transmitida por alimentos
DO	Densidade óptica
ESP	Eventos em Saúde Pública
EPS	Exopolissacarídeos
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos)
GSS	<i>Global Salm-Surv</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
SPI	<i>Salmonella Pathogenicity Island</i> (ilha de patogenicidade de <i>Salmonella</i> )
TTSS	<i>Type Three Secretion System</i> (Sistema e Secreção do Tipo III)
UFC	Unidade formadora de colônia
UFP	Unidade formadora de placa
UPF_BP1	<i>Salmonella Phage</i> UPF_BP1
UPF_BP2	<i>Salmonella Phage</i> UPF_BP2
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
min	Minutos
mL	Mililitros
g	Gramas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	16
<b>2.2</b>	<b>Objetivo Específico</b> .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>3.1</b>	<b>O gênero <i>Salmonella</i> spp.</b> .....	17
3.1.1	<i>Salmonella</i> - sorovares de interesse.....	18
<b>3.2</b>	<b>Importância da salmonelose na saúde pública</b> .....	19
<b>3.3</b>	<b>Patogenia da salmonelose em humanos</b> .....	20
<b>3.4</b>	<b>Patogenicidade e fatores de virulência em <i>Salmonella</i></b> .....	21
3.4.1	Ilhas de patogenicidade .....	22
3.4.2	Plasmídeos .....	23
<b>3.5</b>	<b>Resistência aos antimicrobianos</b> .....	24
<b>3.6</b>	<b>Biofilmes microbianos</b> .....	25
<b>3.7</b>	<b>Bacteriófagos</b> .....	29
3.7.1	Classificação dos Bacteriófagos .....	30
3.7.2	Taxonomia dos Bacteriófagos .....	31
3.7.3	Ciclo de Replicação dos Bacteriófagos .....	34
3.7.3.1	Ciclo de replicação lítico.....	35
3.7.3.2	Ciclo de replicação lisogênico.....	36
3.7.4	Controle biológico utilizando bacteriófagos.....	37
3.7.5	Benefícios e limitações da terapia fágica .....	41
3.7.6	Controle biológico de biofilmes utilizando bacteriófagos.....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
<b>4.1</b>	<b>Local de realização dos experimentos</b> .....	46
<b>4.2</b>	<b>Cepas de <i>Salmonella enterica</i></b> .....	46
4.2.1	Caracterização das cepas.....	46
4.2.2	Pesquisa de presença de prófago nas amostras de <i>Salmonella</i> .....	50
<b>4.3</b>	<b>Bacteriófagos</b> .....	50
4.3.1	Amplificação, concentração e purificação dos bacteriófagos.....	51
4.3.2	Titulação dos bacteriófagos.....	52

4.4	Análises Estatísticas .....	53
5	<b>EXPERIMENTOS</b> .....	54
5.1	<b>Experimento I - Avaliação da adesão bacteriana de <i>Salmonella</i> em poliestireno</b> .....	55
5.1.1	Materiais e métodos.....	55
5.1.2	Resultados e discussão.....	55
5.2	<b>Experimento II – Sequenciamento dos bacteriófagos</b> .....	58
5.2.1	Materiais e métodos.....	58
5.2.2	Resultados e discussão.....	60
5.3	<b>Experimento III -Avaliação da ação dos bacteriófagos contra <i>Salmonella enterica</i> pelo método de difusão em ágar</b> .....	69
5.3.1	Materiais e métodos.....	69
5.3.2	Resultados e discussão.....	70
5.4	<b>Experimento IV - Eficiência de plaqueamento dos bacteriófagos contra <i>Salmonella enterica</i></b> .....	72
5.4.1	Materiais e métodos.....	72
5.4.2	Resultados e discussão.....	72
5.5	<b>Experimento V - Ação e eficiência do coquetel de bacteriófagos contra <i>Salmonella enterica</i> pelo método de difusão em ágar</b> .....	75
5.5.1	Materiais e métodos.....	75
5.5.1.1	Elaboração do coquetel de bacteriófagos.....	75
5.5.1.2	Ensaio de ação e eficiência de plaqueamento dos fagos contra as cepas de <i>Salmonella enterica</i> .....	75
5.5.1.3	Resultados e discussão.....	76
5.6	<b>Experimento VI - Ação lítica do coquetel contra formação e para remoção de biofilmes de <i>Salmonella</i></b> .....	79
5.6.1	Materiais e métodos.....	79
5.6.2	Resultados e discussão.....	80
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	87
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	88
	REFERÊNCIAS .....	89
	ARTIGOS A SEREM SUBMETIDOS .....	109

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira vem apresentando significativos índices de crescimento. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, com 13.245 mil toneladas produzidas, e líder nas exportações, com 4.214 mil toneladas exportadas para mais de 150 países. Presente em todo território nacional, a carne de frango tem destaque na região Sul, sendo os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul os principais produtores (ABPA, 2020). O setor busca continuamente a modernização e emprega instrumentos como o manejo adequado do aviário, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada entre indústria e produtores para excelência técnica em todas as etapas da cadeia produtiva. Esta estratégia resulta em custos reduzidos e na maior qualidade do produto, atendendo às demandas do mercado mundial (MAPA, 2018). Fatores de controle como qualidade microbiológica e físico-química contribuíram para aperfeiçoar a produtividade no setor.

Bactérias patogênicas e deteriorantes podem ser encontradas em diversas etapas da cadeia avícola, na forma de vida livre como células planctônicas ou em comunidades sésseis, ligadas em superfícies bióticas e/ou abióticas, também conhecidas como biofilmes. A presença de microrganismos afeta negativamente a indústria avícola, pois podem acarretar prejuízos econômicos e são responsáveis pela deterioração de produtos, podendo causar doenças transmitidas por alimentos (DTA). Um dos principais agentes causadores de infecção alimentar em humanos é *Salmonella* spp. (VIEIRA *et al.*, 2009). Este patógeno é onipresente na cadeia alimentar humana e está frequentemente associado a surtos de doenças (CDC, 2018), sendo os produtos de origem avícola as principais fontes de contaminação (GAST, 1997). *Salmonella* está associada a mais de 1.200.000 casos de doenças reportadas anualmente, dentre estas pelo menos 100.000 infecções são devidas a cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos clinicamente importantes para humanos, como ceftriaxona e ciprofloxacina (DIVEK *et al.*, 2018).

O controle epidemiológico e as medidas de controle sanitárias são controladas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através de normas e legislação vigentes, essenciais para as certificações, comercialização e exportação de produtos avícolas.

*Salmonella*, assim com outros microrganismos patogênicos, pode formar biofilmes. E seu estilo de vida sésil (biofilme), resiste significativamente mais aos sanitizantes e aos desinfetantes empregados nos procedimentos de higienização na



indústria, podendo ser de 500 a 1.000 vezes mais resistentes do que as células planctônicas (vida livre) (COSTERTON *et al.*, 1995). Os biofilmes formados por *Salmonella* spp. em equipamentos e superfícies de processamento de alimentos servem como um reservatório persistente de contaminação, comprometendo a segurança dos alimentos e a saúde humana (VAN HOUDT & MICHIELS, 2010), gerando um impacto negativo em várias etapas e representando perdas significativas para indústrias alimentícias (JESSEN & LAMMERT, 2003). Outra característica associada ao biofilme é o aumento da resistência aos antimicrobianos. Quando agregados em biofilmes, os microrganismos tornam-se de 10 a 1.000 vezes menos suscetíveis aos antimicrobianos do que quando em células planctônicas (DAVIES, 2003).

Diversas medidas para o controle de *Salmonella* spp. têm sido utilizadas, dentre elas o uso de antimicrobianos. No entanto, existem preocupações a respeito da seleção de bactérias resistentes a estas substâncias e a possibilidade de resíduos desses princípios ativos em alimentos de origem animal. Deste modo, tem surgido o interesse em tratamentos alternativos como o uso de bacteriófagos (ANDREATTI FILHO, 2007). Bacteriófagos (ou fagos) são vírus bacterianos intracelulares obrigatórios, que infectam somente procariotos. A utilização de bacteriófagos pode ser uma alternativa à antibioticoterapia para o tratamento de doenças em humanos e animais, é amplamente explorada para minimizar as cargas de patógenos nos produtos de origem animal e vegetal. Também podem ser utilizados para a substituição do uso de sanitizantes químicos, evitando resíduos. 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, assim como em culturas de produtos fermentados (HAGENS & LOESSNER, 2007). Uma das principais formas de utilização dos fagos como controle biológico é a elaboração de coquetéis, que são produtos desenvolvidos com dois ou mais tipos de bacteriófagos com potencial sinérgico, com ação conjunta frente à patógenos como os diferentes sorovares de *Salmonella enterica* ou mesmo outras enterobactérias.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é pesquisar a viabilidade de desenvolver um produto para o controle biológico de diferentes sorovares de *Salmonella enterica*, assim como prevenir e remover biofilmes bacterianos utilizando bacteriófagos previamente isolados no estado do Rio Grande do Sul.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Pesquisar a viabilidade de controle biológico de diferentes sorovares de *Salmonella enterica* através de testes utilizando bacteriófagos isolados no estado do Rio Grande do Sul.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o sequenciamento dos bacteriófagos já isolados e ainda não identificados;
- Testar os bacteriófagos individualmente frente a sorovares de *Salmonella enterica* pelo método de ágar difusão.
- Verificar a eficiência de plaqueamento de cada um dos fagos selecionados.
- Testar um coquetel de fagos, frente a sorovares de *Salmonella enterica* pelo método de ágar difusão.
- Testar um coquetel de fagos contra a formação e para a remoção de biofilmes de *Salmonella enterica* em microplacas de poliestireno.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O gênero *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* foi isolado e identificado pela primeira vez em 1885, por Daniel Elmer Salmon e encontra-se amplamente distribuído no ambiente em todo o mundo. Este gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, a qual possui mais de 25 gêneros bacterianos, incluindo diversos patógenos como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. Estudos genéticos sugerem que *E. coli* e *Salmonella enterica* derivaram de um ancestral comum, há 100 milhões de anos, pois estimam que seus genomas possuam uma diferença de apenas 10% nas suas sequências de DNA (JONG *et al.*, 2012).

*Salmonella* é uma bactéria Gram negativa, formato de bastonete curto, aeróbia e anaeróbia 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, sendo que cresce entre 5 °C e 45 °C. O pH ideal é 7, mas cresce em pH entre 4 e 9 (GAST, 1997). São termossensíveis, podendo ser destruídas a 60 °C por 15 a 20 min (FORSYTHE, 2013).

O gênero *Salmonella* é classificado em duas espécies: *Salmonella bongori*, geralmente associados a animais de sangue frio e ambiente; e *Salmonella enterica*, esta se divide em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II), *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécie *houtenae* (IV), *S. enterica* subespécie *indica* (VI).

Além da caracterização em espécie e subespécie, o gênero *Salmonella* também é classificado em sorogrupos e sorovares. Visando caracterizar os diferentes sorotipos do gênero com base em seus antígenos somáticos (*O*) e flagelares (*H*), em 2007 o Instituto Pasteur descreveu 2.579 sorovares, através do esquema Kauffmann-White-LeMinor (KWL). Os sorovares devem ser escritos com a primeira letra maiúscula, ou seja, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, denominada comumente *S. Enteritidis* (GRIMONT & WEILL, 2007). Os diferentes sorovares são identificados pelas estruturas presentes na sua parede bacteriana com base em duas estruturas na sua superfície: a porção mais externa das bactérias, chamado de antígeno somático *O*; e uma estrutura filiforme delgada, chamada antígeno flagelar *H*. Alguns sorovares também possuem o

antígeno capsular Vi (BRENNER *et al.*, 2000). Os antígenos *O* são distinguidos pela sua diferença na composição. Os antígenos *H* distinguem-se pelo teor de proteína dos flagelos. Cada antígeno *O* e *H* tem um número de código único e o sorotipo é baseado na combinação antigênica distinta de *O* e *H* (GRIMONT & WEILL, 2007).

Os principais sorogrupos são A, B, C1, C2, D1, E1 e G, sendo 97% dos isolados de casos clínicos em humanos classificados em um destes grupos. Alguns sorotipos são encontrados somente em um tipo de animal ou em um único lugar, outros são encontrados em vários animais e em todo o mundo. Alguns podem causar doenças graves, enquanto outros causam doenças mais leves. (FIELDS, 2006). Mais de 2.600 sorotipos já foram descritos para *Salmonella*, menos de 100 são os responsáveis pela maioria das infecções humanas e cerca de 60% pertencem à subespécie *enterica* (GRIMONT & WEILL, 2007; LIBBY *et al.*, 2008).

### 3.1.1 *Salmonella* - sorovares de interesse

*Salmonella* Enteritidis é um dos sorovares mais comuns em aves, e juntamente com *S. Typhimurium* é um dos mais importantes na ocorrência de paratifo aviário. Estes dois são responsáveis por infecções alimentares no homem (ANDREATTI FILHO, 2007). As aves situam-se neste contexto como um dos mais importantes hospedeiros de *Salmonella*, sendo responsáveis por auxiliar na propagação a outras espécies animais, inclusive ao homem, com relativa facilidade (HOFER *et al.*, 1997). Além destes, outros sorovares já foram isolados em abatedouros de aves, como *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzengrund*, *S. Tennessee* (SANTOS *et al.*, 2015). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) em seu programa Global Salm-Surv (GSS), todos os sorovares acima citados estão na lista entre os 15 sorovares mais identificados em amostras de animais, humanos, alimentos e ambiente no Brasil. No entanto, dado o elevado número de sorovares emergentes, é necessária uma revisão das estratégias de controle (CHOUSALKER, *et al.*, 2018). *Salmonella* Heidelberg foi isolado por Nascimento *et al.*, (1997) em carcaças de frango e encontra-se, juntamente com *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport* e *S. Javiana*, entre os cinco sorovares mais frequentemente encontrados em caso de surtos de salmoneloses em todo o mundo, sem considerar a fonte de contaminação (ROBINSOM, 2013).

### 3.2 Importância da *Salmonella* na saúde pública

Doença transmitida por alimentos (DTA) é uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, relacionada à ingestão de água ou alimentos contaminados. Também podem ocorrer manifestações, extraintestinais em órgãos como rins, fígado, sistema nervoso central, dentre outros. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). A ocorrência de DTA vem aumentando de modo significativo nos últimos anos, vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças. Entre eles destacam-se o crescente aumento das populações, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o processo de urbanização desordenado, a necessidade de produção de alimentos em grande escala, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante à qualidade dos alimentos ofertados às populações (MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SVS, 2016). Apesar dos controles já implementados, as infecções decorrentes de alimentos contaminados continua sendo um problema (WHO/GSS, 2016).

Considerada uma bactéria cosmopolita, *Salmonella* é uma das espécies bacterianas enteropatógenicas mais onipresentes no mundo, sendo uma das mais comuns e amplamente distribuídas doenças alimentares. As últimas décadas testemunharam o surgimento de isolados de *Salmonella* altamente virulentos e resistentes a antibióticos, representando um risco significativo para segurança alimentar (DIVEK *et al.*, 2018). A 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 (WHO, 2017). Existem evidências que os produtos oriundos da carne de frango são uma das mais importantes fontes de infecção para seres humanos (HALD *et al.*, 2004).

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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

No Brasil, o início da vigilância dos surtos de DTA iniciou em 1999. Surtos constituem Eventos em Saúde Pública (ESP) e são episódios em que duas ou mais pessoas apresentem os mesmos sinais/sintomas após ingerirem alimentos ou água da mesma origem (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). De acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, entre os anos de 2009 a 2018, ocorreram 6.809 surtos de DTA, mais de 634.568 pessoas foram expostas, 120.584 ficaram doentes e 99 foram a óbito. Do total

de surtos notificados, apenas 3.196 foram confirmados laboratorialmente e destes, apenas 2.593 tiveram identificação do agente etiológico: bactérias (92,2%), vírus (6%), agentes químicos/outros (1,2%) e protozoários e/ou helmintos (0,6%). Dentre os agentes etiológicos mais identificados em surtos, encontram-se *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a *Salmonella* é uma das quatro principais causas de doenças diarréicas em todo o mundo. A maioria dos casos de salmonelose são considerados leves, no entanto algumas vezes pode ser fatal, dependendo dos fatores do hospedeiro e do sorotipo de *Salmonella*. Estima-se que todos os anos uma em cada dez pessoas fique doente, ou seja, 550 milhões de pessoas adoecem a cada ano, incluindo 220 milhões de crianças menores de 5 anos e 33 milhões de pessoas perdem qualidade de vida.

### 3.3 Patogenia da salmonelose em humanos

A principal forma de transmissão em humanos ocorre através da ingestão de alimentos contaminados. Após a ingestão, *Salmonella* atravessa a camada epitelial intestinal, alcança a lâmina própria (camada na qual as células epiteliais estão ancoradas), onde proliferam. Depois da colonização intestinal, *Salmonella* spp. invade as células M e os enterócitos, com auxílio do Sistema de Secreção do Tipo III (*Type Three Secretion System* - TTSS) (GAL-MOR, 2014). Após a invasão celular, são fagocitadas pelos macrófagos, resultando em resposta inflamatória decorrente da hiperatividade do sistema reticuloendotelial. Ao contrário do que ocorre na febre tifóide, nas enterocolites a penetração de *Salmonella* spp. fica limitada à lâmina própria e nestes casos raramente se observa septicemia ou infecção sistêmica, e a infecção fica restrita à mucosa intestinal (SHINOHARA *et al.*, 2008). Por outro lado, se as bactérias conseguirem permanecer viáveis dentro de vacúolos nos macrófagos, elas podem se multiplicar ocorrendo uma infecção sistêmica (BÄUMLER, 1997). Normalmente a dose infectante para que ocorra a gastroenterite oscila entre  $2,0 \times 10^2$  a  $1,0 \times 10^6$ , dependendo do sorotipo isolado, mas também ocorre variação quanto ao alimento envolvido e a espécie de *Salmonella*, pois espécies adaptadas ao homem necessitam de doses infectantes menores que as não adaptadas para provocar a mesma sintomatologia característica da doença. Entretanto, algumas vezes a doença pode ser fatal em crianças, idosos ou imunocomprometidos, devido à menor resistência às infecções (SHINOHARA *et al.*, 2008).

### 3.4 Patogenicidade e fatores de virulência em *Salmonella*

Patogenicidade é a capacidade de um microrganismo em causar doença. Os microrganismos patogênicos se diferenciam de outros da mesma espécie pelo fato de possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, ou seja, propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que levam à doença. (VIEIRA, 2009). Virulência refere-se à gravidade da doença causada pelo agente, seus mecanismos conferem ao microrganismo a habilidade de sobreviver, invadir, multiplicar e persistir dentro do hospedeiro (BECEIRO *et al.*, 2013). Os fatores de virulência podem estar relacionados com os mecanismos de invasão, interferência na resposta imune do hospedeiro, capacidade de formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos (VIEIRA, 2009). O que diferencia os microrganismos patogênicos de outros da mesma espécie é a patogenicidade e os fatores de virulência expressos pelo microrganismos, assim como o sorovar em questão. (BECEIRO *et al.*, 2013).

O mecanismo de patogenicidade da *Salmonella* é multifatorial e complexo, incluindo presença de fatores de virulência que são codificados por genes de virulência e a supressão de qualquer um deles pode resultar em redução ou perda da virulência. Os genes de virulência podem fazer parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria, os chamados genes *housekeeping*, assim como nas ilhas de patogenicidade ou em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e bacteriófagos, e podem atuar em diferentes estágios da infecção (OLIVEIRA, 2013; VAN ASTEN *et al.*, 2005).

Os fatores de virulência da *Salmonella* estão codificados em genes agrupados em ilhas de patogenicidade no cromossomo bacteriano, denominadas de SPI (*Salmonella Patogenicity Islands*) e os fatores que determinam o papel da virulência das ilhas de patogenicidade são os genes dentro da ilha, o *status* do receptor do microrganismo e a característica do hospedeiro que promove o progresso da doença (GROISMAN, 1996). Dentre as propriedades conferidas por estas ilhas de patogenicidade está a capacidade de aderir e invadir o epitélio da célula hospedeira, produzir toxinas, captar ferro do meio ambiente e sintetizar o Sistema de Secreção Tipo III (*Type Three Secretion System – TTSS*), que é um dispositivo molecular que permite a translocação de moléculas efetoras para o interior da célula hospedeira. A capacidade de adquirir propriedades patogênicas em um único evento genético permite evolução, bem como o surgimento de microrganismos patogênicos (VIEIRA, 2009).

Alguns componentes da estrutura bacteriana possuem um papel importante na virulência das cepas, como as fímbrias, os flagelos, cápsula e o lipopolissacarídeo. Fímbrias são polímeros de proteínas produzidas na superfície bacteriana e são responsáveis pela fixação da bactéria à célula do hospedeiro, funcionando como adesinas. Funcionam como mediadores de interações entre bactéria e hospedeiro no processo de colonização e invasão das células, são importantes na formação de biofilmes. Os flagelos conferem motilidade às bactérias e desempenham um papel importante nos estágios iniciais da adesão bacteriana por superar as forças repulsivas associadas com o substrato, permitem a bactéria atravessar a camada de muco e contribuem para o processo inflamatório. A cápsula está relacionada com a capacidade invasiva da bactéria (DONLAN, 2002; ÁLVAREZ, 2007). A camada de lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias Gram negativas, interagem com os macrófagos de modo que se tornem resistentes aos peptídeos catiônicos, à ação endotóxica e à ação antimicrobiana das enzimas lisossomais, as propriedades tóxicas do LPS estão relacionadas às endotoxinas ou lipídios A (PERRY, 1993).

#### 3.4.1 Ilhas de patogenicidade

As ilhas de patogenicidade de *Salmonella* são grandes regiões do cromossomo que codificam vários fatores de virulência. Estas ilhas estão ausentes em cepas não patogênicas da mesma espécie, apresentam conteúdo de guanidina e citosina (G+C) diferente do restante do cromossomo e frequentemente estão localizadas adjacentes a genes que codificam RNA transportador (OLIVEIRA, 2013). As SPI podem ser adquiridas através de transferência horizontal de genes e permite que a bactéria apresente novas funções de virulência oriundas de outros microrganismos ou cepas de *Salmonella* spp. (MARCUS *et al.*, 2000; SHIMIDT & HANSEL, 2004).

Atualmente, foram descritas 23 SPI, sendo a última descrita em 2013 (SPI-23). Porém, as funções dos genes contidos dentro de cada ilha ainda não foram completamente elucidadas (HAYWARD *et al.*, 2013). A SPI-1 possui mais de 26 genes que codificam proteínas para os sistemas de secreção tipo III (*Type Three Secretion System – TTSS*), para a invasão das células não fagocíticas, como as células M do intestino, e para a ativação da resposta inflamatória e é importante para que ocorra a infecção intestinal (ÁLVAREZ, 2007; MIRMOMENI *et al.*, 2008; VIEIRA, 2009; JONG *et al.*, 2012). *invA*, *prgH*, *sipB*, *orgA*, *spaN* são genes codificadores de proteínas estruturais dos TTSS, o gene



*sip* forma os poros para secreção das proteínas efetoras (*Sop*, *Avr*, *Sif*, *Siv*) e reguladoras (*Hil*) (ÁLVAREZ, 2007). Alguns genes são responsáveis pela multiplicação da *Salmonella* no interior de macrófagos (*spiA*), para a sobrevivência no interior de fagossomos (*msgA*, *pagC*), para a captação do ferro (*iroN*) e para codificar endotoxinas (*stn*, *cdtB*) (ÁLVAREZ, 2007; BARROW *et al.*, 2010). O gene *hilA* é importante na patogenicidade de *Salmonella* pois é necessário para a colonização das bactérias no lúmen do intestino dos hospedeiros, codifica a secreção de proteínas relacionadas com a invasão celular, sendo um regulador no processo de invasão e é importante na regulação do TTSS, que codifica a secreção de proteínas relacionadas com a invasão celular (MURRAI & LEE 2000; CARDONA-CASTRO *et al.*, 2002). A ilha de patogenicidade SPI-2 é responsável pela capacidade de *Salmonella* sobreviver dentro dos macrófagos e se multiplicar dentro das vesículas das células eucarióticas, ocasionando infecção sistêmica (SHIMIDT & HANSEL, 2004). Esta ilha constitui um exemplo da eficácia da adaptação de um patógeno em uma célula hospedeira (ÁLVAREZ, 2007).

#### 3.4.2 Plasmídeos

Os plasmídeos são sequências de DNA relativamente simples, porém eficazes para expressão de genes, nas quais é possível inserir um gene terapêutico por técnicas de DNA recombinante. De formato circular, se replicam independentemente do cromossomo do hospedeiro, e podem ser transmitidos horizontalmente entre as bactérias em um processo chamado de conjugação bacteriana (LINDEN, 2010). Os plasmídeos podem conferir vantagens aos microrganismos, como o recebimento de genes os quais podem aumentar sua virulência ou conferir em uma maior resistência antimicrobiana (MADIGAM, 2010). Apenas algumas cepas de *Salmonella* spp. possuem este tipo de plasmídeo (JONG *et al.*, 2012). O *operon spv* (*Salmonella plasmid virulence*) é comum a todos os plasmídeos de virulência de *Salmonella* spp. e está relacionado à sobrevivência no interior do macrófago (ÁLVAREZ, 2007).

Os plasmídeos codificam para a resistência aos agentes antimicrobianos múltiplos, enquanto os biofilmes fornecem um mecanismo de seleção e promovem resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos (DONLAN, 2002). Os plasmídeos conjugativos expressam fatores que favorecem o acesso das bactérias planctônicas a comunidades de biofilmes (GHIGO, 2001).

### 3.5 Resistência aos antimicrobianos

Os antimicrobianos podem ser administrados em animais para tratar ou prevenir a ocorrência de doenças infecciosas e, também, como aditivos para melhorar o desempenho zootécnico de animais de produção. Ocasionalmente, pode resultar em resistência bacteriana pela contínua exposição a estas substâncias, representando um grande risco para a saúde humana devido aos casos de infecções de difícil controle com terapia antimicrobiana ineficaz (SPELLBERG *et al.*, 2013). O uso terapêutico de antimicrobianos em lotes de aves é comum, mas o uso abusivo tem provocado um aumento da resistência aos antimicrobianos (ANVISA, 2012). Quando o emprego dos antimicrobianos é utilizado de maneira indiscriminada, há um aumento na pressão seletiva para o fármaco, podendo ocasionar o aparecimento de microorganismos resistentes (KOLUMAN & DIKICI, 2013).

A resistência bacteriana pode ser classificada como natural ou intrínseca, decorrente de uma propriedade comum aos microrganismos da espécie, ou seja, quando uma espécie é resistente a um determinado antimicrobiano mesmo antes de sua exposição ao fármaco. A resistência adquirida é resultante da aquisição de mecanismos de resistência, ou seja, quando um microrganismo continua a multiplicar-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano ao qual ele já foi sensível, sendo o maior problema a seleção de bactérias resistentes (ANVISA, 2008; SCHWARZ *et al.*, 2010; RAO, 2013).

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 (ANVISA, 2008; RAO, 2013).

Em meados da década de 70, a discussão sobre resistência aos antimicrobianos ganhou atenção quando alguns médicos perceberam que a ampla oferta de agentes antimicrobianos não estava resolvendo todas as infecções bacterianas (LOWY, 2003).

Ainda que a resistência aos antibióticos seja considerada um problema contínuo, o mais preocupante é a diversidade e a grande extensão de organismos envolvidos em ocorrências clínicas e com grande impacto para a saúde pública (WRIGHT, 2007). A grande quantidade de antimicrobianos utilizados tanto na medicina humana quanto na produção de alimentos acaba elevando a quantidade destes produtos que chegam ao

ambiente e, conseqüentemente, resulta em uma pressão seletiva na população bacteriana multirresistente (SPELLBERG *et al.*, 2013).

O gene *mcr-1* foi descoberto na China, em bactérias de suínos e vem sendo responsável por conferir altas taxas de resistência à colistina, o qual é conhecido como “antibiótico de último recurso” na medicina humana. Em alguns locais de produção, quase 100% dos animais possuem o gene *mcr-1* em bactérias encontradas nas fezes, além de relatos de um número cada vez maior de casos em amostras de fezes humanas. A propagação deste microorganismo que contém o gene *mcr-1*, é um dos exemplos mais claros de como o uso de antibióticos em animais de produção pode levar à resistência em infecções humanas (REARDON, 2017).

A importância da *Salmonella* spp. na saúde pública não se deve somente ao fato de ser frequentemente isolada, mas sim devido a resistência antimicrobiana que vem sendo verificada em vários países nos últimos anos. Este fato é preocupante, uma vez que *S. enterica* é uma das causas mais comuns de gastroenterite humana em todo o mundo (BRAZ *et al.*, 2011). A resistência a apenas um antimicrobiano não é de grande preocupação, mas estudos têm relatado um aumento na taxa de patógenos multirresistentes (resistência a três ou mais classes de antibióticos) (LERTWORAPREECHA *et al.*, 2013). Segundo o Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana de Bactérias Entéricas (NARMS, 2013), cepas de *Salmonella* spp. isoladas de fonte avícola apresentaram resistência à ceftriaxona antibiótico importante usado para tratar pacientes gravemente doentes.

*Salmonella* resistentes a antimicrobianos representam um risco à saúde pública, porque podem comprometer o tratamento. Além disso, pessoas infectadas com cepas resistentes são mais propensas a sofrer um efeito adverso a saúde, como doença prolongada, aumento da gravidade da doença, hospitalização ou morte, em comparação àquelas infectadas com cepas sensíveis (COOK *et al.*, 2009).

### **3.6 Biofilmes Microbianos**

Um biofilme é uma comunidade multicelular mono ou multiespécie, composto por células procarióticas e/ou eucarióticas incorporadas em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas (EPS) composta de material sintetizado pelas células sésseis na comunidade, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, em cuja formação os microrganismos exibem diferenciados

fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (COSTERTON, 2007; DONLAN & COSTERTON, 2002; FLEMMING *et al.*, 2016). As EPS sintetizadas por células microbianas variam muito na sua composição, e conseqüentemente, nas propriedades químicas e físicas. Esta matriz tem inúmeras funções, como adesão inicial, retenção de água, adsorção de compostos, fonte de nutrientes, troca e armazenamento de informações genéticas. Além disso, o EPS é a principal barreira protetora no biofilme, capaz de prevenir o acesso físico de certos agentes antimicrobianos e de agentes sanitizantes, restringindo a difusão destes para o interior da matriz (GILBERT & FOLEY, 1997; ELVERS & LAPPIN-SCOTT, 2000). Os biofilmes podem ser encontrados numa vasta gama de superfícies e podem ser constituídos por uma população que se desenvolveu de uma única espécie ou por uma comunidade resultante de múltiplas espécies (DAVEY & O'TOOLE, 2000).

Biofilmes microbianos foram relatados desde que o primeiro microscópio foi construído, o pesquisador holandês Antoine Van Leuwenhoek (1632-1723) observou esse tipo de forma de vida ao examinar amostras de seus dentes utilizando um microscópio capaz de ampliar a imagem em até quinhentas vezes. Visualizou mais fragmentos de células agregadas (sésseis) do que sob a forma planctônica. Os biofilmes são encontrados em ambientes extremos, como fontes hidrotermais, energia nuclear, plantas, indústrias de petróleo e até em pedras do deserto (COSTERTON *et al.*, 1987; COSTERTON, 2007). Em 1943, Zobel publicou um estudo onde descreveu células bacterianas aderidas em cascos de navios e em diferentes superfícies. Em 1978, Costerton, verificou que a maioria dos microrganismos nos ambientes naturais se encontrava fixo a suportes, e não na forma livre, atribuindo o nome de biofilme às células microbianas aderidas (COSTERTON *et al.*, 1995).

A formação de um biofilme requer uma série de etapas, inicia com a adsorção de macromoléculas (proteínas, polissacáridos e ácidos húmicos) e moléculas pequenas (ácidos graxos e lípidos) na superfície. Moléculas adsorvidas formam filmes condicionantes que alteram as propriedades físico-químicas e características da superfície, incluindo hidrofobicidade superficial e carga elétrica. Após o passo de condicionamento da superfície, os microrganismos começam a aderir. A adesão pode dividir-se em duas fases: a reversível e a irreversível. A fase reversível inclui interações de longa distância, tais como eletrostática, hidrofobia, interações e forças de Van der Waals, enquanto na fase irreversível são várias forças de variação (dipolo-dipolo, hidrofóbico, íon-dipolo, íon-íon, ligações covalentes e interação hidrogênio). Os

microrganismos da superfície são bactérias planctônicas. Vale ressaltar que os agregados de células destacadas de biofilmes também podem iniciar o crescimento de biofilme quando preso em superfícies irregulares (COSTERTON *et al.*, 1994). Depois do contato inicial com a superfície, os microrganismos iniciam a produção de fibras finas, que podem ser vistas por microscopia eletrônica. Essas fibras se tornam mais grossas com o tempo, levando à formação das matrizes. A produção de EPS aumenta conforme a adesão das bactérias às superfícies (KUMAR & ANAND, 1998).

A composição dos biofilmes depende de vários fatores, tais como o tipo de microrganismo, o seu estado fisiológico, o ambiente físico e a superfície na qual as células estão aderidas. Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, ambiente onde os microrganismos se multiplicam, seja em cultivo puro ou em associação com outros microrganismos. Assim, os microrganismos tornam-se mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos, utilizados nos procedimentos de higienização (RICHARD *et al.*, 2003; MARQUES, 2005).

As várias fases da interação microbiana parecem requerer a produção de estruturas extracelulares que ajudam na adesão inicial, na manutenção da estrutura do biofilme, e mesmo no desprendimento de agregados (SAUER *et al.*, 2002). Os produtos excretados incluem enzimas, proteínas, bacteriocinas, solutos de baixa massa e ácidos nucleicos liberados devido à lise celular (CERCA & CERCA, 2012). A celulose é um dos principais componentes do biofilme produzido pela *Salmonella*. Além da celulose, a *Salmonella* produz Tafi, finas fimbrias agregativas que facilitam a adesão às superfícies e fornece resistência às células contra forças químicas e mecânicas. A síntese de ambos componentes, celulose e Tafi, é regulada por um sistema complexo, que leva à formação de uma rede altamente hidrofóbica, com células muito compactadas em uma matriz rígida (CERCA & CERCA, 2012).

Em biofilmes mono e multiespécies, a posição das células bacterianas não ocorre aleatoriamente e algumas regras específicas para determinadas espécies e certas classes de pili podem ditar o posicionamento do microorganismo. O volume e a extensão dos biofilmes são totalmente dependentes dos fatores nutricionais e ambientais presentes como pH, temperatura, natureza da superfície (biótico ou abiótica), entre outros. A fixação e formação de biofilme por microrganismos são também influenciadas pelas espécies bacterianas cooperativas e competitivas adjacentes que influenciam o posicionamento celular e a atividade na comunidade (LAPPIN & COSTERTON, 1995).

Quando as células se desprendem dos biofilmes, as células irão preferencialmente se associar com células da mesma espécie onde irão formar agregados. O desprendimento do biofilme depende de fatores como espessura do biofilme, tensão de cisalhamento do fluido, disponibilidade de nutrientes e velocidade (LAPPIN & COSTERTON, 1995).

Não há limites para a variedade de arranjos celulares em biofilmes, e há diversos relatos com várias descrições diferentes de estruturas (LABBATE *et al.*, 2004; KLAUSEN *et al.*, 2003). Pelo menos três tipos de estruturas diferentes já foram descritas até o momento: a estrutura tradicional do biofilme (estrutura plana e homogênea); o modelo homogêneo em mosaico (constituída por microcolônias de bactérias unidas por EPS rodeadas por uma fase líquida); e a forma em cogumelo (estrutura de biofilme semelhante a um cogumelo com vários canais através dos quais passa a fase líquida), sendo essa última a mais citada (BEER *et al.*, 1994; COSTERTON *et al.*, 1995).

Cinco etapas fazem parte da formação do biofilme: 1) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; 2) transporte de células e nutrientes para o local de aderência; 3) início do processo de adesão bacteriana (reversível); 4) crescimento celular, colonização e adesão (irreversível) e 5) biofilme com alta atividade metabólica e liberação de células localizadas na periferia (CHARACKLIS, 1984).

Microrganismos adotam o modo de crescimento em biofilme como uma estratégia de sobrevivência, para resistir contra estresses ambientais e à inativação causada por antimicrobianos e desinfetantes, que são mais eficazes contra células planctônicas (BOURION & CERF, 1996; ZOTTOLA & SASAHARA, 1994). Além disso, a diversidade populacional pode melhorar as chances de sobrevivência de algumas células (HARRISON *et al.*, 2005). Assim, a resistência inerente de bactérias sésseis pode levar a ciclos de crescimento de biofilme mesmo após os procedimentos de limpeza e desinfecção. Além da proteção contra agentes antimicrobianos, as comunidades de biofilmes oferecem maior disponibilidade de nutrientes para o crescimento, aumento da ligação de moléculas de água, reduzindo a possibilidade de desidratação, proximidade com progênie e outras bactérias, facilitando a transferência de plasmídeos (LAPPIN & COSTERTON, 1995).

### 3.7 Bacteriófagos

Bacteriófagos ou fagos são vírus específicos de procariotos. São intracelulares obrigatórios, hospedeiro-específicos, capazes de infectar espécies ou grupos dentro de uma mesma espécie (HAGENS & LOESSNER, 2007). Estima-se que existam em média  $10^{30}$  a  $10^{32}$  fagos para cada célula bacteriana, sendo fundamentais na preservação do equilíbrio em cada ecossistema onde existam bactérias (SULAKVELIDZE, 2011). Os primeiros relatos dos bacteriófagos 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* (ABEDON *et al.*, 2011). 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 terapêuticamente, tratando quatro crianças com disenteria bacteriana. Para cada paciente foi administrada uma dose de “*micróbio invisível e antagonista do Bacillus disenteri*”, fagos anti-disenteria, e em 24 horas os pacientes apresentaram melhora. Outros estudos foram realizados utilizando fagos, nos quais constatou-se sua capacidade em lisar outras bactérias patogênicas, como *S. Typhimurium*, *E. coli*, *Pasteurella multocida*, *V. cholerae*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus species*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria meningitis* (FRUCIANO & BOURNE, 2007). A primeira publicação relatando a eficácia de fagos no tratamento de uma doença infecciosa em humanos foi em 1921, publicado por Richard Bruynoghe e Joseph Maisin, 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 (ABEDON *et al.*, 2011).

Em 1923, D'Herelle junto com bacteriologista George Eliava fundou na Geórgia o o Centro Mundial de Pesquisa em Fagos e Terapia Fágica - IBMV (do inglês *World Centre of Phage Research and Phage Therapy*) em Tbilisi, na Geórgia. Uma década depois, D'Herelle inaugurou em Paris o *Laboratoire du Bacteriophage*, onde eram comercializados cinco coquetéis de bacteriófagos que asseguravam a terapêutica de uma ampla variedade de infecções (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001; FRUCIANE & BOURNE, 2007; ABEDON *et al.*, 2011). A comercialização teve um impacto global, gerando o

interesse de empresas do setor farmacêutico como *Ely Lilly*, *Parke-Davis* e *Abbot* que investiram na sua produção. Infelizmente houve muita controvérsia em torno da ausência de ensaios clínicos que comprovassem a eficácia da fagoterapia, e o forte impacto negativo, juntamente com o início da era dos antibióticos, fez com que o interesse na fagoterapia começasse a decair no Ocidente durante as décadas de 1940 e 1950. Contudo, na União Soviética e no Leste Europeu (Geórgia, Ucrânia, Polônia e Rússia) continuaram as pesquisas com bacteriófagos para controle de infecções bacterianas (SULAKVELIDZE, 2006). O Instituto Eliava desempenhou um papel importante na elaboração de novas preparações biológicas e fabricação de produtos contra quase todas as principais doenças bacterianas e virais, como o Antraz, Rubi, Tuberculose, Brucelose, Salmonelose, Disenteria, etc. (INSTITUTO ELIAVA, 2019). Atualmente o Instituto Eliava conta com o Eliava Phage Therapy Center, o qual oferece terapia a milhares de pacientes com infecções bacterianas multirresistentes e crônicas. A equipe de médicos especialistas trabalha em conjunto com os microbiologistas para fornecer tratamento eficaz utilizando bacteriófagos. Uma opção que as pessoas recorrem devido a infecções altamente resistentes que não responderam à medicina convencional. Por muitos anos esta instituição tem sido uma organização líder em pesquisas com bacteriófagos, preparações com fagos e aplicação prática. Especialistas no mundo todo reconhecem a contribuição dos cientistas do IBMV na produção de preparações diagnósticas, profiláticas e terapêuticas utilizando coquetéis, medicamentos antimicrobianos e imunológicos com bacteriófagos que atuam contra infecções bacterianas e sua aplicação em vários campos na medicina, medicina veterinária e ambiente (ELIAVA, 2019).

### 3.7.1 Classificação dos bacteriófagos

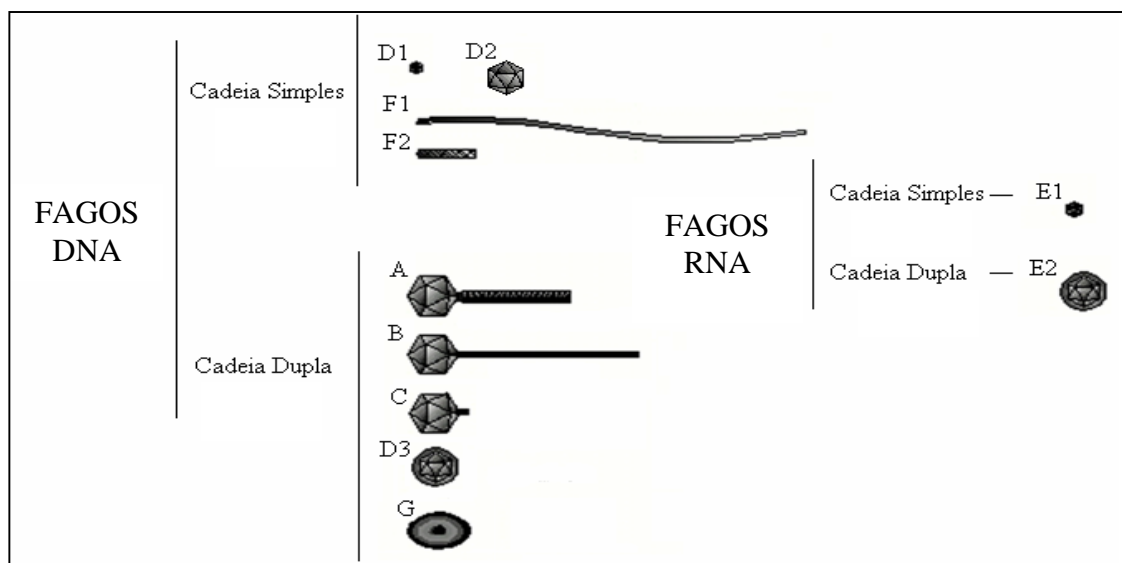
Na natureza, podemos encontrar uma diversidade de fagos, com uma vasta gama de tamanhos, formas, simetrias e estruturas de capsídeo. O genoma pode ser de ácido desoxirribonucléico (DNA), ou de ácido ribonucléico (RNA); cadeia simples (cs) ou de cadeia dupla (cd); e na conformação linear, circular ou superenrolada.

O sistema de classificação de vírus foi desenvolvido em 1971 por David Baltimore, e baseia-se na síntese de RNAm Viral. O sistema agrupa os vírus em sete classes, de acordo com seu genoma DNA ou RNA, modo de replicação e expressão gênica. Os fagos pertencem às classes: I DNA (cd) que fazem a transcrição do mRNA por assimetria, II DNA (cs) da mesma polaridade do mRNA, III RNA (cd) que fazem a



transcrição do mRNA por assimetria e produzem RNAm diretamente e IV RNA(cs) de sentido positivo. A classificação dos fagos é organizada conforme o tipo morfológico e o tipo de ácido nucléico (Figura 1). Os fagos com DNA cadeia dupla, podem ser com cauda contráctil (A), cauda não-contráctil (B), cauda curta (C), sem cauda (D3) e pleomórficos com invólucro lipídico (G). Os fagos de DNA cadeia simples podem ser icosaédricos (D1 e D2) ou filamentosos (F1 e F2). Os do grupo E são icosaédricos com RNA cadeia simples (E1) e dupla (E2) (ACKERMANN, 1998).

Figura 1 - Classificação dos fagos com base na morfologia e ácido nucléico.



Fonte: Ackerman *et al.*, 1992

### 3.7.2 Taxonomia dos bacteriófagos

Atualmente, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses- ICTV*) classifica os fagos em vinte e seis famílias, das quais onze delas, não foi atribuído a ordem a que pertencem. Os fagos também são classificados em quatro subfamílias, sendo que não foram atribuídas famílias ou ordem a que pertence estas subfamílias (Tabela 1). Os fagos com DNA cadeia dupla e com cauda, pertencentes à ordem *Caudovirales*, representam 96% de todos os fagos descritos até hoje e são divididos em quatro famílias: *Ackermannviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae* (ORLOVA, 2012; POPOV, 2021). 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 (CERCA & CERCA, 2012).

Alguns bacteriófagos conhecidos para *Salmonella enterica* são os denominados OX174, pertencentes à família *Microviridae*. Em 1952 Zinder e Lederberg demonstraram a transferência de material genético entre uma *S. Typhimurium* e outra *S. Typhimurium* mutante que envolvia um fago intermediário. Este fago possuía um profago chamado atualmente de P22, sendo utilizado para investigar a genética bacteriana (BYL & KROPINSKI, 2000). O bacteriófago T4, pertencente à família *Myoviridae*, é relacionado ao sorovar *S. Enteritidis* (ABEDON, 2008).

Tabela 1 - Classificação taxonômica dos bacteriófagos

<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>Subfamília</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Acido Nucleico</b>
Belfryvirales	Turriviridae		Envelopado, icosaédrico	L - dsDNA
Caudovirales	Ackermannviridae		Não envelopado, cauda contráril	L - dsDNA
	Myoviridae		Não envelopado, cauda contráril	L - dsDNA
	Siphoviridae		Não envelopado, cauda longa, não contráril	L - dsDNA
	Podoviridae		Não envelopado, cauda curta, não contráril, icosaédrico	L - dsDNA
Halopanivirales	Sphaerolipoviridae		Não envelopado, icosaédrico	L - dsDNA
Haloruvirales	Pleolipoviridae		Envelopado, pleomórfico	C - ssDNA, C - dsDNA, L - dsDNA
Kalamavirales	Tectiviridae		Não envelopado, cauda contrátil, icosaédrico	L - dsDNA
Levivirales	Leviviridae		Não envelopado, icosaédrico	L - ssRNA
Ligamenvirales	Lipothrixviridae		Envelopado, helicoidal	L - dsDNA
	Rudiviridae		Não envelopado, helicoidal	L - dsDNA
Mindivirales	Cystoviridae		Envelopado, esférico	S - dsRNA

Petitvirales	Microviridae	Não envelopado, icosaédrico	C - ssDNA
Tubulavirales	Inoviridae	Não envelopado, filamentoso	C - ssDNA
Vinavirales	Corticoviridae	Não envelopado, icosaédrico	C, T - dsDNA
	Ampullaviridae	Envelopado, pleomórfico	L - dsDNA
	Bicaudaviridae	Não envelopado, pleomórfico	C - dsDNA
	Clavaviridae	Não envelopado, helicoidal	C - dsDNA
	Finnlakeviridae	-	ssDNA
	Fuselloviridae	Não envelopado, pleomórfico	C, T - dsDNA
	Globuloviridae	Envelopado, icosaédrico	L - dsDNA
	Guttaviridae	Não envelopado, ovóide	C - dsDNA
Não atribuído	Plasmaviridae	Envelopado, pleomórfico	C, T - dsDNA
	Portogloboviridae	Envelopado, icosaédrico	C - dsDNA
	Spiraviridae	Não envelopado, helicoidal	C - ssDNA
	Tristromaviridae	Envelopado, helicoidal	L - dsDNA
	Peduovirinae	-	-
	Spounavirinae	Cauda longa, icosaédrico	-
	Não atribuído	Tevenvirinae	-
	Eucampyvirinae	Não envelopado, icosaédrico, cauda contrátil	-

Legenda: C- circular, L- linear, S- segmentado, T- superenrolada, ss- cadeia simples, ds- cadeia dupla, - não descrito.

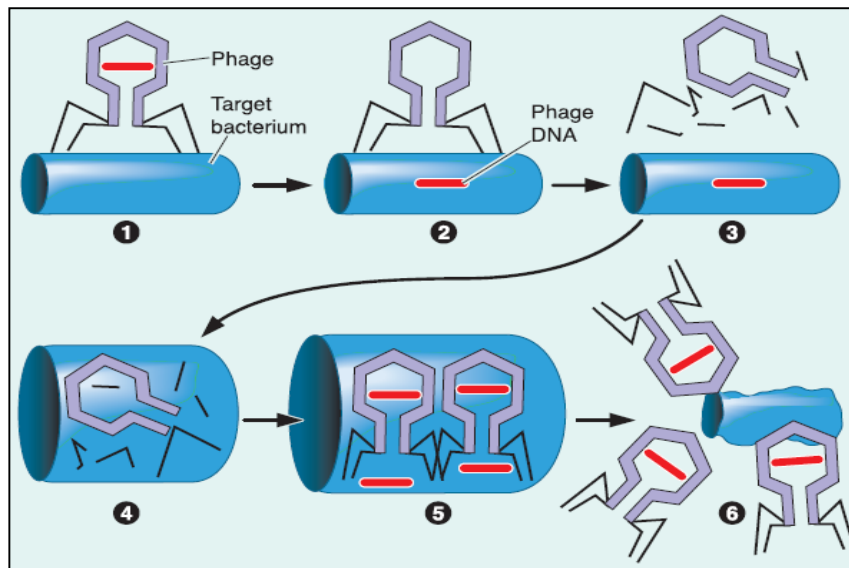
Fonte: Ackermann (2006), Popov (2021)

### 3.7.3 Ciclo de Replicação dos Bacteriófagos

Os fagos, assim como os outros vírus, são parasitas intracelulares obrigatórios e, para replicar eles precisam de um hospedeiro específico. Os fagos possuem dois ciclos de replicação diferentes: lítico (forma virulenta de bacteriófagos) ou lisogênico (também chamado de fago temperado). O contato do fago com uma bactéria hospedeira ocorre através de sua cauda que reconhece os receptores necessários (carboidrato, proteína e moléculas de lipopolissacarídeos e flagelos) que estão presentes na superfície dos hospedeiros. A maioria dos fagos é altamente específica para seus receptores e há pouca ou nenhuma interação com receptores com estruturas diferentes (WELKOS *et al.*, 1974). Os fagos dependem do metabolismo das células hospedeiras, pois não possuem sistemas geradores de ATP e sistemas necessários à síntese das suas próprias proteínas e ácidos nucléicos (TORTORA *et al.*, 2012).

A primeira etapa do ciclo de replicação dos fagos consiste na ligação do fago à célula bacteriana, realizada por uma ligação reversível e mediada pela cauda do fago, onde as fibras se anexam a um receptor específico na superfície celular bacteriana. Normalmente ocorre quase instantaneamente após exposição da célula hospedeira ao fago. Em seguida ocorre 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. Com isso, o fago assume a maquinaria biossintética do hospedeiro e proteínas são sintetizadas. Na próxima etapa, o ácido nucléico e as proteínas estruturais são sintetizadas e novos fagos se acumulam dentro da célula bacteriana. A última etapa é a liberação dos fagos, o que resulta na lise bacteriana, conforme representado na Figura 2. O número de novos fagos produzidos, ou progênie, depende da espécie e das condições. Cada fago é capaz de produzir em média 50 a 200 novos fagos por ciclo lítico (CARLTON, 1999).

Figura 2- Etapas de replicação dos bacteriófagos



Fonte: Sulakvelidze, 2011

### 3.7.3.1 Ciclo de replicação lítico

O ciclo lítico é a reprodução da virulência dos bacteriófagos e ocorre dentro do hospedeiro induzindo à lise das células bacterianas, o que resulta na liberação de uma nova progênie de bacteriófagos, recomeçando, assim, um novo ciclo de infecção (Figura 3). 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 (MAYER, 2016). Após a lise da bactéria hospedeira, os novos fagos saem das células bacterianas expressando duas proteínas, a holina e a endolisina (SHI *et al.*, 2012; FAN *et al.*, 2016). A holina é responsável por criar um poro na membrana citoplasmática, permitindo que a endolisina passe e interaja com a matriz de peptidoglicano resultando em lise celular (LOESSNER, 2005; FISCHETTI, 2010). A endolisina, quando clonada e purificada, tem ação antimicrobiana e seu uso se torna outra possibilidade para atuação dos fagos (DONOVAN *et al.*, 2006). Infecção fágica de ciclo lítico, resulta em halos claros e lípidos quando testadas em placas de petri, contendo bactérias hospedeiras suscetíveis.

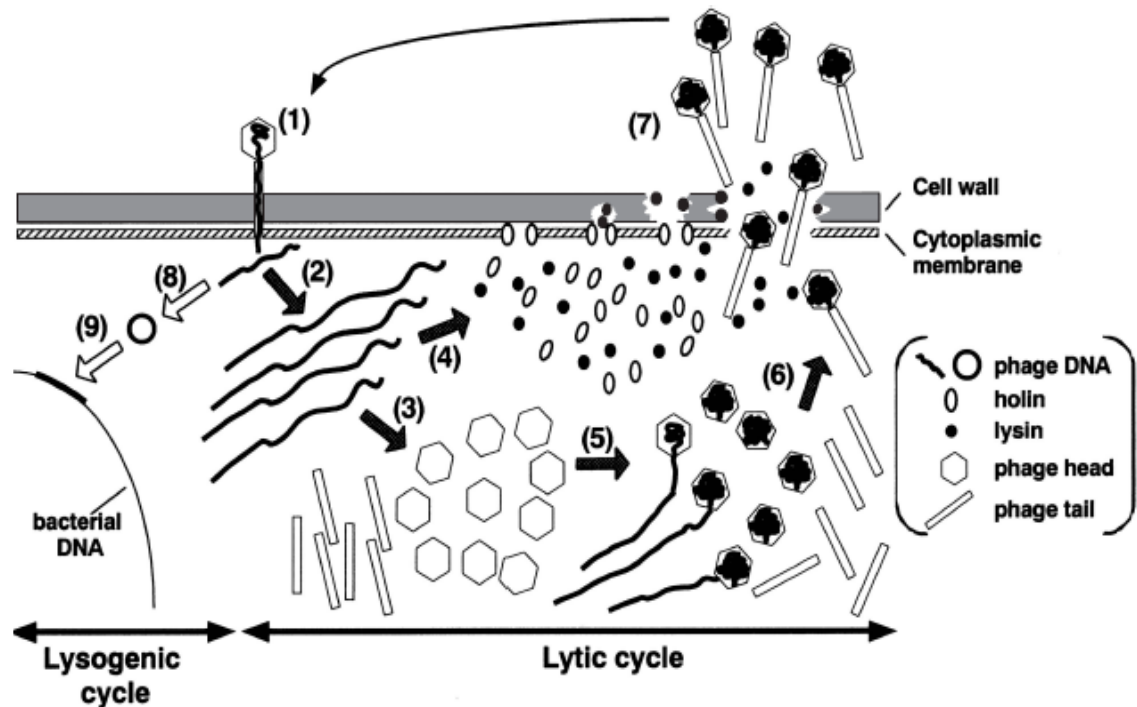
A lise das células bacterianas faz com que esses fagos sejam uma alternativa terapêutica viável para as infecções bacterianas, pois a dose inicial é suficiente para

atingir a eficácia terapêutica, ao contrário dos antimicrobianos que necessitam de repetidas doses para que sejam mantidas as concentrações adequadas (ABEDON & ABEDON, 2010; LOC-CARRILLO & ABEDON, 2011; SULAKVELIDZE, 2006; VANDAMME, 2013). Além disso, os fagos têm demonstrado ser eficazes no combate à formação de biofilmes e em biofilmes pré-formados, diferentemente dos antimicrobianos e sanitizantes que muitas vezes são ineficazes devido à impossibilidade de atuarem nas células sésseis que estão embebidas por EPS (ABEDON *et al.*, 2011).

### 3.7.3.2 Ciclo de replicação lisogênico

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 (Figura 3). Ao replicar-se, a bactéria replica o prófago para as células filhas, evento chamado de lisogenia. Fagos lisogênicos formam halos turvos quando testados em placas de petri contendo bactérias hospedeiras susceptíveis. Quando uma cepa é lisogenizada com um fago, ela se torna resistente à infecção por outros fagos relacionados que compartilham o mesmo perfil (CAMPBELL, 1996). O ciclo lisogênico, 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, causando a formação da progênie lítica por indução espontânea. Estes mutantes virulentos nem sempre são distinguidos de fagos líticos e não respondem à presença de um receptor celular específico (KRYLOV, 2001; MAYER, 2016; GOLDING, 2011). Quando o material genético persiste no cromossomo bacteriano, é chamado de profago, e pode conferir novas funções aos seus hospedeiros, como resultado da transferência horizontal de genes por meio da transdução. Porém, o papel dos fagos na disseminação de genes de resistência a antimicrobianos entre hospedeiros bacterianos, ainda não foi claramente resolvido e deve ser considerado ao projetar estratégias para enfrentar este problema (LEKUNBERRI *et al.*, 2017).

Figura 3 - Ciclos de replicação dos bacteriófagos



Legenda: (1) adsorção e injeção de DNA; (2) replicação DNA; (3) produção de cabeça e cauda; (4) síntese de holina e endolisina; (5) empacotamento de DNA; (6) montagem; (7) rompimento da parede celular e liberação da progênie; (8) circularização do DNA do fago; (9) integração de o DNA do fago no genoma do hospedeiro.

Fonte: Matsuzaki *et al.*, 2005

### 3.7.4 Controle biológico utilizando bacteriófagos

Antes do surgimento dos antimicrobianos, alguns pesquisadores sugeriram que as infecções bacterianas poderiam ser prevenidas ou tratadas com a administração de fagos. Entretanto, com a descoberta dos antimicrobiais e quimioterápicos, a terapia fágica acabou sendo utilizada apenas em estudos de virologia ou para o monitoramento e identificação de microrganismos (MANDILARA *et al.*, 2006). Com o crescente aumento da resistência bacteriana a agentes antimicrobianos, a terapia fágica se tornou uma possível alternativa biológica para combater bactérias patogênicas. Além disso, com o declínio no desenvolvimento de antimicrobianos, em meio à emergência de bactérias resistentes a múltiplas substâncias, aumentou o interesse em desenvolver novos agentes antibacterianos, incluindo as aplicações utilizando bacteriófagos (SULAKVELIDZE, 2011).

Fagos são considerados agentes terapêuticos potencialmente atraentes devido às diversas características que possuem, como serem extremamente hospedeiro-específicos, eficazes na lise de bactérias patogênicas, capacidade de auto-replicação no local da infecção, não prejudiciais para o homem e os animais, e rapidamente modificáveis para combater o aparecimento de novas ameaças bacterianas, assim como não apresentarem nenhum efeito colateral conhecido. Além disso, os fagos apenas se replicam em células bacterianas específicas, não destruindo a microbiota adjacente. Sua produção é simples, barata e ecologicamente correta (SULAKVELIDZE *et al.*, 2001). Apesar de a especificidade dos bacteriófagos ser frequentemente considerada uma desvantagem, esta característica pode ser vantajosa em diversas situações. As bactérias resistentes a determinado fago permanecem susceptíveis aos demais que possuam um espectro semelhante, contrariamente ao que sucede com os antimicrobianos, cuja resistência abrange todas as substâncias pertencentes à mesma classe (HANLON, 2007; VANDAMME, 2013; LU & KOERIS, 2011; LOC-CARRILLO & ABEDON, 2011).

Os bacteriófagos também têm se mostrado eficazes no tratamento de infecções com pouca irrigação sanguínea ou com formação de biofilmes, situações em que os antimicrobianos são ineficazes devido à impossibilidade de acessarem o local da infecção. Além disso, constituem ainda uma alternativa em situações de alergias que contra-indicam o uso de determinada substância (ABEDON *et al.*, 2011).

Estudos recentes indicam que um número de fagos de  $10^2$ - $10^3$  unidades formadoras de placas (UFP) é suficiente para iniciar a replicação fágica e desencadear ação terapêutica, em  $10^6$ - $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (RHOADS *et al.*, 2009; WRIGHT *et al.*, 2009; PARRACHO *et al.*, 2012).

A fagoterapia tem sido testada com êxito no tratamento experimental de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em ratos, com o propósito de avaliar seu potencial para tratamento em humanos, mostrando que a fagoterapia pode ser eficaz contra infecções causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos (SOOTHILL, 1992). Em estudo realizado contra *Vibrio vulnificus*, que contamina crustáceos como ostras e que podem causar infecção alimentar em humanos, a fagoterapia mostrou-se eficaz tanto para infecções localizadas quanto sistêmicas (CERVENY *et al.*, 2002).

A terapia fágica contra os sorovares *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium*, proporcionou uma redução de 4  $\log_{10}$  na contagem bacteriana, quando comparado aos controles não tratados (SHARMA *et al.*, 2015). Em outro estudo, utilizou-



se o bacteriófago P22 em ovos líquidos, bebidas energéticas, leite desnatado, suco de maçã e peito de frango, inoculados com *S. Typhimurium*. Também foi verificado diminuição de  $2 \log_{10}$  na contaminação, quando comparados aos controles não tratados. Os resultados indicaram que os fagos podem ser utilizados no controle de agentes patogênicos de origem alimentar (ZINNO *et al.*, 2014).

Já estão disponíveis produtos à base de bacteriófagos comercializados que são utilizados na medicina veterinária, em alimentos e na agricultura. Na área veterinária, esses produtos demonstraram até 100% de eficácia contra patógenos bacterianos e são administrados em bovinos, aves, suínos, e na piscicultura. Além disso, esses produtos são usados no controle biológico e podem reduzir com segurança a contaminação bacteriana dos alimentos. Na medicina humana já são comercializados diferentes produtos à base de fagos, os quais podem ser administrados por via oral (comprimidos e tablets), spray e via intravenosa.

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*US Department of Agriculture - USDA*), autorizou o uso do BacWash TM, produto que tem o objetivo de combater *Salmonella* e *E. coli* O157: H7 que foi especialmente criado para ser usado em animais antes do abate, podendo ser aplicado como uma lavagem, aspersão, ou pulverizado diretamente no animal vivo. A Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency – EPA*) aprovou em 2005 um produto AgriPhage TM para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria e *Pseudomonas syringae* pv. em tomates e pimentas, entre outras culturas. Este produto pode ser aplicado às culturas por diferentes meios, tais como a irrigação por gotejamento ou equipamento de pulverização aérea e tende a diminuir a concentração bacteriana. Também pode ser utilizado em fazendas na pré-colheita.

No Brasil, existem dois produtos bioprotetores, o PhageGuard Listex e PhageGuard S, ambos à base de bacteriófagos líticos, utilizados no combate a *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp, respectivamente. Sua aplicação pode ser realizada diretamente no alimento, no ambiente de fabricação, em superfícies de contato, nos pisos e drenos (SACOO, 2017). Porém, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) ainda não autorizou a utilização diretamente em alimentos, somente no ambiente de processamento, diferente do que já ocorre há anos nos EUA e na União Europeia. Recentemente foi lançado o Fagolac®, produto em pó à base de bacteriófagos líticos para controle de bactérias patogênicas causadoras de diarreia em bezerros, através da administração via alimento (BAYER, 2018).

Em agosto de 2017 o governo brasileiro publicou a Instrução Normativa nº 30 de 9 de agosto de 2017, que estabelece procedimentos para submissão de propostas, avaliação, validação e implementações de inovações tecnológicas a serem empregadas em qualquer etapa da fabricação de produtos de origem animal em estabelecimentos registrados (BRASIL, 2017). Esta medida foi tomada após algumas exportações brasileiras retornam ao país ou após o embargo em função de contaminação por microrganismos como a *Salmonella*. Com isso, abre-se a possibilidade de aplicação de bacteriófagos na indústria de alimentos.

### 3.7.5 Benefícios e limitações da terapia fágica

Alguns benefícios da terapia fágica frente os antimicrobianos são: (a) os bacteriófagos são específicos para uma determinada espécie ou sorovar bacteriano, dependendo do tipo de receptor que ele reconheça; (b) fagos são os “predadores naturais” das bactérias; (c) a comunidade bacteriana está exposta constantemente a estas entidades biológicas; (d) são ubíquos e abundantes na natureza e no planeta; (e) são facilmente isolados de diferentes materiais e amostras; (f) apresentam elevada permeabilidade tecidual, ótimos para uso tópico, possuindo boa penetração cutânea, atingindo camadas mais profundas da pele onde possam existir feridas profundas e crônicas; (g) podem ser aplicados no tratamento de bactérias patogênicas, sem afetar a microbiota comensal, evitando-se infecções secundárias; (h) não afetam células eucarióticas, pois não possuem afinidade para elas; (i) apresentam um crescimento exponencial e replicam-se no interior da bactéria e, desta forma, acumulam-se em elevadas concentrações no local de infecção; (j) tornam-se desnecessárias administrações sucessivas de preparações fágicas, pois enquanto a bactéria alvo estiver presente, o fago encontra-se em constante replicação, até que a porcentagem bacteriana baixe para um valor que não apresente perigo para o organismo em questão, sendo eliminados posteriormente pelo organismo; (k) revelam elevada capacidade de penetração em biofilmes bacterianos; (l) podem sofrer mutações e superar a resistência bacteriana; (m) o processo de isolamento de novos fagos é considerado barato e simples, quando comparado ao processo de desenvolvimento de novos antibióticos; (n) podem ser uma alternativa terapêutica segura para doentes alérgicos aos antibióticos e (o) o tratamento pode ser eficaz utilizando pequenas concentrações de fagos (PINTO, 2013; SULAKVELIDZE *et al.*, 2001; WEBER-DABROWSKA *et al.*, 2003; MATSUZAKI *et al.*, 2005; SKURNIK E STRAUCH, 2006;

HERMOSO *et al.*, 2007; ABHILASH *et al.*, 2009; O'FLAHERTY *et al.*, 2009; HAGENS E LOESSNER, 2010; KUTTER *et al.*, 2010).

Entretanto, a terapia fágica também pode apresentar algumas limitações, tais como: a) é necessário identificar o agente infeccioso e, posteriormente, isolar o seu fago específico; b) os bacteriófagos ao serem administrados por via sistêmica desencadeiam uma resposta imune, levando à produção de anticorpos, o que pode reduzir a eficácia do tratamento; c) na terapia fágica só podem ser utilizados fagos exclusivamente líticos, não sendo indicado a utilização de fagos temperados ou lisogênicos, o que reduz o número de fagos disponíveis para a terapia fágica (HERMOSO *et al.*, 2007; O'FLAHERTY *et al.*, 2009; PARRACHO *et al.*, 2012; CHAN E ABEDON, 2012). Além disso, pode ocorrer resistência bacteriana aos bacteriófagos, sendo que esses mecanismos de resistência estão geralmente associados à anulação do processo de adsorção fágica, através de mutações que geralmente conduzem à perda dos receptores específicos que permitem a ligação entre o fago e a bactéria, e também podem induzir a produção de camadas ricas em mucilagens que revestem toda a superfície bacteriana, impedindo o contato do fago com o seu respectivo receptor. A bactéria também pode adquirir resistência através de fagos lisogênicos que contêm no seu material genético sequências que codificam resistências bacterianas ou toxinas que, após a integração no genoma da bactéria, passa a adquirir a referida resistência. Além destes mecanismos, as bactérias podem hidrolisar o material genético do fago através de endonucleases de restrição presentes no citoplasma e podem metilar o seu próprio DNA, funcionando como mecanismo de defesa aos fagos. A resistência pode ser também causada por mutações em genes, que codificam proteínas essenciais para a replicação fágica ou indispensáveis na montagem da progênie. Entretanto, a resistência bacteriana nem sempre é favorável para a bactéria, pois muitas vezes, a resistência pode reduzir a “performance” da bactéria, ou, se o receptor específico for um fator de virulência, a mutação pode provocar uma redução drástica da sua virulência (PINTO, 2013; LEVIN E BULL, 2004; SKURNIK E STRAUCH, 2006).

### 3.7.6 Controle biológico de biofilmes utilizando bacteriófagos

O fato de o processo de replicação dos bacteriófagos poder culminar na lise das células bacterianas faz com que eles representem uma alternativa terapêutica viável para a prevenção e o controle de biofilmes (SULAKVELIDZE, 2006). A principal limitação dos tratamentos utilizando fagos é a capacidade de acessar células bacterianas dentro do

biofilme para se conectar aos receptores específicos que estão localizados na superfície celular das bactérias, pois somente após isso a infecção e a replicação são iniciadas. Essa limitação existe devido à presença de EPS que atua como um obstáculo físico para o fago. Além disso, a difusão através do biofilme pode ser influenciada pela morfologia do fago assim como pela densidade do biofilme. A difusão dos fagos através de biofilmes densos é mais difícil do que através de biofilmes menos densos. Da mesma forma, os biofilmes que possuem canais de água maiores, são mais propensos ao ataque de fagos do que as estruturas mais densas (HU *et al.*, 2010).

No entanto, alguns fagos possuem exopolissacarídeo despolimerases (PIRES *et al.*, 2016), e a presença desta enzima aumenta a invasão de fagos e o processo de dispersão através do biofilme (PARASION *et al.*, 2014). As endolisinas e hidrolases presentes nos fagos também já foram avaliadas como agentes de remoção de biofilme por possibilitar a penetração nos biofilmes e atacar os proteoglicanos presentes nas células bacterianas (SHEN *et al.*, 2013; GUTIÉRREZ *et al.*, 2014). Possíveis falhas na infecção por fagos podem ser causadas pela presença de enzimas proteolíticas na matriz do biofilme, no entanto este é um parâmetro que depende do hospedeiro, pois irá refletir em diferentes componentes da matriz do biofilme (DOOLITTLE *et al.*, 1996). Embora a presença de enzimas exopolissacarídeo despolimerase tenha sido relatada em fagos, essa característica não é comumente observada em todos os fagos isolados.

A dificuldade em isolar os fagos que possuem enzimas degradadoras de EPS levou à reconstrução de fagos, como o T7 (LU & COLLINS, 2007). O fago T7 foi produzido especificamente para expressar uma enzima de degradação do biofilme, uma vez que o fago começa a infectar e reproduzir partículas filhas dentro de um hospedeiro. Outra estratégia estudada e comprovada para reduzir a formação de biofilme por *Staphylococcus epidermidis* é o pré-tratamento de superfícies de cateteres com fagos (CURTIN & DONLAN, 2006). Segundo Sillankorva & Azeredo (2014), as células que ficam nas camadas mais profundas do biofilme e sob baixas condições de nutrientes e oxigênio reduzem a ação do fago, sendo uma das principais razões pelas quais os fagos replicam mais nas células planctônicas em comparação às células sésseis. A fim de melhorar o controle biológico com uso de bacteriófagos, podem ser utilizadas formulações com fagos distintos, na forma de coquetéis, ou seu uso associado a antimicrobianos e outros agentes bactericidas (CHAN *et al.*, 2013). Embora apenas fagos líticos sejam utilizados para fins terapêuticos, os lisogênicos também podem ser explorados para transferir genes para tornar a bactéria mais suscetível a outros fatores como antimicrobianos (LU & COLLINS,

2009). Os fagos lisogênicos podem ser explorados para o controle, detecção e tipificação de bactérias, como veículos para carreamento de antimicrobianos e desenvolvimento de vacinas (SANTOS *et al.*, 2018).

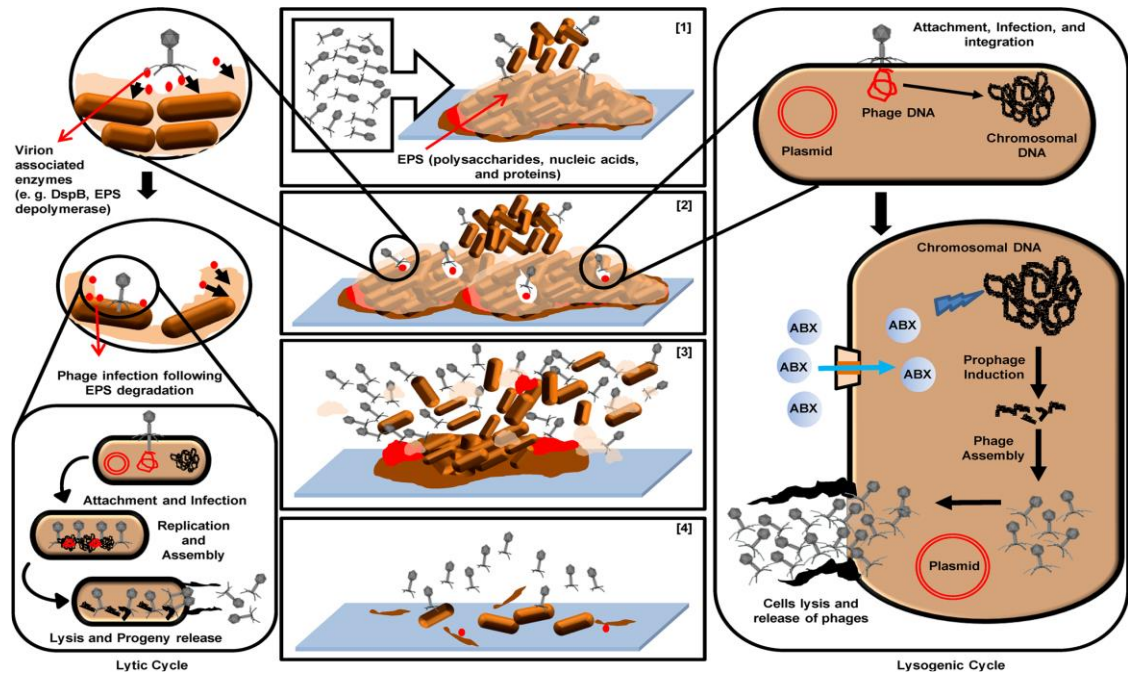
A especificidade dos receptores na superfície da célula bacteriana determina a gama de organismos hospedeiros que os fagos irão infectar, reduzindo os danos à comunidade microbiana em geral (MODI *et al.*, 2014). Esta especificidade confere uma série de vantagens quando comparados aos antibióticos que afetam toda a comunidade microbiana (CHIBANI-CHENNOUFI *et al.*, 2004). Os bacteriófagos se multiplicam no local da infecção somente quando os hospedeiros bacterianos estão presentes, portanto a propagação de fagos depende da presença de seu hospedeiro, o que confere propriedades auto-limitante e de auto-dosagem (KUTTER, 2005).

Em estudo recente, Olsen *et al.*, (2018) descobriu que o polissacarídeo despolimerase DA7 e a endolisina LysK purificada são agentes potente contra biofilmes de cepas de *Staphylococcus aureus* em condições estáticas e de crescimento, e em combinação, as duas enzimas mostraram efeitos sinérgicos na erradicação do biofilme.

Além disso, a terapia com fagos pode ser um método bem-sucedido para usar contra o biofilme, pois alguns são capazes de sintetizar enzimas capazes de degradar o EPS, mesmo antes de começarem a interagir com seus hospedeiros (WITTEBOLE *et al.*, 2014). Na Figura 4 é possível observar o processo de controle de biofilme através de utilização de bacteriófagos. O processo do biocontrole dos biofilmes inclui a aplicação de fagos no biofilme, iniciando com a ruptura do EPS do biofilme através de enzimas associadas aos fagos, tais como dispersina B (DspB) ou EPS despolimerases, logo em seguida ocorre o rompimento do EPS e por fim a desintegração de biofilme e lise das células bacterianas (MOTLAGH, *et al.*, 2016).

Embora a relação fago-biofilme tenha sido onipresente ao longo da história em diversos ambientes, a maioria das pesquisas foram conduzidas em culturas líquidas, e, portanto, a coevolução e interação entre fagos e hospedeiros em biofilmes é pouco estudada. Mas a compreensão da natureza do fago, predação e importância para a genética e a diversidade de utilização como tratamentos extrema importância (HANSEN *et al.*, 2019).

Figura 4 – Controle de biofilme utilizando bacteriófagos



Legenda: ABX: antibióticos.

Fonte: Motlagh, 2016

Alguns estudos mostram reduções significativas nos biofilmes mono e multiespécies após uso de bacteriófagos. Porém, a erradicação completa é quase impossível (LEHMAN & DONLAN, 2015; GUTIÉRREZ *et al.*, 2015; GONG & JIANG, 2017). Muitos estudos são necessários para entender melhor a interação entre os fagos e os biofilmes, uma vez que sua limitação já foi relatada (PIRES *et al.*, 2017).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização dos experimentos

O projeto foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo (UPF).

### 4.2 Cepas de *Salmonella enterica*

#### 4.2.1 Caracterização das cepas

Foram selecionadas cepas de *Salmonella* previamente isoladas de matadouros-frigoríficos no Rio Grande do Sul e confirmadas geneticamente: *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzengrund*, *S. Tennessee*, *S. Heidelberg* e as cepas padrão de *S. Enteritidis* (ATCC 13076) e *S. Typhimurium* (ATCC 14028). As cepas foram previamente avaliadas quanto à resistência a antimicrobianos e à presença de genes de virulência (SANTOS, 2015; BORGES *et al.*, 2019; WEBBER, 2018), conforme descrito na Tabela 2. As cepas estavam armazenadas em caldo infusão cérebro e coração (BHI) suplementado com 20% de glicerol, conservadas a - 20 °C. Todas as cepas foram reativadas para verificação da pureza, utilizando meio de enriquecimento não seletivo (BHI - Oxoid®), seguido da inoculação em caldo Rappaport Vassiliadis (RV - Merck®), plaqueadas em Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD - Merck®) e incubadas a 37±1°C. Depois de 24 horas, foi observado o padrão de colônias para avaliar se eram compatíveis com *Salmonella* spp., seguido da confirmação bioquímica e sorológica.

O perfil de suscetibilidade antimicrobiana das amostras foi previamente determinado por (Borges *et al.*, 2019 e Webber, 2018) para os seguintes antimicrobianos: sulfonamida (SSS), cloranfenicol (CHL), gentamicina (GEN), tetraciclina (TET), ampicilina (AMP), enrofloxacina (ENR), ceftazidima (CAZ), aztreonam (ATM), amoxicilina + ác.clavulânico (AMC), cefotaxima (CTX), amoxicilina (AMX), ceftiofur (TIO), ciprofloxacina (CIP), espectinomicina (SPT), sulfafurazole (SOX), sulfa +

trimetoprim (SXT), estreptomicina (STR). Para a amostra de *Salmonella* Heidelberg, os princípios ativos testados foram: sulfazotrin (SUL), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), cefoxitina (FOX), ceftriaxona (CRO), estreptomicina (STR), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TET), imipenem (IMP) e cefazolina (CZO), conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Características das cepas de *Salmonella* quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos

<b>Sorovar</b>	<b>Perfil de resistência aos Antimicrobianos</b>
<i>S. Brandenburg</i>	SSS
<i>S. Anatum</i>	SOX, SSS
<i>S. Tennessee</i>	STR, SOX, TET, SXT, GEN, CAZ, ATM, AMC, CTX
<i>S. Agona</i>	SOX, SSS, ENR
<i>S. Bredeney</i>	SPT, SOX, SXT, CHL, SSS
<i>S. Schwarzengrund</i>	EST, SOX, SXT, CHL, SSS
<i>S. Infantis</i>	EST, SOX, SXT, CHL, SSS, GEN, ENR, CAZ, ATM, AMC, CTX
<i>S. Rissen</i>	SSS
<i>S. Lexington</i>	SSS
<i>S. Panama</i>	SSS, ATM, AMC, CTX
<i>S. Heidelberg</i>	SUL, AMP, FOX, STR, CRO, CIP, TET, CZO
SE ATCC 13076	NA
ST ATCC 14028	NA

Legenda: NA: não avaliado; S: Sensível a todos os princípios ativos.

Assim como neste estudo, outros pesquisadores corroboram com os achados de multirresistência, e sugerem que a resistência a apenas um antimicrobiano não é a grande preocupação, mas estudos têm relatado um aumento na taxa de patógenos multirresistentes (LERTWORAPREECHA *et al.*, 2013).



A detecção de genes relacionados à virulência e patogenicidade foram previamente realizados por Santos (2015), Borges *et al.* (2019) e Webber (2018), conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Características das cepas de *Salmonella* quanto aos genes de virulência

Sorovar	Genes de virulência									
	Invasão celular		Fímbrias			Proteínas efetoras			Plasmídeo	Biofilme
	invA	HilA	sefA	ipfA	agfA	avrA	sopE	sivH	spvC	spiA
Brandenburg	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
Anatum	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Tennessee	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Agona	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Bredeney	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Schwarzemgrund	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Infantis	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Rissen	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Panama	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Heidelberg	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
SE ATCC	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
ST ATCC	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Legenda: + possui o gene de virulência; - não possui o gene de virulência; NR: não realizado

Os fatores de virulência são codificados por uma série de genes, e podem estar localizados no próprio cromossomo da bactéria, como podem estar presentes nas chamadas Ilhas de Patogenicidade, ou em elementos genéticos móveis e, quando presentes e expressados, podem conferir vantagens à bactéria (GROISMAN & OCHMAN, 1996; MARCUS *et al.*, 2000; VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005). A descrição dos genes associados a virulência, nome, gene e a respectiva função estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Pesquisa de genes associados à virulência e à patogenicidade

Nome	Gene	Função
Invasiva	<i>invA</i>	- componente da estrutura dos TTSS - reconhecimento do hospedeiro e invasão - internalização da bactéria para invasão de células epiteliais
Hiperinvasiva	<i>hilA</i>	- reconhecimento do hospedeiro e invasão - regulação dos componentes do TTSS
Fímbria de <i>S. Enteritidis</i>	<i>sefA</i>	- melhor interação entre bactéria e macrófagos - atuação em conjunto com outras fímbrias
Fímbria Longa Polar	<i>lpfA</i>	-favorece o tropismo pelas Placas de Peyer - adesão às células M do intestino - confere imunidade cruzada entre sorovares
Fímbria Agregativa	<i>agfA</i>	-autoagregação (maior sobrevivência) - interação entre <i>Salmonella</i> e o intestino - formação de biofilmes
Avirulência	<i>avrA</i>	- indução da apoptose celular - inibe produção de IL-8 e TNF- $\alpha$ - proteína efetora dos TTSS
Proteína de membrana externa de <i>Salmonella</i>	<i>sopE</i>	- proteína efetora dos TTSS - deformação da membrana plasmática e citoesqueleto da célula do hospedeiro
Homólogos invasiva de <i>Salmonella</i>	<i>sivH</i>	- colonização das Placas de Peyer - proteína efetora dos TTSS
Plasmídeo	<i>spvC</i>	-favorecer a manutenção da bactéria no interior da célula do hospedeiro - auxiliar no início do processo de infecção
Proteína secreção da membrana externa	<i>spiA</i>	-sobrevivência no interior do macrófago - participação na formação de biofilmes

Fonte: COLLINSON *et al.*, 1992; BÄUMLER & HEFFRON, 1995; SWAMY *et al.*, 1996; GUO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002; SKYBERG *et al.*, 2006; PETERSON *et al.*, 2010; BARMAN *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2013.

#### 4.2.2 Pesquisa de presença de prófago nas cepas de *Salmonella*

Toda as cepas, incluindo as cepas padrão, foram testadas para a presença de prófago no seu DNA para não resultar em falso positivo para presença de bacteriófagos. Para o preparo dos inóculos, uma alíquota de cultura bacteriana foi transferida para caldo tripton de soja (*Trypticase Soy Broth* - TSB) sem glicose (Oxoid®), e incubada a 36°C ± 1°C por 18 a 24 horas. Após foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos® 2010) a 600 nm, onde o valor da densidade óptica foi de aproximadamente 0.400.

Para verificar a presença de profago, foram produzidas placas de petri contendo uma fina camada de ágar tripton de soja (*Trypticase Soy Agar* – TSA, Difco®) e uma sobrecamada contendo 5 mL de meio semi-sólido composto por 94% de caldo tripton de soja (Difco®) e 0,6% de ágar-ágar onde foram inoculados 100 µL de cada solução bacteriana, separadamente. Após, utilizando-se a técnica de microgotas, foram adicionadas 10 gotas de 10 µL do mesmo inóculo bacteriano utilizado na sobre camada. As placas foram incubadas invertidas por 24 h a 36 °C ± 1°C e posteriormente avaliadas. (SILLANKORVA *et al.*, 2008).

Nenhuma das cepas avaliadas e apresentou áreas de lise. Este estudo indica que as cepas não possuem prófagos, sendo possível utilizá-las nos experimentos.

### 4.3 Bacteriófagos

Foram utilizados sete bacteriófagos previamente isolados por Pottker (2016), conforme método proposto por Sillankorva *et al.* (2008). Os bacteriófagos estão descritos na Tabela 5. 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 Sillankorva *et al.* (2008), com modificações.

Os bacteriófagos foram caracterizados de acordo com Kropinski *et al.* (2011), seguindo protocolos que envolvem genômica, proteômica e sequenciamento. Dos sete fagos utilizados, dois deles já haviam sido seqüenciados, sendo ambos, novos fagos. O fago *Salmonella Phage* UPF\_BP1 possui genoma circular, DNA fita dupla, com 39.902 pares de base, pertence à ordem *Caudovirales* e à família *Podoviridae* Tipo 3, e foi registrado no *GenBank* sob o número KX776161.1. O fago *Salmonella Phage* UPF\_BP2 possui genoma circular, DNA fita dupla, com 54.894 pares de base, pertence à ordem

*Caudovirales* e à família *Myoviridae* Tipo 1 Grupo 7, e foi registrado no *GenBank* sob o número KX826077.1.

Tabela 5 – Informações dos fagos utilizados

<b>Fago</b>	<b>Hospedeira</b>	<b>Fonte do isolamento</b>	<b>Registro GenBank</b>
UPF_BP1	<i>Salmonella</i> Brandenburg	efluente	KX 776161.1
UPF_BP2	<i>Salmonella</i> Bredeney	efluente	KX 826077.1
UPF_BP3	<i>Salmonella</i> Enteritidis	fezes	-
UPF_BP4	<i>Salmonella</i> Infantis	efluente	-
UPF_BP5	<i>Salmonella</i> Rissen	fezes	-
UPF_BP6	<i>Salmonella</i> Rissen	efluente	-
10:2	<i>Salmonella</i> Panama	efluente	-

Para realização dos experimentos, foi preparada uma solução estoque de cada fago. Esta solução foi armazenada a 4 °C durante todo o período do experimento.

#### 4.3.1 Amplificação, concentração e purificação dos bacteriófagos

Os bacteriófagos foram amplificados utilizando-se as respectivas bactérias hospedeiras, inoculadas em caldo TSB em concentração dupla. Em uma solução contendo 5 mL de TSB, foram inoculados 2 mL da bactéria hospedeira a uma concentração de  $10^7$  UFC/mL e adicionado 1 mL do fago ( $10^9$  UFP/mL), sendo posteriormente incubado por 24 horas a  $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Após esse período, a solução foi centrifugada sob refrigeração a 8000 rpm por 5 a 10 minutos e filtrada em seringa com filtros de  $0,22\mu\text{m}$ . Após a filtração, foi adicionado 0,584g de NaCl para cada 10 mL do fago. Em seguida foi feita a incubação a  $4\text{ °C}$  por 1 h. Após foi feita a centrifugação a  $4\text{ °C}$  em 9.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e adicionado polietilenoglicol - PEG 8000 (1%). O material foi incubado a  $4\text{ °C}$ , *overnight*. Após, foi centrifugado por 10 min a  $4\text{ °C}$  a 9000 rpm. O *pellet* foi ressuscitado com 5mL de TSB e foi adicionado clorofórmio na proporção 1:5 (v/v) e foi feita a agitação em vórtex por 1 minuto. Após, o material foi centrifugado por 15 min a  $4\text{ °C}$  a 3000 rpm, e o sobrenadante foi transferido para frascos estéreis e armazenados a  $4\text{ °C}$ , conforme protocolo de Andreatti Filho (2007) e Sillankorva *et al.* (2008), com adaptações.

#### 4.3.2 Titulação dos bacteriófagos

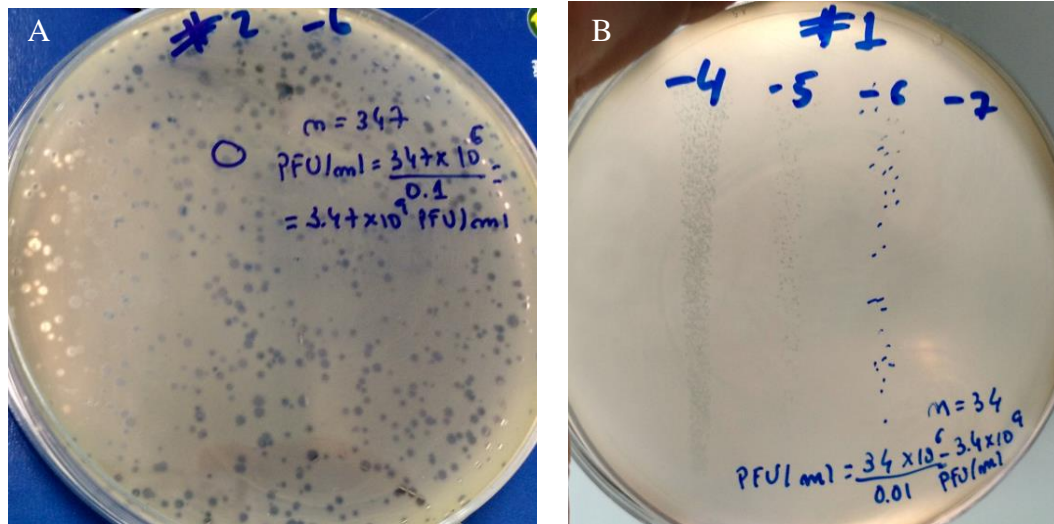
Os bacteriófagos foram titulados a partir da solução estoque. Inicialmente foi realizada a diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) em microtubos contendo 900  $\mu\text{L}$  de Solução salina (0,9%). Após, os microtubos ficaram em repouso por 15 a 30 minutos para pré-adsorção dos fagos. Adicionalmente placas de petri foram preparadas com uma fina camada de ágar TSA, onde foi inoculada a bactéria hospedeira do fago. A partir desta etapa a contagem foi realizada de através de duas técnicas, conforme demonstrado na Figura 5. Na primeira metodologia, a bactéria hospedeira foi previamente cultivada a  $36^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24h. Após esse tempo, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos<sup>®</sup> 2010) a 600 nm, onde o valor da densidade óptica foi de aproximadamente 0.400. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da bactéria hospedeira sobre a placa de petri juntamente com 100  $\mu\text{L}$  do fago, verteu-se 5 mL de ágar semissólido e foram realizados movimentos de “oito” para homogeneização. Após a secagem do ágar a placa foi incubada invertida a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 h. (Sillankorva *et al.*, 2008). Realizou-se a contagem de halos ou placas fágicas para determinar a titulação de acordo com a Equação 1. Na segunda placa a bactéria hospedeira foi previamente cultivada a  $36^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24h, após esse tempo, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos<sup>®</sup> 2010) a 600 nm, onde o valor da densidade óptica foi de aproximadamente 0.400. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da bactéria hospedeira sobre a placa de petri, verteu-se 5 mL de ágar semissólido realizando movimentos de oito para homogeneização. Após a secagem do ágar, inoculou-se 10  $\mu\text{L}$  do fago e inclinou-se a placa de maneira que a gota escorresse. A placa foi incubada invertida a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Após a incubação de ambas as técnicas, realizou-se a contagem de halos ou placas fágicas para determinar a titulação de acordo com a Equação 1, seguindo o protocolo de Sillankorva *et al.*, (2008).

Equação 1 – Titulação dos bacteriófagos

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

Os bacteriófagos foram titulados e em todos os ensaios realizados neste estudo, a solução estoque foi ajustada na concentração  $10^9$ .

Figura 5 – Ensaio de titulação



Legenda: A: Titulação utilizando 100  $\mu$ L do fago; B: Titulação utilizando 10  $\mu$ L do fago

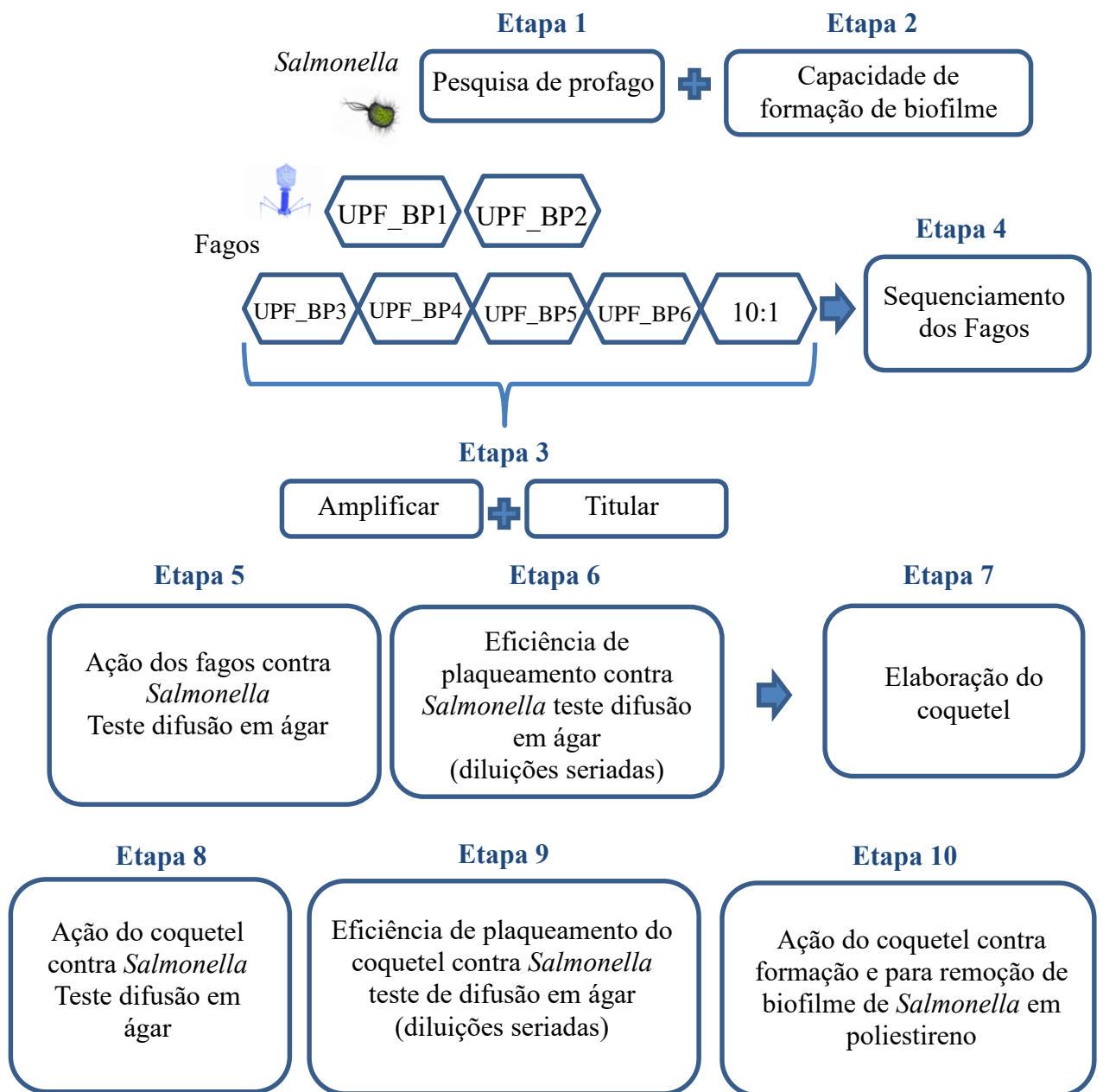
#### 4.4 Análises estatísticas

Os programas Microsoft Excel (Microsoft; Redmond, EUA), SPSS versão 2.3 (SILVA, 2014) e PAST 3.20 (IBM; Hong Kong) foram utilizados para a análise estatística dos dados. Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância e a comparação das médias será realizada com o teste Tukey a 5% de probabilidade. Os testes não paramétricos de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foram usados para a classificação estatística da capacidade de formação de biofilme das cepas de *Salmonella*. O Teste de Shapiro-Wilk foi utilizado no ensaio de inibição e remoção de biofilme pré-formado, pois verifica se os dados tendem a uma distribuição normal, em trabalhos realizados em triplicata.

## 5 EXPERIMENTOS

Para melhor elucidação do desenvolvimento deste projeto, na Figura 6 é apresentado o organograma com as principais etapas realizadas.

Figura 6 - Organograma com as etapas desenvolvidas neste projeto.



Fonte: elaborado pela Autora (2021).

## 5.1 Experimento I – Avaliação da adesão bacteriana de *Salmonella* em poliestireno

### 5.1.1 Materiais e métodos

As cepas de *Salmonella* foram utilizadas para o ensaio de avaliação da capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno, e a quantificação da adesão foi realizada conforme descrito por Stepanovic *et al.* (2000; 2004), Rodrigues *et al.* (2009) e Doijad *et al.* (2015). Uma alíquota de cada cultura bacteriana foi inoculada em caldo TSB sem glicose (Oxoid<sup>®</sup>) e incubada a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24. Após, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos<sup>®</sup> 2010) a 600 nm, onde o valor da densidade óptica foi de aproximadamente 0.400. Posteriormente, 200  $\mu\text{L}$  de cada suspensão bacteriana foram inoculadas, em triplicata, em poços de microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Kasvi<sup>®</sup>). Os controles negativos foram poços contendo caldo TSB sem glicose, em triplicata, não inoculados. O material foi incubado a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após a incubação, a suspensão bacteriana foi aspirada de cada poço, e as placas foram lavadas três vezes com 250  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril (Synth<sup>®</sup>), e foram levemente secas. Em seguida, as células bacterianas foram fixadas com 200  $\mu\text{L}$  de metanol p.a. (Neon<sup>®</sup>) por 15 minutos. O metanol foi removido e as placas foram secas em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram coradas com 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta de Hucker 2% (Vetec<sup>®</sup>) por cinco minutos, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Após, foi adicionado de 250  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial 33%, e realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos<sup>®</sup> 2010) a 550 nm. O valor da densidade óptica de cada amostra (Doa) foi obtido pela média aritmética da absorbância dos três poços e comparado com a média da absorbância dos controles negativos (Docn). Para determinar o grau de formação de biofilme foi utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ( $\text{Doa} \leq \text{Docn}$ ), fracamente formadora de biofilme ( $\text{Docn} < \text{Doa} \leq 2.\text{Docn}$ ), moderadamente formadora de biofilme ( $2.\text{Docn} < \text{Doa} \leq 4.\text{Docn}$ ) e fortemente formadora de biofilme ( $4.\text{Docn} < \text{Doa}$ ).

### 5.1.2 Resultados e discussão

A avaliação de formação de biofilmes em microplacas de poliestireno foi utilizada para selecionar as cepas de *Salmonella* com potencial de formação de biofilme em superfície abiótica para os testes de controle biológico utilizando-se os bacteriófagos.



Entre as cepas analisadas, 50% (6/12) foram classificadas como fortemente produtoras de biofilmes e 50% (6/12) com moderada formação (Tabela 6).

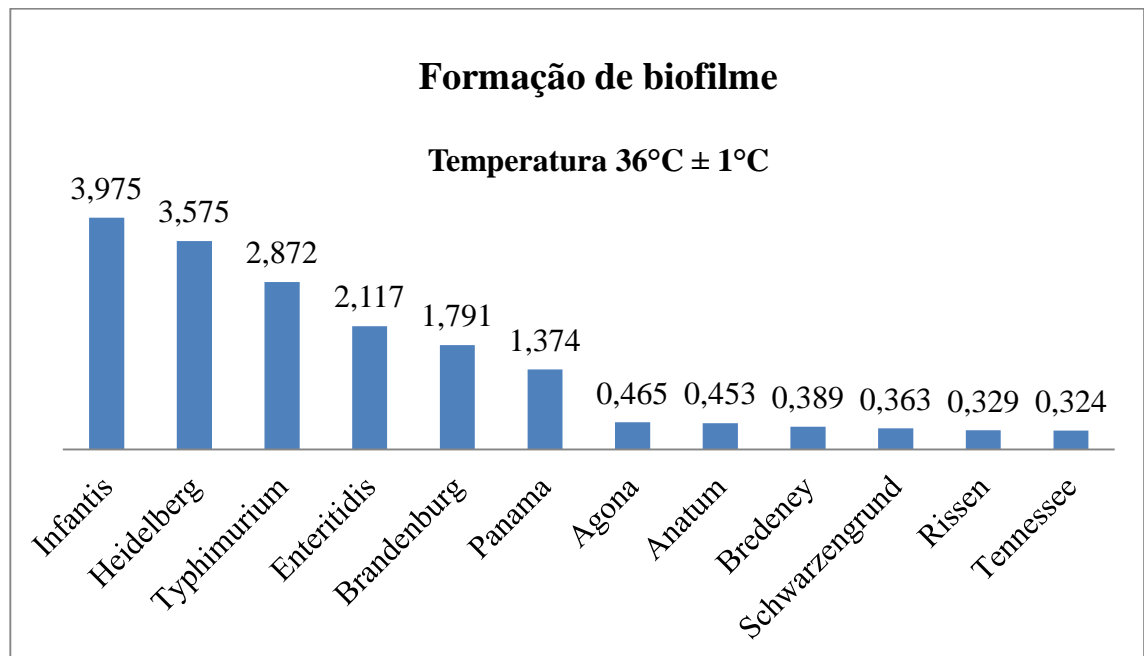
Tabela 6 - Classificação das cepas de *Salmonella* conforme a capacidade de formação de biofilme à  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

<b>Formação de Biofilme - DO 550 nm</b>			
Não produtora	Fraca ( $\text{Docn} < \text{Doa} \leq 2\text{Docn}$ )	Moderada ( $2\text{Docn} < \text{Doa} \leq 4\text{Docn}$ )	Forte ( $4\text{Docn} < \text{Doa}$ )
0/12 (0%)	0/12 (0%)	6/12 (50%)	6/12 (50%)

Legenda: leitura da absorbância em leitor de ELISA a 550 nm

Na Figura 7, pode-se comparar a distribuição das densidades ópticas de formação de biofilme das amostras utilizadas.

Figura 7 - Distribuição das densidades ópticas das cepas de *Salmonella* formadoras de biofilme.



Legenda: Fortemente formadora de biofilme ( $\text{DOa} > 0,56$ ) Moderadamente formadoras de biofilmes ( $\text{DOa}$  entre 0,28 à 0,55).

A superfície de poliestireno simula alguns dos materiais plásticos utilizados em indústrias de processamento de alimentos, como o polietileno presente nas placas de corte e o poliuretano nas esteiras de transporte dos matadouros-frigoríficos avícolas e apresenta uma boa adaptação *in vitro* (PIRES *et al.*, 2015). A utilização do caldo TSB sem glicose pareceu favorecer a formação de biofilmes *in vitro*, por ser um meio menos enriquecido que os caldos de enriquecimento. Estudos anteriores mostram que condições menos favoráveis servem como um estímulo à formação de biofilmes (RODRIGUES *et al.*, 2009; REUTER *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2013). Pesquisadores detectaram cepas de *Salmonella* spp. capazes de formar biofilmes em superfície de poliestireno. Porém, o grau de formação é variável entre os trabalhos publicados (STEPANOVIC *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2018). Uma vez formado o biofilme nessas superfícies ele age como ponto de contaminação constante podendo comprometer a qualidade microbiológica de produtos (FUSTER-VALLS *et al.*, 2008).

A capacidade de formação de biofilme pode ser um fator de risco para a persistência de alguns sorotipos de *Salmonella* na indústria de processamento de alimentos (VESTBY *et al.*, 2009). Sabe-se que comparado aos microorganismos na forma planctônica, aqueles em forma de vida sésil resistem significativamente mais aos agentes empregados nos procedimentos de higienização. Isto ocorre porque o biofilme atua como uma barreira física que impede ação de agentes sanitizantes, tornando a eliminação desses patógenos um desafio em instalações de processamento de alimentos. (COSTERTON *et al.*, 1995; STEPANOVIC *et al.*, 2004; STEENACKERS *et al.*, 2012).

O biofilme formado por *Salmonella* spp. é denso e formado principalmente por celulose e finas fimbrias agregativas (CERCA, 2012), tem uma matriz rígida altamente hidrofóbica com células muito compactadas, o que dificulta ainda mais a eliminação do biofilme. Alguns estudos descrevem a formação de biofilmes por *Salmonella* spp. sob baixas temperaturas, como 4°C e 8°C, e ressaltam a dificuldade que os desinfetantes comuns tem em eliminá-los (MOREY & SINGH, 2012; CORCORAN *et al.*, 2014; WEBBER *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Neste estudo observou-se alta e moderada capacidade de formação de biofilme entre os isolados testados, diferente dos resultados encontrados por Borges *et al.* (2018) para *S. Typhimurium* e *S. Agona* que apresentaram como fraca produção de biofilmes. Resultados semelhantes foram encontrados por Mandelli *et al.* (2019) que descreveu as cepas de *S. Agona* e *S. Rissen* como não formadoras de biofilme a 36°C.

Estudos com cepas de *S. Enteritidis* descreveram este sorovar como o mais forte produtor de biofilme, o que pode estar relacionado com surtos de salmonelose (SCHONEWILLE *et al.*, 2012, PUFFAL, 2013; BORGES *et al.*, 2018). De acordo com Borges *et al.* (2018), poucos estudos avaliaram a capacidade de formação de biofilme de cepas de *Salmonella* relacionadas aos sorotipos *S. Tennessee*, *S. Brandenburg*, *S. Bredeney*, *S. Anatum*, *S. Infantis* e *S. Schwarzengrund*. Ademais, foi observado anteriormente que a maioria destas cepas apresentaram baixa capacidade de produção de biofilmes a 36°C diferindo dos nossos resultados.

Um estudo realizado por Mandelli *et al.* (2019) demonstrou que as cepas de *S. Brandenburg*, *S. Anatum*, *S. Tennessee*, *S. Bredeney*, *S. Schwarzengrund*, *S. Infantis* e *S. Panama* demonstraram fraca capacidade de formar biofilme a 36°C. As diferenças encontradas podem estar associadas as características como a presença de fímbrias, flagelos, proteínas de membrana e outros apêndices celulares que podem ser mais importantes do que as condições ambientais para a produção de biofilme (AGARWAL *et al.*, 2011). Dessa forma, fica claro a necessidade de impedir a formação do biofilme, de atuar nas primeiras fases da formação, onde o biofilme ainda é reversível, o que pode ser feito utilizando-se bacteriófagos como ferramenta na anti-adesão de bactérias patogênicas. Testes para avaliar a eficácia de tratamentos alternativos, como o biocontrole com uso de bacteriófagos podem oferecer importantes contribuições para estudos futuros.

## 5.2 Experimento II - Sequenciamento dos bacteriófagos

### 5.2.1 Materiais e métodos

Para a purificação do DNA dos fagos foi utilizado 1 mL da solução estoque de cada bacteriófago. A extração do DNA foi realizada 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, utilizando-se gel de agarose 0,7%. A concentração e a pureza foram determinadas em Nanodrop ND-1000, onde os parâmetros foram: A260/280, que avalia uma possível contaminação por proteínas, onde os valores devem ser < 1,8 e A260/230, que avalia uma possível contaminação ou por resíduos de compostos orgânicos, onde os valores devem ficar entre 2.0-2.20.

O sequenciamento dos bacteriófagos *Salmonella Phage UPF\_BP4*, *Salmonella Phage UPF\_BP5*, *Salmonella Phage UPF\_BP6* foi realizado a partir das alíquotas

purificadas de DNA. Para o sequenciamento, foi utilizada uma cobertura de 50 vezes, utilizando-se o sequenciador MySeq, do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF). Com o genoma sequenciado, antes de iniciar as análises de dados, o primeiro passo foi aplicar o controle de qualidade nas sequências geradas, para remover sequências de baixa qualidade e os adaptadores. Para esta etapa foi utilizado o programa SeqyClean (SETTLES *et al.*, 2015) nas *reads* geradas pelo sequenciador MySeq da plataforma de sequenciamento Illumina®. Após as sequências passarem pelo controle de qualidade foram montadas por programas específicos, MaSuRCA (ZIMIN *et al.*, 2013) e Newbler (Roche). Com o genoma montado, programas de predição gênica Glimmer (DELCHER *et al.*, 2007) e GeneMarkS (BESEMER *et al.*, 2001) foram utilizados na identificação de regiões codificadoras de proteínas. Depois de obtidas as sequências gênicas, com o objetivo de prever suas funções biológicas, foi utilizado o programa de alinhamento de sequências BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) para comparar as sequências de proteínas contra bancos de dados biológicos. Entre os bancos utilizados, estão o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e INTERPRO (*Protein Sequence Analysis e Classification*).

Os bacteriófagos foram analisados e caracterizados com base em sua homologia com sequências de recursos depositados e disponíveis no NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A anotação da análise de montagem foi realizada usando Prokka (SEEMANN, 2014), que analisa uma variedade de bancos de dados para associar o CDS do genoma com funções biológicas previstas. O genoma anotado foi submetido ao site do banco de dados de bioinformática bacteriana PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center) (WATTAM, AR *et al.*, 2014) para identificar regiões genômicas dos bacteriófagos que correspondem dentro o banco de dados. A ferramenta de identificação de profago *PHAge Search Tool - O Enhanced Release* (PHASTER) também foi usado para determinar a região contendo elementos do tipo profago em genomas bacterianos (ARNDT *et al.*, 2016). As funções putativas dos produtos traduzidos foram analisadas e anotadas usando o banco de dados BLASTp e PHASTER Prophage / Virus. Para realizar análises de enviesamento e conteúdo de GC e gerar os arquivos de imagem, foi utilizado o CGView Server (GRANT E STOTHARD, 2008). A manipulação e edição da árvore filogenética foram realizadas utilizando a opção Tree View (EDGAR *et al.*, 2011). *Salmonella enterica* foi usada como raiz da árvore.

### 5.2.2 Resultados e discussão

As análises de sequenciamento dos genomas não mostraram nenhuma semelhança com genes conhecidos associados à virulência, à resistência a antimicrobianos ou genes com potenciais alérgenos alimentares, conforme relatório da FARRP (*Food Allergy Research and Resource Program*) (2020). Verificou-se uma alta porcentagem de proteínas hipotéticas em seus genomas, como já relatado em outros bacteriófagos sequenciados e registrados em estudos anteriores (KLUMPP *et al.*, 2013, POTTKER *et al.*, 2020). Contudo, a identificação de sua função é fundamental para aumentar o conhecimento dos bacteriófagos e o nível de segurança de suas aplicações, seja como fagoterapia ou biocontrole. A este respeito, deve ser considerado que nenhuma das proteínas hipotéticas mostrou similaridade significativa com fatores conhecidos ou hipotéticos envolvidos na patogenicidade bacteriana, por isso consideramos improvável que eles tenham um papel na virulência bacteriana. Além disso, não possuem o gene integrase, responsável pelo ciclo lisogênico, sendo fagos líticos.

As proteínas e os genes dos três fagos sequenciados foram classificados em diferentes grupos: Grupo 1 (G1) associado ao metabolismo e à replicação do genoma, Grupo 2 (G2) relacionada à lise bacteriana, Grupo 3 (G3) relativo às estruturas de montagem, Grupo 4 (G4) referente à multiplicação em *Salmonella*, Grupo 5 (G5) associado a mudanças na estrutura da célula bacteriana, Grupo 6 (G6) relacionado a proteínas não especificadas, Grupo 7 (G7) relativo a proteínas hipotéticas e Grupo 8 (G8) referente à capacidade de transporte de drogas.

O bacteriófago *Salmonella Phage UPF\_BP5*, possui 32.158pb, DNA, pertence a ordem *Caudovirales*, Família *Myoviridae*, Sub Família *Tevenvirinae*, gênero *Gelderlandvirus*.

A análise da anotação genômica e organização genética do *UPF\_BP5* mostrou alta homologia com o do bacteriófago *Salmonella phage Melville*. As funções foram atribuídas a 104 ORFs. Além disso, 130 proteínas hipotéticas codificadas, pertencentes ao G7, mostraram similaridade com proteínas hipotéticas já descritas, mas suas funções não puderam ser determinadas. Também foram encontradas 17 proteínas não especificadas relacionadas ao fago, pertencentes ao G6, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização genômica do *Salmonella Phage UPF\_BP5*

<b>Grupos</b>	<b>Proteínas/Gens</b>	<b>Exemplares</b>
	Phage DNA topoisomerase large subunit	1
	dihydrofolate reductase	1
	putative thymidylate synthase	1
	Thymidylate synthase	1
	Phage DNA primase/helicase	1
	DNA helicase	1
	Phage DNA helicase	1
	Phage DNA helicase loader	1
	DNA end protector protein	1
	recombination protein	1
	Replication factor C small subunit / Phage DNA polymerase clamp loader subunit	1
	Phage DNA polymerase clamp loader subunit Gp62	1
	Sliding clamp DNA polymerase accessory protein, phage associated	1
	gp61 DNA primase subunit	1
	Phage recombination-related endonuclease Gp46	1
	Phage recombination-related endonuclease Gp47	1
	Phage-associated homing endonuclease	2
	Phage endonuclease	1
G1	Exonuclease	1
	gp30 DNA ligase	1
	DNA endonuclease IV	1
	Endonuclease	1
	putative homing endonuclease	1
	RNA polymerase binding protein	1
	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), activating protein	1
	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), large subunit	1
	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), beta subunit	2
	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), alpha subunit	1
	Phage ribonuclease H	1
	Phage endoribonuclease translational repressor of early genes, regA	1
	gp55 sigma factor for T4 late transcription	1
	phage T4-like nrdH, anaerobic glutaredoxin	1
	Inh inhibitor of gp21 prohead protease	1
	Phage double-stranded DNA binding protein( dsbA), late transcriptional regulation	1
	Phage late transcriptional regulator #T4-like phage gp33, activator	1
	Single stranded DNA-binding protein, phage-associated	1

	activator of middle period transcription	1
	nucleoid disruption protein	1
	RNA ligase	2
	Phage-encoded phospholipase	1
	dCMP deaminase	1
	thymidine kinase	1
	Thioredoxin	2
	Thioredoxin, phage-associated	1
	dCTP pyrophosphatase , phage-associated	1
	deoxynucleoside monophosphate kinase	1
	Phage anti-sigma fator	1
	anti-sigma factor, putative	2
	conserved putative regulatory protein, FmdB family	1
	modifier of suppressor tRNAs	1
	DNA ligase, phage-associated #T4-like phage gp30 #T4 GC1627	1
	putative holin	1
G2	Phage baseplate hub structural protein / Phage lysozyme R	1
	lysis inhibition accessory protein, rapid lysis phenotype	1
	Phage head decoration protein (Soc)	1
	Phage head assembly chaperone protein (T4-like gp40)	1
	Phage baseplate wedge initiator (T4-like gp7)	1
	Phage baseplate wedge subunit (T4-like gp8)	1
	baseplate wedge tail fiber connector	1
	baseplate wedge subunit and tail pin	1
	Phage baseplate wedge subunit (T4-like gp10)	1
	Phage straight tail fiber (short tail fiber) (T4-like gp12)	1
	Phage tail completion protein (T4-like gp3)	1
	head completion protein	1
	baseplate wedge subunit	1
G3	Phage baseplate wedge subunit (T4-like gp6)	1
	Phage straight tail fiber (short tail fiber) (T4-like gp12)	1
	predicted membrane protein	1
	Phage head assembly chaperone protein	1
	Phage baseplate hub	2
	baseplate hub subunit	1
	Phage baseplate tail tube cap (T4-like gp48)	1
	tail assembly protein	1
	Phage tail sheath	1
	tail sheath stabilizer and completion protein	1
	Phage neck protein	2
	Phage tail connector protein	1
	Phage tail fiber	1

	Phage tail sheath	1
	putative portal vertex protein	1
	tail fibers protein	1
	Phage prohead assembly (scaffolding) protein	1
	Phage prohead assembly (scaffolding) protein	1
	Phage terminase, large subunit (T4-like gp17)	1
	Phage terminase, small subunit	1
	capsid and scaffold protein	2
	major capsid protein	2
	capsid vertex protein	2
G4	Phage anti-restriction nuclease	1
	glucosyl transferase	1
G5	beta glucosyl transferase	1
	Phage rIIA lysis inhibitor	1
	inhibitor of host transcription	1
G6	Proteínas não específicas	17
G7	Proteínas hipotéticas	130
G8	Transporte de drogas	1

Legenda: Grupo 1 (G1) associado ao metabolismo e replicação do genoma, Grupo 2 (G2) relacionada a lise bacteriana, Grupo 3 (G3) relativo as estruturas e montagem, Grupo 4 (G4) referente a multiplicação em *Salmonella*, Grupo 5 (G5) associado a mudanças na estrutura da célula bacteriana, Grupo 6 (G6) relacionada a proteínas não especificadas, Grupo 7 (G7) relativo a proteínas hipotéticas e Grupo 8 (G8) referente a capacidade de transporte de drogas.

Fonte: elaborado pela Autora (2021).

Com referência ao grupo G1 associado ao metabolismo e à replicação do genoma, foram identificadas algumas proteínas, dentre elas, DNA primase e helicase, consideradas fundamentais para a replicação (VANDER BYL E KROPINSKI, 2000) e as proteínas DNA polimerase, DNA ligase, exonuclease, endonuclease e outras proteínas codificadas pelos genes *frd* (dihydrofolate reductase), *nrdA* (Ribonucleotideo redutase, classe Ia aeróbica, subunidade alpha), *nrdB* (Ribonucleotideo redutase classe Ia aeróbica, subunidade beta), *dmK* (deoxynucleosideo monofosfato kinase e *td* (thymilate synthase). Estes genes estão envolvidos no metabolismo do nucleotídeo, o qual permite a replicação do fago e controle transcricional da maquinaria hospedeira.

As proteínas do G2 envolvidas na lise bacteriana, holina responsável pela abertura dos poros na membrana citoplasmática da bactéria alvo e lisozima, que tem a capacidade de hidrolisar o peptidoglicano e provocar lise celular, também foram identificadas. Estudos anteriores realizados por Bardina *et al.* (2016) já haviam descrito a presença dessas proteínas em bacteriófagos.



Genes do grupo G3, envolvidos na estrutura e montagem dos fagos, podem ser divididos naqueles que codificam terminases, capsídeo, injeção de DNA ou proteínas da cauda. Os genes *gtrC* (glucosyl transferase) e *gtrB* (beta glucosyl transferase), responsáveis por promover uma mudança química no antígeno O do lipopolissacarídeo bacteriano, também foram identificados. Quanto a esses genes, sabe-se que essa mudança no antígeno, impede que outros bacteriófagos que reconhecem esse mesmo receptor se liguem na bactéria (KROPINSKI *et al.*, 2007).

No genoma do *Salmonella Phage* UPF\_BP5 também foram identificados genes do grupo G4, que codificam a proteína anti-restrição nucleasse, responsável pela multiplicação do fago em *Salmonella*. Esta proteína pode conferir vantagem sobre outros bacteriófagos. Scholl *et al.* (2004) já havia descrito essa proteína em seu estudo. Além disso, o fago UPF\_BP5 expressa uma proteína pertencente ao G5, caracterizada por ser inibidora da transcrição do hospedeiro. Essa é uma das estratégias utilizadas pelos fagos para interferir nos fatores de iniciação da transcrição do hospedeiro. Essa inibição eventualmente pode levar, ao desligamento da expressão das proteínas do hospedeiro e dá aos transcritos do vírus uma vantagem competitiva para o acesso ao mecanismo de tradução celular. A prevenção da expressão de proteínas do hospedeiro também é uma estratégia para neutralizar a resposta antiviral.

O fago UPF\_BP5 expressa, ainda, uma proteína relacionada ao G8 e que é capaz de transportar antimicrobianos. Esta proteína pode ser utilizada para o controle de bactérias patogênicas, funcionando como uma eficiente forma de terapia direcionada, satisfazendo os critérios de seletividade de ligação no alvo de liberação oportuna de medicamento. Yacoby *et al.* (2007) avaliou a utilização de fagos para transportar antimicrobianos direcionados e observou-se a inibição total no crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Escherichia coli*, com uma melhora na potência por um fator de 20.000 em comparação ao medicamento livre.

O sequenciamento do genoma do bacteriófago *Salmonella Phage* UPF\_BP4 possui 26.407pb, DNA, pertence a ordem *Caudovirales*, Família *Markadamsvirinae*, gênero *Tequintavirus*. A análise da anotação genômica e organização genética do fago UPF\_BP4 mostrou alta homologia com o *Escherichia phage* vB\_EcoS\_HdH2. As funções foram atribuídas a 50 ORFs.

Além disso, 28 proteínas codificadas pertencentes ao G7, mostraram similaridade com proteínas hipotéticas já descritas, mas suas funções não puderam ser determinadas.

Também foram encontradas 86 proteínas do G6, não especificadas, relacionadas ao fago, conforme descritas na Tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização genômica do *Salmonella* Phage UPF\_BP4

<b>Grupos</b>	<b>Proteínas/Genes</b>	<b>Exemplares</b>
G1	Dihydrofolate reductase, phage-associated	1
	Thymidylate synthase	1
	Phage DNA primase/helicase	1
	Phage DNA helicase	1
	NAD-dependent protein deacetylase of SIR2 family	1
	DNA polymerase, phage-associated	1
	Phage-associated homing endonuclease	1
	Phage HNH homing endonuclease	3
	Phage protein, contains HNH endonuclease motif	3
	Phage recombination related exonuclease	1
	DNA ligase, phage-associated	2
	Phage endonuclease	1
	Ribonucleotide reductase class III (anaerobic), large subunit	1
	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), beta subunit	1
	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), alpha subunit	1
	Phage ribonuclease H	1
	Phage phosphate starvation-inducible protein PhoH	1
	2-ketobutyrate formate-lyase; Pyruvate formate-lyase	1
	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	1
	Phage-associated recombinase	1
	Phage antitermination protein Q	1
	Cold shock protein of CSP family	1
	Metallopeptidase, phage-associated	1
	Phosphoesterase	1
	putative serine/threonine protein phosphatase	1
	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit ClpP	1
	Thioredoxin, phage-associated	1
dNMP kinase	2	
G2	Phage holin	1
	Endolysin	1
	Phage lysin	1
	Phage tail tape measure protein	1
G3	Phage long tail fiber	1
	Phage major tail protein	1
	Phage tail fiber	6
	Phage portal (connector) protein	1

	Phage terminase, large subunit	1
	Phage capsid and scaffold	2
G6	Phage protein	86
G7	hypothetical protein	28

Legenda: Grupo 1 (G1) associado ao metabolismo e replicação do genoma, Grupo 2 (G2) relacionada a lise bacteriana, Grupo 3 (G3) relativo as estruturas e montagem, Grupo 6 (G6) relacionada a proteínas não especificadas, Grupo 7 (G7) relativo a proteínas hipotéticas e Grupo 8 (G8) referente a capacidade de transporte de drogas.

Fonte: elaborado pela Autora (2021).

Além da similaridade dos genes e proteínas classificados nos grupos já descritos acima, o fago UPF\_BP4 possui o *Phage tail tape measure protein* pertencente ao G2 e que tem propriedades de formação de poros na membrana do hospedeiro, necessários para a entrada do DNA viral na bactéria alvo. É uma provável exolisina envolvida na digestão do peptidoglicano do hospedeiro. Também funciona como uma fita métrica que serve como base para a polimerização da proteína do tubo da cauda e atua como um modelo para a determinação do comprimento da cauda, assim como já descritos nos bacteriófagos *Escherichia phage T5* e o phage T4 (UNIPROT, 2020). Outra proteína pertencente ao G2 e encontrada no fago UPF\_BP4 é a endolisina com atividade de lisozima que degrada os peptidoglicanos do hospedeiro e participa junto com a holina nos eventos sequenciais que levam à lise programada da célula hospedeira, liberando as partículas virais maduras. Uma vez que a holina tenha permeabilizado a membrana da célula hospedeira, a endolisina pode atingir o periplasma e quebrar a camada de peptidoglicano. Essa proteína já foi descrita anteriormente nos fagos T4 e *Escherichia phage T7*.

O fago UPF\_BP4 também possui uma outra lisina do G2 que é essencial para lise da parede celular bacteriana do hospedeiro, demonstrando atividade de hidrólise da parede celular. Essa lisina já havia sido descrita nos *Pneumococcus phage Dp-1* e *Escherichia coli (strain K12)*.

O sequenciamento do genoma do bacteriófago *Salmonella Phage UPF\_BP6* possui 79.994pb, DNA, pertence a ordem *Caudovirales*, Família *Myoviridae*, Subfamília *Tevenvirinae*, gênero *Gelderlandvirus*. A análise da anotação genômica e da organização genética do fago UPF\_BP6 mostrou alta homologia com o bacteriófago *Salmonella phage Melville*. Foram encontradas proteínas e genes pertencentes aos grupos descritos anteriormente, conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9 - Caracterização genômica do *Salmonella* Phage UPF\_BP6

<b>Grupos</b>	<b>Proteínas /Genes</b>	<b>Exemplares</b>
	DNA topoisomerase	1
	putative thymidylate synthase	2
	Phage DNA primase/helicase	1
	DNA helicase (EC 3.6.1.-), phage-associated	1
	Phage DNA helicase	1
	Phage DNA helicase loader	1
	DNA end protector protein	1
	Phage DNA polymerase clamp loader subunit Gp62	1
	Sliding clamp DNA polymerase accessory protein, phage associated	1
	gp61 DNA primase subunit	1
	Phage recombination-related endonuclease Gp47	1
	Phage-associated homing endonuclease	1
	Phage endonuclease	1
	Exonuclease	1
	gp30 DNA ligase	1
	DNA endonuclease IV	1
	Endonuclease	1
	putative homing endonuclease	1
	RNA polymerase binding protein	1
G1	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), activating protein	1
	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic), large subunit	1
	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic), alpha subunit	1
	Phage ribonuclease H	1
	gp55 sigma factor for T4 late transcription	1
	phage T4-like nrdH, anaerobic glutaredoxin	1
	Inh inhibitor of gp21 prohead protease	1
	Phage double-stranded DNA binding protein (dsbA), late transcriptional regulation	1
	Single stranded DNA-binding protein, phage-associated activator of middle period transcription	1
	RNA ligase	2
	Phage-encoded phospholipase	1
	dCMP deaminase	1
	Thioredoxin	2
	dCTP pyrophosphatase , phage-associated	1
	deoxynucleoside monophosphate kinase	1
	anti-sigma factor, putative	1
	conserved putative regulatory protein, FmdB family	1
G2	phage baseplate hub + tail lysozyme	1

	Phage baseplate hub structural protein / Phage lysozyme R	1
	lysis inhibition accessory protein, rapid lysis phenotype	1
	Phage head assembly chaperone protein	1
	Phage baseplate wedge initiator (T4-like gp7)	1
	Phage baseplate wedge subunit (T4-like gp8)	1
	baseplate wedge subunit and tail pin	1
	Phage baseplate wedge subunit (T4-like gp10)	1
	Phage tail completion protein (T4-like gp3)	1
	baseplate wedge subunit	1
	Phage baseplate wedge subunit (T4-like gp6)	1
	Phage straight tail fiber (short tail fiber) (T4-like gp12)	1
G3	Phage baseplate	1
	Phage baseplate hub	2
	tail assembly protein	1
	Phage neck protein	1
	Phage tail connector protein	1
	Phage tail fiber	2
	Phage prohead assembly (scaffolding) protein	2
	Phage tail protein and peptidase	1
	Phage terminase, large subunit (T4-like gp17)	1
	capsid and scaffold protein	1
	capsid vertex protein	2
G4	Phage anti-restriction nuclease	1
	glucosyl transferase	1
G5	Phage rIIA lysis inhibitor	1
	inhibitor of host transcription	1
G6	Proteínas não especificadas	8
G7	Proteínas hipotéticas	101
G8	Transporte de drogas	1

Legenda: Grupo 1 (G1) associado ao metabolismo e replicação do genoma, Grupo 2 (G2) relacionada a lise bacteriana, Grupo 3 (G3) relativo as estruturas e montagem, Grupo 4 (G4) referente a multiplicação em *Salmonella*, Grupo 5 (G5) associado a mudanças na estrutura da célula bacteriana, Grupo 6 (G6) relacionada a proteínas não especificadas, Grupo 7 (G7) relativo a proteínas hipotéticas e Grupo 8 (G8) referente a capacidade de transporte de drogas.

Fonte: elaborado pela Autora (2021).

Além disso, 101 proteínas codificadas pertencentes ao G7, mostraram similaridade com proteínas hipotéticas já descritas, mas suas funções não puderam ser determinadas. Também foram encontradas 8 proteínas não especificadas, relativas ao G6 e funções foram atribuídas a 72 ORFs. O fago UPF\_BP6 possui genes e proteínas pertencentes aos grupos descritos anteriormente. Outras duas proteínas relacionadas ao G2, a proteína *phage baseplate hub + tail lysozyme* e a *Phage baseplate hub structural protein / Phage lysozyme R*, que possuem atividade de lisozima, com a capacidade de

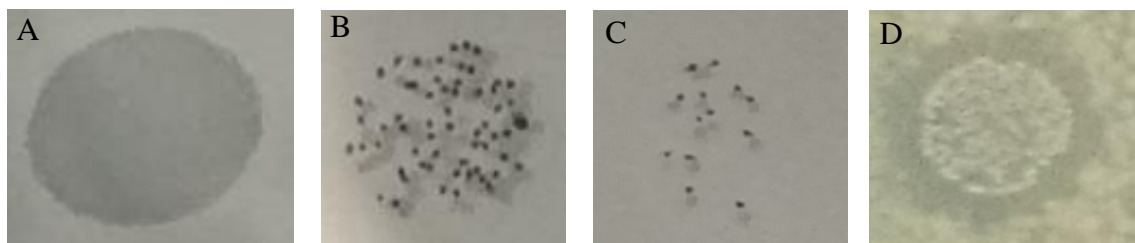
hidrolisar o peptidoglicano e provocar a lise celular e atuar no processo catabólico do de peptidoglicano, igual ao encontrado no fago T4, já descrito em estudos anteriores.

### 5.3 Experimento III - Avaliação da ação dos bacteriófagos contra *Salmonella enterica* pelo método de difusão em ágar

#### 5.3.1 Materiais e métodos

Avaliou-se a ação individual dos bacteriófagos, frente a cada cepa de *Salmonella enterica*. As cepas de *Salmonella* foram previamente preparadas e incubadas em BHI a  $36 \pm 1$  °C até atingir a fase exponencial. Após 18 a 24h, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos® 2010) a 600 nm, onde o valor da densidade óptica foi de aproximadamente 0.400. Posteriormente, 100 µL da suspensão bacteriana foram inoculados em placas de petri contendo uma fina camada de TSA e uma sobre camada do meio semi-sólido vertido sobre a superfície. Com o objetivo de homogeneizar a suspensão bacteriana junto ao meio, realizou-se movimentos em forma de “oito”. Após a secagem, foram inoculados 10 µL de cada fago, em triplicata, sendo que a titulação dos fagos foi previamente ajustada para  $10^9$  UFP/mL. As placas foram incubadas a  $36 \pm 1$  °C pelo período de 24 horas. Em seguida foi realizada a leitura buscando a presença de halos ou unidades formadoras de placas (UFP). Como controle negativo foi utilizado 10 µL de TSB estéril em triplicata. As placas de lise foram classificadas como: lise confluyente (+++); lise semi-confluyente (++); placas individuais (+); lise sombreada (S); sem placa de lise (HERINGA *et al.*, 2010; HOOTON *et al.*, 2011). Na Figura 8 estão representadas as quatro classificações de placas de lise.

Figura 8 – Referências de halos fágicos utilizados para classificação de lise



Legenda: A: lise confluyente; B: lise semi-confluyente; C: placas individuais; D: lise com sombra

### 5.3.2 Resultados e discussão

Nos testes de ação lítica com os bacteriófagos, observou-se que 75% (9/12) das cepas de *Salmonella* sofreram lise pelos sete fagos testados. Outros 16,7% (2/12) sofreram lise por seis fagos testados e 8,3% (1/12) sofreu lise por cinco dos sete fagos testados, demonstrando ação lítica (Tabela 10).

Tabela 10 - Suscetibilidade das cepas de *Salmonella* aos bacteriófagos conforme lise em placa

Cepas de <i>Salmonella</i>	Suscetibilidade aos bacteriófagos						
	UPF_BP1	UPF_BP2	UPF_BP3	UPF_BP4	UPF_BP5	UPF_BP6	10:2
<i>S. Bredeney</i>	+	++	+++	-	++	+++	+++
<i>S. Brandenburg</i>	+++	++	+++	+++	++	++	++
<i>S. Agona</i>	+	+	++	++	+++	+++	+++
<i>S. Anatum</i>	+	++	+++	++	+++	++	+++
<i>S. Rissen</i>	+++	++	++	+	+	+++	+++
<i>S. Infantis</i>	++	++	+++	++	+++	+++	+++
<i>S. Tennessee</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Scwarzengrund</i>	+	+	+	-	-	+	+
<i>S. Typhimurium</i>	++	++	+++	++	++	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. Panama</i>	+	+	+++	++	+++	+++	+++
<i>S. Heidelberg</i>	++	++	+++	-	+++	+++	+++

lise confluenta (+++); lise semi-confluenta (++); placas individuais (+); lise com sombra (S); sem placa (-)

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, os bacteriófagos UPF\_BP1 e UPF\_BP2 demonstraram ação lítica frente a outros sorovares de *Salmonella* spp., como *S. Heidelberg*, *S. Lexington* e *S. Gallinarum* (POTTKER, 2016; RIZZO, 2017; PEIXOTO, 2019; WEBBER, 2020).

No presente estudo, o bacteriófago UPF\_BP1 apresentou a melhor classificação de lise, quando comparado ao UPF\_BP2. Ao testar os mesmos bacteriófagos (UPF\_BP1, UPF\_BP2) sobre cepas de *S. Enteritidis* isoladas de surto de DTA e de origem avícola, Peixoto (2019) corrobora com nossos resultados, já que os cinco isolados de SE sofreram lise pelos fagos testados, demonstrando a ação lítica para o biocontrole de diferentes sorovares de *Salmonella*.

Estudos anteriores já demonstraram que os fagos podem ser utilizados no controle de agentes patogênicos de origem alimentar, como Zinno *et al.* (2014), que utilizou o bacteriófago P22 em ovos líquidos, bebidas energéticas, leite desnatado, suco de maçã e peito de frango, inoculados com *S. Typhimurium* e verificou uma redução de 2 log<sub>10</sub> na contaminação, quando comparados aos controles não tratados.

O fago fmb-p1, isolado da bactéria hospedeira *S. Typhimurium*, foi capaz de lisar dez das 34 cepas de *Salmonella* testadas, incluindo *S. Heidelberg* (WANG *et al.*, 2017). Grygorcewicz *et al.* (2017) verificaram a ação do bacteriófago sall\_v01, isolado de águas residuais, e demonstraram que ele foi capaz de infectar diversos sorovares de *Salmonella* encontrados em esterco suíno. Estes estudos demonstram a importância do uso de bacteriófagos líticos na redução do risco de salmonelose de origem hídrica, e consequentemente, de minimizar os impactos na saúde pública.

A busca de novos fagos como alternativa para o controle de *Salmonella*, torna-se interessante uma vez que os fagos atacam, replicam-se e lisam células bacterianas patogênicas específicas, não interferindo na microbiota natural do ambiente e/ou dos alimentos, demonstrando efetividade e especificidade.



## 5.4 Experimento IV - Eficiência de plaqueamento dos bacteriófagos contra *Salmonella enterica*

### 5.4.1 Materiais e métodos

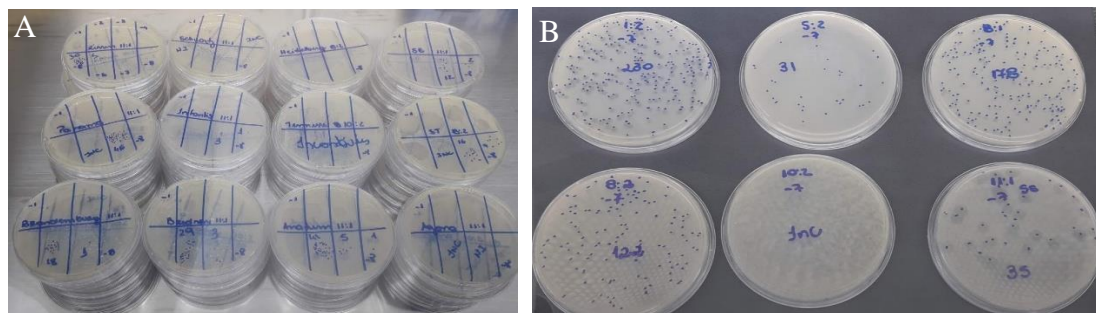
A fim de verificar a eficiência de plaqueamento EOP (*efficiency of plating*) do fago frente à cepa hospedeira e aos demais sorovares, foi realizada a diluição seriada da solução estoque dos fagos ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) (a titulação inicial dos fagos foi ajustada para  $10^9$  UFP/mL) em 900  $\mu$ L de tampão SM, (composto por, 1 litro de água destilada, 5,8g de cloreto de sódio (NaCl), 2g de Sulfato de Magnésio (MgSO<sub>4</sub>), e 50mL de 1M Tris-HCL pH7,5) e 100  $\mu$ L da solução de fagos, de  $10^{-1}$  até  $10^{-8}$ , em microtubos estéreis. Foram preparadas placas de petri com ágar TSA e sobrecamada com 100  $\mu$ L de cada cepa de *Salmonella* foram previamente incubadas em BHI a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  até atingir a fase exponencial, apresentando uma densidade óptica de 0.400 após a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos<sup>®</sup> 2010) a 600 nm. Após a inclusão de cada cepa, adicionou-se meio semissólido, conforme descrito anteriormente. Foi utilizada a técnica de microgotas, adicionando 10  $\mu$ L de cada diluição (SILLANKORVA *et al.*, 2010). A classificação da eficiência de plaqueamento, foi realizada conforme descrito por Melo *et al.* (2013), nos escores alto (>10%), moderado (1-0,1%) e baixo ou lise por fora (*lysis from without* – LFW) (<0,1), comparando o título máximo observado e assumindo que este é 100%, e as demais titulações. Validando assim a capacidade individual de plaqueamento de cada bacteriófago e sua capacidade de gerar progênie lítica.

### 5.4.2 Resultados e discussão

No ensaio para verificação da eficiência de plaqueamento, foi realizada a diluição seriada da solução estoque dos fagos e os resultados foram classificados nos escores alto, moderado e baixo, (Figura 9) Todos os fagos apresentaram uma baixa eficiência em pelo menos uma das cepas de *Salmonella* testadas. Os fagos UPF\_BP1 e UPF\_BP2, apresentaram o pior desempenho no quesito eficiência de infecção. Esse dado demonstra que em algum momento os fagos deixam de invadir a bactéria, inviabilizando a sua própria multiplicação. Vários fagos se ligam a receptores na superfície bacteriana e rompem a membrana causando a lise. Essa baixa eficiência pode ser explicada pela lise por fora (*lysis from without* - LFW), mecanismo que acontece quando uma sobrecarga de fagos infecta simultaneamente uma bactéria levando à lise pela ação de lisinas ou do

rápido esgotamento dos recursos das células. No entanto, isso requer uma grande quantidade de fagos, em média de 100 vezes mais do que o número de bactérias.

Figura 9 – Ensaio de eficiência de plaqueamento



Legenda: A: Diluição seriada dos bacteriófagos e teste em ágar; B: Diluição individual

Em contra partida, pelo menos cinco fagos tiveram ação contra as cepas de *Salmonella*. Dentre os fagos com melhor desempenho, estão os fagos UPF\_BP6, 10:2 e UPF\_BP3, que demonstraram alta eficiência em mais de 75% das *Salmonella* submetidas. Apenas dois fagos (UPF\_BP4 e UPF\_BP5) não tiveram ação contra uma ou mais cepas testadas (Tabela 11).

Tabela 11 – Classificação da eficiência de plaqueamento

Cepas de <i>Salmonella</i>	Fagos /Score						
	UPF_BP1	UPF_BP2	UPF_BP3	UPF_BP4	UPF_BP5	UPF_BP6	10:2
<i>S. Bredeney</i>	B	M	A	-	M	A	A
<i>S. Brandenburg</i>	A	B	A	A	B	B	B
<i>S. Agona</i>	B	B	M	M	A	A	A
<i>S. Anatum</i>	B	M	A	M	A	M	A
<i>S. Rissen</i>	A	M	M	B	B	A	A
<i>S. Infantis</i>	M	M	A	M	A	A	A
<i>S. Tennessee</i>	A	A	A	A	A	A	A
Schwartzengrund	B	B	B	-	-	B	B
<i>S. Typhimurium</i>	M	M	A	M	M	A	A
<i>S. Enteritidis</i>	M	A	A	A	A	A	A
<i>S. Panama</i>	B	B	A	M	A	A	A
<i>S. Heidelberg</i>	M	M	A	-	A	A	A

Legenda: Classificação em escores A: alto (>10%), M: moderado (1-0,1%) e B: baixo ou *lysis from without* - LFW (<0,1), - : sem infecção fágica.

Melo *et al.* (2013) descreveu amplo espectro lítico do bacteriófago SEP1 que foi capaz de infectar todas as cepas de *Stafilococcus epidermidis*, apresentando uma eficiência de plaqueamento alta, infectando 15 das 41 cepas testadas. Entretanto, segundo Hyman *et al.*, (2010) uma infecção por fago é um processo complicado e um único teste em ágar não define se este fago é realmente eficaz para infectar bactérias, pois o lisado pode conter resíduos de uma bacteriocina que mata bactérias. Além disto, próprios fagos podem dar origem a qualquer infecção lítica ou lise por fora (LFW), ambas formando zonas claras em uma placa bacteriana, mas sem novos fagos sendo produzidos.

Para considerar um fago como candidato à terapia fágica podemos avaliar a gama de hospedeiros que o fago infecta, assim como se fago dá origem a uma infecção produtiva, ou seja, além da lise em si, uma produção de progênie de fagos líticos. Além disso, as infecções produtivas de um fago em diferentes cepas, devem resultar em tamanhos de explosão, ou capacidade lítica comparáveis ao resultado da infecção de seu hospedeiro bacteriano primário, e para isso não basta somente o resultado de testes pontuais sem a verificação da eficiência de plaqueamento (MIRZAEI *et al.*, 2015).

A virulência de um fago geralmente está associada à eficiência de infecção, que é um pré-requisito para atingir a infecção produtiva, que por sua vez é fundamental para o sucesso da fagoterapia. Com isso, a seleção de fagos, não pode ser feita somente com base em testes pontuais que apenas refletem um efeito bactericida, como os teste de ação lítica ou gama de hospedeiros. Sendo assim, os testes de eficiência de plaqueamento, são considerados os melhores método a serem aplicados no processo de seleção.

Em estudo realizado por Mirzaei & Nilsson (2015) foi demonstrado que as análises de eficiência comprovam que a quantidade do isolamento inicial de fagos frequentemente resulta em fagos com maior eficácia em outras bactérias do que a cepa primária de isolamento. Isso demonstra a necessidade de um melhor isolamento, seleção e testes em fagos. Em testes pontuais onde não é realizado a EOP dos bacteriófagos, as zonas de lise observadas, podem não ser necessariamente resultado de lise que dão origem a progênie de fagos, pois o lisado pode simplesmente conter resíduos de alguma bacteriocina e ainda, os próprios fagos podem ter realizado uma infecção de lise por fora (*LFW - lysis from without*). Em ambos os casos há formação de áreas de lise sem que novos fagos sejam produzidos. A EOP difere do teste local a esse respeito, pois mede o título da progênie do fago que infecta a cepa bacteriana (MIRZAEI *et al.*, 2015).

## 5.5 Experimento V – Ação e eficiência do coquetel de bacteriófagos contra *Salmonella enterica* pelo método de difusão em ágar

### 5.5.1 Materiais e métodos

#### 5.5.1.1 Elaboração do coquetel

De acordo com os resultados preliminares, foi elaborado um coquetel contendo diferentes fagos de modo a contemplar a ação lítica contra o maior número possível de sorovares de *Salmonella enterica* e com a melhor eficiência possível. Para o preparo do coquetel, utilizou-se os sete fagos disponíveis, todos foram amplificados, concentrados, purificados e titulados, conforme descrito anteriormente. Foi utilizada a titulação de  $10^9$  UFP/mL e a proporção de 1:1(v/v) para elaboração do coquetel.

#### 5.5.1.2 Ensaio de ação e eficiência de plaqueamento dos fagos contra as cepas *Salmonella*

As cepas de *Salmonella* foram previamente preparadas e incubadas em BHI a  $36^\circ\text{C}$  por 18 a 24h. Após esse tempo, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos<sup>®</sup> 2010) a 600 nm, onde o valor da densidade óptica foi de aproximadamente 0.400. Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana foram inoculados em uma placa de petri, contendo uma fina camada de TSA e adicionou-se 5 mL do meio semissólido. Com o objetivo de homogeneizar a suspensão bacteriana junto ao meio realizou-se movimentos em forma de oito. Após a secagem, foram inoculados 10  $\mu\text{L}$  do coquetel, em triplicata. Incubou-se pelo período de 24 horas. Após este período, foi realizada a leitura para verificar a suscetibilidade das cepas, frente ao coquetel elaborado, observando-se as áreas de lise ou unidades formadoras de placa (UFP). Como controle negativo foi utilizado 10  $\mu\text{L}$  de TSB estéril em triplicata. As placas de bacteriófagos foram registradas como lise confluyente (+++); lise semi-confluyente (++); placas individuais (+); lise sombreada (S); sem placa de lise (-) (HERINGA *et al.*, 2010; HOOTON *et al.*, 2011).

A fim de verificarmos a eficiência de plaqueamento do coquetel frente as cepas, foi realizada a diluição seriada da solução estoque do coquetel (titulação inicial dos fagos foi ajustada para  $10^9$  UFP/mL) em 900  $\mu\text{L}$  de tampão SM e 100  $\mu\text{L}$  da solução de fagos,

de  $10^{-1}$  até  $10^{-8}$ , em microtubos estéreis. Foram preparadas placas de petri com ágar TSA e sobrecamada com 100  $\mu\text{L}$  da bactéria, cada cepa de *Salmonella* foi previamente preparada. As cepas foram incubada em BHI a  $36 \pm 1$  °C até atingir a fase exponencial. Após 18 a 24h, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos® 2010) a 600 nm, onde o valor da densidade óptica foi de aproximadamente 0.400. Foi adicionado meio semissólido, conforme descrito anteriormente. Foi utilizada a técnica de microgotas, adicionando 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição (SILLANKORVA *et al.*, 2010). A classificação da eficiência de plaqueamento do coquetel, foi realizada conforme descrito por Melo *et al.* (2013), nos escores alto (>10%), moderado (1-0,1%) e baixo ou *lysis from without* - LFW (<0,1), comparando o título máximo observado e assumindo que este é 100%, e as demais titulações. Validando assim a capacidade de infecção do coquetel.

#### 5.5.1.3 Resultados e discussão

No ensaio de ação lítica com o coquetel observou-se que todos os isolados sofreram lise. E para verificação da eficiência do coquetel, foi realizada a diluição seriada da solução estoque dos fagos e os resultados foram classificados nos escores alto, moderado e baixo. Os dados demonstram que utilizando o coquetel, houve uma eficiência alta em 83,4% (10/12), moderada em 8,3% (1/12) e baixa eficiência em 8,3% (1/12) das cepas, conforme a Tabela 12. A combinação sinérgica de fagos, utilizando-se um coquetel, demonstrou ser o tratamento com o melhor percentual de eficácia de ação de lise, quando comparado à eficiência de ação utilizando fagos isoladamente. Portanto, o uso dos fagos em sinergismo é uma grande promessa para melhorar os atuais sistemas de tratamento de contaminação bacteriana em alimentos

Tabela 12 - Classificação da eficiência de plaqueamento do coquetel

Cepas de <i>Salmonella</i>	Escore
<i>S. Bredeney</i>	A
<i>S. Brandenburg</i>	M
<i>S. Agona</i>	A
<i>S. Anatum</i>	A
<i>S. Rissen</i>	A
<i>S. Infantis</i>	A
<i>S. Tennessee</i>	A
<i>S. Schwartzengrund</i>	B
<i>S. Typhimurium</i>	A
<i>S. Enteritidis</i>	A
<i>S. Panama</i>	A
<i>S. Heidelberg</i>	A

Legenda: Classificação em escores A: alto (>10%), M: moderado (1-0,1%) e B: baixo ou *lysis from without* - LFW (<0,1), - : sem infecção fágica.

Estudos anteriores, Pereira *et al.* (2016) relatam eficiência semelhante comparando o uso dos fagos individualmente e na forma de coquetéis, porém ressaltam que o desenvolvimento de menor resistência bacteriana indica que os coquetéis de fagos pode ser a escolha mais promissora a ser usada no biocontrole de salmonelose.

Zurabov e Zhilenkov (2021) isolaram, caracterizaram e testaram quatro diferentes bacteriófagos contra *Klebsiella pneumoniae*. Quando testados isoladamente, os fagos vB\_KpnS\_FZ10 e vB\_KpnP\_FZ12 foram ativos contra as bactérias em percentuais de 57% e 71% respectivamente. Já a atividade lítica dos fagos vB\_KpnS\_FZ41 e vB\_KpnM\_FZ14 foi menor que 29%, quando testados contra as mesmas cepas. No entanto, quando combinados, os fagos foram eficazes contra todas as cepas bacterianas estudadas.

Islam *et al.* (2019) realizaram um estudo aplicando um coquetel de bacteriófagos controle de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* de origem alimentar, testando em leite e peito de frango contaminados experimentalmente. Os resultados demonstraram que o coquetel reduziu notavelmente *Salmonella*, ocorrendo eliminação quase completa no leite após 6h

e 12 h, assim como em peito de frango também foi verificado não haver contagem viável por plaqueamento após 3 horas.

Os fagos são usados muito além do controle de microrganismos em alimentos, meio ambiente e na medicina humana. São usados na engenharia genética como veículo de liberação de drogas, como sensores biológicos altamente específicos usados em kits de ensaios laboratoriais para detecção de microrganismos através do uso de fagos que expressam luciferases e utilizados também na nanotecnologia (MILETIC *et al.*, 2016).

Métodos antimicrobianos tradicionais como pasteurização, processamento de alta pressão, irradiação e desinfetantes químicos são capazes de reduzir as populações microbianas nos alimentos em graus variados, mas também têm considerável desvantagens, como grandes investimentos, danos potenciais aos equipamentos devido à corrosão e um impacto nas características organolépticas dos alimentos. Com isso o biocontrole utilizando fagos é uma intervenção antimicrobiana interessante. A maioria, dos produtos de biocontrole com fagos que existem comercialmente são oriundos de fagos naturais, isolados do meio ambiente, que não são geneticamente modificados (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE; 2018). Além disso os fagos, tem rápida ação na bactéria hospedeira, custo relativamente baixo, não são tóxico e são de fácil manipulação.

Hoje já existem produtos a base de fagos para controle de *Salmonella* liberados pela FDA e estão atualmente no mercado: SalmoFresh™, PhageGuard S™, SalmoFREE® e SalmoPro® (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE; 2018; CLAVIJO *et al.*, 2019). Todos utilizam combinações de fagos, Woolston *et al.* (2013) examinaram seis fagos listados como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) na redução de níveis de *Salmonella* presente em superfícies encontradas na indústria de alimentos, e verificaram redução significativa na população desta bactéria.

Como já mencionado anteriormente, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) ainda não autorizou a utilização direta em carne de frango em matadouros-frigoríficos do Brasil, somente no ambiente de processamento, diferente do que já ocorre nos EUA e na União Europeia. Diante desse empasse, o governo publicou em 2017 a Instrução Normativa nº 30 de 9 de agosto de 2017, a qual estabelece procedimentos para submissão de propostas, avaliação, validação e implementações de inovação tecnológicas a serem empregadas em qualquer etapa da fabricação de produtos de origem animal (BRASIL, 2017).

## 5.6 – Experimento VI - Ação lítica do coquetel contra formação e para remoção de biofilmes de *Salmonella*

### 5.6.1 Materiais e método

A avaliação da ação do coquetel na inibição da formação de biofilmes, e para remoção do biofilme pré-formado, foi realizada a partir da aplicação do coquetel em placas de poliestireno. Utilizou-se um método colorimétrico, para determinar quantitativamente a eficácia do bacteriófago, com base na metodologia descrita por Gong e Jiang (2017), com modificações. As cepas de *Salmonella* foram previamente cultivadas em caldo TSB sem glicose por 18 a 24 h a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Após esse tempo, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos<sup>®</sup> 2010) a 600 nm, onde o valor da densidade óptica foi de aproximadamente 0.400, (aproximadamente  $3,0 \times 10^8$  UFC/mL). Foram inoculados 150  $\mu\text{L}$  destes inóculos em cada poço da microplaca de 96 cavidades com fundo chato, em triplicata. Como controle positivo para formação de biofilmes foram inoculados poços que não receberam tratamento com bacteriófagos.

Para avaliar a inibição da formação do biofilme, foram inoculados 150  $\mu\text{L}$  de *Salmonella* e adicionado 150  $\mu\text{L}$  do coquetel, em um título final de  $10^9$  UFP/mL, em cada poço. Foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de TSB com concentração dupla, estéril, nos poços do controle positivo. As microplacas foram incubadas a  $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 h.

Para avaliar a remoção do biofilme pré-formado, as microplacas inoculadas com as cepas de *Salmonella* foram incubadas a  $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por 39 horas. Após, em três momentos diferentes (3, 6 e 9 horas), foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  do coquetel ( $10^9$  UFP/mL), em cada poço. Como os fagos estão em caldo TSB com concentração dupla, foram adicionados mais 150  $\mu\text{L}$  de TSB estéril com concentração dupla nos poços do controle positivo, a fim de garantir as mesmas condições de formação de biofilme, e totalizar 300  $\mu\text{L}$  em todos os poços. Após, as microplacas foram incubadas por mais 3, 6 e 9 horas a  $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Totalizando 48 h de incubação total.

Após os tempos e tratamentos, cada poço foi lavado com 300  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril (Synth<sup>®</sup>) por três vezes e seco em temperatura ambiente. Em seguida, as células bacterianas foram fixadas com 300  $\mu\text{L}$  de metanol p.a. (Neon<sup>®</sup>) por 15 minutos. O metanol foi removido e as placas foram secas em temperatura ambiente. As placas foram coradas com 300  $\mu\text{L}$  de cristal violeta de Hucker 2% (Vetec<sup>®</sup>) por cinco minutos, lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente. Após, foi



adicionado 250 µL de ácido acético glacial 33% e realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Rosys Anthos® 2010) a 600 nm. A porcentagem de remoção e prevenção de biofilme foi calculada conforme a Equação 2, segundo GONG e JIANG (2017).

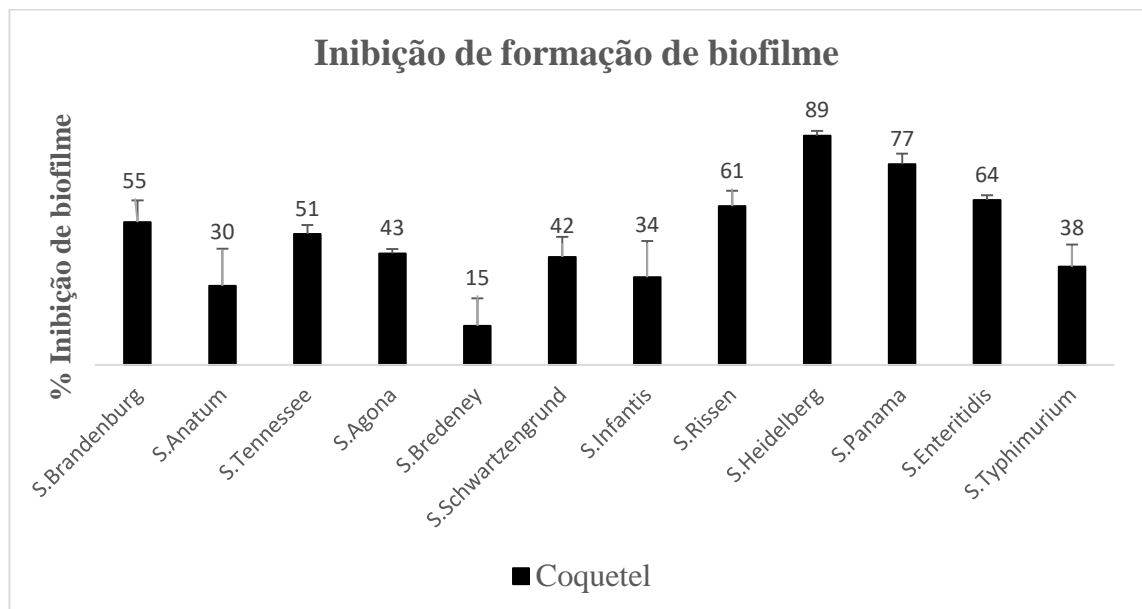
Equação 2 - Cálculo percentual de inibição e remoção de biofilme

$$\% \text{ inibição/remoção de biofilme} = \frac{\text{DO Controle} - \text{DO Tratamento}}{\text{DO Controle}} \times 100\%$$

### 5.6.2 Resultados e discussão

A utilização do coquetel de bacteriófagos na inibição da formação do biofilme, apresentou reduções de até 89% quando comparado aos controles não tratados, conforme apresentado no Gráfico 1

Gráfico 1 - Percentual de inibição de formação de biofilme, através da ação lítica do coquetel de bacteriófagos.



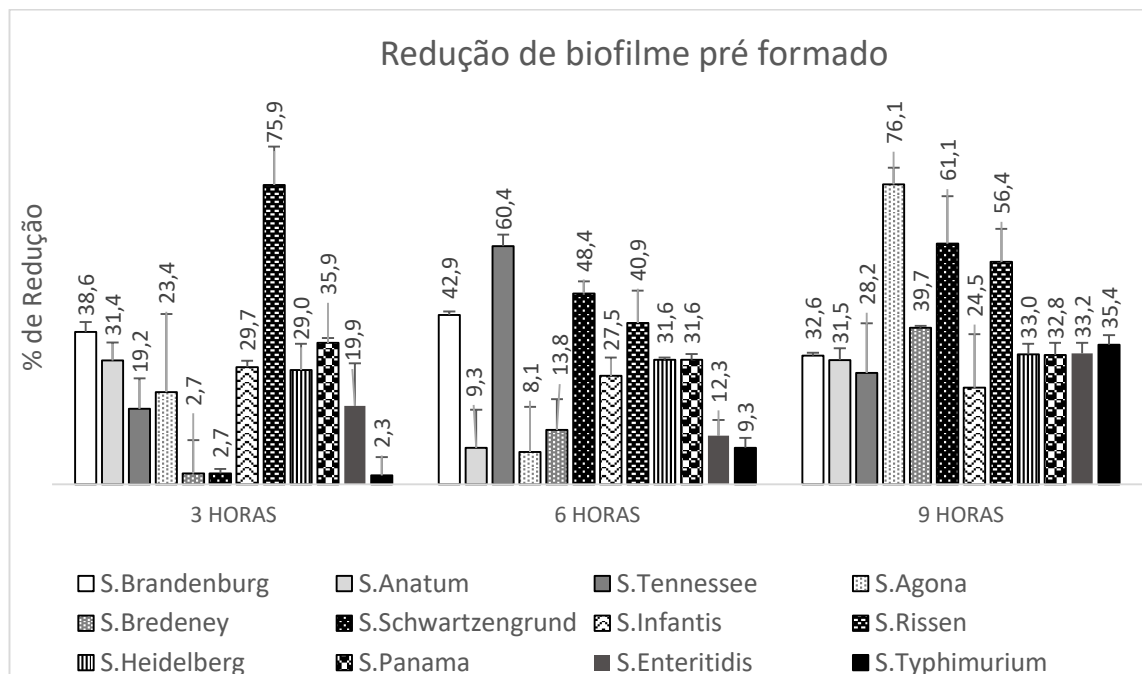
Os resultados encontrados para inibição de formação de biofilme utilizando o coquetel de bacteriófagos tiveram uma variação de 15% a 89%. Na média, inibiram a formação de biofilme em 50% das cepas. Além disso, as cepas de *Salmonella* Brandenburg, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram fortes formadoras de biofilmes e

tiveram inibições significativas 55%, 64% e 38% respectivamente. As cepas de *Salmonella* Infantis, *S. Heidelberg* e *S. Panamá*, além de serem fortes formadoras de biofilmes, foram caracterizadas como multiressistentes a antimicrobianos e mesmo assim o tratamento com o coquetel de fagos, conseguiu inibir a formação de biofilme em 34%, 89% e 77% respectivamente.

Vale ressaltar que as amostras de *Salmonella* Bredeney com inibição de 15% e Scwartzengrund com 42%, também foram caracterizadas como multirresistentes a antimicrobianos e não foram sensíveis a pelo menos um fago, quando testadas com cada fago individualmente.

Já para os resultados obtidos com a ação lítica dos bacteriófagos na redução do biofilme pré-formado, em diferentes tempos de incubação (3, 6 e 9 horas), demonstraram uma redução de até 76,10% quando comparados aos controles não tratados, conforme o gráfico 2

Gráfico 2 - Percentual de Redução de biofilme, pela ação lítica de coquetel de bacteriófagos com ação em 3, 6 e 9 horas.



No ensaio para verificação de redução de biofilme nos diferentes tempos de 3, 6 e 9 horas, os percentuais médios de redução de biofilme foram de 25,88% no tempo de 3

horas, 28,01% em 6 horas, sendo estatisticamente diferente com 40,38 % em 9 horas de tratamento.

Em 9 horas de tratamento, a redução de biofilme foi significativa para as amostras de *Salmonella* Agona (76,1%), *S. Schwartzengrund* (61,1%) e *S. Rissen* (56,4%), considerando que estas três amostras são moderadas formadoras de biofilmes e possuem os genes *AgfA* e *SpiA*, relacionados com agregação e formação de biofilmes. Além disso a amostra de *S. Schwartzengrund* não foi sensível a dois diferentes fagos quando testados individualmente, enquanto os demais fagos tiveram baixo EOP quando testados nessa amostra.

Em 6 horas de ação o coquetel de fagos conseguiu reduzir em 60,4% a formação de biofilme para a amostra de *S. Tennessee* quando comparada ao controle não tratado, lembrando que essa *Salmonella* foi classificada como multirresistente aos antimicrobianos e possui uma capacidade moderada de formação de biofilme.

Além disso observou-se que em 6 horas, a ação dos fagos não foi tão efetiva no controle do biofilme. Algumas hipóteses podem explicar a diminuição de ação neste período, como o surgimento de uma resistência momentânea, onde as bactérias podem ter se tornado resistentes aos fagos, em contrapartida, elas podem favorecer a seleção de bacteriófagos capazes de se adaptar a esta mutação, gerando uma vantagem seletiva e proporcionando o aumento do espectro de ação dos fagos (GARCIA *et al.*, 2017; COMEAU E KRISCH, 2005). Outra hipótese a ser considerada, está na liberação e acúmulo de DNA extracelular bacteriano, liberado no momento da lise mediada por bacteriófagos, tais substâncias seriam responsáveis pelo aumento dos níveis de biofilme no período (GARCIA *et al.*, 2017; GÖDEKE *et al.*, 2011).

No tempo de ação de 3 horas, o coquetel de fagos conseguiu reduzir o biofilme da amostra de *Salmonella* Rissen em 75,9%, nos demais sorovares houve uma fraca ação lítica, ou seja, a redução foi menor, provavelmente por ser um biofilme com 45 horas de formação, conseqüentemente um biofilme mais maduro e com mais EPS. Ressaltando que a ação dos fagos em células planctônicas é mais fácil do que em sésses, depois do biofilme formado a eliminação se torna um grande desafio (PIRES *et al.*, 2017), principalmente em um curto tempo de tratamento.

Para as amostras de *Salmonella* Infantis, *S. Heidelberg*, *S. Panama* e *S. Enteritidis* não houve diferença estatística no percentual de redução de biofilme nos diferentes tempos de 3, 6 e 9 horas.

Estima-se que a lise bacteriana ocorre cerca de 25 minutos após a infecção fágica e assim ocorrem novos ciclos líticos a partir da progênie dos fagos (MADIGAM *et al.*, 2010). Em nosso estudo observamos ação do fago em um tempo de contato reduzido de 3 horas, o que é relevante para bactérias patogênicas como *Salmonella*, que possuem tempo rápido de geração e longa permanência no ambiente e nas superfícies de equipamentos de processamento de alimentos (BENSINK, 1979; NESSE *et al.*, 2005; IIBUCHI *et al.*, 2010).

Nossos resultados demonstram maior percentual de redução na inibição da adesão de *Salmonella* do que sobre o biofilme já formado, indicando que a técnica de condicionamento de superfícies poderia ser utilizada na prevenção da formação dos biofilmes. Sabe-se que a fixação é o passo inicial para as bactérias colonizarem uma nova superfície, nesta etapa a adesão irreversível da população bacteriana ainda não foi formada, e as células bacterianas podem se desprender da superfície e retornar ao estilo de vida planctônico (COSTERTON, 1995; SREY *et al.*, 2013). Sendo assim, a aplicação de bacteriófagos na fase de adesão inicial é mais eficaz do que sobre biofilmes desenvolvidos e protegidos por uma estrutura complexa e resistente (KINLEY, 2009; HERINGA *et al.*, 2010; KELLY *et al.*; 2012; GONG & JIANG, 2017).

Em estudo realizado por Webber, 2020, utilizando amostras de *Salmonella* Heidelberg, também encontraram resultados semelhantes quando utilizado pool de fagos na prevenção de formação de biofilme, com reduções de até 83,4%. Já para a remoção de biofilme pré-formados, obteve reduções de até 64%. Esse estudo corrobora confirmando que a ação do fago na prevenção da formação do biofilme é melhor do que quando utilizado no biofilme pré-formado.

Islam *et al.* (2019), utilizaram um coquetel contendo 3 diferentes fagos líticos, da família Siphoviridae, para controle de biofilme de *Salmonella* spp. em microplacas de 96 poços e em superfície de aço inoxidável. Obtiveram reduções de 44% a 63% no ensaio utilizando microplacas e reduções de 5,23 a 6,42 log<sub>10</sub> na superfície de aço inoxidável. Demonstrando que o coquetel utilizado pode ser considerado para controle biológico de biofilmes formados por *Salmonella*.

Darch *et al.* (2017) em um estudo in vitro, com *Pseudomonas aeruginosa*, os fagos foram capazes de prevenir a formação de biofilmes quando adicionados simultaneamente com o inóculo bacteriano, mas quando testados para remoção de biofilme, foram incapazes de erradicar biofilmes já estabelecidos.

Outros ensaios demonstram que os fagos foram eficazes na redução de biofilmes de *Salmonella* tanto na etapa de fixação, como na remoção de biofilmes, sendo capazes de prevenir a formação de biofilme até 90%, reduzindo o risco de um novo ciclo de produção de células patogênicas (GONG & JIANG, 2017).

Garcia *et al.* (2017) citam que biofilmes formados por *Salmonella* em superfícies de vidro foram resistentes a 6 h de tratamento com o *pool* de fagos, mas após 9 h de ação os fagos tiveram ação lítica e reduziram o biofilme. Corroborando com nossos achados, com 9 h houve maiores porcentagens de redução no biofilme pré-formado. Vale ressaltar que o fago já demonstrou reduções mesmo em curto tempo de contato.

Andreatti *et al.* (2007), avaliaram a ação dos bacteriófagos (CB4Ø) isolados de ambiente avícola e (WT45Ø) de uma estação de tratamento de esgoto, em reduzir *S. Enteritidis in vitro*. Eles observaram que os bacteriófagos CB4Ø e WT45Ø reduziram as amostras de *Salmonella* em 1,5 a 5 logs, respectivamente. Entretanto, após 6h de tratamento o fago CB4Ø não foi capaz de reduzir as bactérias, enquanto que o WT45Ø reduziu em mais de 6 logs.

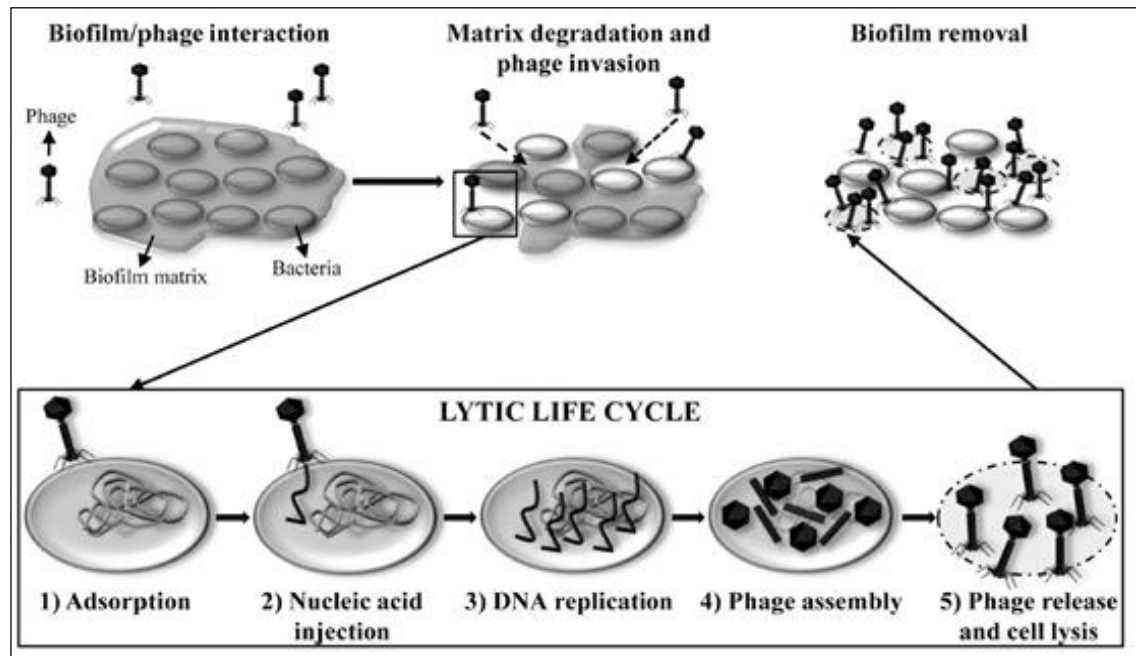
Outros estudos também citam o biocontrole usando o *pool* de fagos, com capacidade de reduções na adesão inicial e no biofilme pré-formado em diferentes bactérias patogênicas, incluindo *Salmonella* spp. (WOOLSTON *et al.*; 2013; HOSSEINIDOUST *et al.* 2013; SHARMA *et al.*, 2015; BAO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016).

Sabe-se que o biofilme formado pela *Salmonella* spp. é altamente hidrofóbico com células compactadas em uma matriz rígida e densa, o que dificulta muito a ação dos bacteriófagos (CERCA, 2012). Na interação entre fagos e biofilmes existe uma limitação que pode estar associada a diferentes fatores como, a densidade da matriz de substância polimérica (EPS) que limita a difusão do fago, o número de fagos e suas hospedeiras necessárias para permitir a sua replicação, bactérias mutantes resistentes (BIM), o pH e a atividade em um substrato sólido (Figura 10) (ATTERBURY *et al.*, 2007; FLEMMING & WINGENDER, 2010; GUTIÉRREZ *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2017).

Os fagos precisam acessar a bactéria hospedeira para se ligar ao receptor, com isso a difusão do fago depende também da densidade do biofilme (HU *et al.*, 2010). Neste estudo, os sorovares selecionados, apresentam diferentes perfis de formação de biofilme, sendo que 50% foi fortemente e 50% moderadamente formador de biofilme em superfície

de poliestireno, mostrando a dificuldade que os fagos encontram ao tentar se ligar aos receptores da bactéria.

Figura 10 - Interação fago e biofilme



Fonte: GUTIÉRREZ *et al.* (2016).

Na etapa de adsorção do fago primeiro ocorre interações reversíveis entre elementos específicos do bacteriófago e do hospedeiro, e logo em seguida, uma ligação irreversível. Ou seja, o processo de ligação do fago na célula hospedeira ocorre por uma combinação de fatores, como o modo de ação do fago, fisiologia da célula hospedeira, difusão física, interações bioquímicas da superfície e alterações conformacionais induzidas por proteínas receptoras presentes em cada fago, por exemplo a proteína receptora descrita do fago P22 é a *gp9* (MILETIC *et al.*, 2016). O fago T7 com ação na hospedeira *E. coli* possui 3 proteínas receptoras, *gp14*, *gp15* e a *gp16* que são responsáveis pela ligação na célula hospedeira (HU *et al.*, 2013). Vale ressaltar que uma cinética de adsorção da maioria dos bacteriófagos não foi ainda descrita na literatura, isso devido a diversidade de fagos presente na natureza.

A fim de minimizar essa limitação na interação fago e biofilme, alguns pesquisadores sugerem o uso de combinações sinérgicas (CHAN *et al.*, 2013). Cui *et al.* (2018), utilizaram combinação sinérgica de fagos com plasma de nitrogênio (CNP) na erradicação de biofilmes de *E. coli* O157: H7 em vegetais. Obtiveram reduções expressivas na contagem de células viáveis de *E. coli* O157: H7. Outras combinações já

foram associadas, como o uso de técnicas antimicrobianas combinadas, como luz UV e fagos, que já foram testadas e podem ser usadas em ambientes industriais para melhorar o controle de *Salmonella* no processamento de carnes (YEH *et al.*, 2018).

Chaudhry *et al.* (2017), realizaram um estudo para controle de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando fagos e antibióticoterapia. Destacaram que quando utilizaram somente fagos ou somente antibióticos, os tratamentos mostraram sucesso restrito. No entanto quando combinaram esses tratamentos houve uma sinergia e a eficiência foi aumentada pelo pré-tratamento utilizando fago. Isso foi sugerido em função dos fagos removerem as células bacterianas periféricas, aumentando as chances de tratamento com antibióticos. Outra hipótese sugerida é que a eficiência dos fagos é maior antes do tratamento com antibióticos, quanto maior o tamanho da população bacteriana, melhor a multiplicação de fago. Além disso, Chaudhry *et al.* (2017), encontraram um desenvolvimento reduzido de resistência aos antibióticos ao combinar os agentes terapêuticos.

Os bacteriófagos de ciclo lítico expressam duas proteínas, a holina e a endolisinas (enzimas proteolíticas) (MADIGAM *et al.*, 2010). Com isso outra proposta de combinações sinérgicas é o uso de proteínas com atividade lítica, as endolisinas isoladas são alternativa antimicrobiana vantajosa pois até o momento não foi descrito nenhuma bactéria resistente a proteínas líticas de fago (RODRÍGUEZ-RUBIO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2017; GRAY *et al.*, 2018), diferente do que já ocorre para os bacteriófagos.

Alguns estudos publicados, descrevem as bactérias mutantes insensíveis a bacteriófagos (BIM), onde utilizam mecanismos de resistência à infecção fágica, através da ação de enzimas de restrição que degradam o DNA/RNA do fago assim que ele é injetado na célula hospedeira, ou são capazes de bloquear os receptores no momento da adsorção prevenindo a injeção do material genético, além de produzir matriz extracelular e inibidores competentes (LABRIE *et al.*, 2010; LEKUNBERRI *et al.*, 2017). Frente a essa questão de resistência bacteriana aos fagos, vale enfatizar que ao contrário dos agentes quimioterápicos/antimicrobianos sintéticos, os bacteriófagos são entidades biológicas vivas que evoluem constantemente para contornar as defesas dos seus hospedeiros, já que são totalmente dependentes da maquinaria da bactéria.

Nossa pesquisa demonstrou que os sorovares testados foram capazes de formar biofilmes, assim como apresentaram multirresistência a antimicrobiano e mesmo assim sofreram ação lítica dos bacteriófagos. Também observamos que a ação dos fagos na

prevenção da formação do biofilme é mais eficiente do que a ação dos fagos no biofilme pré-formado. Assim conclui-se que o uso do *pool* de bacteriófagos no condicionamento de superfícies é uma alternativa no controle de biofilme de *Salmonella*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescente número de bactérias resistentes a antibióticos e a variedade de isolados de *Salmonella enterica* identificadas em surtos de DTA, na indústria avícola, assim como em toda a cadeia produtiva, nos levou a estudar alternativas ao uso de antimicrobianos que elimine ou reduza a carga bacteriana desses patógenos, a fim de garantir a segurança alimentar.

Os resultados obtidos denotam grande relevância devido à possibilidade de utilização destes bacteriófagos como possíveis agentes no biocontrole de *Salmonella enterica*. Esse estudo contribuiu para uma melhor compreensão da ação destes fagos, assim como sua aplicação tanto em células na forma planctônica como em biofilmes. A utilização de bacteriófagos deve ser considerada, pois poderá ser uma boa alternativa aos tradicionais agentes químicos, uma vez que demonstraram eficiência de plaqueamento (EOP) mesmo quando realizada a sua diluição.

Como perspectivas para ampliar o uso de bacteriófagos, mais pesquisas são necessárias para provar a eficácia e segurança do biocontrole como alternativa antimicrobiana no processamento de alimentos, como por exemplo requererem algum tipo de proteção (por exemplo, microencapsulação) para permanecer viáveis sob várias condições fisiológicas e de fabricação, assim como estabilidade para reaplicação dos fagos em intervalos de tempos no processamento de alimentos, a fim de garantir maior efetividade do biocontrole nas etapas de higienização (ZHANG *et al.*, 2015).

Embora a indústria de alimentos venha evoluindo constantemente, o risco de contaminação durante o processamento de alimentos continua alto, e a presença de biofilme é uma das principais causas de contaminação. O biocontrole com uso de bacteriófagos ainda precisa de mais estudos, a fim de garantir que esta seja uma ferramenta adicional em programas de controle de qualidade dos alimentos. Além disso, no Brasil ainda temos outro desafio referente a sua utilização, pois esbarramos na legislação para liberação de uso de fagos como agentes controladores de patógenos em plantas industriais, em superfícies que entram em contato com o alimento e no ambiente.



## 7 CONCLUSÕES

- Todos os sorovares de *Salmonella* testados para presença de profago, foram avaliadas e não foram encontradas áreas de lise.
- Os doze sorovares utilizados no estudo, possuem capacidade de formar biofilmes em placas de poliestireno a 36° C, apresentando diferentes graus de formação, classificados como grau moderado e fortemente formador de biofilme.
- Os bacteriófagos sequenciados, são 3 novos fagos líticos
- No ensaio de avaliação da ação dos bacteriófagos contra *Salmonella enterica* pelo método de difusão em ágar, observou-se que 75% das amostras de *Salmonella* sofreram lise pelos sete fagos testados. Outros 16,7% sofreram lise por seis fagos testados e o restante 8,3% sofreram lise por cinco dos sete fagos testados, demonstrando a ação lítica.
- No ensaio de eficiência de plaqueamento, pelo menos cinco fagos tiveram ação contra as cepas de *Salmonella*. Dentre os fagos com melhor desempenho, estão os fagos UPF\_BP3, 10:2 e UPF\_BP6 que demonstraram alta eficiência em mais de 75% das *Salmonellas* submetidas. Apenas dois dos fagos avaliados não tiveram ação contra uma ou mais cepas testadas, são os fagos UPF\_BP4 e UPF\_BP5.
- Quando avaliada a ação e eficiência do coquetel de bacteriófagos contra *Salmonella enterica* pelo método de difusão em ágar, os dados demonstraram que utilizando o coquetel, houve uma alta eficiência de plaqueamento 83,4% e que em somente 16,6% a eficiência de plaqueamento foi baixa.
- Os resultados encontrados para inibição na formação de biofilme utilizando o coquetel de bacteriófagos para condicionar a superfície, apresentaram redução de até 89% e para remoção de biofilme pré-formados, o melhor resultado foi no tempo de 9 horas de ação com 76,1% de remoção do biofilme.

Com os resultados obtidos neste estudo, concluímos que os fagos selecionados poderão ser utilizados para remover biofilmes no estado inicial de formação e também para proteger as superfícies de uma colonização.

## 8 REFERÊNCIAS

ABEDON, S.T.; KUHL, S.J.; BLASDEL, B.G.; KUTTER, E.M. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**. vol. 1, no. 2, pp. 66–85, 2011.

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

ABEDON, S.T.; ABEDON, C.T.; THOMAS, A.; MAZURE, H. Bacteriophage prehistory Is or is not Hankin, 1896, a phage reference? **Bacteriophage**, v1, p 174-178; May/June 2011. Landes Bioscience Bacteriophage v 1.

ABEDON, S.T. Bacteriophage Ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses. Nova York: Cambridge University Press, 2008. 508p.

ABHILASH, M.; VIDYA, A. G.; JAGADEVI, T. Bacteriophage therapy: A war against antibiotic resistant bacteria. **The International Journal of Alternative Medicine**, 7(1), p. 1, 2009.

ABPA, **Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2017**. Disponível em:<[http://abpa.br.com.br/storage/files/3678c\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web\\_reduzido.pdf](http://abpa.br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf)>. Acesso em abril. de 2018.

ACKERMANN, H. W.; ABEDON, S.T. **The bacteriophage**. Oxford University press. Second Edition. Cap.1, p 9. 2006

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

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

AGARWAL, R.K., SINGH, S., BHILEGAONKAR, K.N.; SINGH, V.P. Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. **Int. Food Res. J.** v. 8, p. 1493-1498, 2011.

ÁLVAREZ, N.M. Virulência, resistência y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. **Tese de Doutorado**: Oviedo: Universidad de Oviedo, Departamento de Biología Funcional, 2007.

ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 33, n. 10, p. 692–699, 2015.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.** Oct 5; 215(3):403-10, 1990.

ANDREATTI FILHO, R.L.; HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; GAONA, G.; WOLFENDEN, A.D.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. Ability of Bacteriophages Isolated

from Different Sources to Reduce *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis In Vitro and In Vivo. **Poultry Science**, 2007 86:1904–1909.

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

APOSTOLIDIS, E. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. **International Journal of Food Microbiology**. v.128, n.2, p.317–324. 2008.

ARNDT, D.; GRANT, J.R.; MARCU, A.; SAJED, T.; PON, A.; LIANG, Y.; WISHART, D. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic Acids Res.** v. 8;44, p. 16-21, 2016. doi: 10.1093/nar/gkw387

BALTIMORE, DAVID. Expression of Animal Virus Genomes. **Bacteriological Reviews**. Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts p. 235-241 Vol. 35, No. 3, Sep. 1971 American Society for Microbiology Printed in U.S.A.

BAO, H. *et al.* Biocontrol of *Salmonella* Enteritidis in foods using bacteriophages. **Viruses**, v.7, n. 8, p. 4836–4853, 2015.

BARDINA, C.; COLOM, J.; SPRICIGO, D.A.; OTERO, J.; SÁNCHEZ-OSUNA, M.; CORTÉS, P.; LLAGOSTERA, M. Genomics of Three New Bacteriophages Useful in the Biocontrol of *Salmonella*. *Frontiers Microbiol.*, 2016. doi.org/10.3389/fmicb.2016.00545

BARROW, P.A.; JONES, M.A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO (Ed) (2010) Pathogenesis of bacterial infections in animals, 4 ed. Ames: Blackwell Publishing. P.231-266.

BÄUMLER, A.J.; GILDE, A.J.; TSOLIS, R.M.; VAN DER VELDEN, W.M.; AHMER, B.M.M.; HEFFRON, F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operon during evolution of *Salmonella* serotypes. **Journal of Bacteriology**. v.179, n.2, p.317-322, 1997.

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

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

BEER, D.; STOODLEY, P.; ROE, F.; LEWANDOWSKI, Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. **Biotechnol Bioeng**. v.43, p.1131-1138, 1994.

BENSINK, J. *Salmonella* contamination of meat and bone meal. **Australian Veterinary Journal**, v.55, p. 13–15, 1979.

BIOCHIMPHARM. **Products and phage therapy.** Disponível em: <<http://biochimpharm.ge/en/applications/>>. Acesso em 09 Janeiro 2019.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; BORSOI, A.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, V.P. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v.33, n.12, p.1416-1422, 2013.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; SOUZA, S.N.; MENEZES, R.; TONDO, E.C.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** 38 (1):71-76. 2018

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q., SOUZA, S.N.; SALLE, C.T.; MORAES, H.L.; NASCIMENTO, V.P. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Salmonella enterica* serotypes isolated from poultry sources in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science.** 2019; 21:eRBCA-2019-0827.

BORGES, K.A. Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Salmonella enteritidis* através da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Dissertação de Mestrado.** Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

BOURION, F.; CERF, O. Disinfection efficacy against pure-culture and mixed population biofilms of *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, teflon(r) and rubber. **Sci Aliments** v.16, p. 151-166, 1996.

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

BRASIL. 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. Acesso em 20 de março 2019.

BRASIL. Ministério da agricultura pecuária e abastecimentos- **MAPA.** Instrução Normativa nº 30 de 9 de agosto de 2017. Estabelece procedimentos para submissão de propostas, avaliação, validação e implementações de inovação tecnológicas a serem empregadas em qualquer etapa da fabricação de produtos de origem animal em estabelecimentos registrados. Nº 156 de 15 de agosto de 2017. Brasília, DF, 2017. Seção 1; p11.

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>. Acesso em 20 de março 2019.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2016. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta---o-Surtos-DTA-2016.pdf>> Acesso em: 06 fevereiro 2019.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: [http://saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_prevencao\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf). Acesso em: 25 de fevereiro de 2018.

BRAZ, F.; OLIVEIRA, M.; LIMA, L.M.; BATISTA, M.E.; BENEVINA, M.; NUNES, M.V.T.; OLIVEIRA, B.M. Indiscriminate use of antibiotics and antimicrobial resistance: a reflection on the treatment of hospital Infections. **Revista Interdisciplinar NOVAFAP**. Teresina. v.4, n.4, p.72-77, 2011.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, Georgia, v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.

BESEMER, J.; LOMSADZE, A.; BORODOVSKY, M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. **Nucleic Acids Res.** Jun 15;29(12):2607-18, 2001.

BYL, C. V.; KROPINSKI, A. M. Sequence of the Genome of *Salmonella* Bacteriophage P22. **Journal of Bacteriology**. v.182, p.6472-6481 Nov. 2000.

CAMPBELL, A.M.: Bacteriophages. In *Fields Virology*. Edited by Fields BN, KnipeDMand Howley PM. New York: Raven Press; 1996:587-607.

CARDONA-CASTRO, N.; RESTREPO-PINEDA, E.; CORREA-OCHOA, M. Detection of *hila* gene sequences in serovars of *Salmonella enteria* subspecies Enterica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002 DEC; 97(8) p. 1153-1156.

CARDOSO-TOSET, F.; LUQUE, I.; MORALES-PARTERA, A.; GALÁN-RELAÑO, A.; BARRERO-DOMÍNGUEZ, B.; HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-LAGUNA, J. Survival of *Streptococcus suis*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Trueperella pyogenes* in dry cured Iberian pork shoulders and loins. **Food Microbiol.** v.61, p.66–71, 2017.

CARLTON, R.M.: Phage Therapy: Past History and Future Prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 1999, 47: 267-274

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report, 2013.** 2013. Disponível em: <[www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/salmonellaannual-report-2013-508c.pdf](http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/salmonellaannual-report-2013-508c.pdf)>, 06 de janeiro 2019.

CDC - Center for Disease Control. **Making Food Safer to Eat: Reducing contamination from the farm to the table.** 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety>>. Acesso em 07 fevereiro 2019.

CDC - Center for Disease Control. *Salmonella*. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/>>. Acesso em 14 de fevereiro 2019.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Salmonella surveillance*: annual summary, 2006. U. S. Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, GA, 2008.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Reports Selected Salmonella Outbreak Investigations. 2018.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html> Acesso em: 13 de fevereiro de 2019.

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

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

CHAN B.K.; ABEDON S.T; LOC-CARRILLO, C. Phage cocktails and the future of phage therapy. **Future Microbiol.** 8:769-783, 2013.

CHAN, B. K. E ABEDON, S. T. Phage therapy pharmacology phage cocktails. *Advances in Applied Microbiology*, 78, pp. 1-23, 2012.

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

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v.61, p.1636-1643, 1998.

CHIBANI-CHENNOUFI, S.; SIDOTI, J.; BRUTTIN, A.; KUTTER, E.; SARKER, S.; BRU'SSOW, H. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of Escherichia coli phages: implications for phage therapy. **Antimicrob Agents Chemother** v. 48(7), p.2558-2569, 2004.

CHOUSALKER, K.; GAST, R.; MARTELLI, F.; SOBOLEVA, T.; PANDE, V. Evaluation of Management of Laying Hens and Housing Systems to Control Salmonella and Other Pathogenic Infections, Egg Contamination, and Product Quality. Website USDA. Disponível em: <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=336971>. Acesso em 25 de fevereiro de 2019.

CLAVIJO, V., BAQUERO, D., HERNANDEZ, S., FARFAN, J. C., ARIAS, J., ARÉVALO, A.; VIVES-FLORES, M. Phage cocktail SalmoFREE® reduces Salmonella on a commercial broiler farm. **Poultry Science**. 2019. doi:10.3382/ps/pez251

COLLINSON, S.K.; EMODY, L.; TRUST, T.J.; KAY, W.W. Thin aggregative fimbriae from Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v.174, n.13, p.4490–4495, 1992.

COMEAU, A.M., KRISCH, H.M. War is peace - Dispatches from the bacterial and phage killing fields. **Curr. Opin. Microbiol.** V. 8, p. 488–494. 2005.doi:10.1016/j.mib.2005.06.004

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

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilmes. **Annual Review of Microbiology**. v.49. p.711-745, 1995.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**. v.284, p.1318-1322, 1999.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J.: **Bacterial biofilms in nature and disease**. *Annu Rev Microbiol* 1987, **41**: 435-464.

COSTERTON, J.W.: **The biofilm primer**. Edited by Costerton WJ. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2007.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D. CALDWELL, D.; KORBER, D.; JAMES, G.: **Biofilms, the customized microniche**. *J Bacteriol* 1994, 176: 2137-2142.

CURTIN, J.J.; DONLAN, R.M.: Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006, 50: 1268-1275.

DARCH, S.E.; KASPER N. K.; ABBOTT, E.A.; BJARNSHOLT, T.; BULL, J.J.; WHITELEY, M. Phage inhibit pathogen dissemination by targeting bacterial migrants in a chronic infection model. *mBio* 8, 1–15, 2017.

DAVEY, M. E.; O´TOOLE, G. A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microb and Molec Biol Rev*. **64**:847-867.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews/ Drug Discovery**. v.2, p. 114-122. 2003.

DELCHER, A.L.; BRATKE, K.A.; POWERS, E.C.; SALZBERG, S.L. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. **Bioinformatics**. Mar 15, 23(6): 673–679, 2007.

D'HERELLE, M. F.; ROUX, M. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. Note by M. F. d'Herelle, presented by M. Roux. Comptes Rendus Academie des Sciences 1917. **Journal Bacteriophage**, v. 1. 2011.

DIVEK, V.T.N.; KUMAR, V.; ANUP, K.J. Antibiotic-Resistant *Salmonella* in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. **Journal Foods** **2018**, 7, 167; doi:10.3390/foods7100167. Disponível em: <https://www.mdpi.com/journal/foods>. Acesso em 13 de fevereiro de 2019.

DOIJAD, S.P. *et al.* Biofilm-Forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different Sources. **PLoS ONE**. 10(9): e0137046.doi:10.1371/journal.pone.0137046. 2015.

DONOVAN, D.M.; LARDEO, M.; FOSTER-FREY, J. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. **FEMS Microbiol Lett**. v.265, p.133–139, 2006.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, n.2, p.167-193, 2002.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002 Sep; 8(9 p. 881-890.

DOOLITTLE, M.M.; COONEY, J.J.; CALDWELL, D.E.: Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. *Journal of Industrial Microbiology* 1996, 16: 331-341

EDGAR, R.C.; HAAS, B.J.; CLEMENTE, J.C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**. v.15;27, 2011.doi: 10.1093/bioinformatics/btr381.

EFSA, European Food Safety Authority. **Salmonella**. 2017. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>>. Acesso em: 11 janeiro 2019.

ELVERS, K.E.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Biofilms and biofouling. **Encyclop of Microbiol**. v.1, p.478-485. 2000.

ELIAVA - **Institute Eliava** © 2010, Eliava Institute, All rights Reserved. Disponível em: <<http://www.eliava-institute.org/>>. Acesso em 11 de janeiro de 2018.

ERUTEYA, O.; ODUNFA, S. Effects of Ethanol and Aqueous Extracts of Six Indigenous Spices on *Listeria monocytogenes* in Meat. **British Microbiology Research Journal**. v.16, n.1., p.1–11. 2016.

FAN, J.; ZENG, Z.; MAI, K.; YANG, Y.; FENG, .; BAI, Y.; SUN, B.; XIE, Q.; TONG, Y.; MA, J. Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1. **Veterinary Microbiology** v.191, p.65–71. 2016



FARRP - Food Allergy Research and Resource Program. Institute of Agriculture and Natural Resources. University of Nebraska–Lincoln. Acesso do relatório em: 03/10/2020. <http://www.allergenonline.org/search36.php>

FDA - Food and Drug Administration. **Antimicrobial resistance: a growing threat, 2009.** from <<http://www.fda.gov>>.

FIELDS, P. *Salmonella* serotyping. In: 10th Annual Pulsenet Update Meeting. **National Salmonella Reference Lab – CDC.** 2006.

FISCHETTI, V.A. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control gram-positive pathogens. **Int. J. Med. Microbiol.** v.300, p.357–362, 2010.

FLEMMING H.C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; RICE, A. S.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol.** v.14, p.563-575, 2016.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol.** v.8, p.623-633, 2010.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M. Food animal associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science,** v.86, n.14, p.173-187, 2008.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2013.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration & Biodegradation,** v. 51, p. 265-269, 2003.

FRUCIANO, D.E.; BOURNE, S. Phage as an antimicrobial agent: d’Herelle’s heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. **Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.** v.18, n.1, pp.19–26, 2007.

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

GAL-MOR, O. *Salmonella enterica*. **The Infectious Disease Research Laboratory – Sheba Medical Center, Israel.** (2014). Disponível em: <http://eng.sheba.co.il>>. Acesso em 20 fevereiro 2019..

GARCIA, K.C.O.D.; CORRÊA, I.M.O.; PEREIRA, L.Q. SILVA, T.M.; MIONI, M.S.R.; IZIDORO, A.C.M.; BASTOS, I.H.V.; GONÇALVES, G.A.M.; OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L. Bacteriophage use to control *Salmonella* biofilm on surfaces present in chicken slaughterhouses. **Poultry Science** v. 96, p. 3392–3398, 2017. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex124>

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

GEORGE ELIAVA INSTITUTE OF BACTERIOPHAGE, MICROBIOLOGY AND VIROLOGY.” [Online]. Available: <http://www.eliava-institute.org/?rid=2>. Acesso: 20 de maio 2019.

GHIGO, J.M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*. 2001; 412 p. 442-445.

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

GOLDING, I. “Decision making in living cells: lessons from a simple system.” *Annu. Rev. Biophys*, v.40, pp.63–80, 2011.

GÖDEKE, J., PAUL, K., LASSAK, J., THORMANN, K.M. Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *The ISME Journal*, v. 5, p. 613–626. 2011. doi:10.1038/ismej.2010.153

GONÇALVES, G.A.M.; SUEHIRO, B.Y.B.; COSTA, L.F.Z.P.; PANTOJA, J.C.F.; ANDREATTI FILHO, R.L. Análise de critérios para utilização na seleção de bacteriófagos líticos com potencial para utilização médica: Dados preliminares. *Revista Veterinária e Zootecnia*. v.22, n. 1, p.72-82, 2015.

GONG, C.; JIANG, X. Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces. *Poultry Science*. 0:1–11, 2017.

GRANT, J.R.; STOTHARD, P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res*. V.1;36(Web Server issue):W181-4, 2008. doi: 10.1093/nar/gkn179

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella***. France: Institute Pasteur, 2007.

GROISMAN, E.A.; OCHMAN, H. Pathogenicity Islands: Bacterial Evolution in Quantum Leaps. *Cell*, v.87, p.791–794, 1996.

GUILHELMELLI, F.; VILELA, N.; ALBUQUERQUE, P., DERENGOWSKI, L. S.; PEREIRA, I. S.; KYAW, C. M. Antibiotic development challenges. The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 1–12, 2013.

GUO, X.; CHEN, J.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from h1a. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.12, p.5248-5252. 2000.

GUTIÉRREZ, D.; VANDENHEUVEL, D.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A.; LAVIGNE, R.; GARCIA, P. Two phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono- and dual-species Staphylococcal biofilms. *Appl Environ Microbiol*. v.81, p.3336-3348. 2015.

GUTIÉRREZ, D.; RUAS-MADIEDO, P.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, P. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. **PLoS One**. 2014.

GYLES, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Animal Health Research Reviews**, v.9, n.2, p.149-158, 2008.

HALD, T.; VOSE, D.; WEGENER, H.C.; KOUPEEV, T. A Bayesian approach to quantify the contribution of animal-food sources to human salmonellosis. *Risk Anal.* 2004. (24): 225-269.

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

HAGENS, S. E LOESSNER, M. J. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 11(1), pp. 58-68, 2010.

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

HANSEN, M.F.; SVENNINGSEN, S.L.; RØDER, H.L.; MIDDELBOE, M.; BURMØLLE, M. Big Impact of the Tiny: Bacteriophage–Bacteria Interactions in Biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 9, 2019.

HARRISON, J.J.; TURNER, R.J., CERI, H.: Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 2005, 7: p. 981-994

HAYWARD, M.R.; JANSEN, V.A.A.; WOODWARD, M.J. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka, two prevalent serovars associated with different livestock species in the UK. **BMC Genomics**. v.14, n.1, p.365, 2013.

HERINGA, S.D. *et al.* Use of a mixture of bacteriophages for biological control of *Salmonella enterica* strains in compost. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.5327–5332, 2010

HERMOSO, J. A.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA, P. Taking aim on bacterial pathogens: From phage therapy to enzybiotics. **Current Opinion in Microbiology**, 10(5), pp. 461-472, 2007.

HYMAN, P.; ABEDON, S.T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. **Advances in Applied Microbiology**, v.70, p. 217–248, 2010.

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

HOOTON, S.P.T., ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, I.F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 157-163. 2011. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.015

HOSSEINIDOUST, Z.; N. TUFENKJI.; T. G. VAN DE VEN. Formation of biofilms under phage predation: considerations concerning a biofilm increase. **Biofouling**, v.9, p.457–68. 2013.

HU, J.; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. Diffusion properties of bacteriophages through agarose gel membrane. **Biotechnol Prog.** v.26, p.1213-1221. 2010.

IIBUCHI, R., Y. *et al.* Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. **Journal of Food Protection**, v.73, p.1506–1510, 2010.

INTERPRO - Protein Sequence Analysis e Classification.  
Disponível em: [www.ebi.ac.uk/interpro](http://www.ebi.ac.uk/interpro)

ISLAM, M.D.S.; ZHOU, Y.; LIANG, L.; NIME, I.; LIU, K.; YAN, T.; WANG, X.; LI, J. Application of a Phage Cocktail for Control of *Salmonella* in Foods and Reducing Biofilms Md. Sharifull. **Viruses**, v.11, n. 841, 2019. doi:10.3390/v11090841.

JONG, H.K. *et al.* Host-pathogen interactions in invasive Salmonellosis. **PLOS Pathogens**, v.8, n.10, p.1-5, 2012.

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponível em: [www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)

KLAUSEN, M.; AES-JORGENSEN, A.; MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T.: Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 2003, 50: 61-68.

KLUMPP, J.; FOUTS, D. E.; SOZHAMANNAN, S. Bacteriophage functional genomics and its role in bacterial pathogen detection. **Brief. Funct. Genomics** v.12, p. 354–365, 2013. doi: 10.1093/bfgp/elt009

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

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews. Microbiology*, v. 8, n. 6, p. 423–435, 2010.

KROPINSKI, A.M.; LAVIGNE, R.; SANTOS, S.B.; VILLEGAS, A. Genomic and Proteomic Characterization of the Broad-Host-Range *Salmonella* Phage PVP-SE1: Creation of a New Phage Genus. **Journal of virology**, p.11265–11273. 2011.

KROPINSKI, A. M.; SULAKVELIDZE, A.; KONCZY, P.; POPPE, C. *Salmonella* phages and prophages—genomics and practical aspects. **Methods Mol. Biol.** V. 394, p. 133–175, 2007. doi: 10.1007/978-1-59745-512-1\_9

KRYLOV, V.N.: Phagotherapy in terms of bacteriophage genetics: hopes, perspectives, safety, limitations. *Genetika* 2001, 37: 869-887.

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

KUTTER, E. Phage therapy: bacteriophages as natural, selflimiting antibiotics. **Textb Nat Med** v.1, p.1147–1161, 2005.

KUTTER, E.; DE VOS, D.; GVASALIA, G. et al. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 11(1), pp.69-86, 2010.

LABBATE, M.; QUECK, S.Y.; KOH, K.S.; RICE, S.A.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S.: Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. **J Bacteriol** 2004, **186**: 692-698.

LAPPIN-SCOTT, H.M.; COSTERTON, J.W. **Microbial biofilms**. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1995.

LEHMAN, S.M.; DONLAN, R.M. Bacteriophage-mediated control of a two-species biofilm formed by microorganisms causing catheter-associated urinary tract infections in an in vitro urinary catheter model. **Antimicrob Agents Chemother** v.59, n.3, p.1127-1137. 2015.

LEKUNBERRI I, SUBIRATS J, BORREGO C.M., BALCAZAR JL. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. **Environmental Pollution** v.220, p.981-984. 2017

LERTWORAPREECHA, M.; SUTTHIMUSIK, S.; TONTIKAPONG, K. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolated From Chicken, and Vegetables in Southern Thailand. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v.6, n.11, p.36-41. 2013.

LEVIN, B. R. E BULL, J. J. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. **Nature Reviews Microbiology**, 2(2), pp.166–173, 2004.

LIBBY, S.J.; HALSEY, T.A.; ALTIER, C., POTTER, J.; GYLES, C.L. *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F. SONGER, J.G.; THOEN, C.O. (Ed.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 3.ed. Blackwell Publishing, p.143-167. 2008.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. Estudos Avançados. Scielo. v.24, n.70. São Paulo, 2010.

LOC-CARRILLO, C.; ABEDON, S.T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, vol.1, n.2, pp.111–114. 2011.

LOESSNER, M.J. Bacteriophage endolysins—current state of research and applications. **Curr Opin Microbiol**, v.8, p.480–487. 2005.

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

LU, T.K.; COLLINS, J.J.: Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104: 11197-11202.

LU, T.K.; COLLINS, J.J. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. **Proc Natl Acad Sci** v.106(12), p.4629–4634, 2009.

LU, T.K.; KOERIS. M.S. The next generation of bacteriophage therapy. **Curr Opin Microbiol.** v.14, 2011 Aug 23.

MADIGAM, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK D.P. **Microbiologia de Brock**. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artemed; 2010.

MANDELLI, J.Z.A.; EHRHARDT, A.; MANTO, L.; BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; WEBBER, B.; RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R. Extended Spectrum Beta-Lactamase Production and Biofilm Formation in *Salmonella* Serovars Resistant to Antimicrobial Agents. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.21 n.2, p. 001-004. 2019.

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

MANIJEH, M.; MOHAMMAD, J.; ROHA, K.K. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on food contact surfaces. **Journal of Biological Science**. v.8, n.2, p.502-505. 2008.

MARCUS, S.L.; BRUMELL, J.H.; PFEIFER, C.G.; FINLAY, B.B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes Infect.** V. 2. p. 145–156. 2000.

MARQUES, C.S. Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. **Dissertação de mestrado**. Mestrado em Microbiologia Ciência e Tecnologia de Alimentos. Lavras: Universidade Federal de Lavras - UFLA; 2005.

MATSUZAKI, S.; RASHEL, M.; UCHIYAMA, J.; SAKURAI, S.; UJIHARA, T.; KURODA, M.; IKEUCHI, M.; TANI, T.; FUJIEDA, M.; WAKIGUCHI, H.; IMAI, S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. **J Infect Chemother** (2005) v.11, p. 211–219.

MAYER, G. Microbiologia e Imunologia. University of South Carolina School of Medicine. Capítulo Sete. Disponível em: [http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter\\_7\\_bp.htm](http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter_7_bp.htm). Acesso em 17 de janeiro 2019.

MILETIC, S. *et al.* A Plant-Produced Bacteriophage Tailspike Protein for the Control of Salmonella. **Frontiers in Plant Science**, v.6. 2016. doi:10.3389/fpls.2015.01221

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

MIRZAEI, M.K.; NILSSON, A.S. Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. **Plos One**, 2015.

MODI, S.R.; COLLINS, J.J.; RELMAN, D.A. Antibiotics and the gut microbiota. **J Clin Invest** v.124(10), p. 4212–4218, 2014.

MORALES-PARTERA, A.M.; CARDOSO-TOSET, F.; JURADO-MARTOS, F.; ASTORGA, R.J.; HUERTA, B.; LUQUE, I.; TARRADAS, C.; GÓMEZ-LAGUNA, J. Survival of selected foodborne pathogens on dry cured pork loins. **International Journal of Food Microbiology**. v. 258, p.68-72. 2017.

MOYE, Z D; WOOLSTON, J; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. **Viruses**, v. 19, n. 4, 2018.

MOTLAGH, A.M.; BHATTACHARJEE, A.S.; GOEL, R. Biofilm control with natural and genetically-modified phages. **World J Microbiol Biotechnol**. 2016

MURRAI, R.A.; LEE, C.A. Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that *Salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. *Infect. Immun.* 2000; 68 p.5050-5055.

NARMS - **Eucast - Integrated Report: 2014**. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric Bacteria.

NARMS - (National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria). **Human Isolates Final Report – 2013**. CDC. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. 2015. 81p.

NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, J.D.; RIBEIRO, A.R.; SANTOS, L.R. dos; CARDOSO, M.O.; PONTES, A.P.; SILVA, A.B. da; ROCHA, S.L.S. Identificação de sorovares de *Salmonella* em cortes e carcaças de frango. In: **Congresso brasileiro de microbiologia**, 1997, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...* Rio de Janeiro: 1997. p.287-287.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

NESSE, L.T. *et al.* Molecular epidemiology of *Salmonella* spp. Isolates from gulls, fish-meal factories, feed factories, animals and humans in Norway based on pulsed-field gel electrophoresis. **Epidemiology and Infection**, v. 133, p. 53–58, 2005.

O'FLAHERTY, S.; ROSS, R.P.; COFFEY, A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. Federation of European Microbiological Societies Microbiology, 33(4), pp. 801-819, 2009.

OLIVEIRA, F.A.; PASQUALOTTO, A.P.; SILVA, W.P.; TONDO, E.C. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. **Food Research International**, v.45, n.2, p.1000-1003. 2013.

OLSEN, N.M.C.; THIRAN, E.; HASLER, T.; VANZIELEGHEM, T.; BELIBASAKIS, G.N.; MAHILLON, J.; LOESSNER, M.J.; SCHMELCHER, M. Synergistic Removal of Static and Dynamic Staphylococcus aureus Biofilms by Combined Treatment with a Bacteriophage Endolysin and a Polysaccharide Depolymerase. **Viruses**, v. 10, 2018. doi:10.3390/v10080438

ORLOVA, E.V. Bacteriophage and Their Structural Organisation, in **Bacteriophages**, I. Kurtboke, Ed. 2012.

PACHECO, K.C.; DEL TORO, G.V.; MARTINEZ, F.R.; DURAN-PARAMO. Viability of *Lactobacillus delbrueckii* under human gastrointestinal conditions simulated *in vitro*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.5, p.37–42, 2010.

PARASION, S.; KWIATEK, M.; GRYKO, R.; MIZAK, L.; MALM, A. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. **Pol. J. Microbiol.** 63, 137–145. (2014).

PARRACHO, H. M.; BURROWES, B. H.; ENRIGHT, M. C. et al. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, 6, pp.279-286, 2012.

PEREIRA, C. *et al.* Bacteriophages with potential to inactivate *Salmonella* Typhimurium: Use of single phage suspensions and phage cocktails. **Virus Research**, v. 220, p. 179–192, 2016.

PERRY, M.B. Some Structural Aspects of the Antigenic O-Polysaccharide Components of Salmonella Somatic Lipopolysaccharides. **Biology os Salmonella**. v.245, p. 63-77, 1993. Disponível em: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-2854-8\\_8](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-2854-8_8). Acesso em 26 de fevereiro 2019.

PINTO, F.M.C., Alternativas aos antibióticos químicos convencionais: estado-da-arte. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacênticas, Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2013.

PIRES D.P.; MELO L.D.R.; VILAS BOAS D.; SILLANKORVA S.; AZEREDO J. Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm related infections. **Current Opinion in Microbiology**. v.39, p.48–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.004>. 2017.



PIRES, D. P.; OLIVEIRA, H.; MELO, L. D.; SILLANKORVA, S.; AZEREDO, J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 100, 2141–2151. doi: 10.1007/s00253-015-7247-0 (2016).

POTTKER, E.S.; WEBBER, B.; CIBULSKI, S.; ZANELLA, R.; GIRARDI, V.; NÚNCIO, A.S.P.; SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V.P.; RODRIGUES, L.B. Genomics and Phenotypical Characterization of Two New Lytic Bacteriophages for Biocontrol of *Salmonella entérica*. **Microbiology Research Journal International** 30(10): 93-105, 2020; Article no. MRJI.64596 ISSN: 2456-7043.

POTTKER, E.S. Genômica e Caracterização Fenotípica De Bacteriófagos Líticos Para Biocontrole De *Salmonella Enterica*. **Dissertação de Mestrado**. Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, 2016.

PUFFAL, J. Investigação de genes de resistência a antimicrobianos e da capacidade de formação de biofilme em isolados de *Salmonella Enteritidis*. 2013. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

RAO, S. **Antibiotic Susceptibility Testing**. Disponível em: <<http://www.microrao.com>>. Acesso em Dezembro 2018.

REARDON, S. Resistance to last-ditch antibiotic has spread farther than anticipated. **Nature**. doi:10.1038/nature.2017.22140. 2017

REARDON, S. Modified viruses deliver death to antibiotic resistant bacteria. **Nature**. doi:10.1038/nature.2017.22173, 2017.

RHOADS, D. D.; WOLCOTT, R. D.; KUSKOWSKI, M. A. et al. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. **Journal of Wound Care**, 18(6), pp.237-238, 2009.

RICHARD, H.A.; GILBERT, P.; HIGH, N.J.; KOLENBRANDER, P.E.; HANDLEY, P.S. Bacterial Coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**. London. v.11, n.2. p.94-99, 2003.

ROBINSOM, S. The Big Five: Most Common *Salmonella* Strains in Foodborne Illness Outbreaks. **Food Safety News**, 2013. Disponível em: <<http://www.foodsafetynews.com/2013/08/the-five-most-common-salmonella-strains/#.UsbJ5dJDunI>>. Acesso em 03 jan. 2016.

ROCHE DIAGNOSTICS COMPANY. Newbler is a software package for de new DNA sequence assembly.

RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; RIZZO, N.N.; TAGLIARI, V.C.; OLIVEIRA, A.P.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S.C.; TAGLIETI, R.M.; DICKEL, E.L.; NASCIMENTO, V.P. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em

poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**. 2009, v. 37, p.225–230.

SACCO BRASIL<sup>®</sup>. 2017. Disponível em: <http://saccobrasil.com.br/bacteriofagos/>. Acesso em: janeiro de 2018.

SANTOS, L.A.; MION, L.; MAROTZKI, M.; PARIZZOTO, L.; RODRIGUES, L.B.; NASCIMENTO, V.P.; SANTOS, L.R. Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouro de frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35 n.3. Rio de Janeiro, Mar. 2015.

SANTOS, S.; COSTA, A.R.; CARVALHO, C.; NÓBREGA, F.L.; AZEREDO, J. Exploiting Bacteriophage Proteomes: The Hidden Biotechnological Potential. **Trends in Biotechnology**. v. 36, n.9, September 2018.

SAUER, K.; CAMPER, A.K.; ERCHLICH, G.D.; COSTERTON, J.W.; DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **J Bacteriol**. v.184, p.1140-1154. 2002.

SCHOLL, D.; KIELECZAWA, J.; KEMP, P.; RUSH, J.; RICHARDSON, C.C.; MERRIL, C.; ADHYA, S.; MOLINEUX, I.J. Genomic analysis of bacteriophages SP6 and K1-5, an estranged subgroup of the T7 supergroup. **J. Mol. Biol.** V. 335, p. 1151–1171, 2004. doi: 10.1016/j.jmb.2003.11.035

SCHONEWILLE, W.; Nesse, L.L.; Hauck, R.; Windhorst, D.; Hafez, H.M.; Vestby, L.K. Biofilm building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 65, p. 360–365, 2012. DOI:10.1111/j.1574-695X.2012.00966.x

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A.P.; GAASTRA, W. Multi-resistance. **DTU Food, National Food Institute** - Newsletter to the National Reference Laboratories for Antimicrobial Resistance, n.4, p.1-4, 2010.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, Issue 14, p. 2068–2069, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>

SETTLES, M. L. University of California, Davis. Genome Center, Bioinformatics. Program Seqclean. Disponíveis em: <https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean>. Última atualização 2015.

SHARMA, C.S.; 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**, n.7, pp.1250-1419, pp.1357-1362. 2015.

SHEN, Y.; KÖLLER, T.; KREIKEMEYER, B.; NELSON, D.C. Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a Bacteriophage-encoded endolysin. **J. Antimicrob. Chemother.** 68, 1818–1824. doi: 10.1093/jac/dkt104 (2013).

SHI, Y.; LI, N.; YAN, Y.; WANG, H.; LI, Y.; LU, C.; SUN, J. Combined antibacterial activity of phage lytic proteins holin and lysin from *Streptococcus suis* bacteriophage SMP. **Curr. Microbiol.** v.65, p.28–34. 2012.

SHIMIDT; HANSEL. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. **Clin. Microbiology.** 2004.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; LIMA FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos – **Ciências e saúde coletiva** vol.13 n.5, PP.1675-1683. Rio de Janeiro, 2008

SILLANKORVA S, AZEREDO J. The use of bacteriophages and bacteriophage-derived enzymes for clinically relevant biofilm control. In **Phage Therapy: Current Research and Applications.** 2014.

SILLANKORVA, S.; PLETENEVA, E.; SHABUROVA O.; SANTOS, S.; AZEREDO J.; KRYLOV, V. *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. **Journal of Applied Microbiology** v.108, p.1175-1186, 2008.

SILVA, F.A.S. **ASSISTAT: Versão 7.7 beta.** DEAG-CTRN-UFCG – Atualizado em 01 de abril de 2014. [Internet]. [cited 2015 fev 10]. Available from: <www.assistat.com>.

SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: facts and fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, 296(1), pp. 5-14, 2006.

SONCINI, R.A.; Controle da *Salmonella Enteritidis* na Avicultura; Anais, 2004. Disponível em: [http://www.cnpa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/anais0204\\_bsa\\_soncini.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais0204_bsa_soncini.pdf)

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

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.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S.D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control.** v.31, p. 572-585, 2013.

STEPANOVIC, S.; IRKOVIC, I.C.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology.** v.38, p.428–432. 2004.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Microbiology Methods**, v. 40, p.175-179. 2000.

SULAKVELIDZE, Z.; ALAVIDZE, J.; GLENN, AND M. JR, “Bacteriophage Therapy MINIREVIEW,” vol. 45, no. 3, 2001.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J.J.G. *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.

SULAKVELIDZE. The Challenges of bacteriophage therapy. **Microbe**. pp. p.20–24. 2006.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2012; p. 827.

UNIPROT – The Universal Protein Resource. **Nucleic Acids Res**. 2008. (Database issue): D190–D195. Published online. doi: 10.1093/nar/gkm895. Acesso em Novembro, 2020.

VAN ASTEN, A.J.A.M.; JAAP, E.; VAN, D. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v.44, n.3, p.251-259. 2005.

VANDAMME, E. **New phage therapy**. no. January, pp. 38–41, 2013.

VANDER BYL, C.; KROPINSKI, A. M. Sequence of the genome of *Salmonella* bacteriophage P22. **J. Bacteriol.** v.182, p. 6472–6481, 2000. doi: 10.1128/JB.182.22.6472- 6481.2000

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surfasse. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1117-1131, 2010.

VESTBY, L.K. *et al.* Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 20, p. 1-6, May 2009.

VIEIRA, A.R.; JENSEN, A.R.; PIRES, S.M.; KARLSMOSE, S.; WEGENER, H.C.; WONG, D.L.F. A resource to link human and non-human sources of *Salmonella*. WHO **Global Foodborne Infections** Network Country Databank. *In*: ISVEE Conference. Durban, South Africa: 2009.

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de Patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, 2009. p.406-414

WARRINER, K.; EVELEIGH, K.; GOODMAN, J.; BETTS, G.; GONZALES, M.; WAITES, W.M. Attachment of bacteria to beef from steam-pasteurized carcasses. **J. Food Prot.** v.64, p.493–497, 2001.

WATTAM, A.R.; ABRAHAM, D.; DALAY, O.; DISZ, T.L.; DRISCOLL, T.; GABBARD, J.L.; GILLESPIE, J.J.; GOUGH, R.; HIX, D.; KENYON, D.; MACHI, D.; MAO, C.; NORDBERG, E.K.; OLSON, R.; OVERBEEK, R.; PUSCH, G.D.; SHUKLA,

M.; SCHULMAN, J.; STEVENS, R.L.; SULLIVAN, D.E.; VONSTEIN, V.; WARREN, A.; WILL, R.; WILSON, M.J.C.; YOO, H.S.; ZHANG, C.; ZHANG, Y.; SOBRAL, B.W. PATRIC, The bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Research*, v. 42, Issue D1, p. D581–D591, 2014.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1099>

WEBBER, B. – Perfil de virulência, suscetibilidade antimicrobiana e alternativas para controle de *Salmonella* Heidelberg formadoras de biofilmes. **Projeto de Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.

WEBER- DABROWSKA, B.; MULCZYK, M.; GORSKI, A. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. **Transplantation proceedings**, 35(4), pp.1385-1386, 2003.

WELKOS, S.; SCHREIBER, M.; BAER, H.: Identification of *Salmonella* with the O-1 bacteriophage. *Appl Microbiol* 1974, 28: 618-622.

WHO. World Health Organization. Global Network Global Foodborne Infections Network. **Global Salm Surv.** 2016. 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)>. Acesso em: 20 fevereiro 2019.

WHO. World Health Organization. Health Topics: **Salmonella**. 2017. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/salmonella/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/salmonella/en/)> Acesso em: 20 fevereiro 2019.

WHO-World Health Organization. Global Network Global Foodborne Infections Network. **Global Salm Surv.** 2013 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)>. Acesso em 05 janeiro 2019.

WHO. World Health Organization. **Salmonella (non-typhoidal)**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en>> Acesso em: 25 de fevereiro 2019.  
 WITTEBOLE, X.; DE ROOCK, S.; OPAL, S.M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence** v.5(1), p. 226–235, 2014

WOOLSTON, J. *et al.* Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces. **Bacteriophage**, v.3, n.3, p.25697, 2013.

WRIGHT, A.; HAWKINS, C. H.; ANGGÅRD, E. E. et al. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. **Clinical Otolaryngology**, 34(4), pp.349-357, 2009.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nat. Rev.Microbiol.**, v. 5, n. 3 p. 175–186, 2007.

YACOBY, I.; BAR, H.; BENHAR, I. Targeted Drug-Carrying Bacteriophages as Antibacterial Nanomedicines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 2156–2163, v. 51, 2007. doi:10.1128/AAC.00163-07

ZIMIN, A.V.; MARÇAIS, G.; PUIU, D.; ROBERTS, M.; SALZBERG, S.L.; YORKE, J.A. The MaSuRCA genome assembler. **Bioinformatics**. Nov 1; 29(21):2669-77, 2013.

ZINNO, P.; DEVIRGILIIS, C.; ERCOLINI, D.; ONGENG, D.; MAURIELLO, G. Bacteriophage P22 to challenge Salmonella in foods, 2014.

ZOBELL, C.E. The effects of solids surfaces upon bacterial activity. **J. Bacteriology**. v.46, p.39-56. 1943.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C.: Microbial biofilms in the food processing industry should they be a concern? *Int J Food Microbiol* 1994, 23: 125-148.

ZOUMPOPOULOU, G.; FOLIGNE, B.; CHRISTODOULOU, K.; GANGETTE, C.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Lactobacillus fermentum ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against TNBS-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. **International Journal of Food Microbiology**, 121, 18–26, 2008.

ZURABOV, F.; ZHILENKOV, E. Characterization of four virulent *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation. **Virology Journal**. 2021. Doi:10.1186/s12985-020-01485.

## ARTIGOS A SEREM SUBMETIDOS

“Sequência completa do genoma de três novos bacteriófagos líticos isolado de *Salmonella* *Infantis* e *Salmonella* *Rissen*”

(Artigo a ser submetido para a revista **Veterinary Research**)

RESUMO: O aparecimento de bactérias multirresistentes a antimicrobianos e a agentes químicos utilizados para o controle de bactérias patogênicas como *Salmonella*, tem incentivado a busca por meios que garantam a inocuidade e a segurança alimentar, uma vez que esses patógenos, quando presentes, são responsáveis por perdas econômicas e alterações na qualidade dos produtos. A urgência de novos compostos ou alternativas para o controle e eliminação desses microrganismos nos instigou a buscar bacteriófagos líticos com aptidão para serem utilizados como biocontroladores. *Salmonella* é uma das espécies bacterianas enteropatogênicas mais onipresentes no mundo e comumente envolvida em surtos de doenças transmitidas por alimentos. Bacteriófagos são vírus específicos de procariotos, são intracelulares obrigatórios, hospedeiro-específicos, capazes de infectar espécies ou grupos dentro de uma mesma espécie. Para tanto, foi sequenciado o genoma de 3 bacteriófagos previamente isolados a fim de verificarmos aptidão para biocontrole. Os três fagos sequenciados são fagos líticos, o *Salmonella Phage UPF\_BP4* tem 26.407 pb, genoma circular, DNA fita dupla, pertence à família Makadamsvirinae e gênero Tequintavirus. O *Salmonella Phage UPF\_BP5* tem 32.158 pb, genoma circular, DNA fita dupla, pertence à família Myoviridae, sufamília Tevenvirinae e gênero Gelderlandivirus. O *Salmonella Phage UPF\_BP6* tem 79.994 pb, DNA fita dupla, pertence a subfamília Tevenvirinae e ao gênero Gelderlandivirus. Todos possuem genes relacionados à lise bacteriana, como as endolisinas e hidrolases, assim como genes relacionados a transporte de drogas e não possuem genes relacionados a lisogenia ou alérgenos. Deste modo tornam-se candidatos para utilização como biocontroladores de bactérias patogênicas como a *Salmonella*.

Palavras-chave: bacteriófagos, biocontrole, sequenciamento.

Utilização de bacteriófagos no controle biológico  
de *Salmonella enterica* formadoras de biofilmes em indústria de alimentos

(Artigo a ser submetido para revista **Brazilian Journal of Microbiology**)

*ABSTRACT:* *Salmonella* é uma das espécies bacterianas mais sorotipificadas e envolvida em surtos de doenças transmitidas por alimentos, no mundo. Algumas cepas podem ser altamente virulentas, resistente a antimicrobianos e capazes de formar biofilmes, sendo os ambientes industriais os mais propícios, devido à constante presença de microrganismos e às condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Altas concentrações de agentes químicos empregados para o controle de biofilmes geram impactos ambientais negativos e controle ineficiente dos patógenos, uma vez que é crescente o número de bactérias resistentes a esses agentes. Devido a necessidade de controlar esses microrganismos, testamos bacteriófagos líticos contra *Salmonella enterica*. Bacteriófagos são vírus específicos para uma determinada espécie bacteriana, apresentam crescimento exponencial e replicam-se no interior das bactérias, com isso administrações sucessivas de preparações fágicas são desnecessárias, pois enquanto a bactéria hospedeira estiver presente, o fago estará em replicação. Neste contexto, testamos a capacidade de biocontrole de fagos distintos contra 12 sorovares de *Salmonella*, algumas cepas multirresistentes a antimicrobianos e capazes de formar biofilmes. Os ensaios foram realizados com fagos individuais e na forma de coquetel. Nossos resultados sugerem que a utilização de combinações de fagos aumenta o sinergismo e potencializa a inibição da formação de biofilmes, bem como o uso no condicionamento das superfícies anti-adesão bacteriana, é mais eficiente do que quando utilizado para remoção de biofilmes pré-formados.

Palavras-chave: bacteriófagos, controle biológico, biofilmes