

Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Isolamento e caracterização de novos bacteriófagos associados a diferentes sorovares de *Salmonella*

AUTOR PRINCIPAL: Edinara Silva de Lima.

CO-AUTORES: Pottker, E.S.; Rizzo, N.N.; Webber, B.; Milho, C.; Melo, L.D.R.; Orsato, J.; Santos, L.R.; Rodrigues, L.B.; Nascimento, V.P.

ORIENTADOR: Laura Beatriz Rodrigues.

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo

INTRODUÇÃO

Salmonella spp. é um dos principais patógenos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos (DTA), com importância em saúde pública em todo o mundo. Observa-se um aumento do número de *Salmonella* resistentes, muitas vezes relacionado à sobrevivência de bactérias pelo uso indiscriminado de antimicrobianos. Com isso, estudam-se tratamentos alternativos, dentre eles o controle biológico com bacteriófagos, que podem ser utilizados para prevenir ou tratar doenças bacterianas como um complemento ou alternativa à terapia com antibióticos. Bacteriófagos, ou fagos, são vírus intracelulares obrigatórios, hospedeiro-específicos, que infectam somente procariotos e estão amplamente distribuídos (AZEREDO *et al*, 2011). Este estudo objetivou o primeiro isolamento e caracterização de bacteriófagos realizado na região de Passo Fundo, RS, para uma melhor compreensão de sua biologia, devido ao seu potencial de uso para tratamento ou prevenção contra *Salmonella* spp.

DESENVOLVIMENTO:

Fagos podem ter um ciclo de vida denominado lítico, onde a reprodução da virulência ocorre dentro do hospedeiro e induz a lise das células, ou um ciclo lisogênico, quando integram seu material genético ao genoma da bactéria hospedeira, recebendo o nome de profago e se

mantendo inativo (AZEREDO *et al*, 2011). *Salmonella* spp. pertence à família Enterobacteriaceae, é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos e com formato de bastonetes curtos. A maioria das espécies são móveis, com flagelos peritríquios (FORSYTHE, 2002). Foram utilizadas como bactérias hospedeiras 12 sorotipos de *Salmonella*: *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredney*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzemground*, *S. Tennessee* e *S. Typhimurium*, previamente isoladas e confirmadas geneticamente por Microarray pelo equipamento Check&Trace, em experimentos anteriormente realizados por nosso grupo de pesquisa. Antes de serem utilizadas foram devidamente testadas a fim de garantir que não possuíam o profago em seu genoma, armazenadas em agar nutriente e reativadas utilizando o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). Como fontes de isolamento dos bacteriófagos foram utilizadas amostras de fezes de aves e resíduos de água de abate antes de entrar na lagoa de tratamento, e seguiu-se metodologia de (AZEREDO *et al*, 2011). Para o isolamento foi inoculada individualmente cada bactéria de interesse em caldo BHI, incubado a 37°C. Após esse período adicionou-se a cultura bacteriana à fonte do fago na proporção de 1g de material para 10 mL da bactéria cultivada, incubado por 24h a 37°C sob agitação. Após esse período realizou-se centrifugação, filtração em filtros de 0,22µm, e verificou-se o filtrado nas bactérias hospedeiras, utilizando placas de agar triptona de soja (TSA) com uma sobrecamada de agar semi-sólido com cada *Salmonella* a ser testada. Após foram pipetados 10µL do filtrado, incubados por 24h a 37°C, e verificou-se a formação de halos indicativos de presença de fagos, conforme Figura 1. Verificou-se a presença de 14 fagos isolados. Com isso, realizou-se o teste de suscetibilidade, onde os isolados foram testados nos 12 sorotipos de *Salmonella*. Como resultado, 7 fagos apresentavam características morfológicas diferentes, como tamanho e formato de halo, contagem de Unidades Formadoras de Placa (PFU), visualizados na Figura 2 e na Tabela 1, e Eficiência de Placa (Efficiency of Plating), descrita na Tabela 2. A nomenclatura dos fagos isolados foi baseada na bactéria hospedeira utilizada e na fonte de isolamento. As demais caracterizações, de acordo com Santos *et al.* (2011), seguindo os protocolos que envolvem genômica e proteômica, encontram-se em andamento, mas já foi determinado que são bacteriófagos com DNA cromossômico. Os fagos 1:2, 5:2, 10:2 e 11:1 mostraram-se altamente eficientes na infecção das bactérias selecionadas, indicando serem fortes candidatos a serem utilizados em fagoterapia contra *Salmonella* spp.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Dentre os 7 (sete) fagos isolados, 4 (quatro) apresentaram bom grau de infecção frente a diferentes sorovares de *Salmonella*. Estudos futuros determinarão a real efetividade e capacidade fagoterápica destes isolados, para melhor compreensão da biologia destes bacteriófagos, com perspectivas de uso para o controle biológico das salmoneloses.

REFERÊNCIAS

AZEREDO J., PIRES D.P., SILLANKORVA S., *Pseudomonas* bacteriophage isolation and production. ***Pseudomonas Methods and Protocols***. 2014. Volume 1149 of the series Methods in Molecular Biology, pp 23-32.

FORSYTHE, S.J. ***Microbiologia da segurança alimentar***. Porto Alegre: Artmed, 410 p.2002.

AZEREDO J., ACKERMANN H.W., CEYSSENS P., CARVALHO C. M., FERREIRA E. C., KRYLOV V. N., 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. 2011. ***Journal of virology***, p. 11265–11273.

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): Não foi necessário, visto que não utilizou-se o modelo animal.

ANEXOS:

Figura 1- Fagos isolados



Figura 2- Contagem das PFU

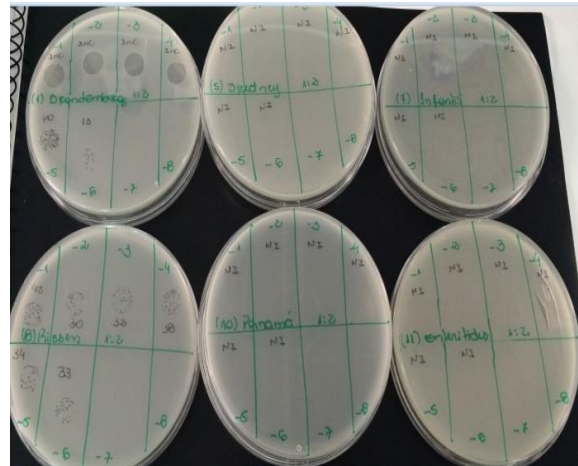


Tabela 1 - Contagem de PFU dos bacteriófagos isolados.

| | Bacteriófagos | | | | | | |
|--------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | 10:02 | 01:02 | 08:02 | 08:01 | 07:02 | 05:02 | 11:01 |
| PFU/mL | $2,9 \times 10^{11}$ | $1,29 \times 10^{11}$ | $1,05 \times 10^{14}$ | $1,22 \times 10^{14}$ | $1,37 \times 10^8$ | $1,76 \times 10^9$ | $8,5 \times 10^7$ |

Tabela 2 - Eficiência de infecção dos bacteriófagos isolados frente à *Salmonella* hospedeira.

| Hospedeiras | <u>Fago 1:2</u> | | | <u>Fago 5:2</u> | | | <u>Fago 10:2</u> | | | <u>Fago 11:1</u> | | |
|-----------------------|-----------------|----|----|-----------------|-----|-----|------------------|-----|----|------------------|-----|----|
| | Diluições | | | Diluições | | | Diluições | | | Diluições | | |
| | -4 | -5 | -6 | -4 | -5 | -6 | -4 | -5 | -6 | -4 | -5 | -6 |
| <i>S. Brandenburg</i> | Inc | 60 | 13 | NI | NI | NI | Inc | 83 | 9 | Inc | Inc | 29 |
| <i>S. Bredney</i> | NI | NI | NI | Inc | Inc | Inc | Inc | 80 | 13 | Inc | Inc | 66 |
| <i>S. Infantis</i> | NI | NI | NI | Inc | Inc | Inc | NI | NI | NI | 44 | 10 | 3 |
| <i>S. Rissen</i> | 38 | 34 | 33 | 28 | 36 | 23 | Inc | Inc | 27 | Inc | Inc | 73 |
| <i>S. Panamá</i> | NI | NI | NI | NI | NI | NI | Inc | Inc | 27 | Inc | Inc | 87 |
| <i>S. Enteritidis</i> | NI | NI | NI | Inc | Inc | Inc | NI | NI | NI | 33 | 7 | NI |

NI- Não Infecta; Inc- Incontáveis halos de infecção