



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**ALEX SANTOS DE ALMEIDA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA DUAS**  
**ESPÉCIES DE ENTEROBACTÉRIAS: *SALMONELLA***  
***ENTERICA* SUBESPÉCIE *ENTERICA* E *SHIGELLA SONNEI***

**MANAUS**

**2020**

**ALEX SANTOS DE ALMEIDA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA DUAS  
ESPÉCIES DE ENTEROBACTÉRIAS: *SALMONELLA*  
*ENTERICA* SUBESPÉCIE *ENTERICA* E *SHIGELLA SONNEI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos

**Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**

**Coorientador: Prof. Dr. Hugo Valério Corrêa de Oliveira**

**MANAUS**

**2020**



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

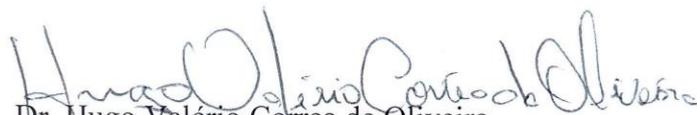
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP**  
**ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**  
**DA AMAZÔNIA – PPGMBT**

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO ALUNO ALEX SANTOS DE ALMEIDA EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA.

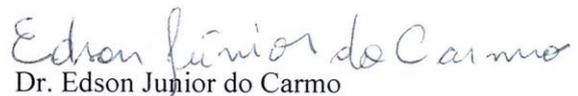
Aos quinze dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte às nove horas, realizou-se Via Web - Conferência, a Defesa Pública da dissertação de mestrado de Alex Santos de Almeida, sob o título “Isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos para duas espécies de enterobactérias: *Samonella enterica* subespécie enterica e *Shigella sonnei*”, requisito exigido para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, tendo como orientador o Dr. Spartaco Astolfi Filho e coorientador o Dr. Hugo Valério Correa de Oliveira, segundo encaminhamento da documentação à Coordenação do Curso e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas - UEA. A banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores: Dr. Hugo Valério Correa de Oliveira, Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio e Dr. Edson Junior do Carmo.

Após as arguições e encerrada a sessão de defesa, os referidos membros da banca emitiram o parecer final sobre a defesa da dissertação de mestrado, tendo o aluno sido

APROVADO

  
Dr. Hugo Valério Correa de Oliveira  
CPF: 681.153.262-91

  
Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio  
CPF: 593.715.361-88

  
Dr. Edson Junior do Carmo  
CPF: 000.297.201-84

Universidade do Estado do Amazonas  
Av.: Djalma Batista, 3578 - Flores  
CEP: 69050-010 / Manaus - AM  
[www.uea.edu.br](http://www.uea.edu.br)

**UEA**  
UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DO  
AMAZONAS

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a). **Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

S237ii

Santos de Almeida, Alex

Isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos para duas espécies de enterobactérias: Salmonella Enterica Subspécie Enterica e Shigella Sonnei / Alex Santos de Almeida. Manaus: [s.n], 2020.

65 f.: color.; 28 cm.

Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020.

Inclui bibliografia

Orientador: Spartaco Astolfi Filho Coorientador: Hugo Valério Corrêa de Oliveira

1. Bacteriófagos. 2. Salmonella Typhi. 3. Shigella sonnei. 4. Enterobacteriaceae. 5. Terapia Fágica. I. Spartaco Astolfi Filho (Orient.). II. Hugo Valério Corrêa de Oliveira (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos para duas espécies de enterobactérias: Salmonella Enterica Subspécie Enterica e Shigella Sonnei

**Elaborado por Geane Macedo Galves – CRB - 11/463**

*Dedico este trabalho a todas as minorias deste país, que lutam diariamente para terem suas vozes ouvidas e seus direitos alcançados. E TODOS que não se calam diante do sistema e se colocam na linha de frente para mudar esta sociedade assolada pelo machismo e conservadorismo.*

*“Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é ser o opressor”.*

Paulo Freire.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À FAPEAM, pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, da UEA.

Ao meu coorientador Dr. Hugo Valério Corrêa de Oliveira, que MUITO me ajudou nesses dois anos e meio de caminhada, e que considero como um pai (apesar de ele não gostar desta atribuição). Irei levá-lo como um exemplo a ser seguido, durante toda minha vida, por ser um excelente profissional.

Aos meus pais, por me darem amor incondicional e suporte durante toda a minha vida, além de estarem comigo nos momentos mais difíceis. Jamais conseguirei retribuir tudo o que vocês fizeram e fazem por mim.

Ao meu orientador, Dr. Spartaco Astolfi Filho.

Ao Dr. Kitajima pelas fotos de eletromicrografia.

Ao coordenador do curso de mestrado, e a todos os professores e secretários do programa.

A toda a equipe do Laboratório de Tecnologias de DNA, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Ao Dr. Allyson Guimarães, por me doar alguns insumos que facilitaram muito a execução de algumas etapas dos experimentos. Além de ser um ótimo amigo e excelente pesquisador, sempre disposto a ajudar qualquer aluno(a) e jovem pesquisador(a).

A todas as minhas amigas do grupo “GR”, por sempre estarem comigo nos momentos mais felizes da minha vida. Vocês sempre conseguem colocar um sorriso no meu rosto, mesmo quando estou passando por situações difíceis.

## RESUMO

Os bacteriófagos são vírus que infectam exclusivamente bactérias, não interagem com células humanas e são os microrganismos mais abundantes no planeta. O uso de fagos vem sendo considerado como uma medida alternativa para o tratamento de infecções bacterianas, principalmente contra cepas multirresistentes a antibióticos. *Salmonella* e *Shigella* são enteropatógenos comumente disseminados por água e alimentos contaminados com material fecal, possuem um poder de invasão do epitélio intestinal muito grande, sendo as causas mais comuns de disenteria bacilar. O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bacteriófagos líticos contra linhagens de *Salmonella* e *Shigella*. Os bacteriófagos foram isolados a partir de fontes hídricas, contaminadas com efluentes domésticos, na cidade de Manaus-Am. Dois sorovares de *Salmonella enterica* subespécie enterica e *shigella sonnei* foram utilizadas como hospedeiras para o isolamento de fagos espécie-específicos, contudo, suas respectivas capacidades de infecções também foram analisadas para outras bactérias. Os fagos isolados foram analisados quanto à natureza de seu material genético, ciclo de infecção, morfologia e estabilidade. Ao todo foram isolados cinco bacteriófagos líticos, a partir de *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Enteritidis e *Shigella sonnei*, todos os bacteriófagos foram capazes de infectar pelo menos outras nove linhagens bacterianas; as curvas apontaram as relações entre diferentes faixas de multiplicidade de infecção (MOI), e aferiram que os vírus isolados possuem um período de latência relativamente baixo, com liberações de altas quantidades de novas partículas virais no “burst size”, a microscopia eletrônica de transmissão revelou que quatro dos fagos pertencem a família *Siphoviridae*, enquanto um único fago possui características de *Myoviridae*; na análise do material genético não possível diferir os fagos isolados para *S. sonnei* por RFLP, porém todos os outros fagos possuíam perfis de digestão distintos com as enzimas de restrição usadas. Os novos fagos caracterizados, no presente trabalho, possuem características promissoras para infectar e gerar lise não somente nas bactérias hospedeiras, como em outras espécies de enterobactérias.

**Palavras-chave:** Bacteriófagos, *Salmonella* Typhi, *Shigella sonnei*, *Enterobacteriaceae*, Terapia Fágica.

## ABSTRACT

Bacteriophages are viruses that only infect bacteria, do not interact with human cells and are the most abundant microorganisms on the planet. The use of phages has been considered as an alternative measure for the treatment of bacterial infections, mainly against multiresistant antibiotic strains. *Salmonella* and *Shigella* are enteropathogens commonly spread by water and food contaminated with fecal material; have a very large intestinal epithelial invasion power, being the most common causes of bacillary dysentery. The present work aimed to isolate and characterize lytic bacteriophages against *Salmonella* and *Shigella* strains. The bacteriophages were isolated from water sources, contaminated with domestic effluents, in the city of Manaus-Am. Two serovars of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* and *shigella sonnei* were used as hosts for the isolation of species-specific phages; however, their respective infection capabilities have also been analyzed for other bacteria. The isolated phages were analyzed for the nature of their genetic material, infection cycle, morphology and stability. Altogether five lytic bacteriophages were isolated, from *Salmonella Typhi*, *Salmonella Enteritidis* and *Shigella sonnei*, all bacteriophages were able to infect at least ten other bacterial strains; the curves showed the relationships between different ranges of multiplicity of infection (MOI), and determined that the isolated viruses have a relatively low latency period, with releases of high amounts of new viral particles in the "burst size", the transmission electron microscopy revealed that four of the phages belong to the family Siphoviridae, while a single phage has characteristics of Myoviridae; in the analysis of the genetic material it is not possible to differentiate the phages isolated for *S. sonnei* by RFLP, however all the other phages had different digestion profiles with the restriction enzymes used. The new phage characterized, in the present work, have promising characteristics to infect and generate lysis not only in host bacteria, but in other species of enterobacteria.

**Keywords:** Bacteriophages, *Salmonella Typhi*, *Shigella sonnei*, *Enterobacteriaceae*, Phage Therapy.

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Tabela 1</b> - Principais Proteínas Secretadas e/ou Translocadas para a Célula Eucariótica Através do Sistema de Secreção Tipo III.....	16
<b>Tabela 2:</b> Proteínas Plasmidiais Secretadas pelo SSTT Envolvidas na Patogenia da Doença...21	
<b>Tabela 3:</b> Fagos da Família <i>Siphoviridae</i> e seus Respectiveos Receptores na Célula Hospedeira.....	28

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1:</b> Eficiência de Plaqueamento (EOP).....	37
<b>Tabela 2:</b> Nomenclatura dos Bacteriófagos .....	42

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1</b> - Distribuição dos Casos de <i>Shieglla flexneri</i> e <i>Shigella Sonnei</i> ao Redor do Mundo.....	23
<b>Figura 2</b> - Morfologia e Composição do Material Genético das Famílias de Bacteriófagos.....	25
<b>Figura 3</b> - Ciclos de Propagação dos Bacteriófagos.....	27

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1:</b> Imagens dos Bacteriófagos em Microscopia Eletrônica de Trasmissão.....	43
<b>Figura 2:</b> Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição.....	44
<b>Figura 3:</b> Multiplicidade de Infecção em Curva de Crescimento de Fase Exponencial.....	45
<b>Figura 4:</b> Curvas de Crescimento de uma Etapa - <i>One-Step Growth</i> .....	46
<b>Figura 5:</b> Testes de Estabilidade Física e Química.....	47

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1	Salmonella enterica .....	13
2.1.1	Patogenia da Salmonelose .....	14
2.1.2	Dados Epidemiológicos.....	17
2.2	Shiguella spp.....	19
2.2.1	Patogenia da Shigelose.....	20
2.2.2	Dados Epidemiológicos.....	22
2.3	Bacteriófagos .....	24
2.3.1	Ciclo de Propagação dos Bacteriófagos .....	25
2.4	Terapia Fágica como Alternativa no Tratamento de Infecções.....	29
3	OBJETIVO GERAL.....	32
<b>CAPÍTULO I .....</b>		<b>33</b>
1	INTRODUÇÃO.....	36
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1	Cepas Bacterianas e Condições de Cultuta.....	37
2.2	Isolamento dos Bacteriófagos.....	38
2.3	Produção e Determinação dos Títulos.....	38
2.4	Análise Morfológica.....	39
2.5	Extração do Material Genético Viral e RFLP.....	39
2.6	Espectro Lítico e Eficiência de Plaqueamento (EOP).....	40
2.7	Curva de Crescimento para Análise de Infecção Fágica.....	40
2.8	Curva de Crescimento de Etapas Isoladas.....	41
2.9	Estabilidade Física e Química.....	41
2.10	Análise dos Dados.....	42
3	RESULTADOS.....	42
3.1	Isolamento dos Bacteriófagos.....	42
3.2	Morfologia e Análise Primária do Material Genético.....	43
3.3	Gama de Hospedeiros e Avaliação de Especificidade.....	44
3.4	Análise de Infecção Fágica.....	45

3.5 Estabilidade Física e Química.....	47
4 DISCUSSÃO .....	48
5 CONCLUSÃO .....	52
REFERÊNCIAS.....	53

## 1 INTRODUÇÃO

Os bacteriófagos são vírus que infectam especificamente células procariotas, não sendo capazes de se propagar em células humanas. Eles compõem a maior pluralidade dos microrganismos existentes no planeta, uma vez que as bactérias são os seres vivos com a maior biomassa existente. A relação é de que uma única célula bacteriana seja reconhecida por centenas de fagos (KONOVALOV; SILHAVY, 2017). Assim como os vírus humanos, os bacteriófagos não são capazes de se reproduzir sem adentrarem e utilizarem da maquinaria de sua respectiva célula hospedeira (WITTEBOLE *et. al.*, 2014). Os fagos líticos, ao final de seu ciclo, destroem a parede celular da bactéria liberando novas partículas virais, estes são comumente estudados como candidatos a um tipo de terapia alternativa contra as infecções bacterianas (multi)resistentes a antibióticos (DOORE *et. al.*, 2019).

O conceito de terapia fágica (ou fagoterapia) nasceu logo após a descoberta dos bacteriófagos, vários pesquisadores passaram a estudar a dinâmica em torno deles (KAKASIS *et. al.*, 2018). Após a descoberta dos antibióticos, o empenho para a caracterização e futuros ensaios clínicos, envolvendo novos fagos, no campo do controle das infecções bacterianas, decaiu (LIN *et. al.*, 2017). Atualmente, com o um aumento do número de bactérias resistentes e multirresistentes, os bacteriófagos voltaram a ganhar destaque por muitos grupos de pesquisas no mundo (AZEREDO *et. al.*, 2020). Esses estudos focam na utilização desses vírus como alternativas de tratamento, sem malefícios à saúde dos pacientes infectados, em contrapartida aos diversos efeitos colaterais que os antibióticos podem causar (CHANISHVILI *et. al.*, 2011; PENADÉS *et. al.*, 2015; LAVEBRATT *et. al.*, 2019).

As bactérias do gênero *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* são as mais prevalentes, entre as gastroenterites infecciosas, e estão disseminadas por todo o globo, algumas cepas provocam disenteria e/ou infecção sistêmica, podendo gerar quadros graves, principalmente em crianças menores de cinco anos (AMEZQUITA *et. al.*, 2014; FARDZANEI *et. al.*, 2017). No Brasil essas infecções costumam ser endêmicas de regiões com escassez de saneamento básico (RODRIGUES *et. al.*, 2020). O consumo de alimentos sem o cozimento adequado também consta como um fator de risco (DALLAL *et. al.*, 2019). Alguns estudos trabalham com o desenvolvimento de vacinas contra epítomos de membrana dessas enterobactérias, no entanto o número de sorotipos existentes é muito grande, o que dificulta a instalação de uma imunidade eficaz e de amplo espectro (SHALL *et. al.*, 2020). Em complicações dessas doenças, como a

febre tifoide e toxinfecção por toxina de shiga, faz-se necessário o uso de antibióticos, e as enterobactérias já estão entre os patógenos com elevado grau de resistência, o que fortifica a necessidade de novas medidas de tratamento (KHAN *et. al.*, 2014; AKHTHAR; GONZALES, 2018). De acordo com o FDA (Food and Drug Administration, nos EUA), para que um fago seja testado como potencial candidato no controle de infecções bacterianas, recomenda-se que os mesmos sejam oriundos de fontes naturais, que reconheçam unicamente fatores de virulência bacterianos, possuam genoma de DNA, sejam obrigatoriamente líticos e não transdutores. Deste modo, isolar e caracterizar fagos líticos contra bactérias patogênicas constitui a primeira ação nesses estudos multifaces.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Salmonella enterica*

*Salmonella enterica* é uma espécie bacteriana pertencente à família *Enterobacteriaceae*; apresenta a morfologia de um bastonete e flagelos dispostos de forma peritríquia, exceto nos sorotipos com isenção do antígeno H, observado em *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* (FORSYTHE *et. al.*, 2013). A membrana plasmática e a parede celular são formadas por uma dupla camada de fosfolipídeos, sendo, assim, caracterizadas como gram-negativas, a maioria das *Salmonella* de importância clínica não fermentam a lactose, salvo aquelas que por transferência de plasmídeos adquiriram genes para as enzimas necessárias (CRUMP *et. al.*, 2015).

*S. enterica* subdivide-se em seis subespécies: *S. enterica* sub. *enterica*, *S. enterica* sub. *salamae*, *S. enterica* sub. *arizonae*, *S. enterica* sub. *diarizonae*, *S. enterica* sub. *houtenae* e *S. enterica* sub. *indica* (FORSTINUS; DICKSON; CHINYERE, 2015). Para a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* existem mais de dois mil sorotipos descritos, que infectam, principalmente, animais de sangue quente (SIMPSON *et. al.*, 2018). Dentro desse grupo, encontram-se os sorotipos mais prevalentes nas infecções humanas, cerca de 99% (AO *et. al.*, 2015). *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* aparecem como os sorotipos mais prevalentes nas infecções humanas (CARNEIRO; COSTA, 2020). Os sorogrupos de *Salmonella* são designados pelo antígeno somático “O”, enquanto os sorotipos (também conhecido como sorovares – unidade taxonômica básica) são definidos pelo antígeno flagelar “H” e algumas vezes pelo

antígeno capsular “K” (FEASEY *et. al.*, 2015; GUTEMA *et. al.*, 2019). Um sorotipo da bactéria pode apresentar mais de um antígeno somático, o que leva sorotipos diferentes a apresentarem a mesma resposta antigênica quanto ao seu antígeno “O” (DEKKER *et. al.*, 2018). As bactérias *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi e *Salmonella* Dublin, possuem um antígeno capsular especial denominado “Vi”, que lhes confere maior virulência (FORTINUS *et. al.*, 2015). Alguns sorotipos de *Salmonella enterica* subespécie enterica são comumente mencionados com as iniciais maiúsculas após a escrita do gênero, abreviando assim a escrita da subespécie a qual pertencem: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Infantis, e outros (FORSTINUS; DICKSON; CHINYERE, 2015; GUTEMA *et. al.*, 2019).

### 2.1.1 Patogenia da salmonelose

A Salmonelose é uma doença que pode causar desde danos ao sistema gastrointestinal até uma infecção sistêmica, estando intimamente relacionado com o sorovar da bactéria, o principal mecanismo de contaminação é por via fecal-oral (ENG *et. al.*, 2015; CARNEIRO; COSTA, 2020). A quantidade do inóculo ingerido, imunidade do hospedeiro, existência de uma comorbidade e os fatores de virulência da bactéria irão influenciar na gravidade da doença (BARTON *et. al.*, 2015). Dentre os mais suscetíveis à uma infecção severa, encontram-se crianças com menos de cinco anos, imunossuprimidos e idosos, grande parte das *Salmonella* são capazes de causar doença devido a sua habilidade de invadir o epitélio (PARRY *et. al.*, 2013; VELAZQUEZ *et. al.*, 2019). A maioria das infecções é autolimitante, levando apenas a quadros de diarreia, que são sanados em poucos dias (CAMPIONI *et. al.*, 2012; WOTZKA *et. al.*, 2017).

A partir do momento que é ingerida, a bactéria resiste a ação do suco gástrico e se instala no intestino delgado, onde adere à superfície dos enterócitos (HARAGA *et. al.*, 2008; VELAZQUEZ *et. al.*, 2019). Essa primeira etapa de adesão é fundamental para a patogenicidade da bactéria, em seguida, ocorre infusão de proteínas dentro das células que promovem o englobamento bacteriano, dando início a etapa de invasão do epitélio (TREBICKA *et. al.*, 2013; ZHANG *et. al.*, 2018). O recrutamento de células polimorfonucleares leva a liberação de prostaglandinas e outras citocinas pró-inflamatórias que desencadeiam a fase aguda da infecção, junto com a liberação de cloro pelos enterócitos, ocasionando a diarreia

(HARAGA *et. al.*, 2008; CANESTRARI *et.al.*, 2019). A gastroenterite observada nesta etapa pode regredir ou evoluir para uma fase de infecção sistêmica, onde a bactéria invade os macrófagos e segue até órgãos do sistema reticuloendotelial, esta disseminação ocorre com as chamadas salmonelas tifoides (HENDRIKSEN *et. al.*, 2011; ZHANG *et. al.*, 2018).

*S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C são os sorotipos capazes de causar febre entérica (febre tifoide e paratifoide), nessas cepas há propagação da bactéria no fígado, baço e medula óssea (QIAN *et. al.*, 2020). A febre pode alcançar até 42°C, se não tratada pode ocorrer perfuração das “placas de Peyer” (conglomerados linfonodulares), na região íliaca acarretando em disenteria; erupções cutâneas são uma característica clássica da febre entérica (RICHARD; PORTER, 2019). Os casos de bacteremia por cepas não tifoides, elevam a temperatura corporal tanto quanto, mas em contrapartida as erupções cutâneas não são observadas (RICHARD; PORTER, 2019; THINDWA *et. al.*, 2019). Quase todas as cepas podem gerar um quadro de bacteremia, visto que todas possuem a capacidade de invadir o tecido da mucosa intestinal, contudo as salmonelas não tifoides seguem como as mais prevalentes registradas (ALMEIDA *et. al.*, 2015). Em complicações extraintestinais da doença o pulmão destaca-se como o órgão mais atingido, contudo existem relatos de focos da infecção em outras áreas como o sistema urinário, meninges e coração (BABU *et. al.*, 2016). *S. Enteritidis* é patógeno muito comum em aves, SPI-13 é primordial para invasão e proliferação em macrófagos nos modelos murinos, mas não em humanos, nestes o SPI-8 parece ser o responsável (ESPINOZA *et. al.*, 2017).

Os fatores de virulência são os responsáveis por definir o grau de virulência da bactéria, e são codificados por genes cromossomais ou extracromossomais; existem genes que são comuns a todos os tipos de *Salmonella* e, portanto, bem conservados (BARTON *et. al.*, 2015; RODER *et. al.*, 2019). Os fatores de virulência podem estar contidos na superfície bacteriana como nos lipopolissacarídeos, fimbrias ou pili, flagelos, e promovem a adesão célula-hospedeiro, primeiro passo na patogênese bacteriana (SIMON *et. al.*, 2013; OBAYES *et. al.*, 2020).

Nas Ilhas de Patogenicidade de Salmonella (SPI) são encontrados os genes responsáveis pela formação do sistema de secreção tipo III (sigla: SSTT, do inglês *type three secretion system*), invasinas, citotoxinas, proteínas efetoras, entre outras (**Tabela 1**), existem 17 ilhas de patogenicidade descritas até o momento, algumas exclusivas de certas estirpes como *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin*, que detem SPI 7 (CHONG *et. al.*, 2019).

Proteína	Localização	Função	Efeito na Célula Hospedeira	Referências
SipA	SPI- 1	Ligação de actina, indução da migração transepitelial de neutrófilos.	Inibição da despolarização de actina, migração transepitelial de neutrófilos.	MCINTOSH <i>et. al.</i> , 2017
SipB	SPI- 1	Componente do sistema translocador, ligação à caspase-1.	Translocação de proteínas efetoras, indução da apoptose em macrófagos.	CANESTRARI <i>et. al.</i> , 2019
SipD	SPI- 1	Componente do sistema translocador, nucleação de feixes de actina.	Translocação de proteínas efetoras, rearranjo do citoesqueleto.	SAMYKANNU <i>et. al.</i> , 2017
SptP	SPI- 1	Tirosina fosfatase.	Rompimento do citoesqueleto de actina.	JOHNSON <i>et. al.</i> , 2016
SopA	SPI- 1	Indução da migração transepitelial de neutrófilos.	Migração transepitelial de neutrófilos.	ZHANG <i>et. al.</i> , 2018
SopB	SPI- 5	Inositol-fosfato fosfatase.	Perda de eletrólitos.	ZHANG <i>et. al.</i> , 2018
SopE	Profago	Fator ativador de troca de guanina (GDP/GTP).	Rearranjo do citoesqueleto.	RODER <i>et. al.</i> , 2019
SopE2	Cromossomo	Fator ativador de troca de guanina (GDP/GTP).	Rearranjo do citoesqueleto.	VILELA <i>et. al.</i> , 2020
SseB	SPI- 2	Componente do sistema translocador.	Translocação de proteínas efetoras.	LEE <i>et. al.</i> , 2017
SseC	SPI- 2	Inserção na membrana da célula alvo, componente do sistema translocador.	Translocação de proteínas efetoras.	OBAYES <i>et. al.</i> , 2020
SseD	SPI- 2	Componente do sistema translocador.	Translocação de proteínas efetoras.	MASERATI <i>et. al.</i> , 2017
SpiC	SPI- 2	Proteína efetora.	Inibição do tráfego intracelular.	KIM <i>et. al.</i> , 2018

**Tabela 1:** Principais Proteínas Secretadas e/ou Translocadas para a Célula Eucariótica Através do Sistema de Secreção Tipo III.

Os genes responsáveis por conferir invasão intracelular são codificados pelo operon *Inv* e é composto de sete genes nomeados de A à G, falhas em alguns desses genes diminuem a propriedade de invadir tecidos da *salmonella*, conseqüentemente, perda da capacidade de causar doença (HENDRIKSEN *et. al.*, 2011; KIPPER *et. al.*, 2019). Para que a bactéria consiga sobreviver ao sistema de imunidade inata, conferida pelo sistema complemento, uma proteína de membrana externa “Rck” (*resistance to complement killing*- resistência ao sistema

complemento) atua no impedimento de fixação das proteínas que formam o complexo de ataque a membrana (MAC) (HUR *et. al.*, 2011; MAMBU *et. al.*, 2017).

Cepas que possuem o plasmídeo *spv*, responsável pela transcrição de cinco genes, envolvidos na resistência, manutenção e proliferação dentro de células do sistema monociticofagocitário, acrescem ainda mais em seu arsenal de virulência (EVANS *et. al.*, 2013; KIPPER *et. al.*, 2019). Esses plasmídeos podem ser difundidos para outras cepas, menos patogênicas, através de um processo conhecido como conjugação, onde uma bactéria doadora (F+) transfere o material genético por uma fimbria especializada, denominada pilus sexual (BONIFIELD; HUGHES, 2003; EVANS *et. al.*, 2013; OBAYES *et. al.*, 2020).

### 2.1.2 Dados epidemiológicos

A *Salmonella* pode infectar diversos animais, desde répteis a mamíferos, geralmente, as bactérias que são estritas a um único tipo de hospedeiro são mais virulentas, visto nos sorovares *S. Typhi* e *Paratyphi* que tem como principal hospedeiro o homem (QIN *et. al.*, 2020). Outros sorovares como, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* podem colonizar um maior número de espécies e estão entre os mais envolvidos nos casos de infecção de origem alimentar (SCALLAN *et. al.*, 2011; SHARMA *et. al.*, 2016).

*S. Enteritidis* emergiu como o principal sorovar causador de gastroenterite no Brasil, análises de filogenia apontaram uma disseminação de linhagens distintas a partir de 1994, essas instalaram-se como um grupo epidêmico global devido sua alta capacidade de colonizar frangos, maior resistência em meio ácido e habilidade superior de invadir e sobreviver em macrófagos (CAMPIONI *et. al.*, 2018; CAMPIONI *et. al.*, 2020). O Brasil é um dos líderes de exportação de carne de aves no mundo e o estado do Rio Grande do Sul destaca-se como um dos principais responsáveis (TONDO *et. al.*, 2015; CAMPIONI *et. al.*, 2020). Estudos apontam que 68,1% dos casos de infecção alimentar, na Região Sul, são oriundos de cepas de *Salmonella* spp., dentre o sorotipo mais prevalente encontra-se a *S. Enteritidis*, introduzida no Brasil em meados dos anos 90 (CAPALONGA *et. al.*, 2014). Baseado nessas informações um estudo realizado por Borges *et. al.* (2017), utilizando uma técnica de robotipagem de PCR, apontou um grau de similaridade de 99,7% - 100% com *S. Enteritidis*, nas amostras de aves e outros alimentos envolvidos em surtos de infecção alimentar.

Já foi mostrado que o uso indiscriminado de antibióticos nos processos de avicultura e pecuária, vem selecionando cepas resistentes as drogas, que podem a qualquer momento entrar em contato com a população, ocasionando surtos por *salmonellas* multirresistentes (MR) (MAJOWICZ et. al., 2010; HENDRIKSEN et. al., 2011; BARATTO et. al., 2020). Almeida et. al. (2015) realizaram um estudo de diversidade genética de *S. Typhimurium*, segundo maior sorovar de *S. enterica* sub. *enterica* causador de enterite humana no Brasil, cerca de 25% dos isolados, coletados de amostras clínicas e de alimentos entre 1983-2013, eram multirresistentes a antimicrobianos.

Miranda et. al. (2016) fizeram uma caracterização genotípica de *Salmonella* spp., no Brasil, encontrando os sorotipos *S. Infantis* (16%) e *S. Enteritidis* (13,7%) como as mais prevalentes nas amostras alimentares, nas amostras clínicas a *S. Enteritidis* (29%) apareceu como a mais predominante, precedendo a *S. Typhimurium* (16%). A incidência de *Salmonella* cresceu em 78%, nos Estados Unidos, e a taxa de mortalidade que era de 2,7% passou para 4,2%, os dados sobre o perfil de suscetibilidade, mostraram um aumento de 2,4% para 50,8% em testes de resistência com mais de sete classes de antimicrobianos (HARVEY et. al., 2017). Dentre as doenças diarreicas, mundialmente, a *Salmonella* spp. entra com uma percentagem de 9% como fator etiológico, entretanto é inversamente proporcional nas causas de morte, sendo essa etiologia responsável por 41% dos óbitos por doença diarreica (WHO, 2016).

Ao et. al. (2015) estimaram que infecções por *Salmonellas* Não Tifoides (SNT) são responsáveis pela morte de cerca de 681.316 pessoas, anualmente, em todo o mundo. O estudo ainda aponta a África Subsaariana e a Europa como as regiões mais incidentes nas infecções (23 e 21 casos/ por 100 mil habitantes, respectivamente). Balasubramanian et. al. (2018) apontaram as infecções por SNT uma preocupação para a saúde pública na África Subsaariana, uma vez que a área possui um grande número de pessoas com outras doenças endêmicas, como HIV e malária (por *P. falciparum*); essas doenças de base associadas as condições de vida precária tornam os quadros de doença por SNT mais severos.

A febre tifoide é endêmica em localidades onde há subestrutura populacional, ou seja, áreas com condições sanitárias sucateadas (SHARMA et. al., 2016). Na Ásia as taxas de mortalidade permanecem altas, especialmente no subcontinente indiano (CRUMP; MINTZ, 2010). Alguns levantamentos apontam que o sorovar Typhi leva a 17,8 milhões de casos por ano, enquanto os sorovares Paratyphi A, B e C contribuem com mais 4,6 milhões de casos (ANTILLÓN et. al., 2017; GBD, 2015).

## 2.2 *Shiguella spp.*

O gênero *Shiguella* compreende espécies de bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas, em forma de bastonetes, não apresentam flagelos, sendo assim imóveis nos testes de motilidade (CUNHA *et. al.*, 2017). Alguns autores tendem a relacionar o gênero como pertencente a espécie *Escherichia coli*, visto que em testes de hibridização de DNA não é possível diferenciá-las (KOTLOFF *et. al.*, 2018). A bactéria tem como hospedeiro principal o homem, infectando ocasionalmente outros primatas, como chimpanzés e gorilas (ANDERSON *et. al.*, 2016).

O gênero é dividido em quatro espécies: *Shigella dysenteriae* (Grupo A; 17 sorotipos), *Shigella flexneri* (Grupo B; 14 sorotipos), *Shigella boydii* (Grupo C; 20 sorotipos), e *Shigella sonnei* (Grupo D; 1 sorotipo) (DAHMOshi *et. al.*, 2020). Nos sorotipos do grupo D, a espécie é encontrada sobre duas formas distintas, lisa (forma I) e rugosa (forma II) (KUO *et. al.*, 2009). Na microscopia óptica a *shigella* é morfológicamente idêntica a outras bactérias da família *enterobacteriaceae*, sendo muitas vezes confundida com infecções por *Salmonella* e/ou *E. coli*, o que acaba levando a incongruências nos registros epidemiológicos dessas enfermidades (ASHIDA *et. al.*, 2011; KUHN *et. al.*, 2017).

A *S. dysenteriae* é descrita como a espécie mais patogênica, tendo em vista sua capacidade de produzir a toxina de shiga, envolvida na síndrome hemolítica urêmica (SHU) (MATTOCK *et. al.*, 2017). Adams *et. al.* (2017) em um estudo de caso relatou um paciente com SHU, que estava infectado por *S. sonnei*. Existe uma espécie de *E. coli* também capaz de produzir a toxina shiga (EHEC) em um mecanismo envolvendo profagos, esse processo de transdução por bacteriófagos torna possível espécies de *Shigella* não produtoras de toxina shiga adquirirem os genes (NYHOLM *et. al.*, 2015; ADAMS *et. al.*, 2017).

Essas bactérias são transmitidas por via fecal-oral, principalmente veiculadas por água e alimentos (DAHMOshi *et. al.*, 2020). São altamente infecciosas, sendo necessárias pequenas concentrações de inóculo (10 – 100 unidade formadora de colônia “UFC”) (BOWEN *et. al.*, 2015). Estudos apontam a *S. flexneri* como mais infecciosa, tendo a menor quantidade de inóculo celular gerando infecção, dentre as quatro espécies (ARIZMENDI *et. al.*, 2016; FAHERTY *et. al.*, 2016).

### 2.2.1 Patogenia da shigelose

A shigelose é uma disenteria bacilar provocada por espécies de *Shigella spp.* cerca de 10 a 100 células são suficientes para causar uma infecção, após ingerida a bactéria consegue sobreviver à ação do pH ácido do estômago e percorre o aparelho digestivo até chegar no íleo terminal, onde instala-se e inicia os processos de colonização e invasão (ASHIDA *et. al.*, 2015; GALLARDO *et. al.*, 2019).

A *Shigella* ao alcançar as placas de peyer, na região ílica, encontra as células M, enterócitos especializados em capturar partículas estranhas, levando-as para região subendotelial para serem apresentadas as células de defesa, uma vez endocitada a bactéria induz essas células à apoptose (morte celular programada), a morte das células M libera as bactérias na submucosa, que são fagocitadas pelas células polimorfonucleares (YANG *et. al.*, 2015).

As bactérias no lúmen intestinal também invadem os enterócitos do íleo, o que gera liberação de citocinas pró-inflamatórias, levando neutrófilos, macrófagos e células dendríticas para o local (CUI *et. al.*, 2015; WANG *et. al.*, 2019). A ação do sistema de defesa gera uma inflamação aguda na região ileocecal com várias lesões ulcerosas, desencadeando a presença de muco, leucócitos e sangue nas fezes (BARDHAN *et. al.*, 2010; KOTLOFF *et. al.*, 2017). A shigelose não causa septicemia, os quadros com esse agravante são ocasionados por outras bactérias intestinais, que invadem a submucosa através das lesões preexistentes (ANANDAN *et. al.*, 2017).

Diferentemente de *Salmonella spp.* a *Shigella spp.* não possui um mecanismo de agregação aos enterócitos efetivo, como adesinas, sendo as interações glicano-glicano as responsáveis por um tempo de permanência suficiente para que a bactéria insira a agulha do SSTT na célula hospedeira (FARHERT *et. al.*, 2012; KOSEOGLU *et. al.*, 2019). Os genes responsáveis pela invasão de células estão todos localizados em um plasmídeo (*pInv*), a perda desse plasmídeo resulta em células incapazes de invadir o epitélio intestinal e causar gastroenterite (GOSH *et. al.*, 2014).

O SSTT é uma artilharia fundamental para que o patógeno dissemine suas proteínas efetoras no interior da hospedeira (**Tabela 2**), o locus Mxi-Spa regula a expressão de vinte proteínas estruturais que formam o aparato (ANDERSON *et. al.*, 2016). Os antígenos plasmidiais de invasão são constituídos por quatro proteínas transcritas a partir do locus *ipa*, as proteínas IpaA e IpaC estimulam o engolfamento das bactérias, IpaB e IpaD geram poros na

superfície celular pelo qual mais proteínas migram; IpaB também é responsável por destruir o vacúolo endocitário dos polimorfonucleados (BELOTSEKOVSKY *et al.*, 2018).

Proteína	Localização	Função	Efeito na Célula Hospedeira	Referências
IpaA	Plasmidial, locus Ipa	Processo de invasão da bactéria.	Rearranjo do citoesqueleto da célula, promovendo a endocitose da bactéria.	GALLARDO <i>et al.</i> , 2019
IpaB	Plasmidial, locus Ipa	Processo de invasão da bactéria.	Responsáveis por lisar membranas endocíticas nos macrófagos, facilita a colonização bacteriana, induz a formação de IL- $\beta$ e inicia o processo de apoptose.	WANG <i>et al.</i> , 2019
IpaC	Plasmidial, locus Ipa	Processo de invasão da bactéria.	Induz a polimerização de actina, formando projeções na célula eucariótica, facilita o espalhamento intercelular.	LOWEY <i>et al.</i> , 2020
IpaD	Plasmidial, locus Ipa	Processo de invasão da bactéria.	Forma um complexo junto com IpaB que geram poros na membrana celular, para introdução de proteínas efetoras.	JNEID <i>et al.</i> , 2020
IpgC	Plasmidial, locus Mxi-Spa	Chaperona.	Protegem as proteínas de invasão da ação de proteases eucarióticas.	BOROJENI ; DELDAR, 2018
IcsA	Plasmidial, locus IcsA	Proteína autotransportadora, motilidade intracelular.	Forma uma calda de actina nos pólos da bactéria, permitindo sua propagação intra e intercelular.	KOSEOGLU <i>et al.</i> , 2019
IcsB	Plasmidial, locus Ipa	Lisa membranas.	Perfura as membranas basolaterais das células eucarióticas, propagando a disseminação intercelular.	LIU <i>et al.</i> , 2018

**Tabela 2:** Proteínas Plasmidiais Secretadas pelo SSTT Envolvidas na Patogenia da Doença.

As proteínas de espalhamento intracelular (IcsA e IcsB), permitem a translocação de *shigella spp.* por dentro do citoplasma dos enterócitos, através da formação de caudas de actina, também agem lisando a membrana citoplasmática, papel principalmente realizado por IcsB, o que permite a disseminação intercelular (Bergounioux *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 20118; KOSEOGLU *et al.*, 2019). O gênero ainda produz algumas enterotoxinas (ShET1 e ShET2), elas induzem a perda de íons pelos enterócitos e acúmulo de fluido para o lúmen intestinal, além de uma toxina diferenciada que está fortemente envolvida nos casos mais severos de shigelose, a toxina Shiga (Stx), ela age interrompendo a síntese proteica levando as células a apoptose (LIVIO *et al.*, 2014). Stx se liga ao receptor Gb3 na superfície das células, após sua internalização é processada no complexo de golgi, e sua subunidade A interage com os

ribossomos no retículo endoplasmático rugoso, interrompendo a síntese proteica na subunidade 28S (QIU *et. al.*, 2015).

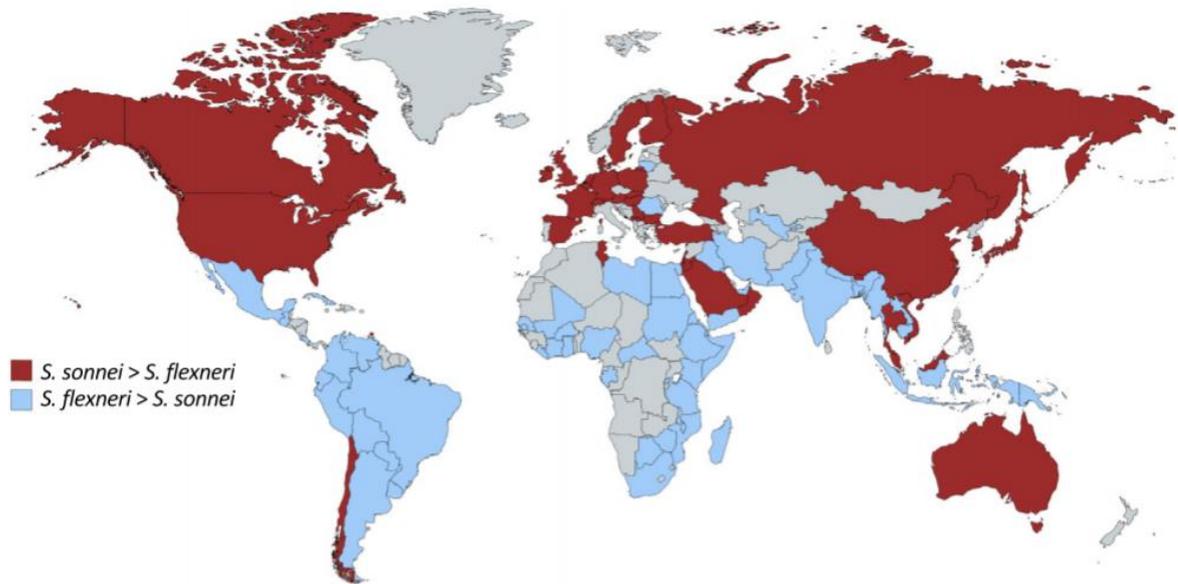
A síndrome hemolítica urêmica é uma complicação da doença pela atividade citotóxica da Stx, apesar de ser comumente encontrada em *S. dysenteriae*, estudos relatam sua presença em outras espécies de *Shigella sp.* e *E. coli* (ZHOU *et. al.*, 2018). A toxina leva a morte das células endoteliais, principalmente nos glomérulos renais, e ao atingir as plaquetas da circulação, induzem a formação de agregados plaquetários, desencadeando plaquetopenia (MATTOCK *et. al.*, 2017). Existem dois tipos Stx 1 e Stx2, estirpes que produzem as duas proteínas tendem a ser mais virulentas, como no caso da cepa *E. coli* O157:H7 (LI *et. al.*, 2019). A Stx é codificada por DNA cromossômico em *S. dysenteriae* e em outras espécies está localizada em plasmídeos, os genes pertencem a loci de bacteriófagos e estudos mostram alta relação com DNA de fago lâmbda (VAHEDI *et. al.*, 2018).

### 2.2.2 Dados epidemiológicos

As doenças veiculadas por alimentos costumam ser até hoje prevalentes em diversas regiões do globo, tendo maiores focos de incidência em países emergentes (**Figura 1**) (GBD, 2017; TORRACA *et. al.*, 2020). A shigelose é a doença veiculada por alimento mais notificada nos casos severos de diarreia pediátrica, em alguns países do continente africano e asiático (KOTLOFF *et. al.*, 2019). Em crianças menores de cinco anos a presença da doença deve ser tomada como alerta, visto as altas taxas de mortalidade presentes nessa faixa etária (LIU *et. al.*, 2016).

Os problemas de infraestrutura e falta de saneamento básico de uma cidade favorecem surtos endêmicos de shigelose (PAZHANI *et. al.*, 2008; MEDEIROS *et. al.*, 2018). As espécies mais frequentes notificadas nos casos de shigelose são *S. flexneri* e *S. sonnei*, a primeira está mais envolvida nas infecções em pessoas de classe econômica baixa, enquanto a segunda tem sido correlatada com indivíduos de classe mais alta (KELMANI; CHIDRE, 2018). Mao *et. al.* (2013) apontaram a prevalência de *S. sonnei* em países industrializados. Um estudo realizado no nordeste brasileiro por Medeiros *et. al.* (2018) apontou um nível de incidência de shigelose maior em épocas de chuva, e dentre as espécies encontradas, *S. sonnei* estava presente em 42,9% das amostras, seguida de *S. flexneri* com 7,9%. A análise de renda das famílias dos infectados mostrou uma divergência entre a espécie prevalente, onde indivíduos com renda

familiar baixa albergavam a espécie *S. flexneri*, nessas os sintomas de dor abdominal eram mais abruptos; o estudo ainda aponta a maior frequência de *S. sonnei* como indicador de crescimento socioeconômico naquela região.



**Figura 1:** Distribuição dos Casos de *Shigella flexneri* e *Shigella Sonnei* ao Redor do Mundo. Em vermelho as áreas onde as infecções por *S. sonnei* são superiores as infecções por *S. flexneri* e em azul as áreas onde os casos de infecção por *S. flexneri* são superiores a *S. sonnei*. **Fonte:** TORRACA *et. al.*, 2020.

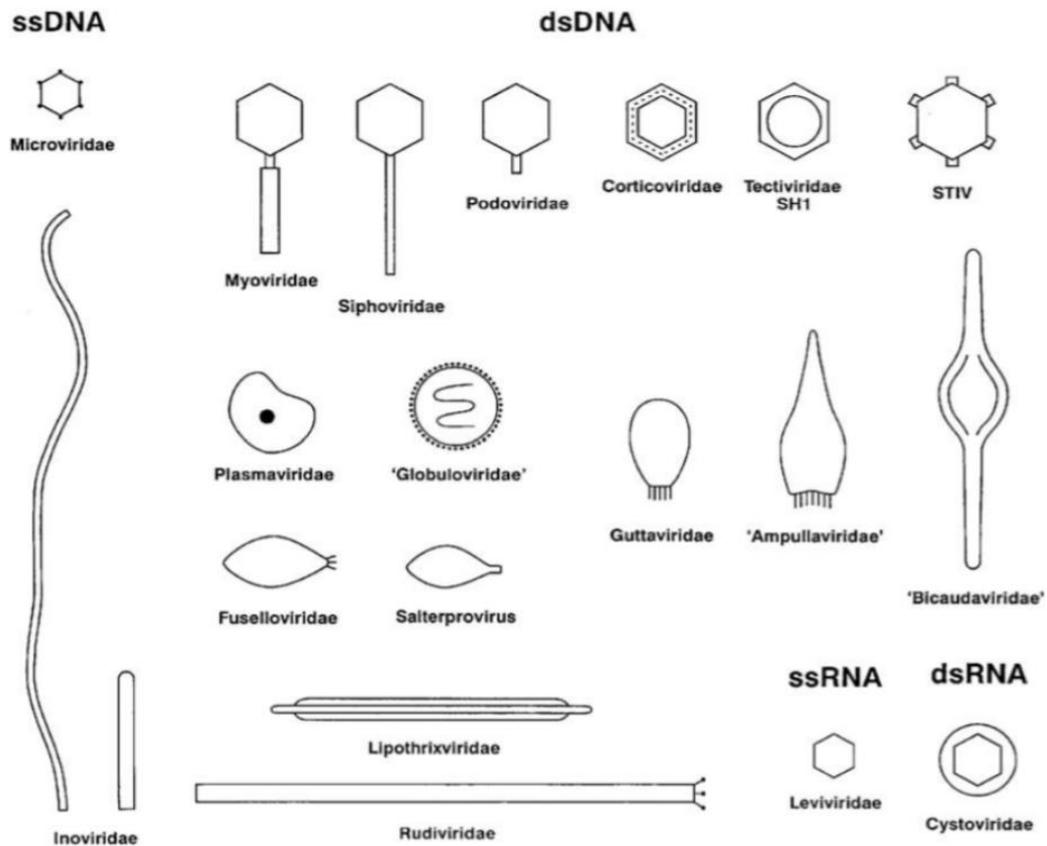
Seribelli *et. al.* (2016) realizaram uma pesquisa para caracterizar as cepas de *S. sonnei*, isoladas entre os anos de 1983 a 2014, no estado de São Paulo, o estudo confirmou o potencial patogênico das cepas através da busca de 12 genes de virulência. Avaliaram também o perfil de resistência antimicrobiano, onde 58,3% das cepas eram resistentes a trimetoprima-sulfametoxazol e 41,6% contra tetraciclina. No estado do Pará o mesmo tipo de estudo, envolvendo resistência antimicrobiana, foi realizado por Bastos *et. al.* (2011), em seus resultados cerca de 93,8% dos isolados eram resistentes a tetraciclina, seguido por clorafenicol (63,9%) e trimetoprima-sulfametoxazol (63,1%), estes dados evidenciam uma maior taxa de resistência nas cepas de *Shigella spp.* na zona norte do país.

Cruz *et. al.* (2014) desenvolveram um estudo no estado Amazonas incluindo crianças de 0 a 10 anos infectadas com *Shigella spp.*, a ordem de prevalência das espécies foi: *S. flexneri* (60%), *S. sonnei* (22,2%), *S. dysenteriae* e *S. boydii* (6,6%). Nesse estudo a maior taxa de resistência foi contra o antibiótico tetraciclina (80%).

A Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) é uma complicação da disenteria bacilar ocasionada pela toxina shiga, e a mesma é encontrada primordialmente na espécie *S. dysenteriae* (EXENI *et. al.*, 2018). Estudos apontam que essa espécie é responsável por apenas 1 a 10% das infecções por *Shigella spp.*, e que as estirpes de *E. coli* produtora de toxina Shiga (ETEC/EHEC) são muito mais influentes na epidemiologia da SHU, destaque para o sorotipo O157:H7 (LI *et. al.*, 2017).

### 2.3 Bacteriófagos

Os bacteriófagos ou, abreviadamente, fagos, conhecidos há mais de um século, são vírus que infectam unicamente bactérias, onde atuam como parasitas obrigatórios, utilizando a maquinaria celular da hospedeira para replicar seu material genético e se propagar (KEEN *et al.*, 2014; MOYE *et. al.*, 2018). São os microrganismos mais abundantes em todo o globo, bastando notar a proporção de que uma única espécie/linhagem bacteriana seja reconhecida por um numeroso grupo de bacteriófagos (KUTATELADZE; ADAMIA, 2010; FUFARO *et. al.*, 2018). Estima-se que haja uma taxa de 5.500 vírus analisados em microscopia eletrônica, com morfologias distintas (**Figura 2**), estes são distribuídos entre as 25 famílias reconhecidas oficialmente (ACKERMANN, 2009; ICTV, 2018). Os bacteriófagos da ordem *Caudovirales* (*Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*) compõem 96% dos fagos descritos até hoje, possuem material genético composto de dsDNA (DNA dupla fita), a estrutura de suas caldas define a família a qual pertencem; novos estudos identificaram mais seis novas famílias afiliadas a esta ordem (ICTV, 2019). O ciclo de replicação de partículas virais culmina em rompimento da membrana bacteriana na maioria dos fagos dessa ordem (ABEDON; HYMAN, 2018).



**Figura 2:** Morfologia e Composição do Material Genético das Famílias de Bacteriófagos.  
**Fonte:** ACKERMANN, 2009.

O sucesso de infecção de um bacteriófago está em primariamente no reconhecimento das RBPs (“*receptor binding protein*” - proteína de ligação ao receptor) aos componentes da parede celular da bactéria (THURBER, 2009; MAESTU *et. al*, 2019). Após esse processo de adsorção o vírião corroe a superfície bacteriana e ejeta o seu material genético dentro do citoplasma, onde dependendo do tipo de fago seguirá ou o ciclo lítico ou o ciclo lisogênico; existem alguns fagos que desencadeam um tipo de infecção crônica no qual as partículas virais são produzidas e liberadas sem a morte da hospedeira (ABEDON; HYMAN, 2019). f1, fd, M13, CTXF são bacteriófagos da família *Inoviridae* e são alguns exemplos de fagos de infecção crônica (SAMSON; MOINEAU, 2013).

### 2.3.1 Ciclo de propagação dos bacteriófagos

Uma vez que o material genético do vírus adentrou o citoplasma da célula ele pode seguir (**Figura 3**):

(i) Ciclo Lítico ou Virulento: o fago imediatamente interrompe o metabolismo bacteriano, induzindo a maquinaria celular a fabricar novas partículas virais. O material genético extensivamente replicado é encapsulado, por um sistema de automontagem, pelo capsídeo e cauda do vírus; estes são extrudados após a lise bacteriana, sendo liberados para infectar novas bactérias (ADHYA; BISWAS, 2014; RASTOGI *et. al.*, 2018).

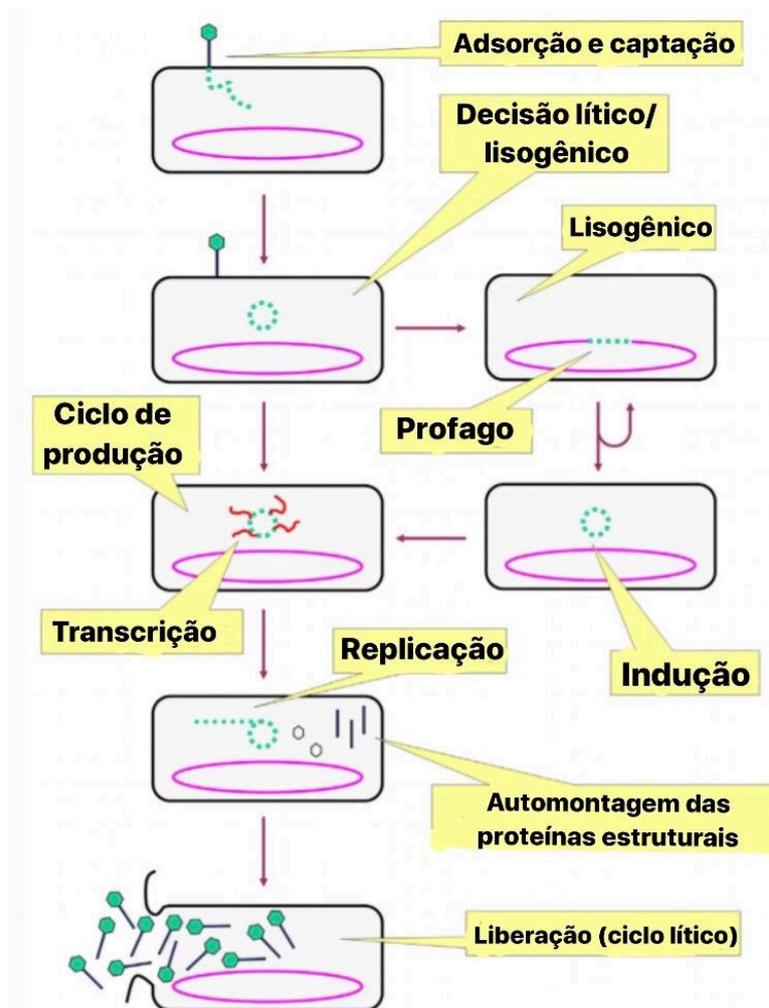
(ii) Ciclo Lisogênico ou Temperado: o material genético é incorporado ao DNA da bactéria, onde permanece em estado latente, nesse estado é chamado de profago. A bactéria segue sua via metabólica normalmente, multiplicando-se e com isso disseminando o profago para suas células filhas. Esse tipo de propagação costuma ser mais lento, porém há casos em que o fago atribui genes que tornam a hospedeira mais virulenta e imune a atividade de outros fagos (SALMOND; FINERAN, 2015; DOSS *et. al.*, 2017).

O processo de automontagem das proteínas estruturais dos fagos com cauda segue um processo já definido (GUO *et. al.*, 2014). As proteínas se unem para formar as estruturas individuais mais complexas e em seguida de maneira ordenada, proteínas auxiliares promovem a ligação dessas partes (FOKINE; ROSSMAN, 2014; MAESTU *et. al.*, 2019). As proteínas da base, onde estão presentes as RBPs, são utilizadas como alicerces para o ancoramento das fibras da cauda. A formação da cauda em si é o processo mais complexo, o tubo é conectado a base e é envolto pelas proteínas da bainha contrátil, uma proteína conectora liga a cabeça icosaédrica ao tubo da calda (JIN *et. al.*, 2019).

Os fagos de infecção crônica que são externalizados sem causar morte ao microrganismo, tem um processo de montagem bastante diferente, onde os vírions não ficam acumulados no interior do citoplasma, e são continuamente liberados conforme são formados (PIRES *et. al.*, 2016). O genoma replicado inicia seu processo de encapsulamento direto na parte interna da membrana, onde as proteínas que fazem o rompimento da mesma são acopladas e toda a estrutura do capsídeo encobre o material genético (GILL *et. al.*, 2010; JR; CORTNIES, 2018). O sistema de montagem migra pelos poros feitos na membrana e ao final da extremidade terminal são adicionados os RBPs, o vírion finalizado é então extrudado (WEBBER *et. al.*, 2016).

Em bacteriófagos líticos o tempo entre a adsorção e a lise bacteriana varia bastante entre as espécies. Após serem adsorvidos os fagos ainda passarão pelas etapas de replicação do material genético e montagem do vírion, este intervalo de tempo até a lise é conhecido como período de latência do vírus (HYMAN *et. al.*, 2019). O período em que o fago permanece

inativo, sem induzir a hospedeira a replicar seu material genético é conhecido como “eclipse” (LEE *et. al.*, 2019). Quando todas as partículas virais estão prontas para serem liberadas, ocorre o rompimento da membrana celular, o número de vírions liberados por célula é denominado “*Burst Size*” (KAKASIS *et. al.*, 2018).



**Figura 3:** Ciclos de Propagação dos Bacteriófagos. **Fonte:** Modificada de HYMAN *et. al.*, 2019.

As adesinas dos bacteriófagos são proteínas encontradas na base da cauda (RBPs) e nas fibras da cauda, estas reconhecem receptores específicos na membrana da célula hospedeira e assim inicia-se o processo de adsorção (JIN *et. al.*, 2019). As fibras da cauda podem interagir de forma reversível às estruturas presentes na membrana da bactéria (receptores primários), isso permite com que o fago “caminhe” sobre a mesma até encontrar o receptor

secundário, específico para as RBPs, essa interação é irreversível e prepara o fago para ejeção do material genético (DOMINGO *et. al.*, 2016).

Os receptores bacterianos abrangem os mais diversos grupos de moléculas (**Tabela 4**): (i) Polissacarídeos; (ii) Lipopolissacarídeos (LPS); (iii) Peptídeos; (iv) Peptídeoglicano; (v) Antígeno O; (vi) Polissacarídeos ácidos (ácido teicóico e lipoteicóico) (SILVA *et. al.*, 2016). As bactérias gram-negativas possuem lipopolissacarídeos, a presença do antígeno O nessa estrutura confere uma região de alta variação entre os açúcares componentes, enquanto a região central do LPS costuma ser mais preservada entre algumas espécies. Fagos que reconhecem a região central do LPS infectam uma gama de hospedeiros maior em relação aqueles que adsorvem no antígeno O das gram-negativas (LETAROV *et. al.*, 2017).

<b>Bacteriófago</b>	<b>Hospedeira</b>	<b>Receptor Primário</b>	<b>Receptor Secundário</b>
T4	<i>E. coli</i> ; <i>Shigella</i>	OmpC	Centro do LPS
Sf6	<i>Shigella flexneri</i>	LPS	OmpA; OmpC
SSU5	<i>Samonella enterica</i> ; <i>Shigella</i> ; <i>E. coli</i> K12	Porção central externa do LPS	N.I.
SPC35	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Antígeno O do LPS	ButB
SPN10H	<i>Salmonella Typhimurium</i>	LPS	ButB
SPN2T	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Flagelo	?
EPS7	<i>Salmonella enterica</i> ; <i>E. coli</i>	N.I.	ButB
ES18	<i>Salmonella</i>	N.I.	FhuA
SPN9T	<i>Salmonella</i>	Flagelina	FliC
SPN4S	<i>Salmonella</i>	Flagelina	FliC; FljB
iEPS5	<i>Salmonella</i>	Flagelo	FliK

**Tabela 4:** Fagos da Família *Siphoviridae* e seus Respectiveos Receptores na Célula Hospedeira. “?”, receptores não identificados. **Fonte:** Adaptada de SILVA *et. al.*, 2016; LETAROV *et. al.*, 2017.

Mecanismos que modificam a estrutura da parede celular bacteriana impedem a eficácia da infecção fágica: (i) Bactérias envoltas de um glicocálix, matriz extracelular composta de glicolípídeos/glicoproteínas, criam uma barreira para o alcance dos receptores; (ii)

Mutações em receptores proteicos acarretam em estruturas de membrana que passam a não reconhecer as RBPs dos bacteriófagos; (iii) Moléculas que exercem alguma função para a célula quando acopladas ao receptor passam a funcionar como antagonistas da adsorção entre o fago e o hospedeiro (ACKERMAN, 2012; LATZ *et. al.*, 2016; LETAROV *et. al.*, 2017).

A adsorção dos fagos pode ser facilitada pela presença de cátions divalentes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) na superfície bacteriana, entretanto há alguns estudos em que a presença desses íons impede o reconhecimento do receptor, por exemplo, acarretando uma mudança conformacional após adsorção desses íons (BHARDWAJ *et. al.*, 2011; NORTH *et. al.*, 2019). Alguns trabalhos acerca de bacteriófagos utilizam alguns reagentes ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ) que liberam esses cátions em solução, promovendo uma superfície de contato que favorece a interação do fago com a bactéria, permitindo que as RBPs se liguem aos receptores secundários (CHAN *et. al.*, 2013).

Os siphovirus possuem enzimas na base da calda que geram poros na bactéria, necessários para a ejeção do material genético (WALDOR *et. al.*, 2005). As holinas são uma classe de enzimas que corroem a membrana fosfolipídica, e as endolisinas são hidrolases, que promovem a destruição do peptídeoglicano (BHOM *et. al.*, 2018). Existem bacteriófagos que possuem espinhos na base da calda com atividade enzimática de despolimerase, estas hidrolisam as ligações glicosídicas presentes no glicocálix, permitindo que o fago alcance os receptores secundários (DOORE *et. al.*, 2019).

Bacteriocinas semelhantes a cauda de fago de *Siphoviridae* advém de fagos defeituosos que não concluem o seu ciclo de montagem e conferem à bactéria a capacidade de destruir a membrana celular de outras bactérias, tornando-as mais competentes a sobrevivência no local onde estão inseridas. O mecanismo de ação dessas bacteriocinas também tem como fator primordial a adsorção da cauda aos receptores de membrana (SCHOLL, 2017).

## 2.4 Terapia fágica como alternativa no tratamento de infecções

Logo após a descoberta dos bacteriófagos, em 1917, houve um aumento nas pesquisas envolvendo os mesmo para o tratamento de infecções bacterianas. Com a descoberta da penicilina por Fleming, dá-se surgimento a era dos antibióticos e, a partir daí, os estudos acerca de bacteriófagos foram sendo menos explorados. Tal fato se deu devido aos antibióticos

proporcionarem uma terapia de amplo espectro, sem precisar de identificação prévia do microrganismo, em contrapartida dos bacteriófagos que são alvo específicos (BOLOCAN *et al.*, 2016).

Os fagos possuem algumas vantagens quando comparados com os antibióticos: (i) São patógenos exclusivos de bactérias; (ii) Não lesionam células de animais ou plantas, (iii) Não causam efeitos adversos e/ou colaterais (iv) São “ecologicamente puros” (v) Por possuírem material genético, podendo evoluir, são menos suscetíveis à resistência antimicrobiana (vi) São mais fáceis de isolar e de custo menor, tendo em vista a dispendiosidade nas etapas para a liberação de um princípio ativo antibacteriano (KUTATELADZE, ADAMIA, 2010; MAESTU *et al.*, 2019).

A propagação fágica é cessada a partir do momento que o hospedeiro é eliminado. As drogas antibacterianas sintéticas são estáticas, possuem sua estrutura e agem de maneira definida, logo, mutações sucessivas nas bactérias acarretam na seleção de cepas resistentes. Por outro lado, os fagos possuem material genético e são capazes de se adaptar e evoluir concomitantemente como o seu hospedeiro, continuando o processo de infecção (DUFOUR *et al.*, 2015).

Para que um bacteriófago seja considerado um candidato à terapia fágica ele precisa possuir algumas particularidades, como, integrar seu material genético na bactéria e garantir que a maquinaria celular irá trabalhar a favor da formação de novas partículas virais até o eclodimento da célula hospedeira, o que promoverá a destruição do microrganismo (JILL, HAYMAN, 2010). Os vírus que realizam o ciclo lisogênico ou são liberados da célula sem levá-la ao rompimento da membrana não são promissores para a terapia, além de possibilitarem um tipo de transformação bacteriana, chamada transdução (GOODRIDGE *et al.*, 2010).

Os relatos de estudos envolvendo fagos de enterobactérias tem demonstrado maior eficácia terapêutica quando administrados em coquetéis. Estes coquetéis contêm fagos com uma ampla variedade de espécies virais, para uma extensão do alcance do hospedeiro alvo. Assim como, impossibilita a sobrevivência bacteriana ao ponto da instalação da resistência a um determinado fago na solução (CHADHA *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2016).

Algumas instituições e startups vem se dedicando ao melhoramento dos estudos e desenvolvimento de serviços em torno de bacteriófagos. O Instituto de Imunologia e Terapia Experimental (IET), localizado na Polônia, vem realizando por décadas trabalhos envolvendo a biologia e as aplicações tecnológicas dos fagos. A unidade de terapia fágica do centro médico

do IJET possui todas as metodologias e equipamentos necessários para tipagens, isolamento e preparação de coquetéis de fagos, além de testes experimentais (IJET, 2019).

AmpliPhi, Adaptive Phage Therapeutics, Microos, PhagePro, são alguns exemplos de startups, que visam a profilaxia de contaminação alimentar e tratamento de infecções bacterianas multirresistentes com a aplicação de bacteriófagos. Essas companhias estão desenvolvendo metodologias robustas e algoritmos de aprendizado computacional para facilitar o processo de escolha de fagos necessários para o combate de cepas específicas bacterianas (MULLIN, 2018).

Muitas bactérias patogênicas tem como principal fator de virulência a formação de biofilmes, comunidades bacterianas embebidas de matriz extracelular, a deposição de exopolissacarídeos permite que a bactéria escape dos mecanismos de defesa como a fagocitose e ação dos anticorpos (DOORE *et. al.*, 2019). As atividades despolimerásicas de alguns fagos permite com que atravessem a camada de biofilme e prossigam no seu ciclo de infecção. Holinas e endolisinas, que são produtos advindos do genoma de fagos também podem contribuir para alternativas de tratamento, já que promovem a destruição da membrana bacteriana (BHOM *et. al.*, 2018).

Pela primeira vez nos Estados Unidos um estudo clínico envolvendo administração de fagos via intravenosa foi realizado com a colaboração da empresa AmpliPhi Biosciences Corporation, a aprovação do teste foi deliberada pela FDA, para que os pacientes com infecção em decorrência do uso de dispositivos de assistência ventricular pudessem ser tratados (Voelker *et. al.*, 2019).

### 3 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar bacteriófagos líticos para duas espécies de enterobactérias: *Salmonella enterica* subespécie enterica e *Shigella sonnei*.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bacteriófagos líticos, contra *S. enterica* sub. enterica e *Shigella sonnei*, de cursos d'água contaminados com efluentes domésticos, na cidade de Manaus-AM;
- Caracterizar a morfologia, o material genético, e as etapas do processo infeccioso dos bacteriófagos.
- Analisar a capacidade bactericida nas hospedeiras e em outras espécies de bactérias.
- Testar a estabilidade dos bacteriófagos, durante o processo de infecção, perante as seguintes influências: temperatura, pH e solventes orgânicos;

## CAPÍTULO I

# **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA *SALMONELLA ENTERICA* SUBESPÉCIE ENTERICA E *SHIGELLA SONNEI***

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA *SALMONELLA ENTERICA* SUBESPÉCIE ENTERICA E *SHIGELLA SONNEI*

Almeida, A.S.<sup>1,2</sup>; Oliveira, H.C.<sup>2</sup>; Filho, S.A.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, <sup>2</sup> Universidade do Estado do Amazonas - UEA, <sup>3</sup> Universidade Federal do Amazonas - UFAM

### Resumo

Os bacteriófagos são vírus que infectam exclusivamente bactérias, não interagem com células humanas e são os microrganismos mais abundantes presentes no planeta. A terapia fágica é uma medida alternativa para o tratamento de infecções bacterianas, principalmente contra cepas multirresistentes a antibióticos. *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* são enteropatógenos comumente disseminados por água e alimentos contaminados com material fecal, possuem poder de invasão do epitélio intestinal muito grande, e são as causas mais corriqueiras de disenteria bacilar. O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bacteriófagos líticos contra linhagens de *Salmonella* e *Shigella*. Os bacteriófagos foram isolados a partir de efluentes domésticos do Igarapé do 40 da cidade de Manaus, foi realizado o teste de eficiência de infecção utilizando outras espécies de enterobactérias como hospedeiras, curvas para análise de infecção fágica utilizando espectrofotometria, testes de estabilidade química e física, além da análise morfológica por MET e do material genético dos bacteriófagos por RFLP. O presente trabalho isolou cinco bacteriófagos líticos a partir das espécies *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhi e *Shigella sonnei*, todos os bacteriófagos foram capazes de infectar pelo menos outras dez linhagens bacterianas, as curvas apontaram as relações entre diferentes faixas de multiplicidade de infecção (MOI), e aferiram que os vírus isolados possuem um período de latência relativamente baixo, com liberação de altas quantidades de novas partículas virais no “burst size”, a microscopia eletrônica de transmissão confirmou que quatro dos fagos pertencem a família *Siphoviridae*, enquanto apenas um possui características de *Myoviridae*, na análise do material genético não foi possível diferir os fagos isolados para *S. sonnei* por RFLP, porém todos os outros fagos possuíam perfis de digestões distintos com as enzimas de restrição utilizadas. Os novos fagos caracterizados no presente trabalho possuem características promissoras para infectar e gerar lise não somente nas bactérias isoladas, como em outras espécies de enterobactérias.

**Palavras-chave:** Bacteriófagos, *Salmonella* Typhi, *Shigella sonnei*, *Enterobacteriaceae*, Terapia Fágica.

## Abstract

Bacteriophages are viruses that only infect bacteria, do not interact with human cells and are the most abundant microorganisms present on the planet. Phage therapy is an alternative measure for the treatment of bacterial bacteria, especially against antibiotic-resistant strains. *Salmonella spp.* and *Shigella spp.* they are enteropathogens commonly disseminated by water and food contaminated with fecal material, they have a very large intestinal epithelial invasion power, and are the most common causes of bacillary dysentery. The present work aimed to isolate and characterize lists of bacteriophages against *Salmonella* and *Shigella* strains. Bacteriophages arose from domestic effluents from the Igarapé in the city of Manaus, the infection efficiency test was carried out using other species of enterobacteria as hosts, curves for the analysis of phage infection using physical spectrophotometry, chemical stability tests and, in addition to morphological analysis by MET and the genetic material of bacteriophages by RFLP. The present work isolated five lytic bacteriophages from the species *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhi and *Shigella sonnei*, all the bacteriophages were infecting at least ten other bacterial strains, as curves pointed out as relationships between different ranges of multiplicity of infection (MOI), and measured whereas the virus must have a relatively low latency period, with the release of high amounts of new viral particles without "burst size", transmission electron microscopy confirmed that four of the phages belong to a *Siphoviridae* family, while only having characteristics of *Myoviridae*, in the analysis of the genetic material it was not possible to differentiate the phages granted to *S. sonnei* by RFLP, however all other phages had different digestion profiles with the restriction enzymes used. The new phages characterized do not present any work and have promising characteristics to infect and generate lysis not only in fed bacteria, but also in other species of enterobacteria.

**Key words:** Bacteriophages, *Salmonella* Typhi, *Shigella sonnei*, *Enterobacteriaceae*, Phage Therapy.

## 1 INTRODUÇÃO

Enterobactérias são bacilos Gram-negativos muito abundantes, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, e que podem causar doenças em seres humanos, sua rota de contaminação é por via fecal-oral. Além das questões de higiene pessoal e saneamento básico, manter uma boa qualidade dos alimentos consumidos são itens essencialmente importantes para se evitar a contaminação e impedir possíveis cadeias de transmissão de agentes patogênicos (DEKKER *et. al.*, 2018). O gênero *Salmonella spp.* e *Shigella. spp.* são responsáveis pelos casos mais severos de doenças veiculadas por alimentos, esses patógenos detêm um arsenal de virulência muito grande, e pequenas doses de inóculo são suficientes para causar infecção (TORRACA *et. al.*, 2020). Apesar de estarem relacionadas à falta de saneamento básico, habitualmente instalado em países emergentes, esses enteropatógenos estão espalhados por todas as regiões do globo, e algumas espécies são conhecidas por causarem infecções em regiões e países bem estruturados, como no caso de *Shigella sonnei* (GBD, 2019).

Alguns sorotipos de *Salmonella sp.* são mais virulentos que outros, *Salmonella enterica* sorovar Typhi é responsável por causar uma infecção sistêmica, denominada febre tifoide, em algumas complicações pode até levar a um quadro de meningite (RICHARD; PORTER, 2019). *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis é uma causa global de enterocolite associada às aves e ovos, podem causar bacteremia e infecção focal em casos críticos (ALDRICH *at al.*, 2019). Todas as espécies de *Shigella sp.* são virulentas, haja vista sua alta capacidade de invadir o epitélio e desencadear uma resposta inflamatória aguda, podendo culminar em disenteria bacilar, a presença de genes que codificam a toxina de shiga só piora o prognóstico, uma vez que esta citotoxina é responsável pela síndrome hemolítica urêmica (EXENI *et. al.*, 2018).

Os bacteriófagos (fagos), vírus que infectam unicamente bactérias, podem ajudar como uma medida alternativa para o tratamento dessas infecções tendo em vista o crescimento exacerbado de cepas multirresistentes às diversas drogas do mercado (KEEN *et al.*, 2014). Algumas empresas farmacêuticas e do ramo da biotecnologia já trabalham com preparações de coquetéis de fagos específicas para o tratamento de infecções por enteropatógenos (SOFFER *et. al.*, 2017). Ademais, seu campo de aplicação também pode envolver a indústria de alimentos e os ambientes hospitalares (KUTATELADZE, ADAMIA, 2010). Contudo, antes de se avaliar o uso de fagos, estes precisam ser isolados e caracterizados. Diversas outras aplicações

envolvem a busca de enzimas de interesse biotecnológico, como despolimerases e bacteriocinas relacionadas a fago (SCHOLL et. al. 2017).

No Brasil, são poucos os grupos de pesquisas trabalhando com fagos e na região amazônica, até o presente estudo, não havia nada descrito. Neste estudo, descrevemos os cinco novos e primeiros bacteriófagos isolados na Cidade de Manaus- AM, com o prospecto de incentivar mais trabalhos que visam essa medida de terapia alternativa.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cepas bacterianas e condições de cultura

As bactérias utilizadas neste trabalho (**Tabela 1**) foram adquiridas da Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária, do Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/IOC/FIOCRUZ), da Coleção Biológica do Instituto de Pesquisa Leônidas e Maria Deane (IPqL&MD/FIOCRUZ-AM) e do acervo biológico do Laboratório de Biorgânica da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). As bactérias foram ativadas em 5mL de meio líquido caldo triptona de soja-*Tryptic Soy Both* (TSB, Kasvi®) em Shaker (Marconi MA-420®) configurado a 35°C por 120 rpm, após o crescimento em *overnight* (12-16h), os pré-inóculos foram repicados em placas de Petri, contendo meio sólido ágar *Salmonella-Shigella* (ágar SS, Kasvi®). As bactérias que não cresciam em meio diferencial foram repicadas em TSA (TSB + ágar Kasvi® 1,5%), e ambas armazenadas a 4°C em geladeira.

Espécie	Linhagem	Resistência Antimicrobiana	EOP				
			MSE1	MSE2	MST1	MSS1	MSS2
<i>Salmonella</i> Enteritidis	INCQS 258 (ATCC13076)	Desconhecida	10 <sup>14</sup>	10 <sup>5</sup>	+++	-	-
<i>Salmonella</i> Typhi	CBAM 0009	amicacina, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, sulfazotrin, cefalotina	LFW	+++	+++	++	++
<i>Salmonella</i> Typhi	CBAM 0010	amicacina, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, sulfazotrin, tobramicina e cefalotina	LFW	+++	+++	++	++
<i>Salmonella</i> Typhi	CBAM 0019	Desconhecida	LFW	+++	10 <sup>8</sup>	++	++
<i>Salmonella</i> Typhi	CBAM 0047	tetraciclina, cloranfenicol, amicacina, cefalotina, tobramicina	LFW	+++	+++	++	+++
<i>Salmonella</i> Typhi	CBAM 0048	ampicilina, cefalotina, amicacina, sulfazotrin	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhi	CBAM 0170	Desconhecida	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> enterica	CBAM 0207	Desconhecida	LFW	++	+	+	-

<i>Salmonella enterica</i>	CBAM 0209	Desconhecida	LFW	++	+	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	INCQS 00236	Desconhecida	LFW	++	+++	+++	+++
<i>Shigella sonnei</i>	CBAM 0033	Desconhecida	+++	-	-	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
<i>Shigella sonnei</i>	CBAM 0040	Desconhecida	+++	-	+	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	CBAM 0007	tetraciclina, cefalotina, cefotaxima, aztreonam, ampicilina, cefoxitina e sulfazotrin	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	CBAM 0037	sulfazotrin e ampicilina	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli (EPEC)</i>	INCQS00181 (CDC O55)	Desconhecida	+++	++	+++	++	+++
<i>Escherichia coli (EPEC)</i>	INCQS 00182 (CDC O86:H35)	Desconhecida	-	-	+++	+	+++
<i>Serratia liquefaciens</i>	UEA 0001	Desconhecida	LFW	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	ceftazidima e outros oxiiimino-beta-lactâmicos	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CBAM 0026	piperacilina + tozobactam, ceftazidima, tobramicina, cefotaxima, imipinem	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CBAM 0614	tobramicina, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona	-	-	-	-	-

**Tabela 1:** Eficiência de Plaqueamento (EOP). As potências de base 10 indicam as titulações obtidas nas hospedeiras; LFW (Lysis from without - Lise por fora); (+++) Alta eficiência; (++) Média eficiência; (+) Baixa eficiência; (-) Ineficiente.

## 2.2 Isolamento dos bacteriófagos

Amostras de 500 mL foram coletadas de um curso d'água contaminado por efluentes urbanos no bairro Petrópolis -3.114406°, -60.001637°, zona centro-sul da cidade de Manaus-Am. Os fagos foram isolados a partir de amostras enriquecidas, utilizando-se a metodologia adaptada de Barros *et al.* (2019). Um volume de 10 mL da amostra foi adicionado em 40 mL de meio TSB mais 100 µL do pré-inóculo bacteriano das hospedeiras (*S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Typhi* CBAM0019 e *S. sonnei* CBAM 0033). 10mL dos lisados foram centrifugados a 8.000 x g por 15 min, o sobrenadante foi filtrado por uma membrana de 0,22 µm (Millipore®, Merck).

## 2.3 Produção e determinação dos títulos

A partir do estoque filtrado foram feitas diluições seriadas com meio líquido TSB até 10<sup>-12</sup>, alíquotas de 5 µL foram pontuadas sobre placas de TSA, contendo as células hospedeiras, previamente espalhadas com *swab*, estas placas foram incubadas em *overnight* a

35°C para visualização de halos límpidos. O ponto da diluição máxima em que ocorreu lise foi raspado, utilizando ponteiras estéreis, e exposto a uma nova etapa de infecção, em 5 ml de TSB, contendo bactérias em fase exponencial ( $DO_{600nm} = 0,2 \approx 1 - 1,5 \times 10^9$  UFC/mL) e em fase estacionária (crescidas até 48h). Após a confirmação da fase de infecção desses fagos, seguiu-se a etapa de purificação pelo método de dupla camada, adaptado dos protocolos de Santos e Colaboradores (2014); Gencay e Colaboradores (2016). 100  $\mu$ L das alíquotas das diluições  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  dos novos lisados foram misturados com 100  $\mu$ L de suspensão bacteriana de fase exponencial, após agitação branda manual, 100  $\mu$ L foram inoculados em 5 mL de meio semissólido (TSB + ágar Kasvi® 0,4%), que foram despejados sobre placas contendo uma fina camada de meio TSA. A dupla camada foi realizada em triplicata, após a obtenção de halos límpidos e uniformes foi feita a escolha do ponto e a raspagem para seguir na etapa de propagação, onde os bacteriófagos foram amplificados em uma cultura líquida (5 mL) bacteriana de fase exponencial.

## 2.4 Análise morfológica

Os lisados de fagos, gerados a partir da amplificação dos estoques purificados, foram precipitados com 1/3 de PEG 8000 (Polietilenoglicol) 30% (p/v) com NaCl 3 M de modo a gerar uma solução final de 1X (PEG 8.000 10% e NaCl 1 M), após ressuspensão da mistura as amostras foram incubadas a 4°C, em *overnight*; e posteriormente centrifugada a 10.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 200  $\mu$ L de tampão SM (100 mMol NaCl, 8 mMol MgSO<sub>4</sub>, 0,01% gelatina, 50 mMol Tris-HCl, pH 7.5). Uma gota de cada suspensão de fago foi colocada sobre telas com *grids* de 400 *mesh*, de cobre, revertidas com *formar*®, por volta de 10 min, a amostra foi lavada três vezes com uma gota de água deionizada, em seguida uma gota de acetato de uranila 1% foi aplicada sobre cada tela. As telas foram secadas à temperatura ambiente e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1011, operando a 60 kv.

## 2.5 Extração do material genético viral e RFLP

Uma cultura de fagos amplificados foi precipitada com PEG 8000 30% e NaCl 3M e ressuspendido em 200  $\mu$ L tampão SM (100 mMol NaCl, 8 mMol MgSO<sub>4</sub>, 0,01% gelatina, 50 mMol Tris-HCl, pH 7.5), conforma já descrito. A amostra foi tratada com DNase e RNase por cerca de duas horas e meia, para destruição dos restos de material genético bacteriano presentes

na solução. Após essa etapa foi adicionado EDTA 0,5 M para inativar as enzimas a uma temperatura de 70°C, por 15 min. Em seguida, adicionou-se proteinase K, SDS 10% e incubaram-se as amostras a 60°C, por uma hora. Após o rompimento dos capsídeos virais, utilizou-se o Kit Illustra™ plasmiprep Mini®, contendo as colunas e as soluções eluentes para a extração do DNA dos bacteriófagos. Após a confirmação da extração do DNA por eletroforese em gel de agarose 0,8%, deu-se início a etapa de RFLP (Restriction fragment length polymorphism - Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição), as digestões ocorreram com as enzimas de restrição da New England Biolabs NEB® (Sspl, SacI, XbaI, NdeI), a preparação das reações de digestão sucedeu-se conforme as recomendações do fabricante, por fim o marcador molecular (Ladder 1Kb Quatro G®) junto aos padrões de restrição foram analisados em eletroforese com gel de agarose 0,8%.

## 2.6 Espectro lítico e Eficiência de plaqueamento (EOP)

Os bacteriófagos purificados foram titulados para verificação do espectro de lise, no qual 5 uL das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-14}$  de cada fago foram pontuadas sobre as placas contendo o gramado bacteriano de suas respectivas hospedeiras. Após o crescimento a temperatura de 35-37°C, em ~12h, foram visualizados os halos que determinaram as titulações máximas obtidas para cada hospedeira (ABATÁNGELO *et. al.*, 2017). A avaliação da especificidade se deu utilizando as 17 cepas bacterianas doadas pelas instituições citadas (**Tabela 1**). O mesmo procedimento feito com as hospedeiras na etapa de titulação foi realizado, em duplicata, com as demais cepas. A partir da ausência ou presença de halos de lise límpidos os fagos foram classificados no quesito de eficiência de infecção, obtido a partir da razão entre a titulação máxima alcançada em cada cepa pela titulação da célula hospedeira, sendo: +++ ( “>0,5 até 1” Alta taxa de infecção); ++ ( “0,2 até 0,5” Média taxa de infecção); + ( “0,001 até <0,2” Baixa taxa de infecção); - ( “<0,001” Ineficiência de infecção).

## 2.7 Curva de crescimento para análise de infecção fágica

A curva foi realizada em microplaca com auxílio do espectrofotômetro (Molecular Devices SpectraMax Plus 384 Absorbance Reader®), sendo uma adaptação da metodologia de Melo *et. al.* (2018). O título dos fagos foi ajustado para  $10^9$ ,  $10^{10}$  e  $10^{11}$  UFP/mL, para obter uma multiplicidade de infecção-*Multiplicity of Infection* (MOI) de 1, 10 e 100, uma vez que as bactérias se encontram na concentração de  $1 - 1,5 \times 10^9$  células (UFC)/mL em fase

exponencial. MOI é um conceito que relaciona o número de partículas virais usadas para infeccionar uma célula hospedeira, um MOI de 1 corresponde uma situação de um vírion para uma bactéria. O experimento foi realizado em triplicata num volume de 200  $\mu\text{L}$  em cada poço da microplaca, e a densidade óptica do branco, controle e das faixas de MOI foi medida de 10 em 10 minutos, enquanto era incubada a 35°C e 120 rpm. O experimento perdurou até que a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  dos poços, contendo os fagos e as hospedeiras, diminuísse e estabilizasse, em contraste a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  do controle que permanecia em fase exponencial.

## 2.8 Curva de crescimento de etapas isoladas

Para determinar o período de latência e o tamanho da explosão (*Burst Size*), momento em que a célula “explode” e libera um determinado número de vírions, foi utilizada uma metodologia adaptada de protocolos descritos por Sue-Er *et. al.* (2011); Sritha *et. al.* (2018). O experimento foi realizado em triplicata, onde as amostras bacterianas em fase exponencial, num volume de 10mL de TSB, foram centrifugadas a 7.000 x g, por 7 min, após o descarte do sobrenadante a solução foi ressuspendida com 5mL de meio TSB. 750  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana foi misturada a 750  $\mu\text{L}$  de uma solução de fago com titulação ajustada para  $10^6$  UFP/mL para criar um MOI 0,001. Após a espera da adsorção dos fagos por 5 minutos, a mistura foi centrifugada novamente, porém a ressuspendição foi feita em 1,5 mL de meio, onde foi incubada a 35-37°C, sob agitação de 150 - 200 rpm. 100  $\mu\text{L}$  dessa amostra foram retirados para as diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , realizadas de 10 em 10 minutos até um total de 120 minutos. Nas duas últimas diluições 50  $\mu\text{L}$  de bactéria, em fase exponencial, foram adicionados para compensar a diluição bacteriana, por fim 100  $\mu\text{L}$  das soluções ( $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) foram despejadas em 5 mL de meio semissólido e difundidas em placas de TSA. Após a incubação das placas em *overnight* a 35°C o número de UFPs foram contados e relacionados com o intervalo de tempo de cada placa para construção do gráfico.

## 2.9 Testes de estabilidade física e química

As metodologias de Askora e Colaboradores (2015); Jurczak-Kurek e Colaboradores (2016) serviram de base para todas as etapas dos testes. Para a termoestabilidade 20  $\mu\text{L}$  da solução de estoque dos bacteriófagos foram levados ao agitador termobloco ThermoCell MB-202 - LGC®, com exposição as temperaturas de 45°C, 55°C, 65°C, 75°C por 60 min, em seguida 10  $\mu\text{L}$  das soluções foram diluídas em 90  $\mu\text{L}$  de tampão SM (100 mMol

NaCl, 8 mMol MgSO<sub>4</sub>, 0,01% gelatina, 50 mMol Tris-HCl, pH 7.5), a diluição seriada seguiu até a titulação 10<sup>12</sup>. 5 µL de cada diluição foram pontuados “spots” sobre placas de TSA (TSB + Ágar 1,5%), contendo as hospedeiras espalhadas, os halos obtidos após o crescimento em *overnight* a 35°C, foram comparados com a titulação máxima dos fagos, sem a influência de temperatura. Os solventes orgânicos clorofórmio (25 e 50% vol/vol); acetona (50% vol/vol); etanol (70% vol/vol); SDS (1% vol/vol); e quatro faixas de pH (2, 4, 10 e 14) na proporção 1:1 foram misturadas aos estoques de fagos por 60 min, o processo de “spots” em placa de meio sólido contendo o gramado bacteriano, previamente citado, foi repetido e os halos comparados com a titulação máxima nas células hospedeiras.

## 2.10 Análise dos dados

O teste de Análise de Variância One-Way (ANOVA), utilizada para comparar as médias das variáveis obtidas nos testes de curva de crescimento para análise e curva de uma etapa. O programa GraphPar Prism foi utilizado para gerar os gráficos dos dados obtidos para as curvas e para os testes de estabilidade.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Isolamento dos bacteriófagos

No total cinco bacteriófagos foram isolados, o nome oficial foi definido conforme as regras de nomenclatura impostas pelo ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - Comitê Internacional de Taxonomia Viral) (TABELA 2):

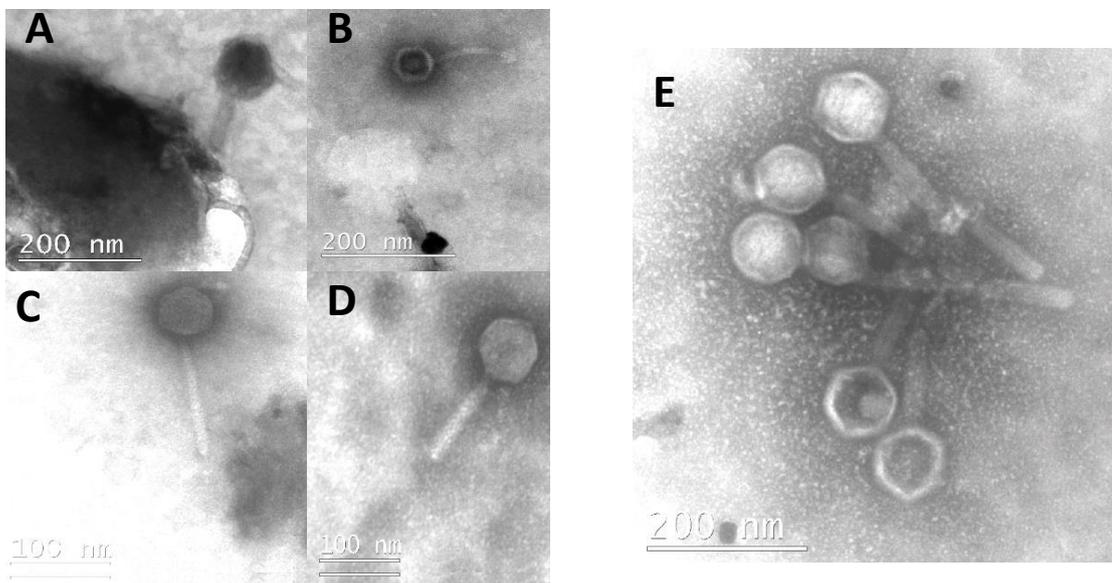
Fago	Nomenclatura Oficial	Bactéria Hospedeira
MSE1	vB_SenS-SE1	<i>Salmonella</i> Enteritidis
MSE2	vB_SenS-SE2	<i>Salmonella</i> Enteritidis
MST1	vB_StyM-ST1	<i>Salmonella</i> Typhi
MSS1	vB_SsoS-SS1	<i>Shigella sonnei</i>

MSS2	vB_SsoS-SS2	<i>Shigella sonnei</i>
------	-------------	------------------------

**Tabela 2:** Nomenclatura dos Bacteriófagos.

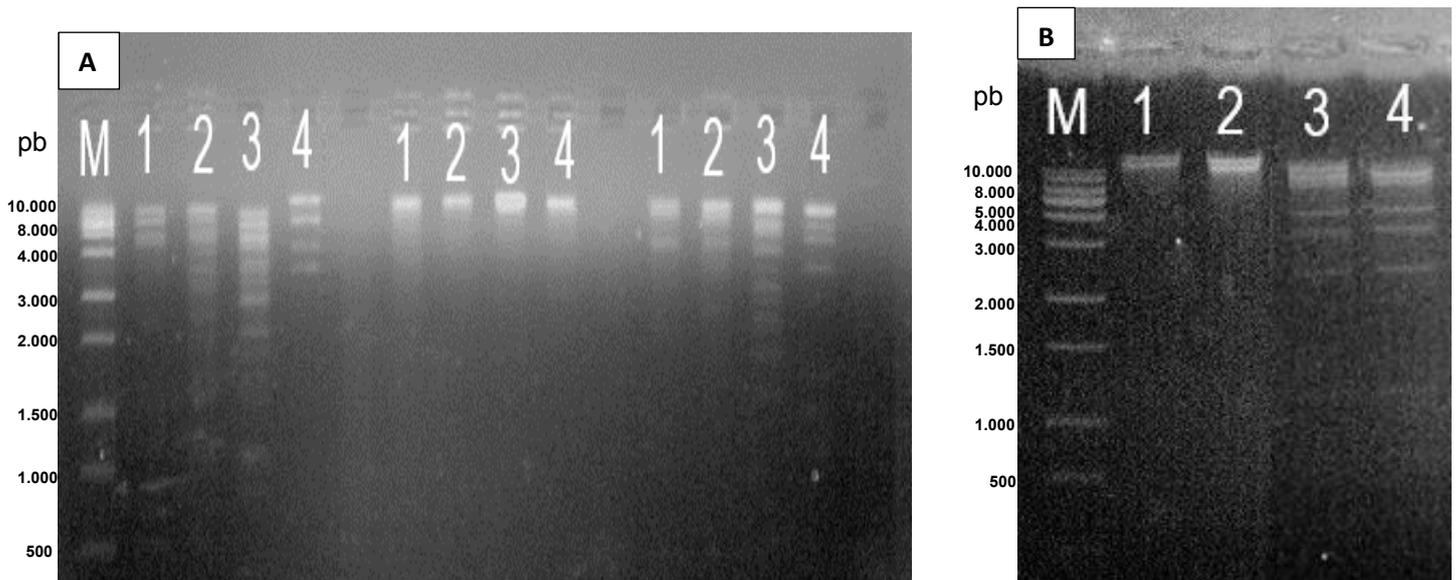
### 3.2 Morfologia e Análise primária do material genético

A microscopia eletrônica mostrou que quatro dos bacteriófagos (MSE1, MSE2, MSS1, MSS2) pertencem a família *Siphoviridae*, MST1 foi o único fago isolado pertencente à família *Myoviridae*.(Figura 1).



**Figura 1:** Imagens dos Bacteriófagos em Microscopia Eletrônica de Transmissão. A: Fago MSE1; B: Fago MSE2; C: Fago MSS1; D: Fago MSS2; E: Fago MST1.

Não houve clivagem do material genético dos bacteriófagos com a enzima *SacI*, as bandas não digeridas ficaram situadas acima da posição do marcador molecular, indicando que o genoma desses bacteriófagos é superior a 10.000 pb. A enzima *SspI* gerou um perfil de restrição distinto entre MSE1 (três bandas) e MSE2 (em torno de sete bandas); para MST1 cerca de dez bandas foram formadas; SS01 4 bandas nítidas de DNA. *NdeI* produziu em MSE1 e MSE2 duas bandas nítidas, com um rastro de DNA um pouco mais intenso na corrida de MSE2; MST1 liberou um rastro com pelo menos oito bandas; enquanto MSS1 gerou 4 bandas nítidas, semelhante a digestão por *SspI*, porém em posições diferentes no gel.



**Figura 2:** Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição. M: Marcador Molecular de 1Kb. **A-** Enzimas *SspI*, *SacI* e *NdeI*.; 1: MSE1; 2: MSE2; 3: MST1; 4: MSS1. **B-** Enzimas *XbaI* e *NdeI*; 1: MSS1; 2: MSS2; 3: MSS1; 4: MSS2.

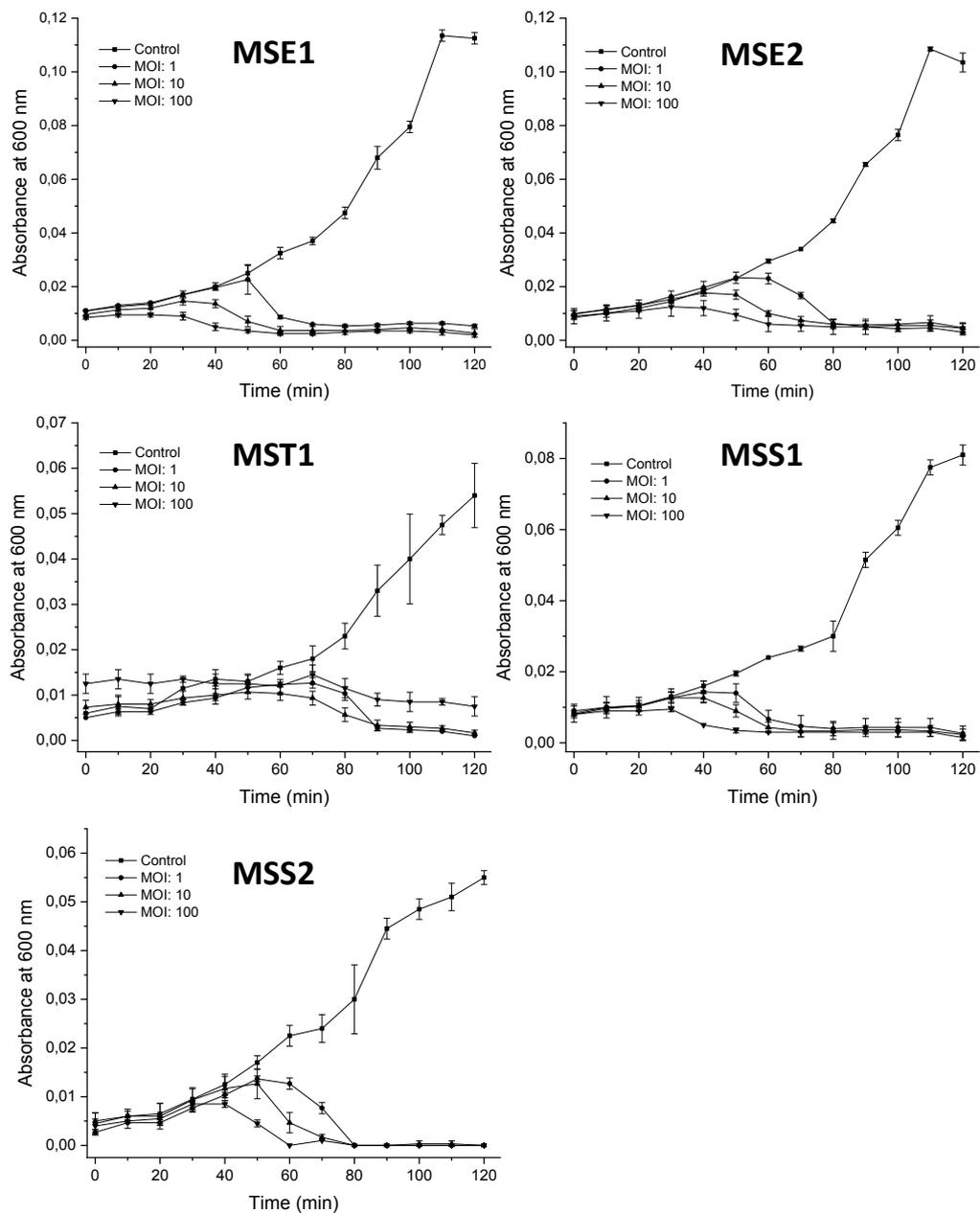
A repetição do experimento com a enzima *NdeI* para os dois bacteriófagos remanescentes (MSS1 e MSS2), reproduziu as mesmas 4 bandas geradas na primeira digestão que acontecera apenas para MSS1, com *XbaI* ambas originaram duas bandas nítidas localizadas acima da posição de 10.000 pb do marcador molecular.

### 3.3 Gama de hospedeiros e Avaliação da especificidade

O fago MSE1 (vB\_SenS-SE1) teve a maior gama de hospedeiras, sendo capaz de infectar e gerar lise em 12 linhagens bacterianas, dentre elas o sorotipo *S. Typhi*, e três espécies diferentes: *E. coli*, *S. sonnei* e *S. Liquefaciens*. O fago MSE2 (vB\_SenS-SE2) foi ineficiente contra *S. liquefaciens* e *S. sonnei*, e curiosamente alcançou um grau de eficiência maior que na sua hospedeira (*S. Enteritidis*), nas linhagens de *S. Typhi*, chegando a titulações de até  $10^8$  UFP/mL. MST1 (vB\_StyM-ST1) foi o fago que conseguiu obter a maior frequência de alta infectividade, das 11 linhagens que infectou, 8 alcançaram eficiência máxima (+++). MSS1 (vB\_SsoS-SS1) e MSS2 (vB\_SsoS-SS2) tiveram taxas de eficiência praticamente similares entre os seus hospedeiros, contudo MSS1 conseguiu infectar uma espécie a mais que MSS2. Não houve formação de halos para as espécies de bactérias gram-positivas (**Tabela 1**).

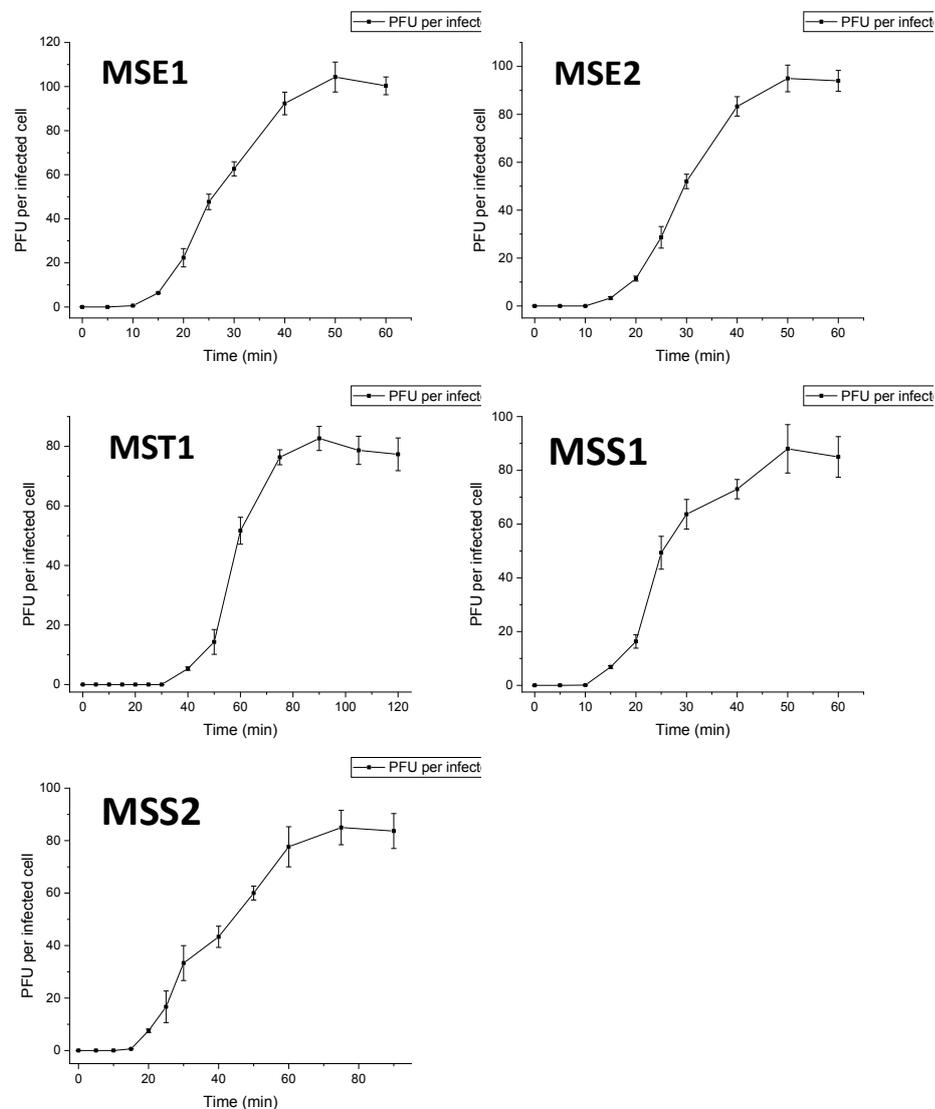
### 3.4 Análise de infecção fágica

Houve um padrão no declínio da curva de crescimento em relação a multiplicidade de infecção, o MOI mais elevado declinara 10 minutos mais cedo que os MOIs subjacentes. A curva para o fago MST1 foi a que mais oscilou durante o experimento e o declínio para todos os MOIs ocorreram em 80 minutos, a única divergência notada para este fago foi o MOI 100 terminar a curva numa DO superior a dos MOI 10 e 1 (**Figura 3**).



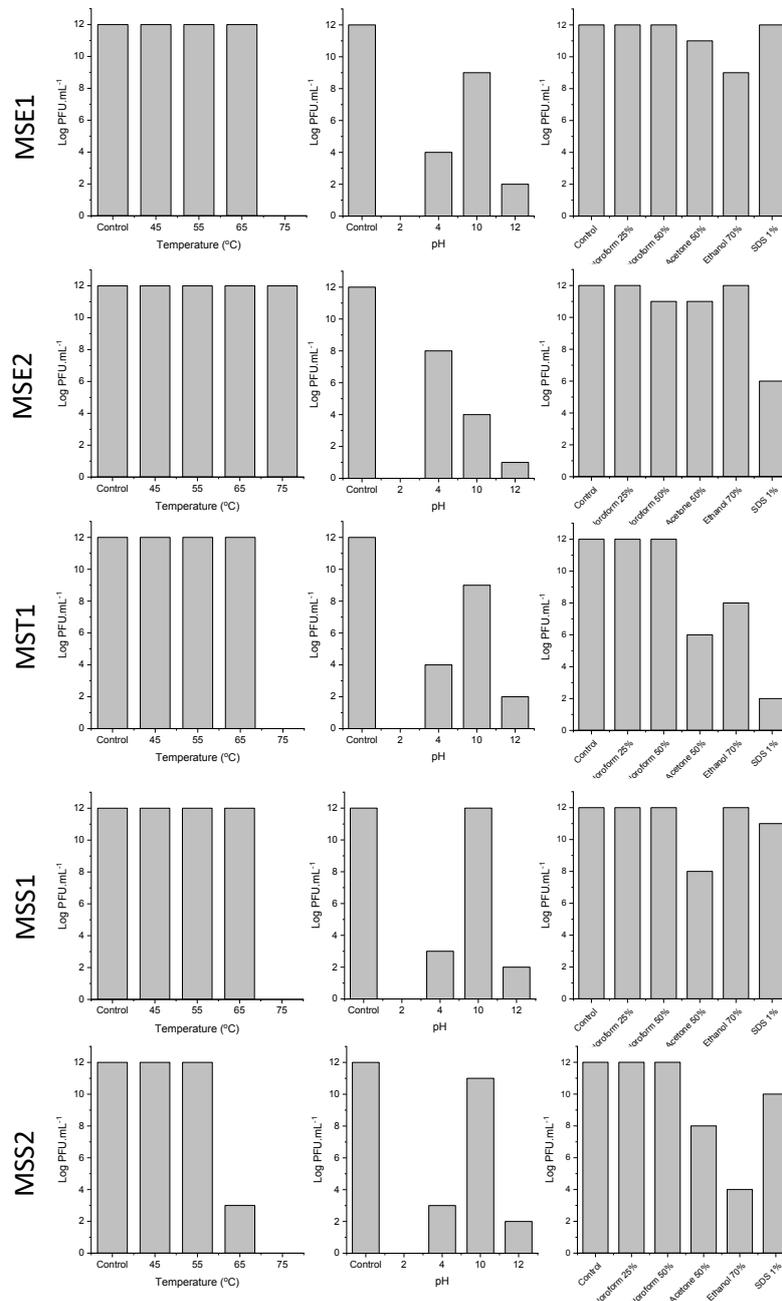
**Figura 3:** Multiplicidade de Infecção em Curva de Crescimento de Fase Exponencial. A: fago MSE1; B: Fago MSE2; C: Fago MST1; D: Fago MSS1; E: Fago MSS2.

Na análise das curvas de crescimento de uma etapa (**Figura 4**) os fagos MSE1, MSE2 e MSS1 alcançaram o mesmo período de latência que perdurou até 10 minutos, desde o início do experimento, os vírus remanescentes tiveram um período de latência um pouco maior MST1 (30 minutos); MSS2 (15 minutos). Os *burst size* de MSE1, MSE2 e MSS1 também ocorreram no mesmo intervalo de tempo, em 50 minutos transcorridos, desde o início do experimento, entretanto a quantidade de vírions liberadas por cada célula hospedeira foi diferente: MSE1 (103 partículas por células infectada); MSE2 (94 partículas por célula infectada); MSS1 (87 partículas por célula infectada). MST1 e MSS2 liberaram 83 partículas por célula infectada.



**Figura 4:** Curvas de Crescimento de uma Etapa - *One-Step Growth*. A: Fago MSE1; B: Fago MSE2; C: Fago MST1; D: Fago MSS1; E: Fago MSS2.

### 3.5 Estabilidade física e química dos bacteriófagos



**Figura 5:** Testes de estabilidade física e química. Gráficos da primeira coluna vertical para os testes nas temperaturas: 45°-55°-65°-75°. Gráficos da segunda coluna para os testes em pH: 2-4-10-12. Gráficos da terceira coluna para os testes em solventes orgânicos: clorofórmio 25%-50%; acetona 50%; etanol 70%; SDS 1%.

Os fagos MSE1, MST1 e MSS1 alcançaram 100% de atividade lítica até a temperatura de 65°C. MSS2 foi o fago mais sensível tendo apenas 25% de atividade a

temperatura de 65°C, enquanto MSE2 foi o fago mais resistente as faixas de temperatura, obtendo 100% de efetividade até 75°C. Nenhum dos bacteriófagos resistiu a incubação por uma hora em pH 2, além disso ocorreram oscilações no percentual dos fagos para as demais faixas. O percentual das faixas de pH 4, 10 e 12 para os fagos MSE1 e MST1 foi o mesmo, 33%, 75% e 16%, respectivamente. Em MSE2 o percentual caiu conforme a alcalinização aumentou (66%, 33%, 8%). MSS1 e MSS2 obtiveram a mesma percentagem para o pH 4 e 12 (25% e 16%); MSS1 teve eficiência máxima em pH 10 (100%) e SS02 (92%). O fago MSE2 alcançou uma resistência de 92% na solução de clorofórmio (50% v/v), enquanto todos os outros fagos foram 100% efetivos após 1 hora de incubação. Em acetona MSE1 e MSE2 alcançaram 92%, MSS1 e MSS2 (66%), MST1 (50%). MSE2 e MSS1 foram 100% resistentes a incubação com álcool, MSE1 (75%), MST1 (66%), MSS2 (33%). Com SDS 1% apenas MSE1 manteve 100% de sua atividade, MSS1 (91%), MSS2 (83%), MSE2 (50%), MST1 (16%) (**Figura 5**).

#### 4 DISCUSSÃO

Os quatro membros da família *siphoviridae* isolados no presente trabalho são morfológicamente semelhantes aos fagos descritos nos trabalhos de Ahamed *et. al.* (2019) e Xu *et. al.* (2018), com cabeça icosaédrica de  $61 \pm 3$  nm de diâmetro e cauda longa não contrátil com aproximadamente  $155 \pm 6$  nm de comprimento. MST1 possui uma estrutura “pescoço” separando a cauda longa, mais espessa, e contrátil da cabeça hexagonal características de *myoviridae* semelhantes a do fago SEN1 (GABISONIA *et. al.*, 2020). Por pertencerem a família *siphoviridae* e *myoviridae*, o material genético desses fagos é constituído de DNA fita dupla, posteriormente confirmado após o tratamento dos mesmos com ssDNA endonucleases. Todos os fagos possuem pontos diferentes para reconhecimento e clivagem do DNA com a enzima *SspI*, enquanto *NdeI* mostrou um padrão de restrição idêntico para MSE1 e MSE2, diferindo-os apenas dos demais fagos. O myovírus MST1 foi o que mais gerou bandas no gel, com as duas enzimas, por possuir um capsídeo mais volumoso que os siphovírus deste estudo, acopla um genoma com maior número de pares de base, o que aumenta a probabilidade de conter mais sítios de reconhecimento dessas enzimas.

Fagos de mesma família ocasionalmente possuem padrões similares de digestão em RFLP, alguns com cerca 97% de semelhança, não foi possível diferir os fagos isolados para *S. sonnei* (MSS1 e MSS2) a partir desse método, apesar destes terem apresentado diferenças em

outras etapas de sua caracterização (STANLIN *et. al.*, 2017). Existem fagos que podem ser resistentes a ação de algumas enzimas de restrição, o que acaba sendo uma desvantagem para a técnica, porém ainda é muito útil para uma primeira etapa de identificação de fagos recém-isolados (MERABISHVILI *et. al.*, 2007). Maszewska *et. al.* (2016) encontraram quatro fagos diferentes que possuíam um grau de similaridade em RFLP de 97,6% com a enzima *EcoRV*, neste estudo não houve sequenciamento dos fagos, e os autores os diferiram unindo essas informações aos testes de EOP. Faz-se necessário o sequenciamento do genoma de todos os bacteriófagos isolados neste trabalho, para uma análise mais profunda e detalhada do material genético dos mesmos.

Na avaliação do espectro lítico nenhum dos cinco bacteriófagos foi capaz de infectar as espécies de gram-positivas, evidenciando a especificidade fago-hospedeiro. Kim *et. al.* (2018) apontam a raridade de se encontrar fagos com uma alta gama de hospedeiras, visto a especificidade dos bacteriófagos com uma única espécie bacteriana, contudo em sua pesquisa conseguiram caracterizar um fago que infecta até cinco espécies de enterobactérias. Já é conhecida a existência de antígenos comuns entre as enterobactérias (ACE), ainda não se tem estudos moleculares a respeito da interação com essas estruturas, entretanto a existência de bacteriófagos capazes infectar mais de uma espécie de enterobactéria sugere que o vírion possa reconhecer esse tipo de antígeno (FREGOLINO *et al.*, 2012). Bridge *et. al.* (2015) trabalharam com um potencial vacina testada em camundongos, contra o antígeno WecA, para *S. Typhimurium*, o estudo demonstrou uma imunização cruzada contra outras cepas de *S. enterica*, evidenciando a presença deste determinante antigênico em cepas distintas. Jun *et. al.* (2016) realizaram o teste com 11 linhagens bacterianas e o fago isolado conseguiu infectar *S. flexneri* e *S. sonnei*, mas não foi capaz de infectar outras espécies de *Shigella sp.* ou de *E. coli*. O fago SGF2 caracterizado no trabalho de Lu *et. al.* (2020) foi ainda mais restrito, ocasionando lise, unicamente, nas placas da sua hospedeira; *S. flexneri*. Estudar a base molecular dos bacteriófagos pode ajudar na descoberta de possíveis hospedeiras, no trabalho de Dustan *et. al.* (2019) demonstraram que o fago YSD1, adsorve em uma proteína presente nos flagelos de *Salmonella spp.*, cepas da bactéria sem a presença desta proteína eram imunes a atividade bactericida.

Em todos os bacteriófagos a multiplicidade de infecção foi determinante para manter as concentrações de bactérias baixas, em relação ao controle, até finalmente despencarem e manterem-se, assim, constante. Quanto maior o MOI aplicado, menor foi a densidade óptica da solução com as bactérias hospedeiras que estavam em crescimento,

indicando que uma maior quantidade de vírus por célula resulta em uma lise bacteriana mais extensa e com declínio na curva em um menor intervalo de tempo (**Figura 3**). A mesma dinâmica do valor de multiplicidade de infecção influenciando a concentração de bactérias foi observada na curva realizada por Huang e Colaboradores (2018), entretanto os mesmos utilizaram valores de MOI muito baixos chegando até 0,001, o que propiciou um crescimento elevado da densidade óptica, com maior tempo para o alcance do declínio e estabilização da curva. Islam *et. al.* (2020) realizaram os testes nas mesmas condições e obtiveram resultados similares ao nosso trabalho, entretanto após 12-16 horas a densidade óptica de todos os fagos começou a subir exponencialmente, os autores não explicaram um motivo para o ocorrido, contudo em uma de nossas tentativas da curva foi notado que todos os poços com fagos haviam turvado, posteriormente confirmamos que houve contaminação durante a incubação da microplaca em 12 - 16h.

Não necessariamente o ciclo infeccioso pode ser o responsável pela lise, existe um fenômeno denominado “lise por fora” - *Lysis from Without*, geralmente ocorre quando há altas quantidades de fagos (titulações maiores de  $10^9$  e MOI de 100 ou superior), ou fagos com genoma muito grande; a aplicação do MOI equipara essas proporções e influi a medida mais efetiva para o estancamento do crescimento bacteriano. Visto que em multiplicidades de infecção muito baixas os fagos não conseguem adsorver um número suficiente de células (ABEDON, 2009; ABEDON, 2011). Sritha *et. al.* (2018) realizou o experimento com 6 faixas de MOI (0,001 / 0,01 / 0,1 / 1 / 10 / 100) onde observou-se um gráfico com escalas decrescentes em relação as UFPs, quanto maior o MOI menos UFPs foram geradas. Em nosso trabalho o fenômeno de “lise por fora” foi observado para o fago MSE1, devido a titulação estar em  $10^{14}$  e isso resultou em uma adsorção muito grande de fagos na membrana das bactérias provocando morte celular precoce, sem a influência de um ciclo de replicação lítico. Isso demonstra um potencial achado de interesse biotecnológico contra outras espécies de enterobactérias, uma vez que as lisinas desse fago foram capazes de agir até contra a espécie *S. liquefaciens*, e agir com alta taxa de eficiência em *S. sonnei*.

O primeiro bacteriófago isolado para *S. Enteritidis* MSE01 obteve o maior *burst size* e menor período de latência, ao mesmo tempo, entre todos os outros bacteriófagos isolados neste projeto. O número de partículas virais liberadas influencia bastante no espectro de lise, visto que vários vírions adsorvendo a membrana de uma única célula hospedeira podem lisá-la antes que ocorra o processo de integração do DNA (SUMMER *et. al.*, 2007; PETSONG *et. al.*, 2019). O fago LSPE1 isolado por Huang *et. al.* (2018), a partir da mesma hospedeira (ATCC

13076) utilizada em nosso trabalho, teve um período de latência de 20 minutos, o *busrt size* ocorreu no mesmo intervalo de tempo, 50 minutos, porém foram liberadas apenas 94 partículas virais por célula. O fago SS3e também isolado de *S. Enteritidis*, caracterizado por Kim *et. al.* (2018), alcançou os mesmos períodos do último trabalho citado, porém liberou aproximadamente 98 vírions por célula. Jun *et. al.* (2016) isolaram um bacteriófago a partir de *S. flexneri* com tamanho de rajada superior (97 UFP/UFC) aos fagos isolados a partir de *S. sonnei* em nosso trabalho, porém obtivemos um *busrt size* maior ao fago de *S. sonnei* caracterizado por Shahin *et. al.* (2018), que foi de aproximadamente 76 UFP/UFC.

O presente trabalho aferiu as curvas de etapas isoladas (**Figura 4**) somente com as bactérias hospedeiras. Ahamed *et. al.* (2019) reproduziram o OSG com o fago Sfin-1 em três espécies de *Shigella sp.*; em *S. flexneri* e *S. dysenteriae* o *busrt size* foi de 27-28 UFP/UFC, enquanto na *S. sonnei* chegou 146 UFP/UFC, os períodos de latência foram menores nas duas primeiras hospedeiras. O resultado deles aponta que um fago com mais de um hospedeiro realiza seu ciclo de propagação, em intervalos de tempo, e com números diferentes de partículas virais liberadas, dependendo da hospedeira infectada. O fago MSE2 isolado a partir de *S. Enteritidis*, que obteve uma taxa de eficiência de infecção muito superior no sorotipo de *S. Typhi*, a partir dessa análise, provavelmente liberaria uma quantidade de vírions superior a 94 UFP/UFC.

A literatura descreve que a maioria dos bacteriófagos da ordem *caudovirales*, são mesofílicos, contudo os fagos encontrados no presente trabalho são termofílicos, pois conseguem se propagar a 65°C e acima (PIETIÃ *et. al.*, 2014; RADFORD *et. al.*, 2017). Bacteriófagos hipertermofílicos, propagam-se acima de 80°C, são pouco descritos na literatura e maioria deles pertencem às famílias de fagos com formato linear, esférico ou de fuso (ULDAHL; PENG, 2013).

Li *et. al.* (2019) ao final da reprodução dos testes de estabilidade aferiram que o fago HEf13 foi viável somente até 60°C, e ainda com a sua atividade reduzida em mais da metade, contudo este bacteriófago foi resistente nas faixas de pH 3-12. Essa faixa de pH foi a mesma alcançada pelo fago SFPH2, entretanto a temperatura onde ocorreu a propagação foi ainda menor, mostrando queda do rendimento de infecção já a 50°C (YANG *et. al.*, 2018). VB\_SauS\_SH-St 15644, um siphovirus que também teve sua atividade lítica reduzida a 50°C e uma resistência às soluções de pH 5-10 (JI *et. al.*, 2020). Os fagos caracterizados neste trabalho alcançaram resistência em uma faixa de pH de 4-12, no entanto a maioria deles obteve maior

grau de resistência em pH10, com exceção de MSE2 que se manteve viável em soluções com pH mais ácido.

No trabalho de Kurek *et. al.* (2016) três colifagos foram inativados após a incubação com solventes orgânicos, exibindo apenas uma atividade baixa após exposição ao clorofórmio; quatro dos fagos isolados para *S. enterica* exibiram uma resistência maior ao clorofórmio, aproximando-se de 100%, e dentre eles, dois fagos, foram relativamente resistentes a SDS 0,9%. Os estudos apontam uma alta taxa de variabilidade no grau de resistência a solventes orgânicos, inclusive entre fagos do mesmo gênero, a realização desses testes ajuda na seleção dos fagos mais promissores para utilização na terapia fágica (COOPER *et. al.*, 2016; GUTIÉRREZ *et. al.*, 2016).

## 5 CONCLUSÃO

- vB\_SenS-SE1; vB\_SenS-SE2; vB\_StyM-ST1; vB\_SsoS-SS1; vB\_SsoS-SS2 são os primeiros bacteriófagos isolados e caracterizados na cidade de Manaus-AM.

- Possuem uma relativa gama de hospedeiros, conseguindo infectar e gerar lise em pelo menos 10 linhagens bacterianas.

- Os bacteriófagos liberam, relativamente, uma quantidade alta de partículas ao fim do *burst size*, em uma média geral de 58 minutos.

- Todos os bacteriófagos são termofílicos (>65°C), com maior resistência em soluções de pH alcalino e com variações na porcentagem de resistência a solventes orgânicos.

- Faz-se necessário um estudo aprofundado acerca do material genético desses bacteriófagos, a realização de um sequenciamento elucidaria algumas questões pendentes, além de revelar possíveis características únicas que esses venham a ter.

## REFERÊNCIAS

- ABEDON, S. T.; ABEDON, S. T. Lysis From Without. **Abedon, stephen**, v. 7081, n. 2011, p. 46–49, 2018.
- ACKERMANN, H. Chapter 13 Phage Classification and Characterization. **Human press**, v. 501, p. 127–140, 2009.
- ADAMS, C. et al. IDCases Shigella sonnei and hemolytic uremic syndrome : A case report and literature review. **IDCases**, v. 8, p. 6–8, 2017.
- AHAMED, S. K. T. et al. Genomic and Proteomic Characterizations of Sfin-1 , a Novel Lytic Phage Infecting Multidrug-Resistant Shigella spp . and Escherichia coli C. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. August, p. 1–19, 2019.
- BALASUBRAMANIAN, R. et al. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal Salmonella infections. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 5515, 2019.
- BARATTO, C.; DA, I.; PRODUTIVA, C. Estudo da multirresistência a antibióticos de salmonella enteritidis isolados da cadeia produtiva de aves. **circuito regional**, 2020.
- BATISTA, C. et al. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- BASTOS; LOUREIRO. Antimicrobial Resistance of Shigella spp . isolated in the State of Pará , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 607–610, 2011.
- BELOTSEKOVSKY, I.; SANSONETTI, P. J. Shigella and Enteroinvasive Escherichia Coli. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 2018.
- BHAT, K. S. S. S. G. Genomics of Salmonella phage  $\Phi$ Stp1 : candidate bacteriophage for biocontrol. **Virus genes**, n. 0123456789, 2018.
- BORGES, K.; FURIAN, S. Spread of a Major Clone of Salmonella enterica Serotype Enteritidis in Poultry and in Salmonellosis Outbreaks in. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 1, p. 158–163, 2017.
- BRIDGE, D. R. et al. An enterobacterial common antigen mutant of Salmonella enterica serovar Typhimurium as a vaccine candidate. **nternational Journal of Medical Microbiology**, 2015.

- BRYAN, D. et al. Bacteriophage T4 Infection of Stationary Phase *E. coli*: Life after Log from a Phage Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. September, p. 1–12, 2016.
- CAMPIONI, F. et al. Changing of the Genomic Pattern of *Salmonella* Enteritidis Strains Isolated in Brazil Over a 48 year- period revealed by Whole Genome SNP Analyses. **scientific reports**, v. 8, n. September 2017, p. 1–7, 2018.
- CAMPIONI, F. et al. Phenotypic analyses of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains isolated in the pre- and post-epidemic period in Brazil. **brazilian journal of microbiology**, 2020.
- CANESTRARI, J. et al. Deciphering the specific interaction between the acyl carrier protein IacP and the T3SS-major hydrophobic translocator SipB from *Salmonella*. **FEBS letters**, p. 1–15, 2019.
- CHEN, Y. et al. Can . J . Microbiol . TUFTS UNIV LIBRARY on 07 / 12 / 18 For personal use only . This Just-IN manuscript is the accepted manuscript prior to copy editing and page composition . It may differ from the final offic. **Can. J. microbiol.**, p. 1–25, 2018.
- CHONG, A. et al. A role for the *Salmonella* Type III Secretion System 1 in bacterial adaptation to the cytosol of epithelial cells. **molecular microbiology**, v. 112, n. August, p. 1270–1283, 2019.
- CUNHA, F.; MARIA, T.; BARBOSA, M. *Shigella* sp: UM PROBLEMA DE. **Higiene Alimentar**, v. 31, p. 52–57, 2017.
- DEKKER, J. P.; FRANK, K. M. *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. **cross mark**, v. 35, p. 225–246, 2015.
- DOORE, S. M. et al. Bacteriophage Receptor Proteins of Gram-Negative Bacteria. **Reference Module in Life Sciences**, p. 1–11, 2019.
- DOSS, J. et al. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. **Viruses**, v. 9, p. 2–10, 2017.
- DUNCAN-LOWEY, J. K. et al. Report *Shigella flexneri* Disruption of Cellular Tension Promotes Intercellular Spread || *Shigella flexneri* Disruption of Cellular Tension Promotes Intercellular Spread. **CellReports**, v. 33, n. 8, p. 108409, 2020.

- DUNSTAN, R. A. et al. The flagellotropic bacteriophage YSD1 targets Salmonella Typhi with a Chi-like protein tail fibre. **molecular microbiology**, v. 0, p. 1–16, 2019.
- ENG, S. et al. Frontiers in Life Science Salmonella : A review on pathogenesis , epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 3769, 2015.
- ESPINOZA, R. A. et al. Differential roles for pathogenicity islands SPI - 13 and SPI - 8 in the interaction of Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhi with murine and human macrophages. **Biological Research**, p. 1–7, 2017.
- EXENI, R. A. et al. Pathogenic role of inflammatory response during Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome ( HUS ). **Pediatric nephrology**, 2018.
- FREGOLINO, E. et al. Occurrence and structure of cyclic Enterobacterial Common Antigen in Escherichia coli O157 : H À. **Carbohydrate Research**, v. 363, p. 29–32, 2012.
- FURFARO, L. L.; PAYNE, M. S.; CHANG, B. J. Bacteriophage Therapy : Clinical Trials and Regulatory Hurdles. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. October, p. 1–7, 2018.
- GABISONIA, T. et al. Characterization of New Bacteriophages of Salmonella and Shigella. **bulletin of the georgian national academy of sciences**, v. 14, n. 2, 2020.
- GADAGKAR, R.; GOPINATHAN, K. P. Bacteriophage burst size during multiple infections Bacteriophage burst size during multiple infections. **journal of biosciences**, n. September 1980, 2014.
- GARRIDO-MAESTU, A. et al. Specific detection of viable Salmonella Enteritidis by phage amplification combined with qPCR ( PAA-qPCR ) in spiked chicken meat samples. **Food Control**, v. 99, n. October 2018, p. 79–83, 2019.
- GOEBEL, F. studies on bacteriophage. p. 255–265, 1949. GOODRIDGE, L. D.; BISHA, B. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. **Landes Bioscience Phage-based**, v. 1, n. 3, p. 130–137, 2011.
- GREER, G. G. Effects of Phage Concentration , Bacterial Density , and Temperature on Phage Control of Beef Spoilage. **research note**, v. 53, n. 4, p. 1226–1227, 1988.

- GROSSA, P. Diversidade microbiológica e suscetibilidade em cepas de Escherichia coli uropatogênica diagnosticadas em Ponta Grossa, Paraná. **Brazilian Journal of clinical Analyses**, n. January, 2016.
- GUTEMA, F. D. Prevalence and Serotype Diversity of Salmonella in Apparently Healthy Cattle : Systematic Review and. **frontiers in veterinary science**, v. 6, n. April, p. 1–11, 2019.
- HAMDI, S. et al. Characterization of two polyvalent phages infecting Enterobacteriaceae. **Nature Publishing Group**, n. December 2016, p. 1–12, 2017.
- HARADA, L. K. et al. Biotechnological applications of bacteriophages : State of the art. **Microbiological Research**, v. 213, n. February, p. 38–58, 2018.
- HARVEY, R. R. et al. Epidemiology of Salmonella enterica Serotype Dublin Infections among Humans , United States , 1968 – 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 9, 2018.
- HENRIQUE, P. et al. Molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance profile of Shigella species isolated from children with moderate to severe diarrhea in northeastern Brazil. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, 2017.
- HUANG, C. et al. Isolation, characterization, and application of a novel specific Salmonella bacteriophage in different food matrices Chenxi. **college of food science**, 2018.
- HUANG, C. et al. Isolation , Characterization , and Application of Bacteriophage LPSE1 Against Salmonella enterica in Ready to Eat ( RTE ) Foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. May, p. 1–11, 2018.
- HYMAN, P.; STATES, U. Bacteriophage : Overview. **Department of Microbiology**, n. April, p. 1–18, 2019. ISLAM, S. et al. Application of a Broad Range Lytic Phage LPST94 for Biological Control of Salmonella in Foods. **microorganisms**, 2020.
- JAMAL, M. et al. Characterization of new Myoviridae bacteriophage WZ1 against multi-drug resistant ( MDR ) Shigella dysenteriae. **journal of basic microbiology**, n. Cdc, p. 1–12, 2014.
- JI, J. et al. Identification of a novel phage targeting methicillin-resistant Staphylococcus aureus In vitro and In vivo. **microbial pathogenesis**, 2020.
- JNEID, B.; ROUAIX, A. SipD and IpaD induce a cross-protection against Shigella and Salmonella infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–18, 2020.

- JOHNSON, R. et al. crossm SptP of Salmonella enterica Serovar. **journal of bacteriology**, v. 199, n. 4, p. 1–18, 2017.
- JR, P. E. P.; CORTINES, J. R. ScienceDirect Phage assembly and the special role of the portal protein. **Current Opinion in Virology**, 2018.
- JUN, J. W. et al. Bacteriophage application to control the contaminated water with Shigella. **Nature Publishing Group**, p. 1–7, 2016.
- JURCZAK-KUREK, A. et al. Biodiversity of bacteriophages : morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **scientific reports**, n. September, p. 1–17, 2016.
- KAKASIS, A.; PANITSA, G.; PANITSA, G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. **journal of antimicrobial agents**, 2018.
- KELMANI, C. R.; CHIDRE, P. Shigellosis : A Conformity Review of the Microbiology , Pathogenesis and Epidemiology with Consequence for Prevention and Management issues. **Journal of pure applied microbiology**, v. 12, n. March, p. 405–417, 2018.
- KIM, S. I. et al. Secretion of Salmonella Pathogenicity Island 1-Encoded Type III Secretion System Effectors by Outer Membrane Vesicles in Salmonella enterica Serovar Typhimurium. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. November, p. 1–13, 2018.
- KIM, S. et al. Characterization of a Salmonella Enteritidis bacteriophage showing broad lytic activity against Gram-negative enteric bacteria §. **journal of microbiology**, v. 56, p. 1–9, 2018.
- KIPPER, D. et al. Salmonella serotype assignment by sequencing analysis of intergenic regions of ribosomal RNA operons. **Poltry Science Assiation**, n. 1–10, 2019.
- KOSEOGLU, V. et al. The autotransporter IcsA promotes Shigella flexneri biofilm formation in presence of bile. **American Society for Microbiology**, n. April, 2019.
- KOTLOFF, K. L. et al. Seminar Shigellosis. **The lancet**, v. 6736, n. 17, 2017.
- KROPINSKI, A. M.; PRANGISHVILI, D.; LAVIGNE, R. Opinion Position paper : The creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of Bacteria and Archaea. **enviromental microbiology**, v. 11, p. 2775–2777, 2009.
- LAMPEL, K. A.; FORMAL, S. B.; MAURELLI, A. T. A Brief History of Shigella. **EcoSalPlus**, 2018.

- LAVEBRATT, C.; GISSLER, M. Early exposure to antibiotic drugs and risk for psychiatric disorders : a population-based study. **Translational Psychiatry**, 2019.
- LEE, D. et al. The Novel Enterococcus Phage vB \_ EfaS \_ HEf13 Has Broad Lytic Activity Against Clinical Isolates of Enterococcus faecalis Bacterial Strains and Culture Conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–14, 2019.
- LEE, S. et al. Dual Immunization with SseB/Flagellin Provides Enhanced Protection against Salmonella Infection Mediated by Circulating Memory Cells. **journal of immunology**, 2017.
- LETAROV, A. V; KULIKOV, E. E. Adsorption of Bacteriophages on Bacterial Cells. **Uspekhi Biologicheskoi Khimii**, v. 82, n. 13, p. 1632–1658, 2017.
- LI, B.; LIU, H.; WANG, W. Multiplex real-time PCR assay for detection of Escherichia coli O157 : H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing E . coli. **BMC microbiology**, p. 1–13, 2017.
- LI, Y. et al. A sensitive electrochemical strategy via multiple amplification reactions for the detection of E. coli O157: H7. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 111752, 2019.
- LIU, W. et al. to modulate host function. **Nature Microbiology**, [s.d.].
- LÓPEZ-CUEVAS, O. et al. Characterization of bacteriophages with a lytic effect on various Salmonella serotypes and Escherichia coli O157 : H7. **Can. J. microbiol.**, v. 1051, n. 2508, p. 1042–1051, 2011.
- LU, H. et al. Genomic characterization of a novel virulent phage infecting Shigella flexneri and isolated from sewage. **Virus Research**, v. 283, n. April, 2020.
- MAI, V. et al. Bacteriophage administration significantly reduces Shigella colonization and shedding by Shigella -challenged mice without deleterious side effects and distortions in the gut microbiota. **bacteriophage**, n. December, p. 1–6, 2015.
- MAMBU, J. et al. An Updated View on the Rck Invasin of Salmonella : Still Much to Discover. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, n. December, p. 1–10, 2017.
- MASERATI, A. et al. General response of Salmonella enterica serovar Typhimurium to desiccation : A new role for the virulence factors sopD and sseD in survival. **PLoS ONE**, p. 1–23, 2017.

- MASZEWSKA, A. Differentiation of polyvalent bacteriophages specific to uropathogenic proteus mirabilis strains based on the host range. **ACTA**, 2016.
- MEDEIROS, C. et al. Genotypic diversity , pathogenic potential and the resistance profile of Salmonella Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983 to 2013 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 1994, p. 1395–1407, 2015.
- MEIKLE, L. M. et al. SipA activation of caspase-3 is a decisive mediator of host cell survival at early stages of Salmonella Typhimurium infection. **infection and immunity**, n. June, 2017.
- MERABISHVILI, M. et al. Digitized fluorescent RFLP analysis ( fRFLP ) as a universal method for comparing genomes of culturable dsDNA viruses : application to bacteriophages. **research microbiology**, v. 158, 2007.
- MIC, S. et al. Capsid Structure of a Freshwater Cyanophage Article Capsid Structure of a Freshwater. **cell press**, p. 1508–1516, 2019.
- MIKALOVÁ, L.; BOSA, J. Novel Temperate Phages of Salmonella enterica subsp . salamae and subsp . diarizonae and Their Activity against Pathogenic S . enterica subsp . enterica Isolates. **PLoS ONE**, n. V, p. 1–14, 2017.
- MIRANDA, A. L.; CORDEIRO, S. M.; REIS, J. N. Phenotypic and genotypic characterization of Salmonella spp . isolated from foods and clinical samples in Brazil. **anais da academia brasileira de ciencias**, v. 89, p. 1143–1153, 2017.
- MOYE, Z. D.; WOOLSTON, J.; SULAKVELIDZE, A. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. **Viruses**, v. 10, p. 1–22, 2018.
- NARAYANAN, S.; IBRAHIM, S.; AHAMED, B. by Molecular Dynamics Simulation. **Informatics in Medicine Unlocked**, 2017.
- NETO, W. S.; CORBELLINI, L. G.; HALD, T. Estimativa de casos de salmonelose humana atribuída às fontes de alimento de origem animal. **Anais da VIII SEMANÍSTICA**, 2017.
- NISA, I. et al. Shigella flexneri : an emerging pathogen. **folia microbiologica**, 2020.
- NORTH, O. I. et al. Phage tail fibre assembly proteins employ a modular structure to drive the correct folding of diverse fibres. **nature microbiology**, 2019.
- NYHOLM, O.; SHIGA, I. C. Characterization of Shigella sonnei Isolate Carrying Shiga Toxin 2–Producing Gene. **letters**, v. 21, n. 5, p. 2–4, 2015.

OBAYES, M. S.; AL-BERMANI, O. K.; RAHIM, S. A. Genetic detection of in vA , sipB , SopB and sseC genes in Salmonella spp isolated from diarrheic children patients. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 3091, n. April, p. 3085–3091, 2020.

PAULO, L. et al. Bacteriophages with potential to inactivate Salmonella Typhimurium : use of. **Virus Research**, 2016.

PAWLOWSKI, A. Thermus Bacteriophage P23-77 : Key Member of a Novel , but Ancient Family of Viruses from Extreme Environments Alice Pawlowski Thermus Bacteriophage P23-77 : Key Member of a Novel , but Ancient Family of Viruses from Extreme Environments. **STUDIES IN BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCE**, 2015.

PETSONG, K.; VONGKAMJAN, K. Lysis Profiles of Salmonella Phages on Salmonella Isolates from Various Sources and Efficiency of a Phage Cocktail against S . Enteritidis and. **microorganisms**, 2019.

PINHEIRO, F. et al. Infection , Genetics and Evolution Virulence traits and expression of bstA , fliC and sopE2 in Salmonella Dublin strains isolated from humans and animals in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 80, n. September 2019, p. 104193, 2020.

PROFILE, S. E. E. A review on shigellosis : Pathogenesis and antibiotic resistance Review Article A review on shigellosis : Pathogenesis and antibiotic resistance. **Drug Invention Today**, n. May, 2020.

QIAN, H. et al. Discovery of seven novel mutations of gyrB , parC and parE in Salmonella Typhi and Paratyphi strains from Jiangsu Province of China. **scientific reports**, v. 10, p. 1–8, 2020.

QUINTELA, P. et al. Molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance profile of Shigella species isolated from children with moderate to severe diarrhea in northeastern Brazil. **Diagnostic microbiology & infectious disease**, 2017.

RADFORD, D. et al. Characterization of antimicrobial properties of Salmonella phage Felix O1 and Listeria phage A511 embedded in xanthan coatings on Poly ( lactic acid ) fi lms. **Food Microbiology**, v. 66, p. 117–128, 2017.

RASTOGI, V.; GAUR, P. K.; VERMA, A. An Overview on Bacteriophages: A Natural Nanostructured Antibacterial Agent. **bentham science**, v. 15, p. 3–20, 2018.

- RICHARD K. GAST AND ROBERT E. PORTER, J. Salmonella Infections. **Diseases of Poultry**, 2020.
- RÖDER, J.; HENSEL, M. Presence of SopE and mode of infection result in increased Salmonella -containing vacuole damage and cytosolic release during host cell infection by Salmonella enterica. **celular microbiology**, n. July 2019, p. 1–17, 2020.
- SCHOLL, D. Phage Tail – Like Bacteriocins. **annual review of virology**, 2017.
- SERIBELLI, A. et al. Molecular and phenotypic characterization of strains of Shigella sonnei isolated over 31 years suggests the circulation of two prevalent subtypes in S ~. **journal medical microbiology**, p. 666–677, 2016.
- SETHUVEL, D. P. M. et al. Update on: Shigella new serogroups / serotypes and their antimicrobial resistance. **applied microbiology**, 2016.
- SHAHIN, K. et al. Microbial Pathogenesis Isolation , characterization , and PCR-based molecular identi fi cation of a siphoviridae phage infecting Shigella dysenteriae. **microbial pathogenesis**, v. 131, n. March, p. 175–180, 2019.
- SHAHIN, K.; BOUZARI, M.; WANG, R. Isolation , characterization and genomic analysis of a novel lytic bacteriophage vB \_ SsoS-ISF002 infecting Shigella sonnei and Shigella flexneri. **journal medical microbiology**, p. 376–386, 2018.
- SILVA, A. et al. No Title. **EEDIC**, n. I, 2017. SILVA, J.; MICROBIOLOGY, F.; ADVANCE, L. FEMS Microbiology Letters Advance Access published January 10, 2016. **FEMS Microbiology**, 2016.
- SIMPSON, K. M. J. et al. Diversity of Salmonella serotypes from humans , food , domestic animals and wildlife in New South Wales , Australia. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, p. 1–11, 2018.
- SOFFER, N. et al. Bacteriophage preparation lytic for Shigella significantly reduces Shigella sonnei contamination in various foods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. i, p. 1–11, 2017.
- STALIN, N.; SRINIVASAN, P. Efficacy of potential phage cocktails against Vibrio harveyi and closely related Vibrio species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. **Veterinary Microbiology**, 2017.
- SUMMER, E. J. et al. Rz / Rz1 Lysis Gene Equivalents in Phages of Gram-negative Hosts. **jmb**, p. 1098–1112, 2007.

- THINDWA, D. et al. Distinct climate influences on the risk of typhoid compared to invasive non-typhoid Salmonella disease in Blantyre , Malawi. **scientific reports**, v. 9, p. 1–11, 2019.
- TORRACA, V.; HOLT, K.; MOSTOWY, S. Shigella sonnei Trends in Microbiology | Microbe of the Month. **microbe of the month**, v. xx, n. xx, p. 10–11, 2020.
- VAHEDI, A. et al. Isolation and identification of specific bacteriophage against enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) and in vitro and in vivo characterization of bacteriophage. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 16, 2018.
- VALENCIA-GALLARDO, C. et al. Shigella IpaA Binding to Talin Stimulates Filopodial Capture and Cell Adhesion Article Shigella IpaA Binding to Talin Stimulates Filopodial Capture and Cell Adhesion. **CellReports**, v. 26, n. 4, p. 921- 932.e6, 2019.
- VELAZQUEZ, E. M. et al. Endogenous Enterobacteriaceae underlie variation in susceptibility to Salmonella infection. **nature microbiology**, 2019.
- VOLUME, M. et al. The Study of the Stable Expression of IpaB , the Virulence Factor in Shigella Sonnei , in Terms of Simultaneous Expression of Chaperone IpgC. **Iranian Journal of Medical Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 260–268, 2018.
- WANG, X. IpaB ligands and its activity is regulated by RanGTP/GDP switch Xin Wang. **JBC papers**, v. 3, p. 9–11, 2019.
- WILSON, K.; ELY, B. Analyses of four new Caulobacter Phicbkviruses indicate independent lineages. **microbiology society**, v. 9, p. 321–331, 2019.
- WOTZKA, S. Y.; NGUYEN, B. D.; HARDT, W. Review Salmonella Typhimurium Diarrhea Reveals Basic Principles of Enteropathogen Infection and Disease-Promoted DNA Exchange. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 4, p. 443–454, 2017.
- XU, Y. et al. Characterization and Genomic Study of Phage vB \_ EcoS-B2 Infecting Multidrug-Resistant Escherichia coli. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. May, 2018.
- YANG, C. et al. Characterization and Genomic Analysis of SFPH2 , a Novel T7virus Infecting Shigella. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. December, p. 1–9, 2018.
- YANG, S. et al. The roles of the virulence factor IpaB in Shigella spp . in the escape from immune cells and invasion of epithelial cells. **microbiological research**, v. 181, p. 43–51, 2015.

YAZDI, M.; BOUZARI, M.; ALLAH, E. Genomics Genomic analyses of a novel bacteriophage ( VB \_ PmiS-Isfahan ) within Siphoviridae family infecting *Proteus mirabilis*. **genomics**, n. April, 2018.

ZHANG, K. et al. Minimal SPI1-T3SS effector requirement for *Salmonella* enterocyte invasion and intracellular proliferation in vivo. **PLoS ONE pathogens**, p. 1–30, 2018.

Manaus-Am, 19 de março de 2024

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - PPGMBT

**Assunto: Encaminhamento de matriz impressa e CD em formato PDF de teses e dissertações.**

Prezado Coordenador,

Eu, Prof(a). Dr(a). **Hugo Valério Corrêa de Oliveira**, orientador(a) do(a) pós-graduando(a) **Alex Santos de Almeida**, junto a este programa, venho por meio deste AUTORIZAR a Coordenação do Programa o encaminhamento à gráfica da UEA da matriz definitiva da sua dissertação intitulada....., uma vez que foram realizadas todas as correções exigidas pela Banca Julgadora, estando deste exemplar tecnicamente correto quanto a sua forma e conteúdo.

Atestamos ainda que a cópia em CD gerada em formato PDF é idêntica em sua forma e conteúdo à matriz definitiva em formato impresso. Encaminhamos em anexo o termo de autorização para publicação digital devidamente preenchido e assinado.

Solicito assim, as devidas providências de encaminhamento em questão, subscrevendo-me.

Atenciosamente,



**Hugo Valério Corrêa de Oliveira**

----- BSc, Pharm, Spec, MSc, PhD -----

**Prof Assoc ESA/UEA • Farm Bioq SES-AM**

Universidade do Estado do Amazonas - UEA

Escola Superior de Ciências da Saúde ESA

Lab Bioquímica. End: av Carvalho Leal 1777

69065-001 - Cachoeirinha, Manaus-AM/BRA

Cel: +55(92) 98155-8337

E-mail: hvoliveira@uea.edu.br