

Área: Ciência de Alimentos

TESTE DE SUSCETIBILIDADE DE DIFERENTES SOROVARES DE *SALMONELLA* FRENTE AO BACTERÍOFAGO P22

Emanuele Serro Pottker^{1,*}, Natalie Nadin Rizzo¹, Bruna Webber¹, Raphael Lucio
Andreatti Filho², Luciana Ruschel dos Santos¹, Laura Beatriz Rodrigues¹

¹PPGBioexp, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

²DCV, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, SP

*E-mail: emanuelepottker@yahoo.com.br

RESUMO – As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são motivo de preocupação, e a salmonelose é uma das zoonoses de maior relevância para a saúde pública em todo o mundo, devido às características endêmicas, alta morbidade e dificuldade de adoção de medidas para seu controle. A maioria dos casos de surtos de doenças de origem alimentar no Brasil e no mundo ocorre devido à ingestão e posterior infecção por *Salmonella* spp. Observa-se um aumento do número de microrganismos resistentes a antimicrobianos, muitas vezes pelo uso indiscriminado dos mesmos. Com intuito de obter alternativas ao uso de princípios ativos antibacterianos, realizou-se esta avaliação como a primeira etapa para utilização de fagoterapia como controle biológico da *Salmonella* spp. O presente estudo avaliou a eficácia da utilização do bacteriófago P22 para realização de fagotipagem frente a cepas de *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Rissen*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Brandenburg*, *S. Anatum*, *S. Tennessee* e *S. Bredeney*. Após realizarmos a fagotipagem, verificamos que o Fago P22 mostrou-se eficaz quando confrontado com bactérias hospedeiras distintas, mesmo sendo específico e isolado a partir de uma *Salmonella Typhimurium*. Também se mostrou eficiente ao ser testado em cepa multirresistente de *Salmonella* Enteritidis. Estes resultados nos fazem conjecturar a possibilidade de uso de controle biológico das salmoneloses com fagoterapia, realizando isolamentos de fagos específicos e os utilizando diretamente em alimentos, embalagens, para controle de biofilmes e outras aplicações.

Palavras-chave: Fagotipagem, *Salmonella*, controle biológico, saúde pública.

1 INTRODUÇÃO

Salmonella spp. é um microrganismo de distribuição mundial, sendo os seres humanos e outros animais seus principais reservatórios naturais. É também considerado um dos principais agentes envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar em países desenvolvidos, muitas vezes associado ao manuseio e preparo impróprio de produtos de origem animal, principalmente oriundos de origem aviária. É o agente mais prevalente em produtos avícolas em diversos países. Segundo estimativa da Secretaria de Vigilância em Saúde até o ano de

2013 a maioria dos casos de surtos alimentares no Brasil ocorreram devido à ingestão e posterior infecção por *Salmonella* spp (Sinan/Net/SVS/MS, 2013). As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são motivo de preocupação, e a salmonelose é uma das zoonoses de maior relevância para a saúde pública em todo o mundo, devido às características endêmicas, alta morbidade e dificuldade de adoção de medidas para seu controle.

O aumento do número de microrganismos resistentes a antibióticos, muitas vezes pelo uso indiscriminado dos mesmos, acaba selecionando as bactérias resistentes. Com isso tem-se buscado tratamentos alternativos como o controle biológico das bactérias, dentre eles o uso de bacteriófagos, que são vírus que infectam especificamente as bactérias para o receptor que eles possuem. Ou seja, existem bacteriófagos específicos para espécies bacterianas ou até para certas cepas. O estudo da biologia dos bacteriófagos se torna um fator determinante para saber manejá-los de maneira que possam ser utilizados como tratamento, ou formas de prevenção contra estes agentes (ANDREATTI FILHO *et al*, 2007).

O gênero *Salmonella* pertencente 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, fermentadoras de glicose produzindo ácido e gás, porém incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. Sua temperatura ótima de crescimento é de aproximadamente 38° C e a temperatura mínima em torno de 5° C. São relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60° C por 15 a 20 minutos. Sua classificação inclui duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, a segunda dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica*. Em 2007, o Instituto Pasteur descreveu 2.579 sorovares através do esquema Kauffmann-White-LeMinor (KWL) para caracterizar os diferentes sorotipos do gênero com base em suas fórmulas antigênicas. (FORSYTHE, S.J/2002) A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis é um dos sorovares mais comuns em aves, depois de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* e, junto com a *S. Typhimurium*, são os sorovares mais importantes na causa de paratifo aviário, responsáveis por infecções alimentares no homem. (ANDREATTI FILHO *et al*, 2007). Além destes, outros sorovares já foram isolados a partir de pontos no fluxograma de abate de aves em trabalhos anteriores realizados na Universidade de Passo Fundo, são eles: *S. Anatum*, *S. Agona*, *S. Brandenburg*, *S. Bredney*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Schwarzemground*, *S. Tennessee*, *S. Typhimurium*.

Vírus bacterianos, ou bacteriófagos, foram descobertos em 1915. São vírus específicos de bactérias, e são intracelulares obrigatórios. São hospedeiro-específicos, capazes de infectar espécies específicas ou até mesmo grupos dentro de uma mesma espécie (GOODRIDGE; ABEDON, 2003; HAGENS; LOESSNER, 2007). Com relação à morfologia, os bacteriófagos podem ser classificados como caudados (binário), isométricos (icosaédricos), helicoidais (filamentosos) e pleomórficos. Todos os bacteriófagos caudados possuem o genoma DNA e podem ser diferenciados nas seguintes famílias: *Myoviridae* (cauda longa e contrátil), *Siphoviridae* (cauda longa e não contrátil) e *Podoviridae* (cauda curta e contrátil). Os bacteriófagos isométricos possuem tanto o genoma DNA como o RNA, e estão presentes nas famílias *Cystoviridae* (RNA), *Microviridae* (DNA) e *Leviviridae* (RNA). Já os bacteriófagos helicoidais, representados pela família *Inoviridae*, e os pleomórficos, possuem, em sua maioria, o genoma DNA. (JOANA AZEREDO *et al*, 2014)

Os bacteriófagos conhecidos para *Salmonella enterica* são pertencentes à família *Microviridae*. Alguns bacteriófagos que parasitam diversos sorovares também já foram identificados, como o do sorovar Typhimurium, denominado P22, que está presente na família *Podoviridae*, e o bacteriófago para o Enteritidis, intitulado T4 e que pertence a família *Myoviridae*. Sobre o P22, sua partícula viral consiste em uma sequência de ácido nucléico, sendo na maioria das vezes DNA – ácido desoxirribonucleico, e em sua minoria RNA – ácido ribonucleico. Ao redor do genoma de ácido nucléico há um capsídeo formado de proteínas que confere proteção, adsorção eficaz e liberação do genoma no citoplasma bacteriano. (ANDREATTI FILHO *et al*, 2014)

Os bacteriófagos podem ter um ciclo de vida lítico ou lisogênico. O ciclo lítico ou a reprodução da virulência dos bacteriófagos ocorre dentro do hospedeiro e induz a lise das células, resultando na liberação de uma nova progênie de bacteriófagos, recomeçando, assim, um novo ciclo de infecção. Os bacteriófagos com crescimento lisogênico integram seu material genético ao genoma da bactéria hospedeira (recebendo o nome de profago) e se mantêm inativo. Ao replicar-se, a bactéria passa o profago para as células filhas (lisogenia), sendo que essa replicação pode estimular o profago a desprender-se do genoma bacteriano e iniciar um ciclo lítico. (JOANA AZEREDO *et al*, 2014) A bacteriofagia foi observada em 1915 por Frederick W. Twort e em 1917 por Felix D’Herelle, sendo melhor compreendido por Andre Gratia em 1921, pois até então não se sabia exatamente a natureza dos bacteriófagos, também chamados de fagos. A utilização terapêutica de bacteriófagos foi realizada com sucesso por D’Herelle, mas com a descoberta dos antibióticos e quimioterápicos acabou sendo esquecida, usados apenas em estudos de virologia, e empregados para monitoramento e identificação de microrganismos. (ABEDON, S.T, 2008)

A fagoterapia apresenta muitas vantagens sobre a antibioticoterapia. É eficiente contra bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos, devido à indução da bacteriolise, e difere completamente da ação destes. Por ser hospedeiro-específico não há infecção de outras bactérias, e apresenta capacidade de responder rapidamente à formação de fago-resistência do hospedeiro, pelo fato dos fagos também apresentarem a capacidade de sofrer mutação. Além disso, o custo de desenvolvimento de uma fagoterapia é mais barato que o de desenvolvimento de novos antimicrobianos. E, como os fagos não afetam células eucarióticas, os efeitos colaterais do seu uso são incomuns (MATSUZAKI *et al.*, 2005).

Com intuito de obter alternativas ao uso de princípios ativos antibacterianos, realizou-se uma avaliação como a primeira etapa para utilização de fagoterapia como controle biológico da *Salmonella* spp., avaliando a eficácia do bacteriófago P22 para fagotipagem de diferentes sorovares de *Salmonella*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado o teste de suscetibilidade dos sorovares *Salmonella* Enteritidis, S. Typhimurium, S. Rissen, S. Lexington, S. Panama, S. Brandenburg, S. Anatum, S. Tennessee e S. Bredney frente a bacteriófago. O bacteriófago P22, da família *Podoviridae*, infecta *Salmonella* e tem genoma constituído de DNA. Foi cedido pela fagoteca do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, SP. As amostras de *Salmonella* utilizadas são provenientes da Bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo (UPF). Para o teste,

realizamos a amplificação do P22, segundo Andreatti filho, 2008, onde cultivou-se a bactéria hospedeira em BHI, incubado por 24h, transferido para o caldo TSB concentração dupla e incubado novamente por 12-24 horas a 37°C. Adicionou-se 2mL do cultivo de *Salmonella* a 1mL do fago em tubos com 5mL de TSB, incubado por 24h. Após esse período, centrifugou-se por 10 minutos a 8.000 rpm, filtrou-se todo o conteúdo e transferiu-se para tubo estéril.

Antes de realizar o teste de suscetibilidade ou a fagotipagem com o P22, as cepas de *Salmonella* foram testadas a fim de verificar se possuíam profago (forma lisogênica do fago) no DNA da bactéria hospedeira. Após confirmar que este teste era negativo prosseguiu-se com a fagotipagem. (S. SILLANKORVA *et al* 2013) Foram utilizadas placas de agar tripton de soja (TSA), onde foi produzida uma sobre-camada bacteriana com cada um dos sorovares de *Salmonella* a serem testados, utilizando cultivo bacteriano previamente preparado e incubado por 24 horas e um top agar semi-sólido. Após a realização da sobre-camada aguardou-se de 5 a 10 minutos até a secagem completa. A seguir, pipetou-se gotas de 10µL do fago P22 sobre a camada bacteriana, aguardou-se a secagem completa e incubou-se por 24h a 37°C. Após este período a leitura foi realizada para verificar a suscetibilidade da bactéria hospedeira ao bacteriófago P22, observando as áreas de lise.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar do bacteriófago P22 ter sido isolado a partir da hospedeira *Salmonella* Typhimurium, nos testes *in vitro* ele mostrou-se eficaz quando confrontado com bactérias hospedeiras de sorovares distintos, conforme observado na Figura 1 e na Tabela 1. Na Figura 2 podemos visualizar o controle negativo do teste.

Figura 1- *S. Enteritidis* suscetível ao P22.

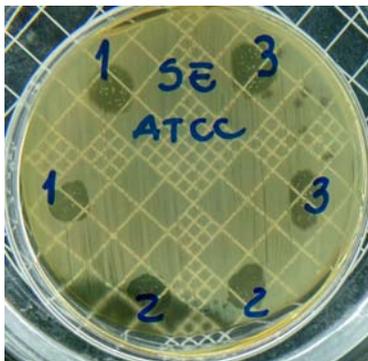
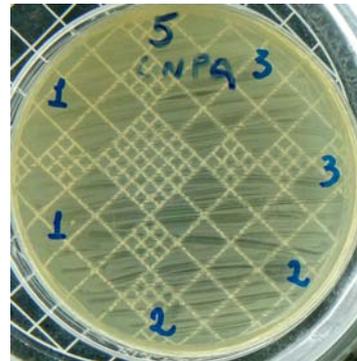


Figura 2 – *S. Anatum* não suscetível ao P22.



Ao analisarmos esses resultados, observamos um bom desempenho do Fago P22 frente aos diferentes sorovares de *Salmonella* expostas a ele por um período de 24 horas, com capacidade de infectar 57,14% das amostras a que foi exposto. Ressaltamos sua ação de lise na *S. Enteritidis*, determinada como multirresistente em trabalho anteriormente realizado (SILVA, C. F, 2014). Quando analisamos que o P22 é específico e sua eficiência é maior quando aplicado na sua bactéria hospedeira de origem, a *Salmonella* Typhimurium, podemos pressupor que, se conseguirmos isolar fagos hospedeiros-específicos para determinadas bactérias, poderemos utilizá-los nas mais diversas formas. Ressaltamos o uso de fagos para tratamentos alternativos, como o controle biológico de bactérias. Os bacteriófagos podem ser utilizados para prevenir ou tratar de doenças bacterianas como um

complemento ou alternativa à terapia com antibióticos. Também podem vir a ser utilizados diretamente em alimentos, embalagens, para controle de biofilmes, e diversas outras aplicações. Ainda são necessários maiores estudos e testes, tanto *in vitro* quanto *in loco*, com este bacteriófago, pois este foi nosso primeiro estudo com o bacteriófago P22.

Tabela 1 – Diferentes sorovares de *Salmonella* e resultado da fagotipagem com P22.

Identificação da <i>Salmonella</i>	Sorovar	Ponto de coleta	Particularidade	Leitura
SE ATCC	Enteritidis	Não se aplica	Não se aplica	Suscetível
ST ATCC	Typhimurium	Não se aplica	Não se aplica	Suscetível
P82	Enteritidis	Asa de frango	Não envolvida em surto de DTA	Suscetível
P170	Enteritidis	Suabe de arrasto	Ambiente	Suscetível
P24	Enteritidis	Fezes	Multirresistente	Suscetível
P69	Enteritidis	Maionese	Envolvida em surto de DTA	Não suscetível
P106	Enteritidis	Suabe de arrasto	Ambiente	Não suscetível
P84	Enteritidis	Peito de frango	Não envolvida em surto de DTA	Suscetível
L001	Rissen	Suabe de cloaca	Abatedouro de aves	Não suscetível
L002	Lexington	Esponjas	Antes da lavagem de carcaça	Suscetível
L003	Lexington	Esponjas	Antes da lavagem de carcaça	Não suscetível
L004	Rissen	Suabe de cloaca	Abatedouro de aves	Não suscetível
L005	spp	Esponjas	Antes da lavagem de carcaça	Suscetível
L006	Panamá	Suabe de cloaca	Abatedouro de aves	Suscetível
L007	Lexington	Esponjas	Antes da lavagem de carcaça	Não suscetível
L008	spp	Esponjas	Depois da lavagem de carcaça	Não suscetível
CM2	Brandenburg	-	Abatedouro de aves	Suscetível
CM4	Anatum	-	Abatedouro de aves	Suscetível
CM5	Anatum	-	Abatedouro de aves	Não suscetível
CM6	Tennessee	-	Abatedouro de aves	Não suscetível
CM12	Bredney	-	Abatedouro de aves	Suscetível

4 CONCLUSÃO

O teste realizado com o bacteriófago P22 frente a diferentes sorovares de *Salmonella* mostrou-se eficaz, mesmo quando utilizado em cepa multirresistente de *Salmonella* Enteritidis. Estes resultados nos fazem conjecturar a possibilidade de uso de controle biológico das salmoneloses com fagoterapia, realizando isolamentos de fagos específicos e os utilizando diretamente em alimentos, embalagens, controle de biofilmes e outras aplicações.

5 REFERÊNCIAS

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

- 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* sorovar Enteritidis in vitro and in vivo. **Poultry Science**, v.86, n.9, p.1904-1909, 2007.
- EUZEBY, J.P. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (Approved Lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (Approved Lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an Opinion. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.927-930, 1999.
- FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 410 p. 2002.
- GOODRIGE, L; ABEDON, S. Bacteriophage biocontrol and processing: Application of phage therapy to industry. V.53 n.6, 2003. Disponível em www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/literome/0009801.pdf. Acesso em 13/03/2015.
- HANGENS, 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.
- JOANA AZEREDO, SANNA SILLANKORVA AND DIANA P. PIRES, *Pseudomonas* bacteriophage isolation and production Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4700-057 Braga, Portugal.
- KUNTER, E.; SULAKVELIDZA, A. Bacteriophages: biology and applications. United States of America: CRC Press, 2005. 510 p.
- 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. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.11, p.211-219, 2005.
- PROGRAMA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS – VEDTA. Programa de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos Divisão de Vigilância Epidemiológica/RS- Secretaria da Saúde do Estado. 2013.
- S. SILLANKORVA, E. PLETENEVA, O. SHABUROVA, S. SANTOS, C. CARVALHO, J. AZEREDO AND V. KRYLOV. *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry - IBB – Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal and State Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 1st Dorozhnii proezd, Moscow, Russia
- SILVA, C. F. Padrão de resistência a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilme. 2014. Passo Fundo, 90f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) – Curso de Pós-graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6 ed. São Paulo: Artmed,2000. 827p.
- WHO-World Health Organization. Global NetworkGlobal Foodborne Infections Network. May 2011 Vol IV. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/GFN_update_may_2011.pdf?ua=1> Acesso em: 02/2015.