

Avicultura

INDUSTRIAL.COM.BR

Nº 02|2020 | ANO 111 | Edição 1296 | R\$ 26,00

Gessulli 
AGRIBUSINESS
REFERÊNCIA E INOVAÇÃO



ISSN 1516-3105



Gumboro: Desafio severo ao sistema imune das aves

Embora controlada no Brasil, a enfermidade continua a ser foco de atenção na produção avícola mundial frente aos prejuízos econômicos e a facilidade do vírus para mutação

BACTERIÓFAGOS: UMA PERSPECTIVA DE PRODUTO BIOLÓGICO PARA CONTROLE DE *SALMONELLA* HEIDELBERG EM FRANGOS DE CORTE

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias seletivamente, replicam-se somente na presença da bactéria-alvo, são inócuos a humanos e animais, e são rapidamente eliminados do organismo hospedeiro na ausência da bactéria suscetível

Por | Clarissa S. L. Vaz* e Daiane Voss-Rech*

A avicultura de corte continua a crescer em tamanho e complexidade, exigindo uma abordagem multifatorial para controle das salmoneloses. Medidas estritas de biossegurança e de Boas Práticas de Produção nas granjas constituem a base da prevenção da infecção das aves, aliadas a programas de vacinação de matrizes e estratégias adicionais, como uso de prebióticos, probióticos, ácidos orgânicos e outros produtos que reduzem a colonização intestinal e a excreção fecal. No que tange o rol de produtos biológicos para controle de salmoneloses, bacteriófagos líticos constantemente aparecem como potenciais alternativas terapêuticas. Trata-se de vírus que infectam bactérias seletivamente, replicam-se somente na presença da bactéria-alvo, são inócuos a humanos e animais, e são rapidamente eliminados do organismo hospedeiro na ausência da bactéria suscetível. Bacteriófagos líticos foram largamente explorados na era pré-antibióticos para

combater bactérias patogênicas no decurso de infecções humanas e animais. O interesse reacendeu nos últimos anos devido à emergência de bactérias multirresistentes a antimicrobianos, levando a um chamamento global para redução do uso indiscriminado e preservação da eficácia dos fármacos disponíveis, como também para desenvolvimento de produtos alternativos aos antimicrobianos. *S. Heidelberg* está entre as salmonelas paratíficas atualmente problemáticas para a avicultura de corte brasileira devido à habilidade de persistir no ambiente avícola^{4**}, refletindo na prevalência em granjas comerciais e em carcaças ao abate. Esse estudo avaliou a atividade lítica de bacteriófagos nativos sobre *S. Heidelberg*, antevendo o desenvolvimento de um produto biológico para o controle em frangos de corte.

ESTUDO DESENVOLVIDO

Foram utilizados microrganismos procedentes da coleção da Embrapa Suínos e Aves. Três bacteriófagos nativos (BRM 13312, BRM 13313 e BRM 13314), previamente isolados de galinhas e com ação lítica já determinada sobre *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*¹, foram analisados. Os bacteriófagos foram individualmente submetidos ao teste de lise em placa, em triplicata, frente a 13 isolados de campo de *S. Heidelberg*.

Tabela 01. Redução *in vitro* de *Salmonella* (log₁₀ UFC/mL) após 3 h de co-incubação com bacteriófagos

Cepa	Bacteriófago		
	BRM 13312	BRM 13313	BRM 13314
<i>S. Heidelberg</i> BRM 42033	1,46	0,97	0,87
<i>S. Enteritidis</i> BRM 48993	1,49	0,58	0,65
<i>S. Typhimurium</i> BRM 42122	1,48	0,48	0,65
Média/fago	1,48	0,68	0,72





berg. Cultivos em fase exponencial foram homogeneizados em meio de cultura com 0,7% de agarose e distribuídos em placa. Após a solidificação, 10 μ L de cada bacteriófagos foram individualmente aplicados sobre a superfície do cultivo, em triplicatas, numa multiplicidade de infecção (MOI) de 1.000 partículas por célula bacteriana, e incubados a 37°C por 24 h. A partir do ensaio de lise em placa, foi selecionada uma cepa de *S. Heidelberg* (BRM 42033) suscetível aos três bacteriófagos, que foi usada para quantificação *in vitro* da atividade lítica, sendo também analisada a ação sobre cepas de campo de *S. Enteritidis* (BRM 48993) e *S. Typhimurium* (BRM 42122). As culturas bacterianas foram ajustadas (10^7 UFC/ml) e individualmente inoculadas com

cada bacteriófago em caldo de cultivo, numa MOI de 5, e incubadas sob agitação (200 rpm) a 37°C. Aliquotas foram colhidas e submetidas à diluição seriada para quantificação de bacteriófagos e de *Salmonella*, em triplicatas, antes (0 h) e após 3 h de co-incubação. *S. Typhimurium* ATCC 14028 foi usada como controle positivo em ambos os ensaios, sendo incubada na presença e na ausência dos bacteriófagos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste em placa revelou ação lítica dos três bacteriófagos sobre 92,3% (12/13) das cepas de *S. Heidelberg* testadas, identificada como áreas sem crescimento da bactéria no local da aplicação dos fagos (Figura 01). A especificidade desses bacteriófagos já foi demonstrada frente a alguns outros sorovares de *Salmonella*,

ao passo que outras bactérias relevantes para a avicultura, como *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli* aviária (APEC), e bactérias naturalmente presentes na microbiota

Tabela 02. Média do aumento do título de bacteriófagos (\log_{10} UFP/mL) após 3 h de co-incubação com cepas nativas de *Salmonella*

Cepa	Bacteriófago		
	BRM 13312	BRM 13313	BRM 13314
<i>S. Heidelberg</i> BRM 42033	1,16	0,80	1,59
<i>S. Enteritidis</i> BRM 48993	0,88	1,27	1,44
<i>S. Typhimurium</i> BRM 42122	1,19	1,00	1,54



Figura 01. Teste de lise em placa dos bacteriófagos BRM 13312, BRM 13313 e BRM 13314 sobre cultivo *overlay* de *Salmonella Heidelberg* (imagem: Daiane Voss-Rech)



intestinal das aves foram refratárias³. Por outro lado, o fato de um isolado de *S. Heidelberg* ter sido refratário aos três bacteriófagos denota que nem todas as cepas de um determinado gênero bacteriano suscetível podem apresentar receptores disponíveis para a adequada adsorção dos bacteriófagos e culminar no rompimento e destruição da célula bacteriana. Isso reforça que o desenvolvimento de um produto biológico à base de bacteriófagos líticos precisa considerar a frequente variação de cepas dentro de uma população de bactérias inicialmente sensíveis a bacteriófagos.

Por sua vez, o teste em suspensão permitiu quantificar a redução de *Salmonella* produzida *in vitro* pelos bacteriófagos. Notavelmente, o efeito dos bacteriófagos foi mais intenso sobre *S. Heidelberg* se comparado à redução obtida de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (Figura 02). Na comparação com o tempo inicial (0 h), o número de UFC/mL de *S. Heidelberg* BRM 42033 foi reduzido 1,46; 0,97 e 0,87 \log_{10} após 3 h de co-incubação com os bacteriófagos BRM 13312, BRM 13313 e BRM 13314, respectivamente (Tabela 01). Simultaneamente, o título de bacteriófagos aumentou no mesmo período em relação à quantificação inicial (0 h) (Figura 03). Nesse tempo de co-incubação com *S. Heidelberg*, o aumento médio do título foi de 1,16; 0,80 e 1,59 \log_{10} UFP/mL dos bacteriófagos BRM 13312, BRM 13313 e BRM 13314, respectivamente (Tabela 02), indicando a habilidade de replicar na presença da célula hospedeira. A fagoterapia com esses bacteriófagos, administrados na forma de coquetel pela via oral, anteriormente reduziu quantitativamente *S. Enteritidis* no conteúdo cecal de frangos de corte², sinalizando o potencial de uso também para controle de *S. Heidelberg*.

CONCLUSÕES

Os testes *in vitro* demonstraram atividade lítica dos bacteriófagos nativos sobre cepas avícolas de *S. Heidelberg*. Estudos *in vivo* associados ao desenvolvimento de uma formulação que aprimore a estabilidade gastrointestinal e a amplitude da ação lítica desses bacteriófagos no organismo

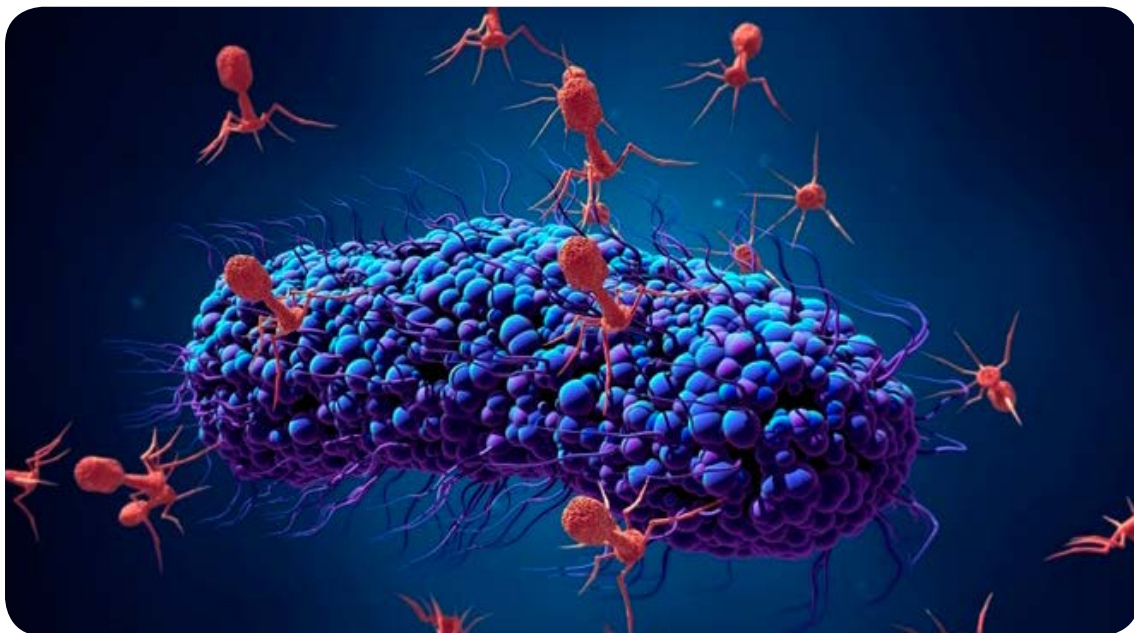


Figura 02. Quantificação de *Salmonella* (\log_{10} UFC/mL) antes (controle 0 h) e após 3 h de co-incubação com bacteriófagos

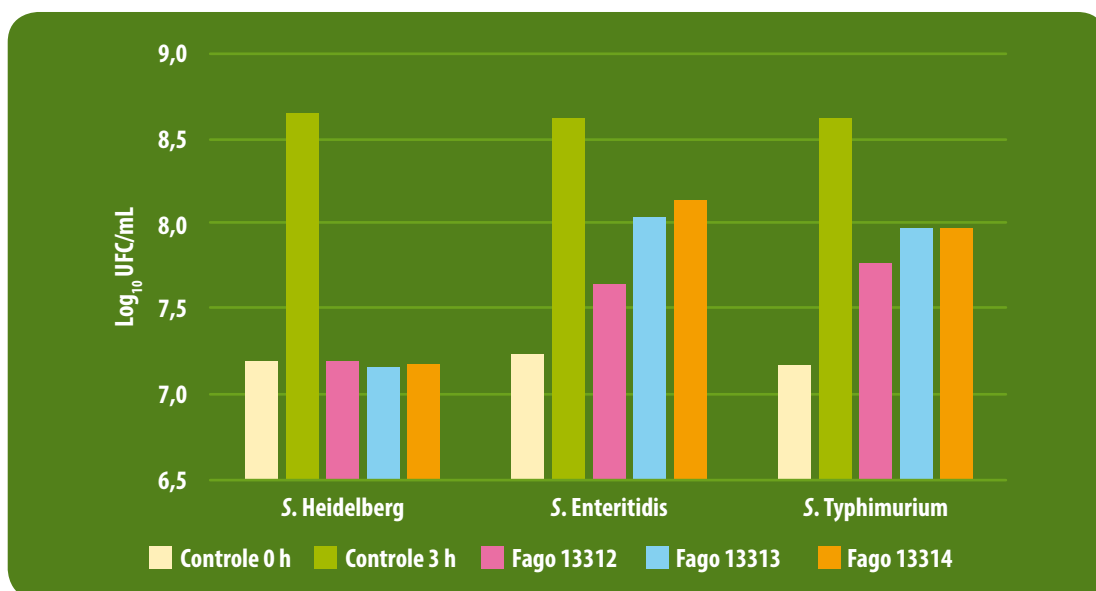
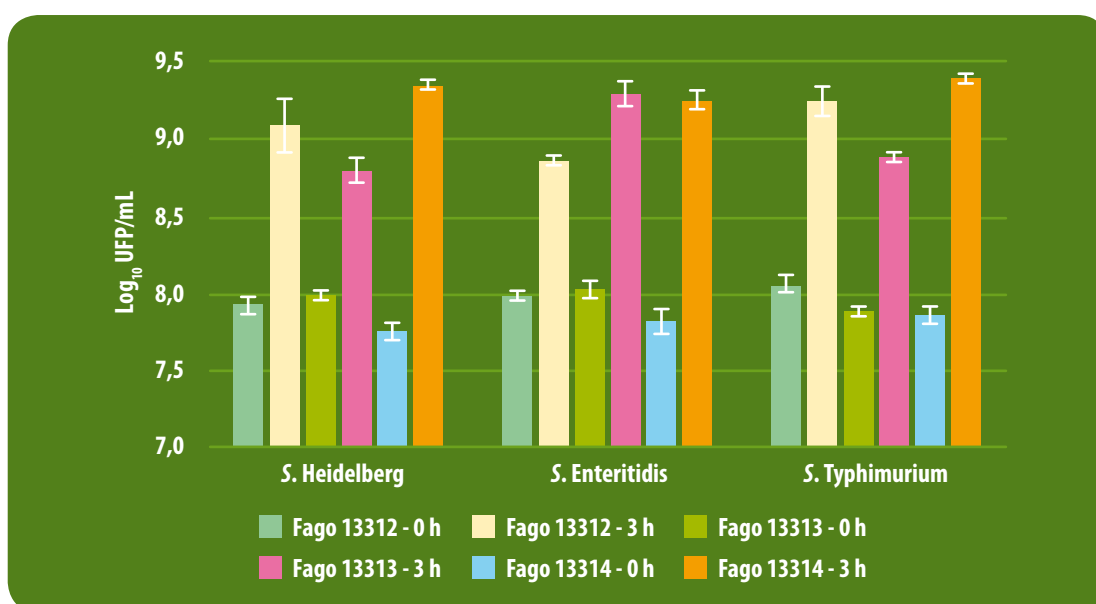


Figura 03. Quantificação inicial dos fagos (\log_{10} UFP/mL) antes (0 h) e após 3 h de co-incubação com cepas nativas de *Salmonella*



hospedeiro indicarão a viabilidade do desenvolvimento de um produto biológico comercial. Um biofármaco a base de bacteriófagos para uso no controle integrado de salmoneloses na avicultura tem potencial inserção no mercado frente à prevalência de *S. Heidelberg* nas granjas de frangos de corte e à necessidade de desenvolvimento de produtos alternativos aos antimicrobianos. ¹⁴

*Embrapa Suínos e Aves, Concórdia (SC). E-mail para contato com o autor: clarissa.vaz@embrapa.br

**Os números sobrescritos ao longo do texto se referem as citações presentes nas Referências Bibliográficas.

As Referências Bibliográficas deste artigo estão disponíveis no site de Avicultura Industrial por meio do link:

www.aviculturaindustrial.com.br/bacteriofago1296