

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

() Resumo

() Relato de Caso

GENÔMICA E AÇÃO LÍTICA DE UM NOVO BACTERIÓFAGO COM POTENCIAL DE USO NO BIOCONTROLE DE *SALMONELLA ENTERICA*

AUTOR PRINCIPAL: Rafael Levandowski

CO-AUTORES: Emanuele Serro Pottker, Bruna Webber, Natalie Nadin Rizzo, Luciana Ruschel dos Santos, Samuel P. Cibulski, Ricardo Zanella, Laura Beatriz Rodrigues

ORIENTADOR: Laura Beatriz Rodrigues

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo - UPF

INTRODUÇÃO:

A *Salmonella* spp. é o principal patógeno envolvido em surtos de doenças transmitidas por alimentos de origem avícola em diversos países. A utilização de antimicrobianos, para tratamento e controle das salmoneloses das aves e como promotores de crescimento, é comum, mas pode resultar na seleção de bactérias resistentes. Esta resistência representa um risco para a saúde humana e animal devido à dificuldade terapêutica e à possibilidade de transmissão horizontal dos genes de resistência entre diferentes espécies bacterianas. É extremamente importante a busca de novas alternativas ao controle químico destes patógenos. Destaca-se o controle biológico com uso de bacteriófagos, vírus bacterianos intracelulares obrigatórios, hospedeiro-específico, que infectam somente procariotos. Com base na relevância do tema, nosso objetivo foi isolar, caracterizar e sequenciar geneticamente bacteriófagos líticos para serem utilizados no biocontrole de diferentes sorovares de *Salmonella enterica*.

III SEMANA DO DESENVOLVIMENTO: CONHECIMENTO

Foi utilizada como bactéria hospedeira o sorovar *Salmonella* Brandenburg, testada para confirmar ausência de profago. Como fonte de isolamento foi utilizada água residual proveniente do abate em frigorífico de aves. O bacteriófago foi isolado e caracterizado segundo Sillankorva *et al.* (2010), com ligeiras modificações. Realizamos a incubação da fonte de isolamento com *S. Brandenburg*, acrescido de meio de cultura próprio para enriquecimento. A amostra foi plaqueada em TSA com sobrecamada semi-sólida com *S. Brandenburg*, e verificada a presença de halo de lise característico de bacteriófago. A produção e a titulação foram realizadas utilizando a mesma bactéria hospedeira, obtendo uma concentração de $1,29 \times 10^8$ PFU/mL. Avaliamos a ação lítica do bacteriófago frente a 12 diferentes sorovares de *Salmonella enterica* (Tabela 1), isolados de abatedouros avícolas por nosso grupo de pesquisa, em trabalhos anteriores. Observamos uma alta eficiência de infecção contra *S. Brandenburg*, *S. Tennessee*, *S. Agona*, *S. Schwarzemgrund*, *S. Rissen*, *S. Lexington* e *S. Typhimurium*, sorovares com fatores de virulência, multirresistentes a antimicrobianos e formadores de biofilmes. Para o sequenciamento do fago, realizamos a extração do DNA segundo o protocolo de Sambrook e Russel (2001), com algumas modificações. O sequenciamento partiu de alíquotas purificadas, as bibliotecas de DNA reunidas, sequenciadas com mais de 100 pb e emparelhadas (2x150nt). Na montagem do genoma foram utilizados os softwares Newbler e Velvet, e as análises subsequentes nos softwares BLAST, PHAST, Virfam e Geneious. As análises resultaram em um fago de genoma circular, DNA fita dupla, com 39.902 pb. Revelaram 382 possíveis ORFs do fago. Destas, somente 68 estão identificadas no BLAST, com funções atribuídas a 38 delas. Nenhum destes genes é essencial para a função de bacteriófagos, pelo menos em culturas *in vitro*, mas a sua presença e manutenção sugerem que podem conferir vantagem seletiva quando presente em outros ambientes (Hendrix, 2002). As 23 ORFs restantes mostraram semelhança com proteínas hipotéticas codificadas já descritas, mas com funções não determinadas. Nenhuma destas proteínas mostrou semelhança significativa com fatores conhecidos ou envolvidos na patogenicidade bacteriana (Bardina *et al.*, 2016), mas muitas destas proteínas hipotéticas podem estar envolvidas no reconhecimento e rompimento do metabolismo do hospedeiro (Klumpp *et al.*,

III SEMANA DO CONHECIMENTO

2013). A análise da organização genética do fago isolado mostrou homologia com outros fagos de enterobactérias e fagos específicos de *Salmonella*. Sua árvore filogenética está descrita na Figura 1. As novas sequências foram depositadas, mas o número de acesso não foi enviado pelo NCBI até o momento. Ressaltamos que se trata de um novo bacteriófago, nunca descrito, pertencente à ordem Caudovirales e à família Podoviridae of Type 3, denominado como *Salmonella* Phage UPF_BP1, que oferece uma excelente alternativa para o controle de agentes bacterianos patogênicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O isolamento de um novo bacteriófago, denominado *Salmonella* Phage UPF_BP1, com alta infectividade frente aos sorovares testados de *Salmonella enterica*, corrobora com nossas expectativas para o desenvolvimento de alternativas para o uso de antimicrobianos, sendo uma inovação para o biocontrole de *Salmonella enterica* em alimentos, animais e meio ambiente.

REFERÊNCIAS:

Sillankorva et al. *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. *Journal of Applied Microbiology* ISSN, 2010. p 1175-1186.

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

Hendrix RW. Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor. Popul. Biol.* Jun 2002.

Klumpp J, Fouts DE, Sozhamannan S. Bacteriophage functional genomics and its role in bacterial pathogen detection. *Briefings in functional genomics*. vol 12, no 4, p 354-365, 2013.

Bardina C, Colom J, Spricigo DA, Otero J, Osuna MS, Cortes P, Llagostera M. Genomics of three new bacteriophage useful in the biocontrol of *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology*, Abril 2016. Vol,7.

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): Não foram utilizados animais ou seres humanos na pesquisa realizada.

III SEMANA DO CONHECIMENTO

ANEXOS:

Tabela 1: Características das amostras de *Salmonella enterica* utilizadas para avaliar a ação lítica do bacteriófago *Salmonella* Phage UPF_BP1.

Sorovar	Capacidade de formação de biofilme a 36°C ^{3,4}	Genes de virulência ^{1,3}										Resistência a Antimicrobianos ^{3,4}	Local de isolamento	Ano de isolamento	
		Invasão celular		Fimbrias			Proteínas efetoras			Plasmídeo	Biofilme				
		invA	hilA	sefA	ipfA	agfA	avrA	sopE	sivH	spvC	spiA				
Enteritidis ATCC	Moderada	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
Typhimurium ATCC	Moderada	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
Lexington ¹	Não produtora	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	SUL	Esponjas antes da lavagem	2013	
Rissen ¹	Não produtora	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	SUL	Suabe de cloaca	2013	
Panama ¹	Fraca	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	SUL, ATM, AMC, CTX	Suabe de cloaca	2013	
Brandenburg ²	Não produtora	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	S	Carcaça após higienização	2012	
Anatum ²	Fortemente	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	SOX, SUL	Suabe de cloaca	2012	
Tennessee ²	Fraca	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	SPT,SOX,TET, SUT, GEN,CAZ, ATM,AMC,CTX	Carcaça congelada 24h	2012	
Bredney ²	Moderada	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	SPT,SOX, SUT, CHL, SUL	Suabe de cloaca	2012	
Agona ²	fraca	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	SOX, SUL, ENRO	Gaiola	2012	
Schwarzemgrund ²	Fraca	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	SPT,SOX,SUT,CHL, SUL	Suabe de cloaca	2012	
Infantis ²	Fraca	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	SPT, SOX, SUT,CHL,SUL,GEN, ENRO, CAZ, ATM,AMC,CTX	Gaiola	2012	

Legendas dos dados obtidos: ¹ Santos, 2015; ² Mion, 2016; ³ Borges, 2106; ⁴ Mandelli, 2016. Princípios ativos testados: Sulfonamida (SUL), Cloranfenicol(CHL), Gentamicina(GEN), Tetraciclina(TET), Ampicilina(AMP), Enrofloxacina(ENRO), Cefazidima(CAZ), Aztreonam(ATM), Amoxicilina+ác.clavulônico(AMC), Cefotaxima(CTX), Amoxicilina(AMX), Cefotiofur(CTF), Ciprofloxacina(CIP), Espectinomicina(EST), Sulfafurazole(SOX), Sulfa + trimetropim(SUT), Estreptomina(SPT), + possui o gene de virulência; - não possui o gene de virulência; NR: não realizado; S: Sensível a todos os princípios ativos.

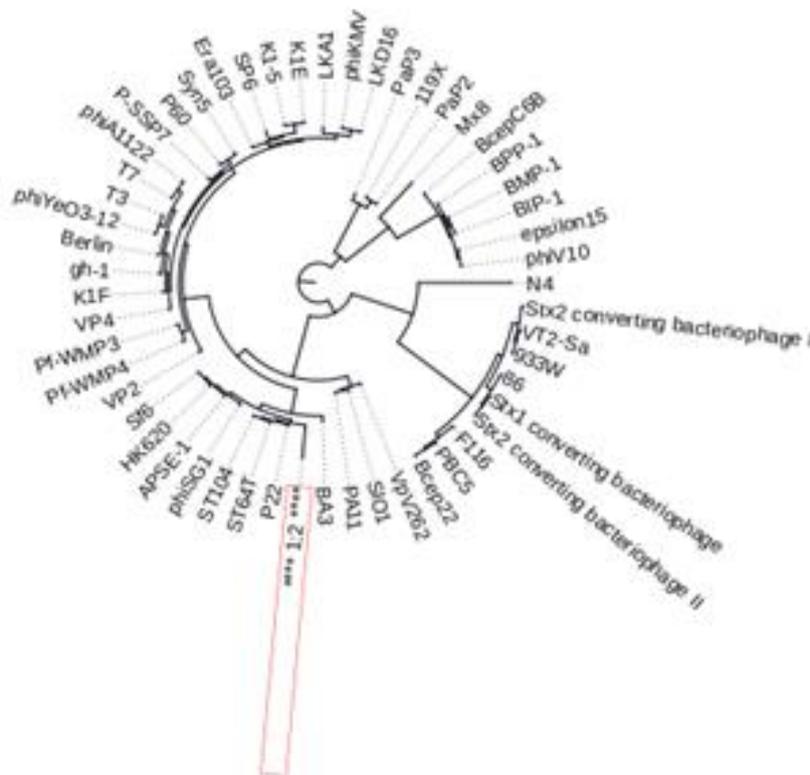


Figura 1: Árvore filogenética do bacteriófago *Salmonella* Phage UPF_BP1.