

Avicultura

INDUSTRIAL.COM.BR

ISSN 1516-3105

Nº 02|2022 | ANO 113 | Edição 1316 | R\$ 26,00

Gessulli
AGRIBUSINESS
REFERÊNCIA E INOVAÇÃO



Contexto internacional traz oportunidades e desafios

Guerra na Ucrânia, Influenza Aviária em importantes *players* avícolas e custos elevados trazem algumas dificuldades, mas podem abrir novas portas para a avicultura brasileira

CATÁLOGO OFICIAL


América Latina | 2022

Em um encarte especial, toda a programação e empresas expositoras da edição 2022 da principal feira da indústria latino-americana de aves, suínos e peixes

BACTERIÓFAGOS: ESTUDO DA AÇÃO LÍTICA SOBRE *SALMONELLA* MINNESOTA ISOLADAS DE CAMA DE FRANGO

Aditivos alimentares à base de bacteriófagos podem ser potenciais auxiliares no controle de salmonelas paratíficas

Por | Clarissa Silveira Luiz Vaz^{a,b}, Daiane Voss-Rech^a e Arlei Coldebella^a

Bacteriófagos (fagos) são vírus amplamente distribuídos na natureza e que infectam bactérias. Os fagos que induzem ao rompimento da célula bacteriana hospedeira após a infecção e multiplicação intracelular são aqueles que desempenham o ciclo lítico, resultando em efeito bactericida. O reconhecimento da bactéria-alvo ocorre por meio de receptores específicos, geralmente presentes na superfície da célula bacteriana, a partir dos quais há a adsorção e infecção do alvo enquanto outras bactérias da microbiota permanecem intactas. Essa alta especificidade dos fagos; a incapacidade de infectar células humanas e animais; e a rápida eliminação do organismo na ausência da bactéria-alvo justificam o interesse de uso como ferramenta de controle biológico de bactérias patogênicas na produção animal.

É o caso da avicultura, onde aditivos alimentares à base de bacteriófagos podem ser potenciais auxiliares no controle de salmonelas paratíficas. A constante pressão de infecção das aves por *Salmonella* nas granjas exige

prevenção contínua, baseada em vigilância, biossegurança e vacinação; aliada a programas de controle integrado. Flutuações temporais e regionais na prevalência de sorotipos são detectadas pela monitoria periódica de *Salmonella* nas granjas avícolas. Partindo desses dados, o uso de bacteriófagos confere uma vantagem em relação a outras opções de aditivos alimentares já bastante usados no controle de salmoneloses paratíficas na avicultura, explorando a característica de especificidade para direcionar o combate aos sorotipos epidemiologicamente relevantes num dado momento e região.

Ainda que o mecanismo de ação de bacteriófagos seja atualmente melhor compreendido, a seleção de fagos-candidatos ao desenvolvimento de aditivos biológicos para uso animal não é tão simples. Além dos critérios primordiais de segurança, que incluem a natureza estritamente lítica, sem promover integração ao genoma da bactéria hospedeira; e ausência de genes de resistência a antimicrobianos ou que codifiquem fatores relacionados à patogenicidade bacteriana; os fagos usados em

aditivos alimentares precisam ter habilidade de sobreviver no veículo de administração e alcançar o sítio de atuação *in vivo*, a ponto de que a concentração de fagos livres seja suficientemente capaz de induzir a redução da população bacteriana-alvo. Devem ainda ser efetivos sobre a ampla diversidade de cepas de campo da bactéria.

A Embrapa tem atuado no desenvolvimento de um biofármaco à base

Tabela 01. Ação lítica (•) dos bacteriófagos nativos estudados pela Embrapa sobre salmonelas aviárias

<i>Salmonella</i>	Sorogrupo	Bacteriófago		
		BRM 13312	BRM 13313	BRM 13314
<i>S. Typhimurium</i>	B	•	•	•
<i>S. Heidelberg</i>	B	•	•	•
<i>S. Enteritidis</i>	D	•	•	•
<i>S. Panama</i>	D	•	•	•
<i>S. Gallinarum</i> bv. <i>Gallinarum</i>	D	•	•	•
<i>S. Gallinarum</i> bv. <i>Pullorum</i>	D	•	•	•



Crédito: Maxx-Studio/Shutterstock

de bacteriófagos para controle de salmonelas paratíficas avícolas, com foco principal em *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg*. Três bacteriófagos nativos (BRM 13312, BRM 13313 e BRM 13314) da coleção de micro-organismos da Embrapa Suínos e Aves reúnem as características desejadas para esse produto, com ação lítica já estudada frente a determinados sorotipos de *Salmonella* (Tabela 01)¹. Em se tratando de um produto cuja conformação permite adaptação de acordo com as necessidades de mercado, é possível substituir ou incluir novos fagos visando atender a alternância de sorotipos problemáticos no campo. *Salmonella* Minnesota tem sido detectada em alta prevalência em cama de frangos no país², refletindo na contaminação de carcaças ao abate^{2,3} e também relatada no produto exportado⁴. Duas linhagens de *S. Minnesota* parecem predominar na avicultura brasileira, ambas apresentando genes de resistência a antimicrobianos e de virulência, e com considerável diversidade genômica⁵. Para atuar de forma mais assertiva no desenvolvimento do biofármaco com fagos, atendendo

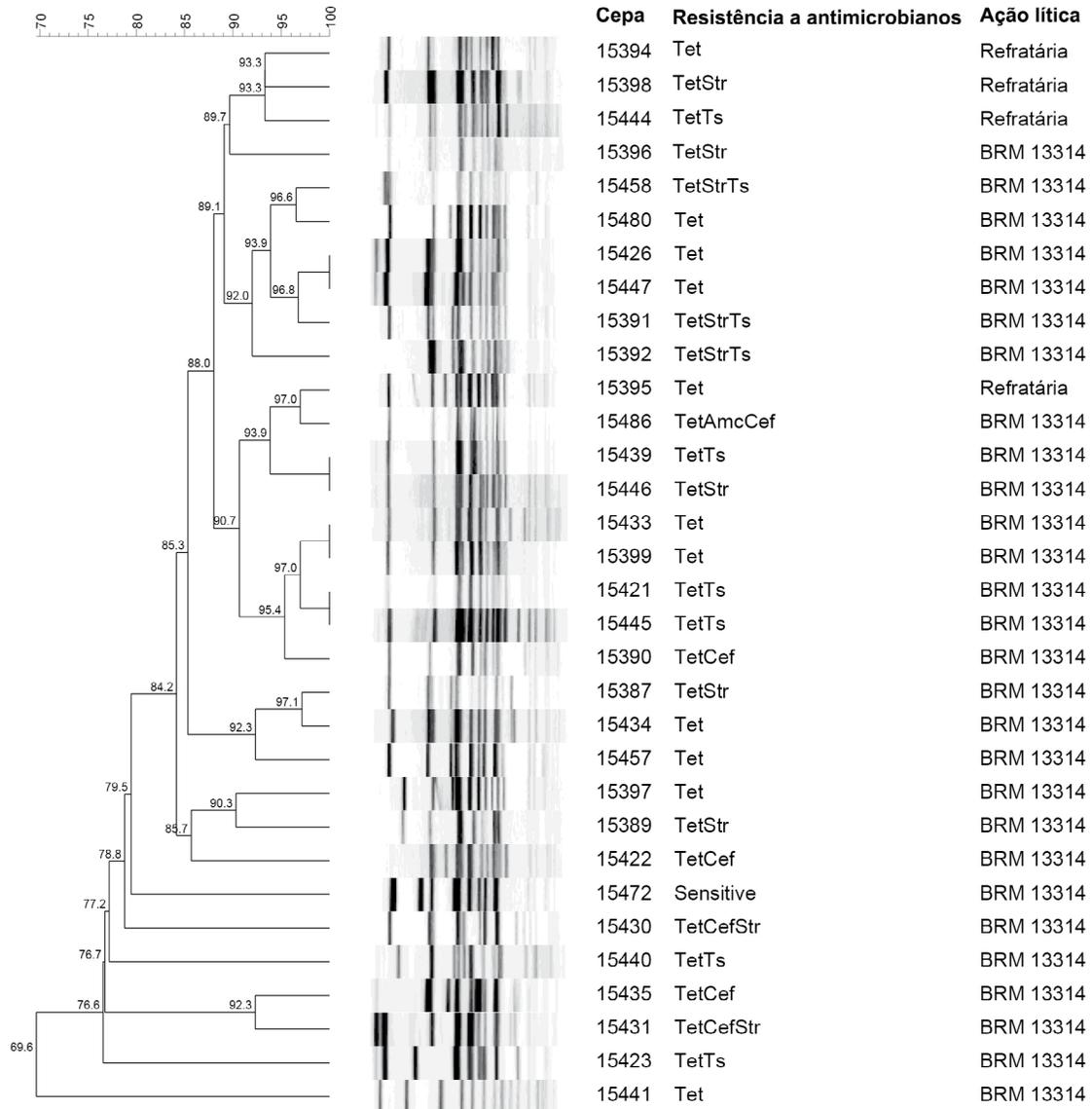
às expectativas de uso frente aos sorotipos paratíficos emergentes em frangos de corte, esse artigo relata o estudo da ação lítica dos bacteriófagos pesquisados pela Embrapa sobre cepas de campo de *S. Minnesota*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 32 cepas de *S. Minnesota* isoladas de suabes de arrasto colhidos sobre cama de frango em granjas nas regiões Sul e Centro-Oeste do País. Esses isolados foram primeiro caracterizados pelo teste de difusão em ágar para determinação da sensibilidade a antimicrobianos e genotipificados por macrorestrição de DNA com *XbaI* seguida de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) usando o protocolo mundialmente estabelecido para *Salmonella* spp. A seguir, a ação *in vitro* dos bacteriófagos BRM 13312, BRM 13313 e BRM 13314 foi testada individualmente frente a cada cepa de *S. Minnesota* por meio do ensaio-padrão de lise em placa, em triplicata. Brevemente, cada bacteriófago foi ajustado na concentração de 10⁹ UFP/mL em tampão SM



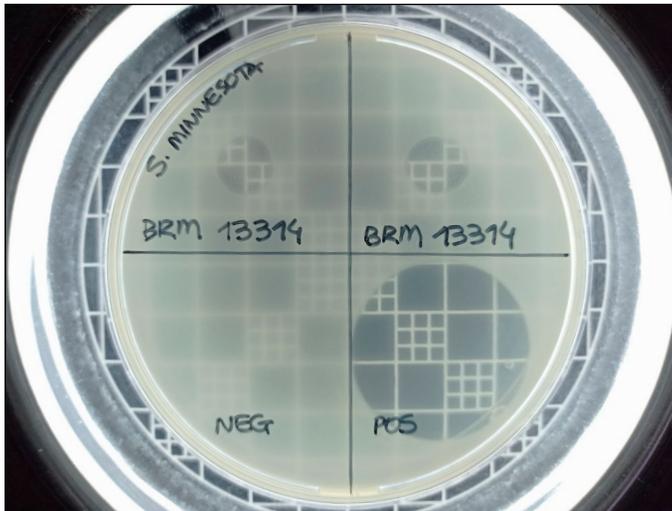
Figura 01. Similaridade genética (%) entre as cepas de *S. Minnesota* determinada a partir dos perfis de *Xba*I-PFGE encontrados. Os perfis de resistência a antimicrobianos de cada cepa e o resultado da ação lítica dos bacteriófagos BRM 13312, BRM 13313 e BRM 13314 são indicados



[NaCl 100 mM, MgSO₄·7H₂O 8 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) e 0,01% de gelatina]. As cepas de *S. Minnesota* foram cultivadas a 37°C por 18 h para obtenção de culturas em fase exponencial, a partir das quais uma alíquota foi colhida e homogeneizada em caldo nutriente contendo MgSO₄ 5 mM e 0,65% de agarose, e distribuída na superfície de ágar nutriente contendo MgSO₄ 10 mM. Após a solidificação, cada bacteriófago foi dispensado por meio de gota sobre o cultivo em *overlay* de *S. Minnesota*, de modo a obter uma multiplicidade de infecção (MOI)

de 1.000 partículas víricas para cada célula bacteriana. Timerosal e tampão SM foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente, em cada placa, sendo também testada uma cepa de *Salmonella* conhecida suscetível aos três fagos (*S. Typhimurium* ATCC 14028). As placas foram incubadas a 37 °C por 18-24 h. O resultado da ação lítica de cada bacteriófago sobre as cepas de *S. Minnesota* foi comparado entre si pelo teste exato de Fisher usando o SAS (versão 9.4) e considerando p ≤ 0,05.

Figura 02. Teste da ação lítica em placa do bacteriófago BRM 13314 sobre cepa de campo de *S. Minnesota*. Controle negativo (Neg): tampão SM. Controle positivo (Pos): timerosal

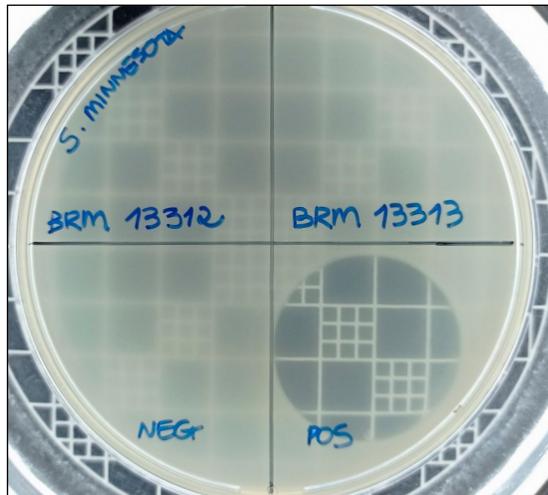


RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise inicial dos isolados de *S. Minnesota* mostrou que as cepas, em sua maioria, eram distintas entre si, e foram distribuídas em 28 genótipos com similaridade genética entre 69,6 e 97,1% (Figura 01). Uma das cepas (3,1%) apresentou suscetibilidade a todos os antimicrobianos testados. Os demais isolados apresentaram resistência a pelo menos um dos seguintes antimicrobianos: Amoxicilina com Ácido Clavulânico (AMC), Cefotiofur (CEF), Estreptomicina (STR), Tetraciclina (TET) e Trimetoprim + Sulfametoxazol (TS); agrupados dentro dos perfis TET (34,4%), TET-TS (18,7%), TET-STR (15,6%), TET-CEF (9,4%), TET-STR-TS (9,4%), TET-CEF-STR (6,2%), e TET-AMC-CEF (3,1%) (Figura 01). Essa variabilidade fenotípica e genotípica sugere que as cepas analisadas são representativas da diversidade de *S. Minnesota* encontrada a campo.

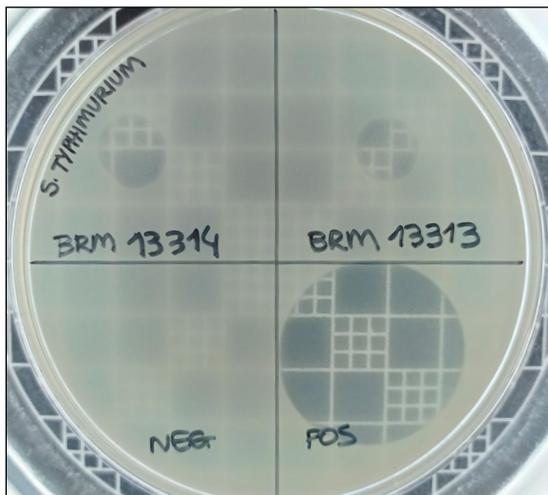
A seguir, o teste da ação lítica dos bacteriófagos revelou placas de lise claras e bem definidas produzidas pelo fago BRM 13314 (Figura 02) em 28 (87,5%) cepas de *S. Minnesota* (Figura 01). Entretanto, todas as cepas de *S. Minnesota* testadas foram refratárias aos outros dois fagos (Figura 03), havendo nítida diferença na ação dos bacteriófagos entre si ($p \leq 0,05$). Os resultados foram validados pelo ensaio realizado com *S. Typhimurium* (Figura 04). É interessante observar que os três bacteriófagos nativos estudados têm ação lítica similar contra sorotipos de salmonelas dos grupos B e D (Tabela 01), enquanto a ação sobre *S. Minnesota* (sorogrupo L) foi limitada ao fago BRM 13314. Esses fagos apresentam características morfológicas semelhantes, porém são geneticamente diferentes entre si¹, muito provavelmente atuando sobre diferentes receptores de *S. Minnesota*, cuja presença

Figura 03. Teste da ação lítica em placa dos bacteriófagos BRM 13312 e BRM 13313 sobre cepa de campo de *S. Minnesota*. Controle negativo (Neg): tampão SM. Controle positivo (Pos): timerosal



ou ausência poderia explicar as diferenças no efeito sobre as cepas analisadas. Além disso, devido à característica de especificidade intrínseca da cada fago, não é incomum encontrar ação lítica restrita a determinado gênero de bactérias e, dentro deste, com ação limitada a determinados grupos⁶. De fato, os fagos estudados pela Embrapa não apresentaram ação lítica sobre outras bactérias relevantes na avicultura além de *Salmonella*,

Figura 04. Controle (*S. Typhimurium*) do ensaio de ação lítica dos bacteriófagos (BRM 13313 e BRM 13314). Controle negativo (Neg): tampão SM. Controle positivo (Pos): timerosal



como por exemplo *Campylobacter*, *Escherichia coli* ou *Clostridium*¹.

Por outro lado, o acesso de fagos aos receptores na bactéria-alvo depende de sua distribuição e densidade na superfície bacteriana, o que pode influenciar a diferença de suscetibilidade apresentada por algumas cepas de um mesmo sorotipo a um determinado bacteriófago, como observado aqui frente ao fago BRM 13314. Todavia, as cepas de *S. Minnesota* analisadas apresentavam variabilidade fenotípica e genotípica, sugerindo boas possibilidades de cobertura do produto contendo esse fago para atuação nas cepas de campo onde uma ampla diversidade é esperada. Não obstante, fatores de virulência e adaptações *in vivo* da bactéria-alvo, como por exemplo, pela produção de polissacarídeos extracelulares; alteração genéticas dos receptores de fagos; e bactérias com localização intracelular no organismo hospedeiro, podem dificultar ou impedir a capacidade de bacteriófagos de acessar e infectar o alvo, interferindo no resultado da fagoterapia⁶.

Como conclusão, o biofármaco em desenvolvimento contendo o fago BRM 13314, pode ser considerado efetivo contra cepas de *S. Minnesota* que circulam no campo. Contudo, a estratégia de trabalhar com um produto contendo um conjunto de bacteriófagos diferentes entre si e atuantes sobre todos os sorotipos-alvo é desejável para limitar a emergência de cepas resistentes aos fagos nos casos de fornecimento prolongado às aves. A eventual resistência a um dos fagos do produto poderia ser compensada pelos outros bacteriófagos disponíveis, sem impactar o efeito sobre os sorotipos desejados. Considerando as salmonelas para as quais o produto tem sido focado, a eficácia dos três fagos é similar. Mas se for considerado somente o efeito do produto sobre *S. Minnesota*, outros fagos além do BRM 13312 e BRM 13313 e com habilidade lítica sobre esse sorotipo podem ser acrescidos. ⁶⁶

^aEmbrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

^bclarissa.vaz@embrapa.br

Os números sobrescritos presentes ao longo do texto se referem a indicações das Referências Bibliográficas, que podem ser obtidas no site de Avicultura Industrial por meio do link:

www.aviculturaindustrial.com.br/bacteriofago1316