

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS TECNOLÓGICOS E**  
**AMBIENTAIS**

**Renata Lopes Simões da Silva**

**BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO ALTERNATIVA DE BIOCONTROLE**  
**CONTRA *SALMONELLA* SPP. ISOLADAS NA REGIÃO DE SOROCABA**

**Sorocaba/SP**

**2026**

### Ficha Catalográfica

S583b Silva, Renata Lopes Simões da  
Bacteriófagos líticos como alternativa de biocontrole contra *Salmonella*  
*spp.* isoladas na região de Sorocaba / Renata Lopes Simões da Silva. -- 2026.  
145 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila.  
Coorientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão.  
Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais) -  
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2026.

1. Bacteriófagos. 2. Controle biológico. 3. Drogas – Resistência em  
micro-organismos. I. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho, orient. II. Balcão,  
Victor Manuel Cardoso Figueiredo, coorient. III. Universidade de Sorocaba.  
IV. Título.

**Renata Lopes Simões da Silva**

**BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO ALTERNATIVA DE BIOCONTROLE  
CONTRA *SALMONELLA* SPP. ISOLADAS NA REGIÃO DE SOROCABA**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

Esta dissertação contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio da concessão de bolsa de estudo de nível mestrado, no âmbito do Projeto Observatório (Ref. 440869/2022-6).

**Orientadora:** Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila  
**Coorientador:** Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão

**Sorocaba/SP**

**2026**


**Renata Lopes Simões da Silva**

**BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO ALTERNATIVA DE BIOCONTROLE  
CONTRA *SALMONELLA* SPP. ISOLADAS NA REGIÃO DE SOROCABA**

Dissertação aprovada como requisito  
parcial para obtenção do grau de mestre  
do Programa de Pós-graduação em  
Processos Tecnológicos e Ambientais da  
Universidade de Sorocaba

Aprovado em: **27/02/2026**


**BANCA EXAMINADORA:**

Documento assinado digitalmente  
 **MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA**  
Data: 19/03/2026 20:53:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Universidade de Sorocaba

Documento assinado digitalmente  
 **SERGIO OLIVEIRA DE PAULA**  
Data: 19/03/2026 14:24:48-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Sergio Oliveira de Paula

Universidade Federal de Viçosa

**FERNANDO DE SA DEL** Assinado de forma digital por  
**FIOL:08177980807** **FERNANDO DE SA DEL**  
**FIOL:08177980807**  
Dados: 2026.03.19 16:00:53 -03'00'

---

Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol

Universidade de Sorocaba

## **DEDICATÓRIA**

*À minha família de sangue, e a que  
meu coração escolheu*

*“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”*

*Mohandas Karamchand Gandhi (Mahatma Gandhi) (1869 – 1948)*

## AGRADECIMENTOS

Existe um provérbio africano que diz: *“Se quiser ir rápido, vá sozinho; se quiser ir longe, vá acompanhado”*. É assim que escolho iniciar estes agradecimentos, pois este trabalho não teria alcançado seus objetivos sem a ajuda de cada pessoa que encontrei ao longo dessa jornada.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela coragem nos momentos de dúvida e incerteza. Aos meus pais, Afrânio Furtado e Helida Mara Lopes, que, mesmo sendo engenheiros, nunca questionaram minha paixão pela ciência desde a infância, mas, ao contrário, incentivaram.

Agradeço especialmente à Profa. Dra. Ana Carolina Porto e à Profa. Me Bianca Belline, que, cada uma a seu modo, foram as responsáveis por me impulsionar a trilhar o caminho da pesquisa. Se este mestrado tem um ponto de partida, certamente começou com o incentivo e o exemplo de vocês.

Ao meu namorado, Henrique Mascarenhas, que esteve ao meu lado em todos os momentos, oferecendo apoio, compreensão e, muitas vezes, apenas o ombro amigo de que eu precisava para seguir em frente. Aos amigos Alanis Proença, Gustavo Nunes, Júlia Gomes, Rafaela Candiani, Renato Candiani, Thais Nunes e ao meu afilhado Caleb Nunes, que sempre me ofereceram um refúgio e lembraram da importância das pausas para recarregar as energias.

Aos pesquisadores do Laboratório de Vírus Bacterianos da Uniso (VBlab – Uniso, Alessandro Marques, Bruna Nogueira, Érica Silva, Fernanda Morelli, Giovanna Brasil, Giulia Pimentel, Gustavo Luchini, Julio Mescoloto, Larissa Santos e Messias Santos, cuja convivência transformou colegas de trabalho em amigos e exemplos de dedicação e inspiração.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Maria Duarte Carvalho Vila e ao meu coorientador Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão, pela paciência, ensinamentos e pela forma como me guiaram na superação de cada obstáculo, contribuindo não apenas para minha formação acadêmica, mas também pessoal.

À Universidade de Sorocaba (Uniso), que, por meio do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais (PPGPTA), me concedeu a oportunidade de aprofundar meus estudos e descobrir o valor da pesquisa e da vida acadêmica.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro através da bolsa concedida, sem a qual minha dedicação integral à pesquisa não teria sido possível.

À Valéria Orsi responsável pelos laboratórios de apoio da Uniso e aos técnicos Márcia Mercedes e Henrique Trombini do Laboratório de Controle Biológico da Uniso, pela paciência, dedicação e constante disposição para ensinar. Agradeço também à equipe do Laboratório Veterinário Centro de Diagnóstico Laboratorial Veterinário (VETLAB) que, desde o primeiro contato, demonstrou prontidão e total disponibilidade para colaborar. Aos técnicos do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida da Unicamp (LaCTAD – Unicamp), pela agilidade e precisão nas análises realizadas. À Dra. Priscila Cervini da Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP/CAQI), pela competência, presteza e suporte nas análises realizadas. À Dra. Liliam Harada, do Laboratório de Avaliação da Bioatividade e Toxicologia de Nanomateriais da Uniso (LABITON - Uniso). E por último, mas não menos importante ao Laboratório de Ciências Moleculares (LACIMO – Uniso).

Assim, ao olhar para trás, percebo que este caminho só pôde ser trilhado até aqui porque nunca estive sozinha. Cada contribuição, por menor que parecesse, foi fundamental para que este trabalho pudesse ir mais longe. Se caminhei até aqui, foi porque tive a companhia, o apoio e a generosidade de todos vocês.

A todos, o meu sincero e eterno **muito obrigada!**

## RESUMO

*Salmonella* spp. são bactérias associadas às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) e representam um desafio à saúde pública e à segurança alimentar mundial. O aumento da resistência antimicrobiana tem impulsionado a busca por estratégias alternativas de controle bacteriano, entre elas o uso de bacteriófagos. Neste sentido, objetivou-se isolar, caracterizar e avaliar o potencial de fagos líticos contra *Salmonella* spp., as quais foram isoladas próximas às criações avícolas de pequeno porte na Região Metropolitana de Sorocaba (SP). Foram coletadas amostras fecais de frangos, seguidas de isolamento bacteriano e identificação bioquímica, genotípica e fenotípica. Dois bacteriófagos líticos foram isolados e designados como SENT-12A (ativo contra *Salmonella* spp. da amostra 12) e SENT-36A (ativo contra *Salmonella* spp. da amostra 36). Os bacteriófagos isolados foram propagados, purificados, caracterizados físico-quimicamente (perfil de absorção no espectro de luz UV-Vis; coeficiente de extinção molar; perfil das proteínas estruturais por eletroforese em gel de poliacrilamida e; análises das características morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)) e biologicamente (curva em um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC); curva de adsorção; gama de hospedeiros (*host range*) e eficiência de plaqueamento (EOP); curvas de inativação bacteriana *in vitro* a vários valores de Multiplicidade de Infecção (MOI); e determinação da frequência de mutantes resistentes ao bacteriófagos. Foram isolados dois bacteriófagos líticos pertencentes a classe Caudoviricetes. As caracterizações biológicas evidenciaram afinidade pelos hospedeiros, sendo o fago SENT-12A, com *burst size* de 9,87 partículas por célula infectada e o fago SENT-36A com 9,64 partículas por célula infectada. Nos ensaios de inativação bacteriana, o MOI 1 apresentou maior eficiência no controle da concentração de células do hospedeiro bacteriano tanto individualmente quanto em coquetel. Para o teste de frequência de mutantes resistentes os valores obtidos foram  $1,01 \times 10^{-3}$  para o bacteriófago SENT-12A e  $0,99 \times 10^{-3}$  para o bacteriófago SENT-36A. Os resultados obtidos indicaram o potencial dos fagos isolados para uso no biocontrole de *Salmonella* spp. em ambientes avícolas e sistemas alimentares.

**Palavras-chave:** bacteriófago; *Salmonella* spp.; fagoterapia; resistência bacteriana aos antibióticos; biocontrole.

## ABSTRACT

*Salmonella* spp. are bacteria associated with foodborne illnesses (FBD) and pose a challenge to public health and food security worldwide. The rise in antimicrobial resistance has driven the search for alternative bacterial control strategies, including the use of bacteriophages. Therefore, the objective was to isolate, characterize, and evaluate the potential of lytic phages against *Salmonella* spp., which were isolated near small-scale poultry farms in the Sorocaba Metropolitan Region, São Paulo. Fecal samples were collected from chickens, followed by bacterial isolation and biochemical, genotypic, and phenotypic identification. Two lytic bacteriophages were isolated and designated SENT-12A (active against *Salmonella* spp. from sample 12) and SENT-36A (active against *Salmonella* spp. from sample 36). The isolated bacteriophages were propagated, purified, and characterized physicochemically (absorption profile in the UV-Vis light spectrum and molar extinction coefficient; profile of structural proteins by polyacrylamide gel electrophoresis; analysis of morphological characteristics by transmission electron microscopy (TEM)) and biologically (curve in a single synchronous growth cycle (OSGC); adsorption curve; host range and plating efficiency (EOP); in vitro bacterial inactivation curves at various Multiplicity of Infection (MOI) values); and determination of the frequency of mutants resistant to bacteriophage. Two lytic bacteriophages belonging to the Caudoviricetes class were isolated. Biological characterizations demonstrated affinity for the hosts, with phage SENT-12A having a burst size of 9.87 particles per infected cell and phage SENT-36A having 9.64 particles per infected cell. In the bacterial inactivation assays, MOI 1 showed greater efficiency in controlling the concentration of bacterial host cells, both individually and in cocktails. For the resistant mutant frequency test, a frequency of  $1.01 \times 10^{-3}$  was observed for bacteriophage SENT-12A and  $0.99 \times 10^{-3}$  for bacteriophage SENT-36A. The results obtained indicate the potential of the isolated phages for use in biocontrol of *Salmonella* spp. in poultry environments and food systems.

**Keywords:** bacteriophage; *Salmonella* spp.; phage therapy; bacterial resistance to antibiotics; biocontrol.

## APRESENTAÇÃO

A pesquisa intitulada “Bacteriófagos líticos como alternativa de biocontrole contra *Salmonella* spp. Isoladas na região de Sorocaba” foi desenvolvida no âmbito do projeto “Observatório de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Sorocaba”. Este projeto teve como propósito contribuir para o desenvolvimento regional, apoiando a gestão pública e privada, subsidiando o planejamento estratégico e fortalecendo a inserção social dos Programas de Pós-graduação da Universidade de Sorocaba (Uniso) na Região Metropolitana de Sorocaba (RMS).

Nesse contexto, o isolamento de bactérias hospedeiras obtidas em Sorocaba e região possibilitou a prospecção e caracterização de partículas bacteriofágicas estritamente líticas, com potencial de aplicação no controle de *Salmonella* spp., microrganismo de relevância para a saúde pública e a cadeia produtiva local.

O trabalho contou com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio da concessão de bolsa de estudo / nível mestrado (PQ-2 (Ref. 301978/2022-0)) para a aluna Renata Lopes Simões da Silva, no âmbito do projeto de pesquisa “Observatório de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Sorocaba” (ref. 440869/2022-6).

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Vírus Bacterianos da Uniso (VBlab), enquanto as análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram conduzidas na Central de Análises Químicas e Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC/USP). As análises dos genomas das bactérias foram realizadas no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Do trabalho de pesquisa realizado resultaram várias comunicações que foram apresentadas em congressos científicos nacionais e internacionais, sendo:

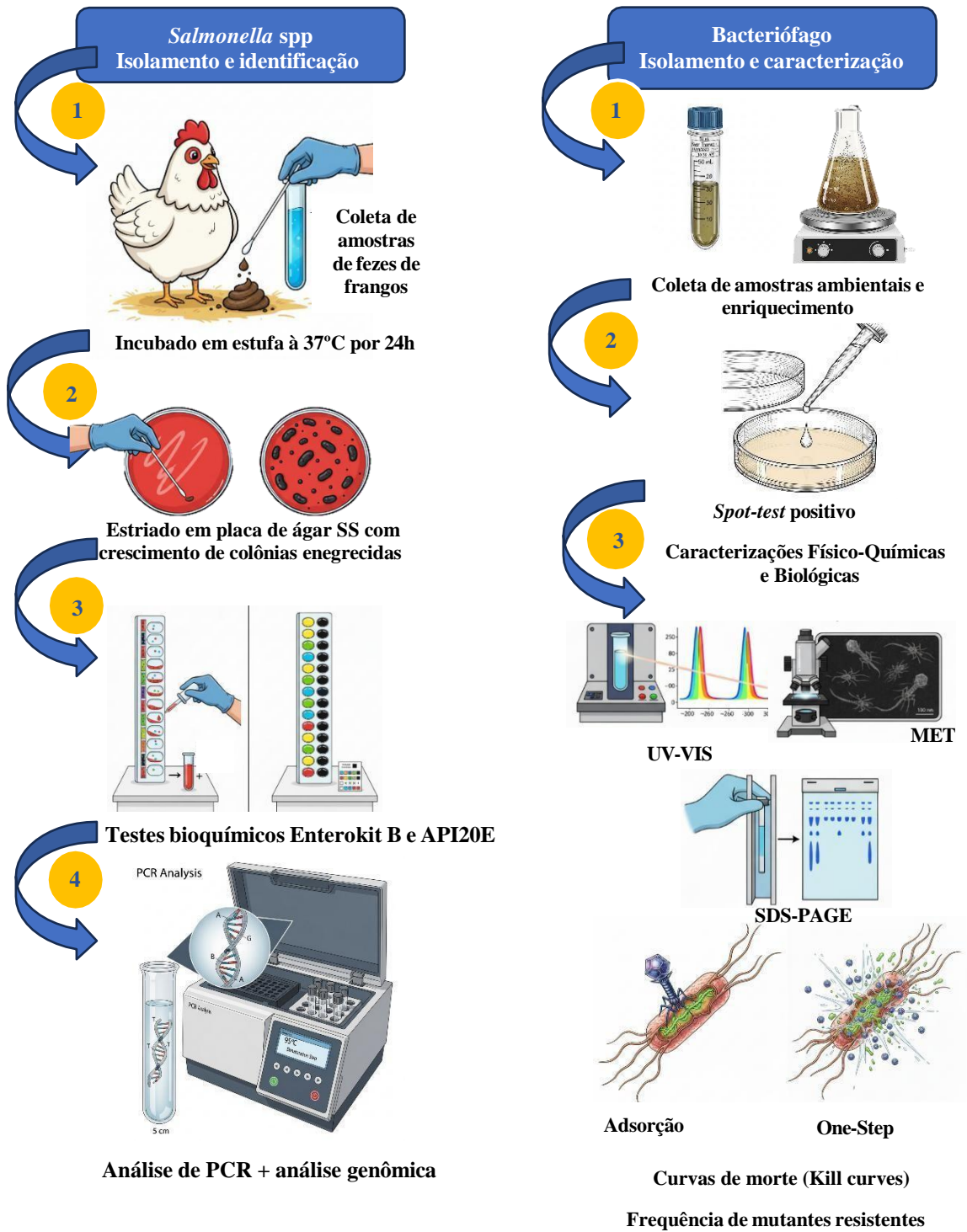
- Renata L. S. Silva, Victor M. Balcão, Marta M. D. C. Vila. Estudo comparativo entre três formas de identificação de *Salmonella* spp. V *Brazilian Congress of Development*, evento *on-line*, São José dos Pinhais, PR, 28 de agosto de 2024 (Anexo 1).

- Renata L. S. Silva, Victor M. Balcão, Marta M. D. C. Vila. Prospecção de *Salmonella* spp. em Sorocaba e região e isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos para seu combate. *V Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia*, evento *on-line*, 26 a 30 de agosto de 2024 (Anexo 2).
- Renata L. S. Silva, Victor M. Balcão, Marta M. D. C. Vila. Identificação e isolamento de *Salmonella* spp. a partir de amostras ambientais. *27º Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica – EPIC*. Sorocaba, SP, 16 a 18 de outubro de 2024 (Anexo 3).
- Renata L. S. Silva, Victor M. Balcão, Marta M. D. C. Vila. Análise da eficácia de métodos bioquímicos na identificação de *Salmonella* spp. em amostras ambientais de produções avícolas de pequeno porte. *21º Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas*. Poços de Caldas, SP, 22 a 25 de outubro de 2024 (Anexo 4).
- Renata L. S. Silva, Victor M. Balcão, Marta M. D. C. Vila. Estudo comparativo entre formas de identificação de *Salmonella* spp. *I Colóquio Interdisciplinar PPGCF e PPGPTA, IV Simpósio em Ciências Farmacêuticas e II Simpósio em Processos Tecnológicos e Ambientais*. Sorocaba, SP, 24 e 25 de outubro de 2024 (Anexo 5).
- Renata L. S. Silva, Marta M. D. C. Vila. Prospecção de *Salmonella* spp. em Sorocaba e região e isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos para seu combate. *1º Encontro de Pesquisadores do Observatório de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Sorocaba – EPO/2025*. Sorocaba, SP, 23 de abril de 2025 (Anexo 6).
- Renata L.S. Silva, Victor M. Balcão, Marta M. D. C. Vila. Eficácia de métodos bioquímicos na identificação de *Salmonella* spp. em amostras de produções avícolas de pequeno porte. *II Congresso Nacional de Agronomia On-line*. Terezina, 3 a 6 de junho de 2025 (Anexo 7).

- Renata L. S. Silva, Bruna C. A. Nogueira, Victor M. Balcão, Marta M. C. D. Vila. Bacteriófagos líticos como alternativa ao combate à *Salmonella* spp. em granjas de pequeno porte. *VI Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia*, evento *on-line*, 25 a 29 de agosto de 2025 (Anexo 8).
- Renata L. S. Silva, Bruna C. A. Nogueira, Victor M. Balcão, Marta M. C. D. Vila. Bacteriófagos líticos: uma abordagem alternativa para o controle de *Salmonella* spp. em granjas de pequeno porte. *28º Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica*, Sorocaba, SP, 28 a 30 de outubro de 2025 (Anexo 9).
- Renata L. S. Silva, Bruna C. A. Nogueira, Fernanda C. Moreli, Júlio C. Mescoloto, Alessandro M. Santos, Lucas M. R. Rodrigues, Victor M. Balcão, Marta M. D. C. Vila. Isolation and characterization of lytic phages for *Salmonella* spp. from Sorocaba and region. *36º Congresso Brasileiro de Virologia e 20º Encontro de Virologia do Mercosul*, Belo Horizonte, MG, 20 a 23 de novembro, 2025 (Anexo 10).

O trabalho de pesquisa foi realizado em duas etapas principais. Na primeira, realizou-se a busca por bactérias provenientes de Sorocaba e região e sua caracterização. Na segunda fase, procedeu-se ao isolamento e a caracterização de bacteriófagos líticos voltados ao combate dessas bactérias. A Figura 1 apresenta um esquema ilustrativo das etapas do estudo.

Figura 1 - Fluxograma ilustrativo da pesquisa desenvolvida



Fonte: Elaboração própria com auxílio de IA (Gemini, 2025).

## IMPACTO ECONÔMICO, CIENTÍFICO, SOCIAL E AMBIENTAL

O desenvolvimento desta pesquisa tem potencial de gerar impactos social, econômico, científico e ambiental, especialmente nos âmbitos da saúde pública, da produção avícola regional e nacional, bem como na formação científica.

No campo social e da saúde pública, os resultados poderão subsidiar estratégias de prevenção e redução da incidência da salmonelose. Esta enfermidade é de grande relevância epidemiológica, frequentemente associada a surtos alimentares no Brasil, sendo responsável por quadros de diarreia, hospitalizações e até óbitos. A busca por alternativas ao uso indiscriminado de antibióticos, como a terapia fágica, mostra-se essencial diante do avanço da resistência bacteriana, reconhecida hoje como um dos maiores desafios globais à saúde humana e animal.

No campo econômico e produtivo, a pesquisa apresenta relevância para o setor avícola. Sendo o Brasil, um dos maiores exportadores mundiais de carne de frango é diretamente impactado por contaminações por *Salmonella* spp., que podem comprometer a competitividade internacional. Na Região Metropolitana de Sorocaba, destacam-se como polos produtores os municípios de Capela do Alto, Porto Feliz e Araçoiaba da Serra. A identificação de bacteriófagos líticos regionais capazes de controlar *Salmonella* spp. poderá reduzir perdas produtivas, mitigar riscos de barreiras comerciais associadas à contaminação alimentar e fortalecer a competitividade da avicultura local e nacional.

Do ponto de vista científico e educacional, o estudo contribui para a inovação em microbiologia aplicada e biotecnologia, promovendo a formação de recursos humanos qualificados. Além disso, amplia o conhecimento sobre a fagoterapia como alternativa sustentável e promissora ao uso de antimicrobianos tradicionais, estimulando novas linhas de investigação e parcerias interinstitucionais.

Por fim, o impacto ambiental também se destaca, uma vez que, o uso de bacteriófagos representa uma alternativa ecologicamente segura e biodegradável, reduzindo o acúmulo de resíduos antimicrobianos no meio ambiente e contribuindo para a preservação da microbiota natural dos ecossistemas.

A divulgação dos resultados em revistas científicas, congressos e meios de comunicação especializados poderá sensibilizar produtores, profissionais de saúde e a comunidade acadêmica quanto à importância do uso racional de antibióticos e do desenvolvimento de terapias alternativas no enfrentamento das infecções bacterianas.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Fluxograma ilustrativo da pesquisa desenvolvida   | 14 |
| <b>Figura 2</b>  | Representação esquemática dos ciclos de vida lítico e lisogênico dos bacteriófagos  | 35 |
| <b>Figura 3</b>  | Imagens de testes negativos e positivos das galerias API20E   | 51 |
| <b>Figura 4</b>  | Perfil bioquímico obtido pela galeria API20E ® e interpretação dos resultados da amostra 12   | 73 |
| <b>Figura 5</b>  | Perfil bioquímico obtido pela galeria API20E ® e interpretação dos resultados da amostra 29   | 74 |
| <b>Figura 6</b>  | Perfil bioquímico obtido pela galeria API20E ® e interpretação dos resultados da amostra 36   | 75 |
| <b>Figura 7</b>  | Mapa genômico <i>Salmonella</i> spp. 12 com genes de resistência destacados   | 79 |
| <b>Figura 8</b>  | Mapa genômico <i>Salmonella</i> spp. 36 com genes de resistência destacados   | 80 |
| <b>Figura 9</b>  | Curvas de crescimento da <i>Salmonella</i> spp. 12 e <i>Salmonella</i> spp. 36  | 82 |
| <b>Figura 10</b> | Curva de crescimento do coquetel bacteriano contendo a <i>Salmonella</i> spp. 12 e a <i>Salmonella</i> spp. 36  | 83 |
| <b>Figura 11</b> | <i>Spot-tests</i> para <i>Salmonella</i> spp. tendo como hospedeiras as bactérias isoladas das amostras 12 e 36   | 85 |
| <b>Figura 12</b> | Placas de Petri com halos de lise dos bacteriófagos isolados  | 87 |
| <b>Figura 13</b> | Espectro de absorção na região UV-Vis obtido para o bacteriófago SENT-12A e SENT-36 <sup>a</sup>  | 88 |
| <b>Figura 14</b> | Curva de extinção molar ( $\epsilon$ ) do bacteriófago SENT-12A   | 89 |
| <b>Figura 15</b> | Curva de extinção molar ( $\epsilon$ ) do bacteriófago SENT-36 <sup>a</sup>   | 89 |
| <b>Figura 16</b> | Imagem de gel de eletroforese SDS-PAGE após coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 com as bandas das proteínas estruturais dos bacteriófagos e as bandas das proteínas dos marcadores de peso | 90 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 17</b> Microfotografia do fago isolado para a bactéria hospedeira <i>Salmonella</i> spp. 12 por microscopia eletrônica de transmissão   | 91  |
| <b>Figura 18</b> Microfotografia do fago isolado para a bactéria hospedeira <i>Salmonella</i> spp. 36 por microscopia eletrônica de transmissão   | 92  |
| <b>Figura 19</b> Curva de adsorção dos fagos SENT-12A(a) e SENT-36A(b) nas células bacterianas de <i>Salmonella</i> spp. 12 e <i>Salmonella</i> spp. 36, respectivamente  | 95  |
| <b>Figura 20</b> Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) do bacteriófago SENT-12A (a) e SENT-36A (b) em cultura com crescimento em fase exponencial de <i>Salmonella</i> spp. 12 e <i>Salmonella</i> spp. 36, respectivamente | 97  |
| <b>Figura 21</b> Curva de inativação bacteriana <i>in vitro</i> . Bacteriófago SENT-12A, bactéria <i>Salmonella</i> spp. 12   | 100 |
| <b>Figura 22</b> Curva de inativação bacteriana <i>in vitro</i> . Bacteriófago SENT-36A, bactéria <i>Salmonella</i> spp. 36   | 101 |
| <b>Figura 23</b> Curva de inativação bacteriana <i>in vitro</i> – Coquetel  | 102 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |     |
|------------------|---|-----|
| <b>Tabela 1</b>  | Reações bioquímicas comparadas entre subespécies de <i>Salmonella</i> spp.  | 30  |
| <b>Tabela 2</b>  | Características bioquímicas de <i>Salmonella enterica</i> sorovares Typhi, Paratyphi A e Enterica   | 30  |
| <b>Tabela 3</b>  | Cepas bacterianas de coleção utilizadas nos ensaios de gama de hospedeiros ( <i>host range</i> ) e eficiência de plaqueamento (EOP) dos dois bacteriófagos isolados | 44  |
| <b>Tabela 4</b>  | Local das amostras ambientais coletadas para identificação de bactérias e isolamento de <i>Salmonella</i> spp.  | 46  |
| <b>Tabela 5</b>  | Testes bioquímicos da galeria API20E®   | 50  |
| <b>Tabela 6</b>  | Caracterização das amostras coletadas para identificação e isolamento de bacteriófagos líticos segundo localização e matriz ambiental                               | 54  |
| <b>Tabela 7</b>  | Morfologia e coloração das colônias de amostras cultivadas em ágar Shigella-Salmonella (SS) sugestivas de <i>Salmonella</i> spp.                                    | 68  |
| <b>Tabela 8</b>  | Resultados das amostras incubadas no Enterokit B®   | 70  |
| <b>Tabela 9</b>  | Métricas de qualidade das montagens genômicas das amostras <i>Salmonella</i> 12 e <i>Salmonella</i> 36  | 79  |
| <b>Tabela 10</b> | Determinação da gama de hospedeiros do bacteriófago isolado ( <i>host range</i> ) e da sua eficiência de plaqueamento (EOP) em cepas bacterianas susceptíveis       | 94  |
| <b>Tabela 11</b> | Determinação da frequência de emergência espontânea de células bacterianas mutantes resistentes ao bacteriófago   | 103 |

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

|                  |  |
|------------------|--|
| ADH              | Arginina di-hidrolase  |
| AM               | Amazonas   |
| AMY              | Amigadalina  |
| ARA              | Arabiose   |
| ATCC             | American Type Culture Collection                                   |
| BHI              | Brain Heart Infusion   |
| CARD             | Resistance Gene Identifier   |
| CCCD             | Coleção de Cultura Cefar Diagnóstica                               |
| CDS              | Coding Sequences   |
| CIT              | Citrato (Simmons)  |
| Cm               | Centmetros  |
| COM              | Cefepime   |
| D                | Detectado  |
| DNA              | cido desoxirribonucléico  |
| DSM              | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen             |
| DTA              | Doença Transmitida por Alimento                                    |
| EOP              | Eficiência de Plaqueamento   |
| EPM              | Eritrose - Peptona – Motilidade                                    |
| EUA              | Estados Unidos da América  |
| G                | Gramas   |
| GEL              | Gelatinase   |
| GLU              | Glicose  |
| GPS              | Global Positioning System  |
| H                | Horas  |
| H <sub>2</sub> S | Sulfeto de hidrogênio  |
| HCl              | cido Clorídrico   |
| IBSBF            | Instituto Biológico do Estado de São Paulo                         |
| IND              | Indol  |
| INO              | Inositol   |
| IQSC-USP         | Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo    |
| JAMES            | p-dimetilaminocinamaldeído dissolvido em álcool e ácido clorídrico |

|                   |   |
|-------------------|---|
| KCN               | Cianeto de Potássio   |
| kDa               | Kilodalton  |
| LaCTAD            | Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida |
| LDC               | Lisina Descarboxilase   |
| mA                | Mili ampers   |
| MAN               | Manitol   |
| MAPA              | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento                       |
| MEL               | Melibiose   |
| MET               | Microscopia Eletrônica de Transmissão                                     |
| MgSO <sub>4</sub> | Sulfato de Magnésio   |
| MILi              | Motilidade - Indol – Lisina   |
| Min               | Minutos   |
| mL                | Mililitros  |
| MOI               | Multiplicidade de Infecção  |
| MTA-TSB           | Molten  |
| NaCl              | Cloreto de Sódio  |
| ND                | Não Detectado   |
| Nm                | Nanômetros  |
| °C                | Graus Centígrados   |
| OCD               | Ornitina Descarboxilase   |
| OD                | Optical Density   |
| $\epsilon$        | Extinção Molar  |
| ONPG              | Orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo                            |
| OSGC              | <i>One-Step Growth Curve</i>  |
| PCR               | Cadeia de Polimerase  |
| PES               | Poliétersufato  |
| RHA               | Ramnose   |
| RMS               | Região Metropolitana de Sorocaba  |
| rRNA              | Ribossomal RNA  |
| RND               | Resistance-Nodulation-Division  |
| S                 | Latitude Sul  |

|          |  |
|----------|--|
| SAC      | Sacarose   |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio |
| SM       | <i>Sodium Magnesium Buffer</i>                                     |
| SOR      | Sorbitol   |
| SP       | São Paulo  |
| SS       | Ágar <i>Shigella-Salmonella</i>                                    |
| ssp.     | Subespécie   |
| TODA     | Triptofano desaminase  |
| TEMED    | Tetrametiletilenodiamina   |
| tRNA     | <i>Transfer RNA</i>  |
| TSA      | <i>Tryptic Soy Agar</i>  |
| TSB      | <i>Tryptic Soy Broth</i>   |
| UFC      | Unidade Formadora de Colônia                                       |
| UFP      | Unidade Formadora de Placas  |
| UFV      | Universidade Federal de Viçosa                                     |
| Unesp    | Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho             |
| Uniso    | Universidade de Sorocaba   |
| Unicamp  | Universidade Estadual de Campinas                                  |
| URE      | Urease   |
| USP      | Universidade de São Paulo  |
| UV-Vis   | Radiação Ultravioleta- Visível                                     |
| V        | Volts  |
| VBLab    | Laboratório de Vírus Bacterianos                                   |
| VM       | Vermelho de Metila   |
| VP       | Voges-Proskauer  |
| W        | Longitude Oeste  |
| μL       | Microlitro   |
| μm       | Micrômetros  |

## SUMÁRIO

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| <b>1</b>  | <b>INTRODUÇÃO</b>   | 26 |
| <b>2</b>  | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>  | 29 |
| 2.1       | <i>Salmonella</i> spp.  | 29 |
| 2.2       | Bacteriófagos   | 33 |
| 2.3       | Bacteriófagos no biocontrole de patógenos bacterianos                                 | 36 |
| 2.4       | Sorocaba e região metropolitana   | 39 |
| <b>3</b>  | <b>OBJETIVOS</b>  | 41 |
| 3.1       | Objetivo geral  | 41 |
| 3.2       | Objetivos específicos   | 41 |
| <b>4</b>  | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>   | 42 |
| 4.1       | Material  | 42 |
| 4.1.1     | Equipamentos analíticos e outros  | 42 |
| 4.1.2     | Reagentes e outros  | 43 |
| 4.1.3     | Material biológico  | 43 |
| 4.2       | Métodos   | 44 |
| 4.2.1     | Preparação dos meios de cultura   | 44 |
| 4.2.2     | Isolamento e caracterização bacteriana  | 45 |
| 4.2.2.1   | Coleta e preparo de amostras  | 45 |
| 4.2.2.2   | Identificação dos isolados bacterianos  | 47 |
| 4.2.2.2.1 | Crescimento em meio de cultura ágar <i>Shigella-Salmonella</i> (SS)                   | 47 |
| 4.2.2.2.2 | Crescimento em caldo Rappaport Vassiliadis  | 48 |
| 4.2.2.2.3 | Coloração de Gram   | 48 |
| 4.2.2.2.4 | Enterokit B®  | 48 |
| 4.2.2.2.5 | Galerias API20E®  | 49 |
| 4.2.2.2.6 | Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)  | 52 |
| 4.2.2.2.7 | Anotação genômica   | 52 |
| 4.2.3     | Curva de crescimento bacteriano   | 53 |
| 4.2.4     | Cultura bacteriana em placa de petri (tapete bacteriana)                              | 53 |
| 4.2.5     | Isolamento, amplificação e purificação de bacteriófagos contra <i>Salmonella</i> spp. | 53 |
| 4.2.5.1   | Coleta das amostras para isolamento de bacteriófagos                                  | 54 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.2.5.2  | Enriquecimento das amostras   | 54        |
| 4.2.5.3  | Teste das gotas ou <i>spot-test</i>   | 55        |
| 4.2.5.4  | Isolamento de placas bacteriofágicas  | 55        |
| 4.2.5.5  | Amplificação de partículas fágicas  | 55        |
| 4.2.5.6  | Purificação das partículas fágicas  | 56        |
| 4.2.5.7  | Determinação do título fágico   | 56        |
| 4.2.6    | Caracterização físico-química dos bacteriófagos isolados  | 56        |
| 4.2.6.1  | Perfil de adsorção das partículas fágicas por varredura espectral UV-Vis  | 57        |
| 4.2.6.2  | Determinação do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ )  | 57        |
| 4.2.6.3  | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)  | 57        |
| 4.2.6.4  | Microscopia eletrônica de transmissão (MET)   | 58        |
| 4.2.7    | Caracterização biológica dos bacteriófagos isolados   | 58        |
| 4.2.7.1  | Gama e hospedeiros ( <i>host-range</i> ) e eficiência de plaqueamento (EOP)   | 59        |
| 4.2.7.2  | Curva de adsorção das partículas fágicas  | 60        |
| 4.2.7.3  | Curva em um só ciclo síncrono de crescimento (OSGC)   | 61        |
| 4.2.7.4  | Curvas de inativação bacteriana <i>in vitro</i> a vários valores de MOI, utilizando os bacteriófagos isoladamente e em coquetel | 61        |
| 4.2.7.5  | Frequência de mutantes bacterianos espontâneos  | 62        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>64</b> |
| 5.1      | Isolamento e identificação dos isolados bacterianos   | 65        |
| 5.2      | Caracterização genômica das <i>Salmonella</i> spp.  | 76        |
| 5.3      | Curva de crescimento bacteriano   | 81        |
| 5.4      | Isolamento, purificação e propagação de bacteriófagos e determinação do título fágico   | 83        |
| 5.5      | Caracterização físico-química e biológica dos bacteriófagos   | 86        |
| 5.5.1    | Observação da morfologia das placas de lise   | 86        |
| 5.5.2    | Varredura espectral UV-VIS e coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ )   | 87        |
| 5.5.3    | Eletroforese em gele de poliacrilamida (SDS-PAGE)   | 90        |
| 5.5.4    | Determinação das características morfológicas dos bacteriófagos   |           |

|          |  |     |
|----------|--|-----|
|          | por microscopia eletrônica de transmissão (MET)  | 91  |
| 5.6      | Caracterização biológica dos bacteriófagos   | 92  |
| 5.6.1    | Determinação da gama de hospedeiros ( <i>host-range</i> ) e da eficiência de plaqueamento (EOP)  | 92  |
| 5.6.2    | Curva de adsorção das células bacterianas hospedeiras  | 94  |
| 5.6.3    | Curva em um só ciclo síncrono de crescimento (OSGC)  | 96  |
| 5.6.4    | Curvas de inativação bacteriana <i>in vitro</i> a vários valores de MOI  | 99  |
| 5.6.5    | Emergência de células bacterianas mutantes resistentes aos fagos   | 103 |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO</b>   | 105 |
| <b>7</b> | <b>TRABALHOS FUTUROS</b>   | 106 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b>   | 107 |
|          | <b>APENDICE 1</b> – Fichas com os resultados das galerias API20E® por amostra com identificação do local de coleta e resultados  | 126 |
|          | <b>ANEXO 1</b> – Certificado <i>V Braziliam Congress of Development</i>  | 127 |
|          | <b>ANEXO 2</b> – Certificado <i>V Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia</i>  | 128 |
|          | <b>ANEXO 3</b> – Certificado <i>27º Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica – EPIC</i>   | 129 |
|          | <b>ANEXO 4</b> – Certificado <i>21º Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas</i>   | 130 |
|          | <b>ANEXO 5</b> – Anais do evento <i>I Colóquio Interdisciplinar PPGCF e PPGPTA, IV Simpósio em Ciências Farmacêuticas e II Simpósio em Processos Tecnológicos e Ambientais</i> | 131 |
|          | <b>ANEXO 6</b> – Certificado <i>1º Encontro de Pesquisadores do Observatório de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Sorocaba – EPO/2025</i>                             | 132 |
|          | <b>ANEXO 7</b> – Certificado <i>II Congresso Nacional de Agronomia On-line</i>   | 133 |
|          | <b>ANEXO 8</b> – Certificado <i>IV Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciências e Tecnologia</i>  | 134 |
|          | <b>ANEXO 9</b> – Certificado <i>28º Encontro de Pesquisadores de Iniciação Científica – EPIC</i>   | 135 |
|          | <b>ANEXO 10</b> – Certificado <i>36º Congresso Brasileiro de Virologia e 20º Encontro</i>  |     |

|   |     |
|---|-----|
| <i>de Virologia do Mercosul</i>   | 136 |
| <b>ANEXO 11</b> – Quadro de leitura das galerias API20E®  | 137 |
| <b>ANEXO 12</b> – Resultados testes de PCR realizados pela empresa VetLab das amostras 12, 29 e 36. | 138 |

## 1 INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) representam um importante problema de saúde pública e causam significativas perdas econômicas. Essas enfermidades são geralmente caracterizadas por sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos, diarreia e dores abdominais, podendo evoluir para quadros mais graves, especialmente em surtos que atingem grandes populações (Melo *et al.*, 2018).

Tendo em vista que as DTA's constituem um problema crescente de saúde pública, sua prevenção tem se tornado um ponto crítico de atenção em toda a cadeia de produção de alimentos. Além disso, outros fatores agravantes, como a resistência antimicrobiana e a contaminação cruzada, têm ganhado destaque nos últimos anos, reforçando a necessidade de medidas eficazes de controle microbiológico (Mthembu *et al.*, 2021).

Dentre os agentes causadores dessas doenças destaca-se *Salmonella* spp., como um dos mais importantes, devido aos seus elevados índices de morbidade e mortalidade (Knodler; Elfenbein, 2019; Silva *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019). De acordo com dados epidemiológicos nacionais, entre os anos de 2016 e 2019 foram registrados, em média, 9.312 casos anuais de DTA's. Desses, apenas 541 casos por ano tiveram o agente etiológico identificado, sendo a *Salmonella* spp. a responsável por aproximadamente 14,9% das ocorrências confirmadas (Brasil, 2020).

As grandes indústrias de alimentos, especialmente nos Estados Unidos, adotam estratégias integradas de controle de *Salmonella* spp. ao longo de toda a cadeia produtiva, com o objetivo de reduzir a prevalência e a carga do patógeno, bem como de proteger a saúde dos consumidores. Essas estratégias incluem o uso de aditivos na ração e na água, probióticos, culturas competitivas e programas de vacinação periódica, aplicados tanto em aves quanto em suínos (Bakin *et al.*, 2025). No estágio de abate, são empregadas medidas como lavagens com ácidos orgânicos, escaldamento, aplicação de água quente e diferentes técnicas de sanitização de superfícies, visando à redução da contaminação de carcaças e do ambiente industrial (Young *et al.*, 2016).

Estudos realizados em países como Brasil, Espanha, Lituânia, Estados Unidos e Grécia já apontavam altas taxas de resistência antimicrobiana em isolados de *Salmonella* spp. Essas pesquisas demonstraram que os perfis de sensibilidade e resistência variam de acordo com os sorotipos analisados, apresentando diferenças significativas. No entanto, foi comum a detecção de resistência a antibióticos como ampicilina, amoxicilina-ácido

clavulânico, cefoxitina e tetraciclina, sendo frequente a resistência múltipla a mais de um agente antimicrobiano. Por outro lado, os isolados mostraram, em geral, sensibilidade a ciprofloxacino, norfloxacin, tobramicina e imipenem (Pandini *et al.*, 2014).

Diante da crescente emergência de bactérias multirresistentes e do risco potencial de uma crise sanitária global decorrente de infecções intratáveis, pesquisas clínicas envolvendo o uso de bacteriófagos têm ganhado destaque como uma alternativa promissora para substituir ou complementar o uso de antibióticos (Nikolich; Filippov, 2020).

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam exclusivamente células bacterianas. Eles utilizam a maquinaria celular da bactéria hospedeira para se replicar, resultando, nos casos dos fagos líticos, na destruição da célula infectada (Harada *et al.*, 2018; Segundo-Arizmendi *et al.*, 2017; Nikolich, Filippov; 2020).

Os bacteriófagos possuem vantagens como: i) são extremamente específicos já que se ligam a receptores da membrana celular da bactéria; ii) possuem elevado potencial para dose única; iii) não apresentam resistências cruzadas; iv) exibem ampla gama de formas de aplicação; v) podem representar menor impacto ambiental, por estarem presentes no ambiente, as vezes em maior número do que as próprias bactérias e; vi) tem boa capacidade de penetração em biofilme (Vaz; Voss-Rech; Codenella, 2022; Vieira *et al.*, 2021).

Contudo, os bacteriófagos apresentam algumas limitações, como a necessidade de uma identificação prévia da bactéria alvo antes do início do tratamento. Além disso, a formulação de coquetéis fágicos eficazes ainda enfrenta desafios, como o risco dos fagos se tornarem reservatórios de genes de resistência. No caso de tratamentos sistêmicos em humanos, é fundamental uma compreensão mais aprofundada da resposta imune do paciente aos fagos, o que ainda constitui um ponto em aberto na pesquisa clínica (Nikolich, Filippov; 2020; Vieira *et al.*, 2021).

A presença de *Salmonella* spp. em ambientes urbanos e rurais representa uma ameaça significativa à saúde pública, sendo uma das principais causas de surtos de doenças transmitidas por alimentos (Mastrantonio; Pereira; Modesto, 2021).

Sorocaba e região são áreas de intensa atividade industrial, agrícola e comercial. A agropecuária regional é bastante diversificada, incluindo a pecuária de corte e de leite, a produção de carne suína, aves, ovos, cana-de-açúcar, citros, frutas, hortaliças, cebola, alho, batata, feijão, milho e atividades de reflorestamento (PMS, 2023). Neste sentido, o município e região apresentam potencial risco de contaminação por bactérias patogênicas,

como a *Salmonella* spp., o que justifica a necessidade de monitoramento constante de fontes ambientais. A busca por alternativas eficazes no combate a *Salmonella*, especialmente diante do crescente problema da resistência antimicrobiana, torna-se essencial. Nesse contexto, os bacteriófagos líticos surgem como uma estratégia promissora para o controle de *Salmonella*. Assim, este trabalho objetiva não apenas a prospecção de cepas bacterianas em fontes ambientais locais, mas também o isolamento e a caracterização de fagos líticos, visando uma abordagem inovadora e sustentável no combate a estes patógenos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *SALMONELLA* SPP.

Em 1885, Daniel Elmer Salmon trabalhava com Theobald Smith, como seu assistente, no *Bureau of Animal Industry* dos Estados Unidos. Eles isolaram uma bactéria de porcos doentes e a chamaram de *Bacillus choleraesuis*. Em 1900, em homenagem a Daniel Salmon, o gênero bacteriano foi batizado de *Salmonella* (Evangelopoulou; Bourriel; Spyrou, 2018).

Desde a sua descoberta, foi observado que a bactéria possui uma ampla diversidade, contudo, somente em 1920 um grupo de microbiologistas se juntou para reclassificar subespécies e sorovares diferentes, baseando-se em métodos clássicos e moleculares para sua identificação (Brasil, 2011; Oludairo *et al.*, 2021).

Atualmente, o gênero *Salmonella* é constituído por duas espécies geneticamente distintas: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A bactéria *Salmonella enterica* subespécie *enterica* é responsável por causar doenças em animais e seres humanos e ainda apresenta uma terceira classificação baseada nos sorovares, sendo os mais importantes *Typhimurium*, *Arizonae* e *Enteritidis* (Brasil, 2011; Gast; Porter Junior, 2020).

*Salmonella* é um gênero de bactérias da família Enterobacteriaceae, caracterizado por bacilos Gram-negativos. No entanto, devido à existência de diversas subespécies e sorovares, suas características bioquímicas podem variar, conforme indicado nas Tabelas 1 e 2 (Brasil, 2011; Holschbach; Peek, 2018). Normalmente, são bactérias móveis, capazes de produzir ácido a partir da glicose, fermentando arabinose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose, xilose e dulcitol. As cepas de *Salmonella* de interesse clínico não fermentam lactose, são oxidase negativas, catalase positivas e apresentam resultados negativos para indol, Voges-Proskauer (VP), vermelho de metila (VM), malonato e ureia. Pela redução do enxofre, produzem sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), devido à ação da enzima cisteína desulfurase. Além disso, são capazes de descarboxilar aminoácidos como lisina e ornitina, reduzir nitrato a nitrito e utilizar citrato como única fonte de carbono (Brasil, 2011; Gast; Porter Junior, 2020; Holschbach; Peek, 2018; Miranda *et al.*, 2020).

**Tabela 1** - Reações bioquímicas comparadas entre subespécies de *Salmonella* spp.

| ESPÉCIES                                  | <i>S. enterica</i> subsp. |                |                             |                   |                 |               | <i>S. bongori</i> | <i>S. subterranea</i> |
|---|---------------------------|----------------|-----------------------------|-------------------|-----------------|---------------|-------------------|-----------------------|
| Subespécies                               | <i>Enterica</i>           | <i>Salamae</i> | <i>Arizonae</i>             | <i>Diarizonae</i> | <i>Houtenae</i> | <i>Indica</i> |                   |                       |
| Testes bioquímicos e suas características | <i>Enterica</i>           | <i>Salamae</i> | <i>Arizonae</i>             | <i>Diarizonae</i> | <i>Houtenae</i> | <i>Indica</i> | <i>S. bongori</i> | <i>S. subterranea</i> |
| Dulcitol                                  | +                         | +              | -                           | -                 | -               | a             | +                 | +                     |
| ONPG (2h)                                 | -                         | -              | +                           | +                 | -               | a             | +                 | +                     |
| Malonato                                  | -                         | +              | +                           | +                 | -               | -             | -                 | -                     |
| Gelatinase                                | -                         | +              | +                           | +                 | +               | -             | +                 | -                     |
| Sorbitol                                  | +                         | +              | +                           | +                 | +               | -             | +                 | -                     |
| Crescimento KCN                           | -                         | -              | -                           | -                 | +               | -             | +                 | +                     |
| L(+) Tartarato                            | +                         | -              | -                           | -                 | -               | -             | -                 | +                     |
| Galacturonato                             | -                         | +              | -                           | +                 | +               | +             | +                 | ND                    |
| Gama-glutamil transferase                 | +                         | -              | +                           | +                 | +               | +             | +                 | ND                    |
| Beta-glucoronidase                        | D                         | D              | -                           | +                 | -               | D             | -                 | ND                    |
| Mucato                                    | +                         | +              | +                           | -<br>(70%)        | -               | +             | +                 | ND                    |
| Salicina                                  | -                         | -              | -                           | -                 | +               | -             | -                 | ND                    |
| Lactose                                   | -                         | -              | +                           | +                 | -               | D             | -                 | -                     |
| Lise-fago O <sub>1</sub>                  | +                         | +              | +                           | +                 | -               | +             | D                 | ND                    |
| Habitat animal normal                     | Sangue quente             |                | Sangue frio e meio ambiente |                   |                 |               | Pouco definido    |                       |

**Legenda:** + : ≥ 90% reações positivas; - : ≥ reações negativas; a: diferentes reações (sorovares); ND – não detectado; ONPG -orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo; KCN - cianeto de potássio; D – detectado.

**Fonte:** Adaptado de Brasil, 2011.

**Tabela 2** - Características bioquímicas de *Salmonella enterica* sorovares *Typhi*, *Paratyphi A*. e *Enterica*

| Teste                        | <i>S. typhi</i> | <i>S. Paratyphi A.</i> | <i>S. enterica</i> subsp.<br><i>Enterica</i> |
|------------------------------|-----------------|------------------------|--|
| Glicose (gás)                | -               | +                      | +  |
| Ácido dulcitol               | +/-             | +                      | +  |
| Ácido arabinose              | -/+             | +                      | +  |
| Descarboxilação de lisina    | +               | -                      | +  |
| Descarboxilação de ornitina  | -               | +                      | +  |
| Dehidrolação de arginina     | +/-             | +                      | +  |
| Produção de H <sub>2</sub> S | +*              | -/(+)                  | +  |
| Citrato de Simmons           | -               | -                      | +  |

**Legenda:** \* - reação fraca; +: positivo; -: negativo; (+): 75% positivo após 48 horas.

**Fonte:** Adaptado de Brasil, 2011.

As cepas de *Salmonella* possuem habitats naturais, sendo divididas em categorias conforme a especificidade de seus hospedeiros. Assim, existem as “altamente adaptadas ao homem”, que incluem cepas como *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, causadoras da febre entérica; as “altamente adaptadas aos animais”, compreendendo cepas como *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, *S. Typhisuis*, *S. Abortusequi*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, responsáveis pelo paratifo em diferentes espécies animais; e as “zoonóticas”, que provocam gastroenterite em humanos e animais, sendo transmitidas principalmente por alimentos de origem animal, como ovos, aves, carnes e laticínios. Essas cepas apresentam distribuição mundial e estão associadas a altos índices de morbimortalidade (Brasil, 2011; Bäumler *et al.*, 1998; Stevens; Kingsley, 2021).

A virulência das cepas de *Salmonella* é multifatorial, envolvendo diversos mecanismos que contribuem para sua patogenicidade. Essas bactérias apresentam mobilidade, facilitando a colonização intestinal, e possuem capacidade de penetrar e se replicar em células epiteliais. Além disso, produzem uma variedade de toxinas, incluindo enterotoxinas, citotoxinas e endotoxinas. Conjuntamente, esses fatores permitem que *Salmonella* estabeleça infecções gastrointestinais e sistêmicas em animais e seres humanos, tornando-se um patógeno de significativa relevância clínica e sanitária (Brasil, 2011; Koczerka *et al.*, 2021; Lamichhane *et al.*, 2024). Estudos indicam que a produção dessas toxinas está associada a manifestações como secreção intestinal, diarreia e dano à mucosa. A intensidade da resposta clínica varia entre cepas e condições do hospedeiro, indicando que as toxinas contribuem para a doença, mas não explicam isoladamente sua gravidade ou evolução (Chopra *et al.*, 1999).

Em pacientes imunologicamente saudáveis, a infecção por *Salmonella* pode variar desde formas assintomáticas até episódios de diarreia autolimitante (Brasil, 2011; Galán-Relaño, 2023; Marzel *et al.*, 2016). No entanto, quando os sintomas se manifestam de forma mais agressiva, a doença pode se apresentar como gastroenterite, febre entérica ou septicemia (com ou sem infecções localizadas). A gravidade dos sintomas está diretamente relacionada à cepa que infecta o hospedeiro, sendo *Salmonella enterica* Typhimurium e *Salmonella enterica* Enteritidis as mais preocupantes para a saúde pública (Ajmera; Shabbir, 2023; Brasil, 2011; Lamichhane *et al.*, 2024).

Já para a indústria avícola três outros sorovares se destacam: *Salmonella enterica* sv Heidelberg, *Salmonella enterica* sv Minnesota e *Salmonella enterica* sv Mbandak. Esses sorovares possuem elevada adaptação ao ambiente produtivo, persistência em diferentes etapas da cadeia de produção e capacidade de sobreviver a condições adversas

de processamento e sanitização. Tais sorovares são frequentemente associados tanto a contaminações ambientais quanto à contaminação de produtos finais, representando um desafio para a segurança dos alimentos (Shah *et al.*, 2017).

A salmonelose configura-se como uma das zoonoses de maior relevância em saúde pública em razão da complexidade de seu controle, da ampla variedade de hospedeiros, da emergência e reemergência de diferentes sorovares e da rápida disseminação na população, já que a principal via de transmissão ocorre pela ingestão de alimentos contaminados (Brasil, 2011). A *Salmonella* spp. pode colonizar produtos lácteos e animais de produção, que funcionam como veículos e reservatórios do patógeno. Contudo, os surtos em humanos são mais frequentemente associados ao consumo de carne e ovos de aves contaminadas (Nunes *et al.*, 2025).

A transmissão da salmonelose está intimamente relacionada à cadeia alimentar, o que a caracteriza como uma das principais doenças transmitidas por alimentos (DTA) em escala mundial (Brasil, 2011). A detecção da bactéria em produtos de origem animal se apresenta como um grande desafio, uma vez que, muitos hospedeiros permanecem assintomáticos e as técnicas de diagnóstico disponíveis apresentam limitações para a identificação do microrganismo nesses produtos (Geinoro *et al.*, 2025; Lu *et al.*, 2024, Brasil, 2011; Patel; Wolfram; Desin, 2024). Tal contexto favorece a persistência da *Salmonella* spp. ao longo da cadeia produtiva, aumentando o risco de exposição humana (Brasil, 2011; Oh; Choi; Lee, 2025; Weerasooriya *et al.*, 2024).

Os boletins epidemiológicos sobre DTA's causadas por *Salmonella* spp. apresentam informações vagas quanto ao número de casos anuais em nível mundial. Estima-se que isso se deva à subnotificação da doença, resultante do seu caráter autolimitante, do acesso limitado ao sistema de saúde por parte de parcela significativa da população, da insuficiência de vigilância laboratorial e da infraestrutura sanitária inadequada (Kumar *et al.*, 2025; Li *et al.*, 2022; Wiens *et al.*, 2024). Globalmente, estima-se que sejam mais de 93,8 milhões de casos anuais com 155.00 mortes (Galán-Relaño *et al.*, 2023). Em âmbito nacional, os dados mais recentes estimam que, entre 2004 e 2023, ocorreram mais de 13.954 casos de DTA's, dos quais 7,4% foram causados por *Salmonella* spp., sendo o sorotipo *Enteritidis* identificado em 74% desses eventos (Guedes, 2024).

A dificuldade em obter dados epidemiológicos oficiais sobre salmonelose no Brasil, deve-se ao fato de a doença ser classificada como de notificação obrigatória apenas quando diagnosticada em aves e, principalmente, quando envolvem sorovares de interesse à saúde pública, como *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*

(Brasil, 2013). Por outro lado, a salmonelose humana não tifoide não é considerada de notificação obrigatória em casos isolados, devido ao seu caráter autolimitante em indivíduos saudáveis, embora alguns óbitos possam ocorrer em populações de risco (Brasil, 2025a). Já os casos isolados de febre tifóide, causada por *Salmonella Typhi*, estão incluídos na lista de notificação obrigatória em razão da gravidade da doença (Brasil, 2025b).

A salmonelose representa um desafio crescente à saúde pública, em grande parte devido à resistência antimicrobiana que a *Salmonella* spp. vem apresentando ao longo dos anos (Brasil, 2011). Diversos estudos indicam que essas bactérias, frequentemente, exibem resistência a classes de antibióticos como tetraciclina, aminoglicosídeos e sulfonamidas, frequentemente associadas ao uso na produção animal (Fatima *et al.*, 2023; Tiba-Casas *et al.*, 2024).

Contudo, do ponto de vista clínico, a maior preocupação atual reside na emergência de cepas resistentes a fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração e macrolídeos, que constituem as principais opções terapêuticas para o tratamento de infecções humanas graves por *Salmonella* spp, sendo o perfil de resistência fortemente dependente do sorovar envolvido (Sivanandy *et al.*, 2024). Essa resistência compromete a eficácia do tratamento convencional, aumenta o risco de falhas terapêuticas e reforça a necessidade de monitoramento contínuo das cepas isoladas, bem como o desenvolvimento de estratégias alternativas, como terapias com bacteriófagos e o uso racional de antibióticos, para o controle da doença em nível clínico e populacional.

## 2.2 BACTERIÓFAGOS

Os bacteriófagos ou fagos, são vírus que infectam especificamente bactérias e utilizam a maquinaria celular do hospedeiro para sua replicação, caracterizando-se, portanto, como parasitas intracelulares obrigatórios. São encontrados na natureza de forma mais abundante do que as próprias bactérias, desempenhando um papel essencial na regulação das populações bacterianas e na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas (Alessa *et al.*, 2025; Huang *et al.*, 2024).

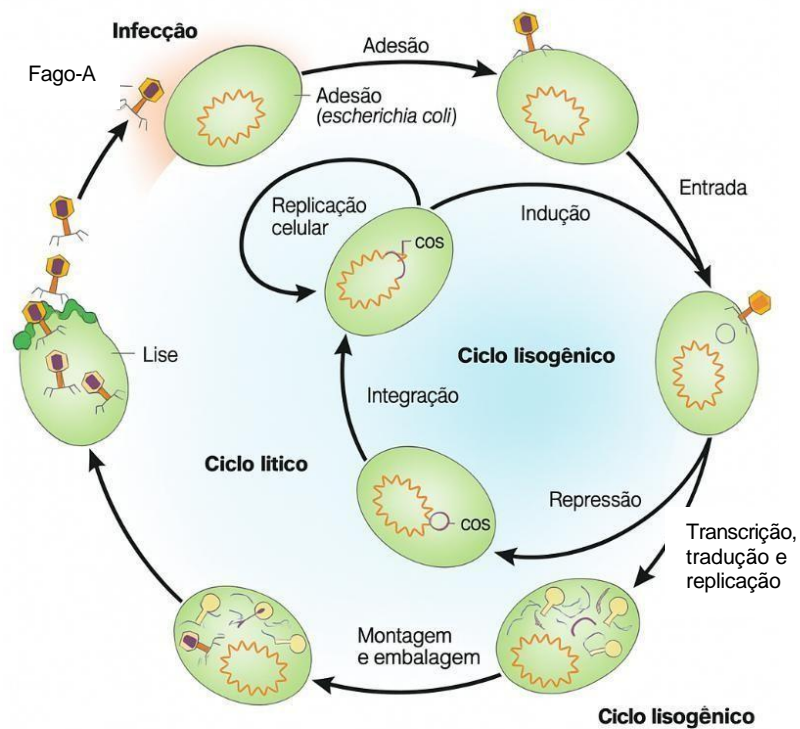
Os bacteriófagos foram descobertos no início do século XX pelo microbiologista britânico Frederick Twort, em 1915, que descreveu a existência de um “agente filtrável” capaz de lisar culturas bacterianas. Dois anos depois, em 1917, o pesquisador Félix d’Hérelle descreveu a capacidade desses vírus de infectar e se replicar dentro de bactérias,

ou seja, de “devorá-las”, e cunhou o termo bacteriófago (*bacteriófago* vem do grego e significa “devorador de bactérias”, resultante da junção de *bactéria* com o grego verbo *fagein*, que significa “comer”). Ele também foi o primeiro a propor o uso terapêutico desses vírus (Aswani; Shukla, 2021; Morongiu *et al.*, 2022; Wei, 2015).

Aprofundando as pesquisas, verificou-se que os bacteriófagos apresentam dois ciclos de vida distintos: o ciclo lítico e o lisogênico. Essa diferenciação entre os ciclos é relevante porque o ciclo lisogênico permite que o bacteriófago permaneça nas populações bacterianas por longos períodos, enquanto o ciclo lítico evidencia o potencial de seu uso em terapias (Harada *et al.*, 2018; Howard-Varona *et al.*, 2017).

No ciclo lítico, o fago adsorve à bactéria hospedeira, transloca o seu genoma para o citoplasma da célula bacteriana, assume o controle da maquinaria celular bacteriana, replica o seu genoma e usa o maquinário celular bacteriano para produzir proteínas virais que são depois montadas em novas partículas virais que lisam a bactéria hospedeira, liberando a progênie fágica (Harada *et al.*, 2018). No ciclo lisogênico, o genoma viral se integra ao cromossomo bacteriano formando um profago, que é replicado juntamente com o ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano durante sua divisão celular normal. Em função de estímulos específicos, como danos ao DNA (radiação ultravioleta), estresse ambiental ou nutricional, ação de produtos químicos e concorrência de outros fagos, o profago pode sofrer excisão do cromossoma bacteriano e entrar em um ciclo lítico (Shang *et al.*, 2025; Venturini *et al.*, 2022). A Figura 2 apresenta o esquema dos ciclos de vida dos bacteriófagos, lítico e lisogênico.

**Figura 2** - Representação esquemática dos ciclos de vida lítico e lisogênico dos bacteriófagos



**Fonte:** Adaptado de American Academy of Microbiology, 2014

Logo após a descoberta dos bacteriófagos, iniciaram-se experimentos voltados ao uso desses vírus como agentes terapêuticos contra infecções bacterianas, especialmente na Europa Oriental e na antiga União Soviética, marcando o início do que hoje se conhece como terapia fágica (Myelnikov, 2018; Niazi, 2025).

Apesar do sucesso inicial das pesquisas com bacteriófagos, a descoberta da penicilina em 1928 e sua ampla disseminação na década de 1940 acabaram suplantando o uso dos fagos como alternativa terapêutica (Niazi, 2025). A preferência pelos antibióticos pode ser explicada por diversos fatores, incluindo maior previsibilidade e eficácia, limitações técnicas e de formulação nos primeiros estudos com bacteriófagos, espectro de ação restrito destes últimos e a rapidez com que os antibióticos produziam efeitos clínicos (Chanishvili, 2012; Myelnikov, 2018). Atualmente, o uso excessivo de antibióticos, não apenas como tratamento, mas também como promotores de crescimento na produção animal e como medidas profiláticas na sociedade, tem levado microrganismos a desenvolver resistência contra grande parte dos antibióticos disponíveis. Além disso, essas resistências surgem em um ritmo muito superior ao da

descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (Diallo; Dublanchet, 2023; Niazi, 2025; Silva *et al.*, 2022).

### 2.3 BACTERIÓFAGOS NO BIOCONTROLE DE PATÓGENOS BACTERIANOS

Atualmente o biocontrole de *Salmonella* spp. nas grandes indústrias é realizado através de biocidas, tais como compostos à base de peróxidos, como ácido paracético e peróxido de hidrogênio; compostos cloro/clorados, como dióxido de cloro e hipoclorito de sódio ou ainda; compostos de amônia quarternária, que são amplamente empregados nas rotinas de limpeza e sanitização de superfícies (Chaves *et al.*, 2024). Esses agentes atuam por meio da oxidação de componentes celulares, desnaturação de proteínas e desorganização da membrana bacteriana, levando à inativação ou morte de microrganismos, como a *Salmonella* spp. (Chaves *et al.*, 2024; Condell, *et al.*, 2012).

Apesar de haver estudos que indicam que o uso de tais formulações seja essencial para os programas de higienização industrial, sua eficácia ainda é bastante variável em função do tipo de superfície, da presença ou ausência de matéria orgânica e da capacidade de formação de biofilmes pelas cepas bacterianas envolvidas, o que leva à necessidade do uso de múltiplos agentes sanitizantes, bem como ao controle rigoroso de sua aplicação (Condell *et al.*, 2012; Hamilton *et al.*, 2025).

Nesse contexto, surgem os bacteriófagos como uma estratégia alternativa e complementar aos sanitizantes já utilizados. Os bacteriófagos apresentam elevada especificidade para o seu hospedeiro bacteriano, ligando-se a receptores presentes na superfície das membranas bacterianas (Degroux *et al.*, 2023; Silva; Storms; Sauvageau, 2016). Sua especificidade, em associação ao seu ciclo lítico, que provoca a lise bacteriana, torna-os ferramentas promissoras no combate as infecções bacterianas em seres humanos e animais (Dunne *et al.*, 2018; Gómez-Ochoa *et al.*, 2022).

Uma das principais vantagens do uso de fago é a sua capacidade de se multiplicar no sítio da infecção em presença da bactéria-alvo. Isso possibilita um efeito terapêutico prolongado após apenas a administração de uma dose, o que reduz a necessidade de reaplicações frequentes (Alvi; Asif; Rehman, 2021; Chanthavong *et al.*, 2025). Além da lise direta promovida no ciclo lítico, muitos fagos produzem enzimas como as endolisinas, capazes de degradar a parede bacteriana e apresentar eficácia contra biofilmes (Mayorga-Ramos *et al.*, 2024; Shutherland *et al.*, 2004). Por serem agentes

naturais, amplamente distribuídos na biosfera, os fagos oferecem grande potencial como alternativa aos antibióticos sintéticos convencionais (Naureen *et al.*, 2020; Niazi, 2025).

A viabilidade de aplicação dos bacteriófagos tem sido explorada em diferentes setores. Na indústria de alimentos, coquetéis fágicos vêm sendo testados para reduzir as cargas de patógenos causadores de DTA's em matérias-primas, superfícies e produtos finais, seja por meio da incorporação em embalagens, seja por tratamentos aplicados antes ou após as etapas de preparo e processamento. Essas abordagens têm resultado no aumento do tempo de prateleira e na redução de surtos, sem promover alterações nas características sensoriais ou físico-químicas dos produtos (Wang; Priyadarshi; Rhim, 2023; Narayanan; Bhaskar; Han, 2024). Na aquicultura comercial, bacteriófagos têm sido investigados como agentes de controle contra patógenos de peixes e crustáceos, apresentando resultados promissores quando aplicados na água de cultivo, na ração ou por imersão (Almeida; Pereira; Moreirinha, 2016; Gang; Nitin, 2019). No setor agrícola são estudados para o controle de fitopatógenos como *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Erwinia*, aplicados via pulverização em folhas, em tratamento de sementes ou em formulações para o solo, com resultados iniciais positivos na redução da dependência de defensivos agrícolas (Gang; Nitin, 2019). Já em ambientes industriais, têm sido empregados para descontaminação de efluentes, tratamento de águas e higienização de superfícies, reforçando sua versatilidade como agentes antimicrobianos (Shivaram *et al.*, 2023).

Dentre suas vantagens em relação aos antibióticos e sanitizantes convencionais, destacam-se: elevada especificidade, preservando a microbiota dos alimentos, do ambiente e dos animais (Endersen; Coffey, 2020); capacidade de manter-se ativo enquanto houver bactéria-alvo, o que possibilita aplicação em dose única (Rogovski *et al.*, 2021); ação eficaz contra biofilmes devido à produção de endolisinas (Mayorga-Ramos *et al.*, 2024); baixo potencial de toxicidade para organismos eucariotos (OECD, 2022); e possibilidade de serem incorporados em embalagens, *sprays* ou como aditivos sem modificar o produto final (Wang; Priyadarshi; Rhim, 2023).

Entretanto, o uso terapêutico de fagos apresenta limitações. A elevada seletividade desses vírus exige formulações em coquetéis capazes de abranger os diferentes agentes envolvidos em uma infecção, bem como a identificação rápida das bactérias-alvo (Altamirano; Barr, 2019). Assim como ocorre com os antibióticos, as bactérias podem desenvolver resistência aos fagos, seja por mutações nos receptores ou por outros mecanismos de defesa, o que torna necessária a utilização de coquetéis, a

rotação de fagos e a combinação com outros antimicrobianos (Egido *et al.*, 2022; Zeng *et al.*, 2024). Soma-se a isso a instabilidade das formulações frente a condições ambientais (pH, temperatura, radiação UV) e processos industriais (Khan; Joshi, 2025), além dos potenciais impactos ecológicos em ecossistemas complexos, que requerem avaliação prévia de riscos (Egido *et al.*, 2022).

Outro desafio é a ausência de regulamentação padronizada, que varia entre países e setores de aplicação (alimentício, agrícola e veterinário), dificultando a consolidação de marcos legais para produção e comercialização (Fürst-Wilmes, 2025). Além disso, ainda há necessidade de padronizar parâmetros como pureza, concentração e qualidade dos preparados, bem como realizar mais estudos pré-clínicos e clínicos para comprovação de segurança e eficácia (Furfarim; Payne; Chang, 2018; Fürst-Wilmes, 2025). A percepção pública também representa barreira, já que o termo “vírus” pode gerar resistência entre consumidores e produtores, tornando essencial investir em comunicação científica transparente acerca da segurança e dos mecanismos de ação dos fagos (Thompson *et al.*, 2024).

No Brasil, diversas instituições têm concentrado esforços em pesquisas com bacteriófagos aplicados ao biocontrole, incluindo Universidade de Sorocaba (Uniso), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade de São Paulo (USP), entre outras. Estudos da Uniso têm abordando saúde animal (Pereira, 2023; Pereira *et al.*, 2023; Balcão *et al.*, 2022a; Guerrero, 2024; Belline, 2022), produção de alimentos (Mota, 2023; Santos, 2025) e controle ou prevenção da contaminação microbiana (Vila *et al.*, 2024).

Paralelamente, observa-se a ampliação da aplicação prática dessa tecnologia no setor produtivo, com o desenvolvimento de produtos por diversas empresas, sobretudo no Leste Europeu. A indústria avícola concentra atualmente o maior número de formulações comerciais à base de bacteriófagos, possivelmente em decorrência das restrições impostas pela legislação europeia ao uso de antibióticos, adotadas como medida para conter a disseminação de bactérias resistentes, bem como da facilidade de incorporação desses agentes à ração das aves (Segundo-Arizmendi *et al.*, 2025). Nesse contexto, uma empresa brasileira tem demonstrado resultados promissores na redução da contaminação por *Salmonella* de diferentes sorovares, por meio da aplicação do coquetel de bacteriófagos INSPEKTOR®, desenvolvido pela empresa PHaGElab (Segundo-Arizmendi *et al.*, 2025; Pino *et al.*, 2025). No entanto, apesar desses avanços, a consolidação do uso de

bacteriófagos no Brasil ainda está condicionada ao estabelecimento de regulamentação específica pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) (Fürst-Wilmes, 2025).

Os resultados indicam que os bacteriófagos possuem potencial para reduzir a contaminação na cadeia produtiva e impedir a disseminação de bactérias multirresistentes a antimicrobianos (Gonçalves, 2013; Soto-Lopez, 2018; Vaz *et al.*, 2021). Contudo, assim como em outros países, ainda não há regulamentação específica, o que dificulta o avanço da aplicação comercial. Nesse cenário, o desenvolvimento de marcos legais aliados às políticas públicas que incentivem a redução do uso indiscriminado de antibióticos pode consolidar os fagos como aliados estratégicos na saúde pública e na segurança alimentar nacional (Fürst-Wilmes, 2025).

Em suma, os bacteriófagos apresentam múltiplas vantagens e um potencial significativo como alternativa no biocontrole de bactérias patogênicas em diversos contextos. Entretanto, sua substituição plena de antibióticos e sanitizantes ainda demanda superação de desafios técnicos, científicos e sociais.

## **2.4 SOROCABA E REGIÃO METROPOLITANA**

Sorocaba é reconhecida como uma importante cidade do interior paulista, com uma população estimada em 762.172 habitantes (IBGE, 2025). O município figura entre aqueles com maior crescimento populacional absoluto do país e destaca-se por ser a sede da Região Metropolitana de Sorocaba (RMS) (PMS, 2025).

A RMS foi oficialmente instituída pela Lei Complementar Estadual nº 1.241/2014 (São Paulo, 2014), marco que consolidou a integração e a cooperação entre os municípios, favorecendo a busca por soluções conjuntas aos desafios regionais e impulsionando o desenvolvimento de forma articulada. Localizada no estado de São Paulo, a Região Metropolitana de Sorocaba é composta por 27 municípios e, em 2018, contava com uma população de aproximadamente 2,1 milhões de habitantes distribuídos em uma área de 11.611,48 km<sup>2</sup> (Silva *et al.*, 2021).

A economia regional apresenta-se diversificada, sustentada por diversos setores produtivos, entre os quais se destacam as indústrias automobilística, metalúrgica, têxtil, cerâmica e de alimentos. Além disso, a região figura como a principal produtora agrícola entre as regiões metropolitanas paulistas, caracterizando-se pela expressiva diversidade de sua produção. A agropecuária da região de Sorocaba apresenta-se variada, abrangendo

atividades de pecuária de corte e de leite, além da produção de carne suína, aves e ovos. Entre as principais culturas agrícolas destacam-se a cana-de-açúcar, citros, frutas, hortaliças, cebola, alho, batata, feijão e milho (Silva *et al.*, 2021). Na Região Metropolitana de Sorocaba, Capela do Alto, Porto Feliz e Araçoiaba da Serra são as cidades que lideram a avicultura (Agrimidia, 2017).

No Brasil, surtos de salmonelose têm sido relatados ao longo dos últimos 50 anos, ocorrendo de forma ampla em diferentes regiões do país. A contaminação da carne de aves pode ocorrer durante o abate ou o processamento, sendo mais frequente em pequenos estabelecimentos, que geralmente não dispõem de infraestrutura adequada. Nessas condições, aumentam os riscos de contaminação cruzada e a exposição dos trabalhadores, que muitas vezes realizam a evisceração manual (Stella *et al.*, 2021).

Visto que o Brasil é um grande produtor mundial de carne de frango e o constante aumento dos relatos de casos de *Salmonella* resistentes a diferentes antibióticos, pesquisadores começaram a buscar terapias alternativas para o tratamento dessa enfermidade, dentre elas, o estudo dos fagos tem ganhado destaque (Passos, 2020).

Neste sentido, a prospecção de fagos líticos a partir de bactérias patogênicas endêmicas, como a *Salmonella*, presentes na região de Sorocaba, representa uma estratégia direcionada e de potencial impacto econômico positivo. O isolamento de cepas hospedeiras locais é fundamental para se obter e caracterizar bacteriófagos estritamente líticos, eficazes contra os patógenos de relevância regional.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar cepas de *Salmonella* spp. provenientes de Sorocaba/SP e região, bem como isolar e caracterizar bacteriófagos líticos eficazes no combate a esses patógenos bacterianos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar cepas de *Salmonella* spp.;
- Caracterizar os isolados bacterianos de *Salmonella* spp. através de análises bioquímicas e genômicas;
- Isolar bacteriófagos líticos contra os isolados de *Salmonella* spp.;
- Propagar, purificar e caracterizar as partículas fágicas isoladas, tanto do ponto de vista físico-químico, quanto do ponto de vista biológico;
- Avaliar a eficácia dos bacteriófagos isoladamente e em coquetel, a vários valores de Multiplicidade de Infecção, para o controle dos isolados bacterianos de *Salmonella* spp.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Equipamentos analíticos e outros

Para o isolamento e propagação de bactérias e bacteriófagos, os equipamentos utilizados foram: cabine de segurança biológica de classe II tipo B2 (modelo 4SP-SBIIB2-1266/4, SP-Labor, Presidente Prudente, SP, Brasil), autoclave vertical (modelo Autoclave Digital CS 50L, Primatec, Manaus, AM, Brasil), estufa de incubação microbiológica (modelo 502, Fanem, São Paulo, SP, Brasil), centrífuga Eppendorf (modelo AG 22331, Hamburgo, Alemanha), e agitador mecânico com aquecimento (modelo TE 0181, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil).

O sistema de filtração esterilizante utilizado (Stericup™-GP, membrana de poliétersulfato (PES) com tamanho de poro de 0,22 µm de diâmetro) foi adquirido da empresa Merck-Milipore (Darmstadt, Alemanha).

Para purificação da água utilizou-se equipamento Master System All (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo, SP, Brasil).

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis da Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA).

O microscópio ótico utilizado para a visualização das bactérias coradas foi da marca Olympus CBA (Olympus Optical do Brasil, Barueri, SP, Brasil).

O equipamento empregado na análise de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi um sistema Mini-Protean® Tetra Cell 4-gel para eletroforese vertical da Bio-RAD (Califórnia CA, USA), com fonte de alimentação PowerPac™ HC (Bio-RAD, Califórnia CA, USA) e ainda banho seco digital também da Bio-RAD (Califórnia CA, USA).

Para as análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizou-se Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL, modelo JEM 2100 (Tokyo, Japão) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – Campus São Carlos.

#### 4.1.2 Reagentes e outros

Todos os produtos e reagentes utilizados, de grau PA (Puro para Análise), foram adquiridos das seguintes empresas: Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Diadema, SP, Brasil), Sigma-Aldrich Brasil (Cotia, SP, Brasil) e Labsynth Produtos para Laboratório (Diadema, SP, Brasil).

A água utilizada foi purificada até alcançar resistividade de 18,18 M $\Omega$ ·cm e condutividade de 0,05  $\mu$ S·cm<sup>-1</sup> por meio do sistema Master All MS2000 (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil). Quando necessário, foi esterilizada em autoclave vertical (modelo Digital CS 50L, Primatec, Manaus, AM, Brasil).

Os meios de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSA), *Tryptic Soy Broth* (TSB) foram adquiridos da empresa Kasvi Brasil (Pinhais, SP, Brasil), caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) foi fornecido pela Sigma-Aldrich Brasil (Cotia, SP, Brasil), enquanto o ágar bacteriológico sólido foi adquirido da Gibco Diagnostics (Madison, WI, EUA). O meio de cultura ágar *Shigella-Salmonella* (ágar SS) foi comprado do fabricante TM MEDIA (Titan Biotech Ltd, Delhi, Índia) e o caldo Rappaport Vassiliadis do fabricante Laborclin Produtos para Laboratório Ltda (Pinhais, PR, Brasil).

Para os ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), o tampão de disrupção foi preparado com Trizma-Base (hidroximetil aminometano),  $\beta$ -mercaptoetanol, sulfato de dodecil de sódio, glicerol, azul de bromofenol, tetrametiletilenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio, todos adquiridos da Bio-RAD (Califórnia, CA, EUA). Os marcadores moleculares utilizados foram do tipo Pre-Stained Precision Plus Protein™ Dual Color, também da Bio-RAD (Califórnia, CA, EUA).

O *kit* para identificação bacteriana Enterokit B® foi adquirido da empresa Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda (São Paulo, SP, Brasil), sendo composto pelos meios de cultura EPM, MILi e Citrato Simmons. As galerias API 20E® para identificação bacteriana foram obtidas da empresa bioMérieux Brasil SA (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

#### 4.1.3 Material biológico

As cepas bacterianas utilizadas para determinar a ampla faixa de hospedeiros (*host range*) estão discriminadas na Tabela abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3** - Cepas bacterianas de coleção utilizadas nos ensaios de gama de hospedeiros (*host range*) e eficiência de plaqueamento (EOP) dos dois bacteriófagos isolados.

| <b>Bactéria</b>                        | <b>Referência</b> |
|--|-------------------|
| <i>Salmonella enterica</i>             | CCCD-S004         |
| <i>Escherichia coli</i>                | CCCD-E003         |
| <i>Escherichia coli</i>                | CCCD-E004         |
| <i>Enterococcus faecalis</i>           | CCCD-E002         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>          | CCCD-P004         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>          | DSM-19871         |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>        | CCCD-S015         |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>           | CCCD-K001         |
| <i>Enterobacter cloacae</i>            | CCCD-E010         |
| <i>Proteus mirabilis</i>               | CCCD-P001         |
| <i>Staphylococcus aureus</i>           | CCCD-S009         |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>         | ATCC-19606        |
| <i>Pseudomonas syringae pv. garcae</i> | IBSBF- 152        |
| <i>Pseudomonas syringae pv. garcae</i> | IBSBF- 2212       |

**Legenda:** IBSBF - Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico do Estado de São Paulo; DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; ATCC - American Type Culture Collection; CCCD- Coleção de Cultura Cefar Diagnóstica.

**Fonte:** Elaboração própria

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preparação dos meios de cultura

Foram utilizados os meios de cultura abaixo descritos, sendo:

**Brain Heart Infusion (BHI):** foi preparado na proporção 37 g do meio desidratado para 1000 mL de água purificada. Em seguida, o meio foi acondicionado tubos de ensaio de 5 mL, levados à autoclave para esterilização e armazenados em geladeira para uso posterior.

**Caldo Rappaport Vassiliadis:** foram adicionados 26,6 g do meio à 1000 mL de água purificada. Em seguida, foram adicionados em tubos de ensaio de 4 mL e levados a autoclave para esterilização e armazenados em geladeira para uso posterior.

**Ágar Shigella – Salmonella (ágar SS):** foram preparados na proporção 63 g do meio desidratado para 1000 mL de água purificada. Como se trata de um meio seletivo, não pode ser levado a autoclave. Assim, o meio foi preparado utilizado um Erlenmeyer de 500 mL esterilizado para a mistura da água com o meio e, em seguida com o auxílio do bico de Bunsen ferveu-se a mistura e, em seguida verteu-se o meio em placas de Petri (cerca

de 20 mL em cada placa). As placas foram levadas a estufa a 37 °C por 24 h, para o teste de contaminação.

***Tryptic Soy Agar (TSA)***: pesou-se 24 g de TSA desidratado e 9,6 g de ágar e adicionou-se em 800 mL de água purificada. Após esterilização, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri descartáveis. As placas foram armazenadas a 4 °C até utilização.

***Meio Molten Top-Agar-TSB***: adicionou-se 15 g de TSB desidratado e 3 g de ágar em um frasco Schott de 500 mL e completou-se com água purificada. O meio foi autoclavado e, posteriormente, armazenado em estufa a 47 °C para mantê-lo no estado líquido.

***Caldo TSB 2x (Tryptic Soy Broth)***: adicionou-se 48 g de TSB desidratado em 800 mL de água purificada num frasco Schott, e esterilizou-se em autoclave. Após resfriamento, o caldo foi mantido a 4 °C.

***SM Buffer***: adicionou-se 6,06 g de Tris-base a 50 mL de água purificada, após a dissolução, o pH foi ajustado para 7,5 com ácido clorídrico (HCl). Em seguida acrescentou-se à solução 5,8 g de cloreto de sódio (NaCl) e 2 g de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) completou-se com água purificada totalizando 1000 mL. Na sequência, o tampão foi levado à autoclave para esterilização.

## 4.2.2 Isolamento e caracterização bacteriana

### 4.2.2.1 Coleta e preparo de amostras

Foram coletadas amostras de fezes de frangos semidomiciliados de diferentes localizações, na região de Sorocaba, São Paulo. Os pontos de coleta foram escolhidos em áreas com criação familiar, caracterizadas por baixo manejo sanitário e reduzido controle de doenças. Os locais foram identificados com ajuda da tecnologia Sistema de Posicionamento Global (do inglês, *Global Positioning System* - GPS). A Tabela 4 abaixo aponta o local da coleta da amostra e a origem.

**Tabela 4** – Local das amostras ambientais coletadas para identificação de bactérias e isolamento de *Salmonella* spp.

| Número | Cidade                          | Coordenadas GPS               |
|--------|---------------------------------|-------------------------------|
| 1      | Brigadeiro Tobias, Sorocaba, SP | 23°30'09.30" S, 47°20'01.33"W |
| 2      | Brigadeiro Tobias, Sorocaba, SP | 23°30'09.30" S, 47°20'01.33"W |
| 3      | Brigadeiro Tobias, Sorocaba, SP | 23°30'09.30" S, 47°20'01.33"W |
| 4      | Brigadeiro Tobias, Sorocaba, SP | 23°30'09.30" S, 47°20'01.33"W |
| 5      | Votorantim, SP                  | 23°32'00.16" S, 47°23'48.88"W |
| 6      | Votorantim, SP                  | 23°31'45.96"S, 47°26'10.64"W  |
| 7      | Sorocaba, SP                    | 23°29'31.77"S, 47°24'13.46"W  |
| 8      | Sorocaba, SP                    | 23°29'42.74"S, 47°25'01.21"W  |
| 9      | Salto de Pirapora, SP           | 23°40'53.65"S, 47°32'08.82"W  |
| 10     | Salto de Pirapora, SP           | 23°36'53.31"S, 47°32'15.06"W  |
| 11     | Brigadeiro Tobias, Sorocaba, SP | 23°30'51.76"S, 47°22'13.56"W  |
| 12     | Brigadeiro Tobias, Sorocaba, SP | 23°30'47.37"S, 47°22'08.66"W  |
| 13     | Brigadeiro Tobias, Sorocaba, SP | 23°30'0,75"S, 47°21'56.83"W   |
| 14     | Sorocaba, SP                    | 23°30'51.51"S, 47°23'54.09"W  |
| 15     | Sorocaba, SP                    | 23°30'11.09"S, 47°24'12.81"W  |
| 16     | Sorocaba, SP                    | 23°30'15.37"S, 47°24'12.81"W  |
| 17     | Capela do Alto, SP              | 23°32'14.91"S, 47°45'38.94"W  |
| 18     | Sorocaba, SP                    | 23°30'38,93"S, 47°27'34.49"W  |
| 19     | Iperó, SP                       | 23°27'12.39"S, 47°33'14.25"W  |
| 20     | Iperó, SP                       | 23°27'12.39"S, 47°33'14.25"W  |
| 21     | Iperó, SP                       | 23°27'12.39"S, 47°33'14.25"W  |
| 22     | Iperó, SP                       | 23°27'12.39"S, 47°33'14.25"W  |
| 23     | Araçoiaba, SP                   | 23°31'52.16"S, 47°30'25.56"W  |
| 24     | Sorocaba, SP                    | 23°26'55.68"S, 47°22'58.03"W  |
| 25     | Sorocaba, SP                    | 23°27'01.17"S, 47°21'30.71"W  |
| 26     | Sorocaba, SP                    | 23°26'55.68"S, 47°22'06.69"W  |
| 27     | Sorocaba, SP                    | 23°25'27.32"S, 47°28'56.14"W  |
| 28     | Sorocaba, SP                    | 23°25'15.41"S, 47°28'38.10"W  |
| 29     | Sorocaba, SP                    | 23°25'56.96"S, 47°28'57.74"W  |
| 30     | Sorocaba, SP                    | 23°25'56.96"S, 47°28'57.74"W  |
| 31     | Sorocaba, SP                    | 23°25'56.96"S, 47°28'57.74"W  |
| 32     | Sorocaba, SP                    | 23°25'35.79"S, 47°26'57.33"W  |
| 33     | Sorocaba, SP                    | 23°25'34.40"S, 47°26'59.85"W  |
| 34     | Sorocaba, SP                    | 23°26'29.94"S, 47°28'19.15"W  |
| 35     | Sorocaba, SP                    | 23°26'43.41"S, 47°28'46.42"W  |
| 36     | Sorocaba, SP                    | 23°26'43.41"S, 47°28'53.85"W  |
| 37     | Sorocaba, SP                    | 23°26'47.68"S, 47°28'55.59"W  |
| 38     | Sorocaba, SP                    | 23°26'47.68"S, 47°28'55.59"W  |
| 39     | Sorocaba, SP                    | 23°26'47.73"S, 47°28'54.35"W  |
| 40     | Sorocaba, SP                    | 23°25'20.40"S, 47°30'22.50"W  |
| 41     | Sorocaba, SP                    | 23°29'41.56"S, 47°25'02.20"W  |
| 42     | Sorocaba, SP                    | 23°30'18.38"S, 47°25'05.58"W  |
| 43     | Sorocaba, SP                    | 23°30'18.27"S, 47°25'06.12"W  |
| 44     | Sorocaba, SP                    | 23°30'10.62"S, 47°25'14.04"W  |

**Legenda:** S = latitude Sul; W = longitude Oeste. **Fonte:** Elaboração própria.

As coletas foram realizadas com auxílio de *swabs* estéreis, que foram imediatamente acondicionados em tubos contendo meio de enriquecimento *Brain Heart Infusion* (BHI). As amostras foram transportadas até o laboratório em caixas térmicas com gelo reciclável. As amostras foram homogeneizadas manualmente para garantir a adequada suspensão dos microrganismos e incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida, foram semeadas em placas de Petri por estriamento em quadrantes (técnica de *streak plate*), utilizando uma alça de platina estéril previamente mergulhada na suspensão. Para o cultivo bacteriano, foi utilizado o meio de cultura ágar *Shigella-Salmonella* (SS).

#### **4.2.2.2 Identificação dos isolados bacterianos**

As amostras coletadas para isolamento e identificação de *Salmonella* foram inicialmente semeadas em ágar *Shigella-Salmonella* (SS) (Lee *et al.*, 2015). As colônias que apresentaram características típicas, como centro enegrecido, foram então inoculadas em caldo Rappaport Vassiliadis. Na sequência, foram submetidas a coloração de Gram e analisadas em microscópio ótico para evidenciar sua coloração e morfologia (Brasil, 2013). Para a confirmação bioquímica, utilizou-se Enterokit B® que fornece um perfil metabólico inicial. Posteriormente, foram empregadas galerias API20E® permitindo a identificação mais precisa com base em um painel de reações bioquímicas específicas para enterobactérias (Biomérieux, 2024; Miranda *et al.*, 2020). As amostras que mantiveram perfil compatível com *Salmonella* foram submetidas à análise molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o objetivo de confirmar a identificação bacteriana e assegurar que pertenciam ao gênero *Salmonella*. Por fim, foi realizada a análise genômica para confirmação da espécie e caracterização aprofundada, incluindo eventuais marcadores de resistência e variantes genéticas. As etapas são apresentadas de forma detalhada abaixo.

##### **4.2.2.2.1 Crescimento em meio de cultura ágar *Shigella-Salmonella* (SS)**

As amostras, após inoculação em meio BHI, foram semeadas por estriamento em ágar SS. Este meio é seletivo e diferencial sendo utilizado para triagem preliminar de colônias com morfologia compatível com *Salmonella* spp. (Lee *et al.*, 2015).

#### 4.2.2.2.2 Crescimento em caldo Rappaport Vassiliadis

As amostras que mostraram crescimento característico no meio ágar SS foram cultivadas em caldo Rappaport Vassiliadis, que é um meio seletivo para *Salmonella*, promovendo o seu crescimento e inibindo outras bactérias entéricas (Laborclin, 2019). As que apresentaram turvamento do meio, foram estriadas novamente em ágar SS como primeira etapa confirmatória para *Salmonella* spp. (Brasil, 2013).

#### 4.2.2.2.3 Coloração de Gram

Uma unidade formadora de colônia (UFC) foi transferida para uma lâmina de vidro de microscópio e espalhada cuidadosamente. Após secagem ao ar, foi adicionada uma gota do corante cristal violeta, deixando-o reagir por um min. Em seguida, a lâmina foi lavada com um leve jato de água purificada, e aplicou-se uma gota de lugol, aguardando-se mais um min. A amostra foi então lavada com álcool por 30 s para o processo de descoloração. Por fim, adicionou-se uma gota de fucsina por 30 s e a lâmina foi novamente lavada com água destilada. A amostra foi analisada ao microscópio óptico (Pinto; Ribeiro, 2020; Brasil, 2013).

#### 4.2.2.2.4 Enterokit B®

O Enterokit B® é composto pelos meios de cultura EPM, MILi e Citrato Simmons. O meio EPM é utilizado para indicar fermentação em glicose e produção de gás, produção de H<sub>2</sub>S, hidrólise de ureia e desaminação do triptofano. O meio MILi permite a avaliação da motilidade bacteriana, da produção de indol e da descarboxilação da lisina. O meio Citrato de Simmons evidencia a utilização do citrato como única fonte de carbono. Para o teste com os *kits* foram usadas somente as amostras que apresentaram crescimento e coloração de Gram compatível com as características de colônias de *Salmonella* (Enterokit B, 2025).

Para a utilização do kit, a bactéria é inoculada em diferentes tubos de ensaio, cada um contendo um meio de cultura específico, desenvolvido para avaliar características bioquímicas distintas do microrganismo, tais como a capacidade de fermentar glicose ou de produzir sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S). Após a incubação, a leitura

dos resultados é feita observando as mudanças de cor ou outras reações que ocorrem nos tubos. Cada uma das 9 (nove) provas bioquímicas recebe um valor numérico. Se a prova for positiva (ou seja, a bactéria reagiu), atribui-se um número específico. Se a prova for negativa (não houve reação), atribui-se o valor 0. Os valores numéricos de todas as provas são somados para gerar um código numérico único. Esse código de quatro dígitos é então comparado com uma tabela de referência fornecida pelo fabricante. Nessa tabela, cada código corresponde a um tipo específico de bactéria. Dessa forma, o código numérico atua como a "assinatura" bioquímica da bactéria, permitindo sua identificação (Probac, 2024).

#### **4.2.2.2.5 Galerias API20E®**

As galerias foram utilizadas conforme as instruções do fabricante e os resultados analisados por comparação com uma base de dados (Biomérieux, 2024). Inicialmente, é fundamental que os microrganismos do grupo Enterobacteriaceae ou outros bacilos Gram-negativos não fastidiosos estejam isolados e recém-cultivados em meio de cultura apropriado. Uma vez garantida essa condição, prossegue-se com a preparação da galeria e das respectivas amostras.

Após a inoculação com a suspensão bacteriana, as amostras são incubadas sob condições controladas, geralmente por um período de 18 a 24 h a uma temperatura de 35 a 37 °C, permitindo o desenvolvimento metabólico das bactérias. Durante esse período, é possível observar alterações visuais, tais como mudanças de cor ou a formação de gás, indicativos de atividade enzimática específica de cada cepa. Em seguida, a coloração observada é comparada com a tabela de referência fornecida no manual da API (Anexo 11). Essa comparação é fundamental para a identificação correta das bactérias, uma vez que cada reação apresenta um perfil característico de cor ou formação de gás. Os testes utilizados estão organizados e apresentados de forma esquemática na Tabela 5.

**Tabela 5** - Testes bioquímicos da galeria API20E®

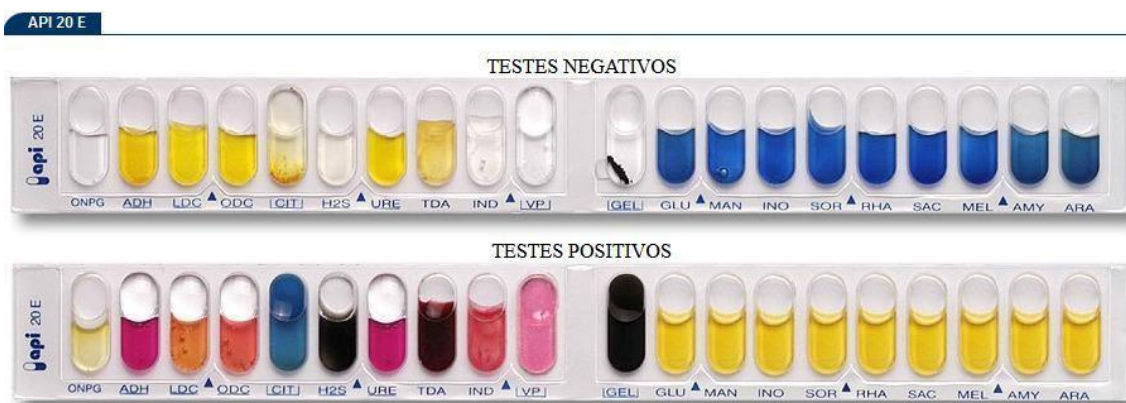
| Sigla            | Teste                             | Substrato/Função Bioquímica   | Resultado Positivo    |
|------------------|-----------------------------------|---|-----------------------|
| ONPG             | $\beta$ -galactosidase            | Hidrólise da ONPG liberando o-nitrofenol  | Amarelo               |
| ADH              | Arginina di-hidrolase             | Descarboxilação da argenina   | Roxo                  |
| LDC              | Lisina<br>Descarboxilase          | Descarboxilação da argenina   | Roxo                  |
| OCD              | Ornitina descarboxilase           | Descarboxilação da argenina   | Roxo                  |
| CIT              | Citrato (Simmons)                 | Uso de citrato como única fonte de carbono $\rightarrow$ alcalinização                    | Azul esverdeado       |
| H <sub>2</sub> S | Produção de sulfeto de hidrogênio | Redução de compostos sulfurados $\rightarrow$ FeS preto                                   | Preto                 |
| URE              | Urease                            | Hidrólise da ureia $\rightarrow$ liberação de NH <sub>3</sub> $\rightarrow$ alcalinização | Rosa (pH alcalino)    |
| TODA             | Triptofano desaminase             | Desaminação do triptofano (com FeCl <sub>3</sub> )  | Marrom avermelhado    |
| IND              | Indol                             | Degradação do triptofano $\rightarrow$ indol (reagente Kovacs)                            | Anel vermelho         |
| VP               | Voges-Proskauer                   | Produção de acetina (via butanodiol)  | Rosa/vermelho         |
| GEL              | Gelatinase                        | Hidrólise de gelatina   | Difusão preta no meio |
| GLU              | Glicose                           | Fermentação da glicose $\rightarrow$ acidificação   | Amarelo               |
| MAN              | Manitol                           | Fermentação do manitol $\rightarrow$ acidificação   | Amarelo               |
| INO              | Inositol                          | Fermentação do inositol $\rightarrow$ acidificação  | Amarelo               |
| SOR              | Sorbitol                          | Fermentação do sorbitol $\rightarrow$ acidificação  | Amarelo               |
| RHA              | Ramnose                           | Fermentação da ramnose $\rightarrow$ acidificação   | Amarelo               |
| SAC              | Sacarose                          | Fermentação da sacarose $\rightarrow$ acidificação  | Amarelo               |
| MEL              | Melibiose                         | Fermentação da melibiose $\rightarrow$ acidificação                                       | Amarelo               |
| AMY              | Amigdalina                        | Fermentação da amigdalina $\rightarrow$ acidificação                                      | Amarelo               |
| ARA              | Arabiose                          | Fermentação da arabinose $\rightarrow$ acidificação                                       | Amarelo               |

**Fonte:** Adaptado de Biomérieux, 2024

O ensaio é realizado, inicialmente, com a preparação da galeria. Para a preparação da galeria, adicionam-se 5 mL de água purificada nos microtubos, utilizando uma pipeta descartável, com o objetivo de criar um ambiente úmido. Em relação às amostras, cada uma deve ser diluída em um tubo estéril contendo 5 mL de água destilada estéril. Após a diluição, a solução deve ser utilizada imediatamente. Para a inoculação nos microtubos, recomenda-se o uso de uma pipeta descartável, tomando cuidado para evitar a formação de bolhas. A solução preparada deve ser distribuída em cada microtubo, preenchendo-os parcialmente, com exceção dos testes Citrato (CIT), Gelatinase (GEL) e Voges–

Proskauer (VP), que devem ser preenchidos até a formação de menisco convexo, evitando a presença de ar. Nos testes Arginina di-hidrolase (ADH); Lisina descarboxilase (LDC), Ornitina descarboxilase (OCD), Produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e Urease (URE) deve-se acrescentar uma gota de óleo mineral, para criar um ambiente de anaerobiose. Após esses procedimentos, incubar a 36 °C ± 2 °C, por 18 – 24 h. Para a interpretação, é necessário que pelo menos três testes, exceto Glicose (GLU), apresentem resultados confiáveis. Em seguida, devem-se adicionar os reagentes apropriados aos respectivos microtubos. No microtubo Triptofano desaminase (TDA), aplicar uma gota do reagente Triptofano desaminase (TDA); no Indol (IND), uma gota do reagente JAMES (p-dimetilaminocinamaldeído dissolvido em álcool e ácido clorídrico); e no Voges–Proskauer (VP), uma gota do reagente VP1 (Reagente 1 para Voges-Proskauer composto de α-naftol em etanol) seguida de uma gota do reagente VP2 (Reagente 2 para Voges-Proskauer composto de hidróxido de potássio 40%). Para o teste VP deve-se aguardar 10 min antes da leitura dos resultados (Biomérieux, 2024). Os testes indicam positividade ou negatividade de acordo com a escala de cores que o microtubo assume, seguindo o Quadro de Leitura disponibilizado no Anexo 11. Para fins comparativos, a Figura 3 apresenta um exemplo de resultados positivos e negativos obtidos na galeria API 20E. (Biomérieux, 2024; Miranda *et al.*, 2020).

**Figura 3** – Imagens de testes negativos e positivos das Galerias API20E



**Fonte:** Biomérieux, 2024

#### 4.2.2.2.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As bactérias que apresentaram turvação no meio Rappaport-Vassiliadis, crescimento de colônias enegrecidas em ágar SS, morfologia Gram-negativa, resultado positivo para *Salmonella* no Enterokit B® e porcentagens superiores a 20% para *Salmonella* spp. nas galerias API 20E foram selecionadas para análise adicional. Essas amostras foram enviadas ao laboratório VetLab - Centro de Diagnóstico Laboratorial Veterinário (Sorocaba, SP, Brasil) para confirmação por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR qualitativo), utilizando o kit comercial BAX® System PCR Assay for *Salmonella* (Higiene, 2025).

O processo consiste em três etapas, sendo o primeiro a desnaturação do DNA à 95 °C, onde as fitas duplas de DNA se separam. Em seguida *primers* específicos ligam-se nas regiões alvos da sequência, essa etapa é chamada de anelamento. Por último uma enzima (DNA polimerase) estende esses *primers* sintetizando uma nova fita de DNA complementar, chamada de extensão. Essas três etapas compõem um ciclo. A cada ciclo, a quantidade de DNA-alvo é duplicada. Esse ciclo é repetido cerca de 40 vezes, levando à um aumento exponencial da quantidade de DNA, o que permite, por exemplo, a identificação bacteriana através da comparação das sequências amplificadas com bases de dados genéticos (Analytical Methods Committee, 2013; Khehra; Padda.; Swift, 2023; Valones *et al.*, 2009).

#### 4.2.2.2.7 Anotação genômica

As bactérias com resultado positivo no PCR para *Salmonella* foram encaminhadas para análise genômica no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida da Universidade Estadual de Campinas (LaCTAD – Unicamp). Foram utilizados dados de sequenciamento Illumina Paired-End com 151 pares de bases (151 bp). As análises realizadas incluíram: extração do DNA bacteriano; verificação da qualidade dos dados; *trimming* e filtragem dos reads; montagem dos reads Illumina; predição de genes e; anotação funcional dos genes.

A extração do DNA de cada bactéria foi realizada utilizando o kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Qiagen Biotecnologia, Hilden, Alemanha), e a quantificação foi realizada por fluorimetria, utilizando o Qubit (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para o *trimming* e a filtragem dos reads, foi utilizado o software *Trimmomatic*. A montagem dos

*reads* foi realizada com o software SPAdes (versão 4.0.0). O mapa genômico circular foi feito através da plataforma *on-line* Proksee (<https://proksee.ca>).

#### **4.2.3 Curva de crescimento bacteriano**

Após as bactérias serem isoladas e confirmadas como *Salmonella* spp. por PCR qualitativo, uma unidade formadora de colônia (UFC) foi retirada, com o auxílio de uma alça estéril, inoculada em 125 mL de caldo TSB estéril e incubada a 37 °C por 36 h. A densidade óptica (OD) da cultura foi avaliada por espectrofotometria a 610 nm em intervalos de tempo predeterminados. Nas primeiras 5 h, amostras foram coletadas a cada 30 min; nas 7 h seguintes, a cada h; e, posteriormente, mais três amostras foram retiradas nos tempos de 24, 36 e 48 h. Foram feitas curvas de crescimento das bactérias isoladas e em coquetel (envolvendo as duas bactérias) nas mesmas condições (1:1).

#### **4.2.4 Cultura bacteriana em placa de Petri (tapete bacteriano)**

Foram utilizados 100 µL de suspensão bacteriana, ajustada a uma densidade óptica (OD) a 610 nm de 0,5, os quais foram adicionados a 5 mL de *Molten Top-Agar* a 37 °C, em um tubo Falcon estéril de 15 mL. A mistura foi suavemente homogeneizada e vertida sobre placas de Petri contendo meio TSA sólido previamente preparado. As placas foram então incubadas a 37°C por 24 h.

#### **4.2.5 Isolamento, amplificação e purificação de bacteriófagos contra *Salmonella* spp.**

As metodologias para isolamento, purificação e propagação dos bacteriófagos seguiram as determinações de Balcão e Vila (2023).

#### 4.2.5.1 Coleta das amostras para isolamento de bacteriófagos

As amostras para o isolamento de bacteriófagos foram coletadas a partir de fontes ambientais em Sorocaba e região/SP, como terra e água de lagos e rios. A Tabela 6 indica os locais de coleta das amostras.

**Tabela 6** – Caracterização das amostras coletadas para identificação e isolamento de bacteriófagos líticos segundo localização e matriz ambiental

| Número | Origem | Cidade         | Coordenadas GPS                |
|--------|--------|----------------|--------------------------------|
| 1      | Riacho | Sorocaba, SP   | 23°29'46.81" S, 47°27'49.61" W |
| 2      | Solo   | Sorocaba, SP   | 23°29'46.81" S, 47°27'49.61" W |
| 3      | Lago   | Sorocaba, SP   | 23°30'59.67" S, 47°28'18.08" W |
| 4      | Riacho | Sorocaba, SP   | 23°31'28.83" S, 47°28'05.47" W |
| 5      | Lago   | Sorocaba, SP   | 23°30'59.67" S, 47°27'53.73" W |
| 6      | Riacho | Sorocaba, SP   | 23°30'52.56" S, 47°26'39.98" W |
| 7      | Rio    | Sorocaba, SP   | 23°29'37.63" S, 47°26'46.89" W |
| 8      | Lago   | Sorocaba, SP   | 23°31'14.30" S, 47°29'13.53" W |
| 9      | Solo   | Sorocaba, SP   | 23°31'11.96" S, 47°30'12.78" W |
| 10     | Solo   | Votorantim, SP | 23°31'16.84" S, 47°30'10.45" W |
| 11     | Lago   | Sorocaba, SP   | 23°28'54.43" S, 47°25'48.19" W |
| 12     | Esgoto | Sorocaba, SP   | 23°28'52.24" S, 47°25'43.12" W |
| 13     | Solo   | Sorocaba, SP   | 23°31'51.79" S, 47°26'39.97" W |

**Legenda:** S = latitude Sul; W = longitude Oeste.

**Fonte:** Elaboração própria

#### 4.2.5.2 Enriquecimento das amostras

Para as amostras líquidas, foram utilizados diretamente 50 mL, enquanto, para as amostras sólidas, foram pesados 10 g, aos quais se adicionaram 50 mL de tampão SM, em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, foram adicionados 50 mL de caldo TSB 2X e 50 µL de uma suspensão bacteriana de *Salmonella* spp., com densidade óptica em 610 nm (OD) ajustada para 0,5. As amostras foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados, microfiltrados utilizando filtros com poros de 0,22 µm e armazenados em tubos Falcon estéreis.

#### **4.2.5.3 Teste da gota ou *spot-test***

Com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados 10  $\mu$ L do filtrado anterior, sobre o tapete bacteriano previamente preparado. A placa de Petri foi incubada por 24 h a 37 °C. Após o período de incubação, a presença de halos de lise indicou a ocorrência de bacteriófagos, enquanto sua ausência indicou resultado negativo.

#### **4.2.5.4 Isolamento de placas bacteriofágicas**

Uma fita de papel filtro estéril embebida na solução fágica filtrada foi aplicada sobre um tapete bacteriano previamente preparado, começando pelo topo até esgotar todo o líquido do papel em uma fileira. Com uma nova fita não umedecida na solução, arrastou-se novamente no tapete bacteriano, cobrindo metade da camada anterior, repetindo-se o procedimento até cobrir a totalidade da placa de Petri. A placa foi incubada a 37 °C por 24 h. Após esse período, buscou-se uma única placa bacteriofágica isolada, e picou-se com um palito de madeira estéril. Esse bacteriófago isolado foi transferido para uma nova placa com tapete bacteriano, picando-a diversas vezes em diferentes pontos (do topo ao fim, na horizontal).

Por último uma nova fita de papel filtro estéril foi deslizada por cima dos pontos picados e a placa novamente incubada a 37 °C por 24 h. Esse processo foi repetido três vezes para garantir o isolamento de um único bacteriófago.

#### **4.2.5.5 Amplificação de partículas fágicas**

Com o auxílio de um palito de madeira estéril, e a partir de uma única placa fágica isolada, picou-se 10 placas de Petri previamente preparadas com tapete bacteriano, diversas vezes na horizontal, do topo até o fim da placa. Com uma fita de papel filtro estéril, deslizou-se acima da camada picada. As placas foram levadas à incubação a 37 °C por 24 h. Após incubação e, verificando se ocorreu lise completa nos tapetes bacterianos, foram adicionados 5 mL de tampão fágico em cada placa de Petri, as quais foram vedadas e armazenadas a 4°C por 12 h.

#### 4.2.5.6 Purificação das partículas fágicas

Após 12 h de incubação a 4 °C, o líquido presente nas placas na etapa anterior foi transferido para tubos Falcon de 15 mL, e adicionado clorofórmio na proporção 10:1. A solução foi centrifugada a 2500 rpm por 20 min e, em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e filtrado em *Stericup*® com membrana esterilizante de 0,22 µm. Esta suspensão foi armazenada a 4 °C, sendo considerada a solução estoque do bacteriófago.

#### 4.2.5.7 Determinação do título fágico

O título da suspensão fágica (UFP/mL, unidade formadora de placas por mililitros) foi estabelecido por meio do plaqueamento das suspensões fágicas diluídas em série, utilizando o método de ágar de dupla camada. Depois do período de incubação, as placas bacteriofágicas formadas foram contadas, considerando somente as placas com 20 a 200 lises fágicas ou UFP. O título fágico da concentração do estoque de bacteriófagos foi calculado usando a Equação 1. A metodologia aplicada seguiu as determinações de Balcão e Vila (2023).

$$Titulo\ fagico = UFP \times \frac{1}{Diluição} \times \frac{1}{V.\ inóculo\ (mL)}$$

(Equação 1)

Onde: UFP é o número de unidades formadoras de placa; e V. inóculo é o volume de inóculo em mL

#### 4.2.6 Caracterização físico-químicas dos bacteriófagos isolados

Os bacteriófagos isolados foram caracterizados físico-quimicamente por meio da determinação do perfil de absorção no espectro de luz UV-Vis e do coeficiente de extinção molar. O perfil das proteínas estruturais foi obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida, e as características morfológicas foram analisadas por meio de imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

#### 4.2.6.1 Perfil de absorção das partículas fágicas por varredura espectral UV-Vis

Foram realizadas varreduras no espectro eletromagnético, abrangendo as regiões do ultravioleta e do visível (190 a 1100 nm). Para isto, foram utilizadas diluições das suspensões concentradas dos bacteriófagos (200 µL de suspensão concentrada de bacteriófago em 2800 µL de tampão fágico SM).

#### 4.2.6.2 Determinação do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ )

Cinco diluições foram realizadas em tampão fágico SM, utilizando diferentes volumes da suspensão concentrada do bacteriófago (10, 25, 50, 100, 150 e 200 µL para volume final total de 2000 µL). As soluções foram analisadas no comprimento de onda que gerou a máxima absorção na varredura espectral UV-Vis (251 nm) e em 320 nm (comprimento de onda em que os cromóforos das partículas fágicas absorvem pouca luz), sendo obtida a diferença entre os valores. A subtração do valor de absorvância em 320 nm visa corrigir de forma aproximada o espalhamento de luz provocado pelas partículas de bacteriófagos e particulados não fágicos. Depois da leitura e, usando o título fágico obtido foi aplicada a equação de Beer-Lambert (Equação 2).

$$Abs = \epsilon \cdot L \cdot C$$

(Equação 2)

Onde: Abs é a absorvância;  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar; L é o percurso ótico da cubeta (1cm) e C é o título fágico UFP/ mL.

#### 4.2.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para determinar o perfil de proteínas estruturais dos bacteriófagos e suas distribuições de pesos moleculares, 500 µL das suspensões concentradas dos bacteriófagos foram adicionados a um volume igual (500 µL) de tampão de ruptura (1,51% (m/v) Tris-Base, 0,5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, 4% (m/v) dodecilsulfato de sódio (SDS), 10% (v/v) glicerol, e 0,012% (m/v) azul de bromofenol) em tubo Eppendorf® (com tampa previamente perfurada) e aquecido a 100 °C durante 10 min. Na sequência, realizou-se análise eletroforética do sobrenadante das amostras (20 µL) e de marcadores

de peso molecular (5  $\mu$ L de *Pre-stained Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* da Bio-RAD, com padrões de proteínas com pesos moleculares entre 10 kDa e 250 kDa), com os géis (gel de concentração com 5% (m/m) acrilamida-bisacrilamida / gel de separação com 12% (m/m) acrilamida-bisacrilamida) corridos a uma voltagem de 200 V, 20 mA por gel, 20 W, durante 60 min. Após corrida, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e fotografados para análise.

#### 4.2.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a análise dos bacteriófagos por microscopia eletrônica de transmissão, foram preparadas grades de cobre com 3 mm de diâmetro, naturalmente hidrofóbicas (Ultrathin Formvar/Carbon on a 200 mesh copper grid, Electron Microscopy Sciences, Hatfield PA, EUA). Para a coloração negativa, uma grade foi imersa em uma gota da solução concentrada de fagos. Em seguida, a grade foi mergulhada em 3  $\mu$ L de solução aquosa de acetato de uranila a 2% (pH 7, m/m) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e deixada secar ao ar. Após 30 segundos, o excesso de corante foi cuidadosamente removido com papel de filtro, conforme o protocolo descrito por Balcão *et al.* (2022a, b).

A visualização e documentação das amostras foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL, modelo JEM 2100 (Tokyo, Japão), equipado com filamento de LaB6, operando a 200 kV e oferecendo resolução de 0,23 nm. As imagens foram capturadas com uma câmera CCD de alta resolução da GATAN Inc., modelo ORIUS™ 832.J4850 SC1000B (Pleasanton CA, EUA), com resolução de 11 Mp (4,0  $\times$  2,7 k pixels / 9  $\times$  9  $\mu$ m<sup>2</sup>). A aquisição das imagens digitais foi feita utilizando o software Gatan Microscopy Suite (Digital Micrograph, versão 2.11.1404.0, Gatan Inc.).

#### 4.2.7 Caracterização biológica dos bacteriófagos isolados

Para a caracterização biológica dos fagos, foram seguidos os métodos descritos por Balcão e Vila (2023). Realizou-se a curva de crescimento de um só ciclo síncrono (OSGC), destinada à determinação dos parâmetros de crescimento dos bacteriófagos (período de eclipse, período latente, período de acumulação intracelular e tamanho de explosão). Também foi feita a curva de adsorção para estimar a taxa de adsorção dos fagos à bactéria hospedeira. A seguir, foram avaliadas a gama de hospedeiros (*host range*) e a

eficiência de plaqueamento (EOP), a fim de determinar o potencial de infecção do bacteriófago. Por fim, foram determinadas as curvas de inativação bacteriana *in vitro*.

#### 4.2.7.1 Gama de hospedeiros (*host range*) e eficiência de plaqueamento (EOP)

A gama de hospedeiros do bacteriófago foi determinada por meio do teste da gota ou *spot-test* utilizando as cepas bacterianas listadas na Tabela 1.

Foram utilizados 5 mL de meio MTA-TSB, previamente inoculados com 100 µL das diferentes cepas bacterianas e sobrepostos ao meio TSA sólido. Na sequência, as placas de Petri foram inoculadas com 5 µL da suspensão de bacteriófago. As placas foram incubadas na temperatura ótima de crescimento da cepa bacteriana (37 °C) e avaliadas quanto à formação de placas de lise após 24 h.

A sensibilidade das bactérias ao bacteriófago recém-isolado foi determinada pela presença de zonas de lise claras no tapete bacteriano. As bactérias testadas foram classificadas com base na translucidez dessas zonas: (+) para zona de lise clara (bactéria suscetível) e (-) para ausência de lise (bactéria resistente). O teste de eficiência de plaqueamento (EOP) foi realizado apenas nas bactérias que apresentaram resultado positivo no *spot-test*. A Eficiência de Plaqueamento (EOP) foi calculada pela razão entre o título obtido na infecção de cada bactéria-alvo e o título obtido na infecção da cepa hospedeira original de isolamento, considerada como 100% de eficiência, conforme a Equação (3). Os valores de EOP foram apresentados como a média de três ensaios independentes e classificados em relação ao hospedeiro de isolamento nos seguintes níveis: elevado ( $\geq 50\%$ ), moderado (10% – 0,1%), baixo (0,1% – 0,001%) ou ineficiente ( $\leq 0,001\%$ ).

$$EOP = \frac{\text{Média das UFP da bactéria alvo}}{\text{Média das UFP da bactéria hospedeira}}$$

(Equação 3)

Onde: EOP = Eficiência de plaqueamento; UFP= unidade formadoras de placas.

#### 4.2.7.2 Curva de adsorção das partículas fágicas

Para a determinação do tempo adsorção dos fagos foi utilizada uma suspensão bacteriana previamente preparada em 25 mL de meio líquido TSB, incubada à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira (37 °C) até atingir a fase exponencial, correspondente a uma densidade óptica (OD) de 0,5 a 610 nm. A partir dessa suspensão, foi ajustada a multiplicidade de infecção (MOI) para 0,001, definida como a razão entre a concentração de partículas virais e a concentração de células bacterianas, de modo a garantir, que cada partícula fágica tenha pelo menos uma célula bacteriana hospedeira. Aguardou-se 30 s (tempo zero), coletou-se uma alíquota de 50 µL da amostra e foram realizadas diluições seriadas até 10<sup>-5</sup>. Em seguida, foram feitas coletas de alíquotas do mesmo volume a cada 5 min durante os primeiros 30 min do ensaio. Após esse período, as coletas foram realizadas em intervalos de 10 min, até completar um total de 150 min de experimento. As alíquotas de 50 µL coletadas foram imediatamente transferidas para 400 µL de meio TSB suplementado com 50 µL de clorofórmio, garantindo a inativação das células bacterianas. Nas diluições subsequentes (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-5</sup>), a adição de clorofórmio não é necessária. As placas de Petri foram armazenadas em estufa a 37 °C por 24 h, para contagem posterior das placas fágicas, considerando as contagens entre 3 e 30 placas fágicas. Os resultados obtidos foram aplicados a Equação 4 (Harada *et al.*, 2022). O ajuste não-linear dos dados experimentais normalizados de adsorção dos fagos ao modelo matemático mencionado foi realizado utilizando a função Solver do Microsoft Excel (Microsoft, Redmond WA, EUA).

$$\frac{P_t}{P_0} = \frac{\Phi}{\delta \cdot X_0 + \Phi} \left\{ 1 + \frac{\delta \cdot X_0}{\Phi} \cdot e^{-\Phi \left( \frac{\delta \cdot X_0 + \Phi}{\Phi} \right) \cdot t} \right\}$$

**(Equação 4)**

Onde:  $P_t$  e  $P_0$  são as concentrações de fago (UFP mL<sup>-1</sup>) nos tempos  $t$  e 0; respectivamente;  $\delta$  é a taxa de adsorção do fago (de primeira ordem) nas células hospedeiras bacterianas suscetíveis (UFC<sup>-1</sup> mL min<sup>-1</sup>);  $\phi$  é a taxa de desorção dos fagos (de primeira ordem) dos complexos reversíveis fago-bactéria (min<sup>-1</sup>);  $X_0$  representa a concentração inicial de células bacterianas (UFC mL<sup>-1</sup>) não infectadas (suscetíveis); e  $t$  é o tempo de infecção (min).

#### 4.2.7.3 Curva em um só ciclo síncrono de crescimento (OSGC)

Os parâmetros de crescimento do bacteriófago foram determinados por meio da curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC, do inglês *One-Step Growth Curve*), com base em três experimentos independentes. A aplicação da OSGC possibilitou a caracterização dos principais parâmetros do ciclo replicativo do fago na cepa bacteriana hospedeira, incluindo os períodos de eclipse, latente e de acumulação intracelular, além do tamanho de explosão (*burst size*) ou rendimento de morfogênese. Na curva OSGC, o período de eclipse corresponde ao intervalo de tempo após a penetração e injeção do genoma fágico no citoplasma da célula hospedeira, durante o qual ocorre a biossíntese e montagem dos novos bacteriófagos, mas ainda sem liberação de partículas virais. O período latente abrange o tempo entre a infecção e a lise celular, momento em que os fagos formados são liberados. A fase de acumulação intracelular é definida como a diferença entre o período latente e o período de eclipse. O tamanho de explosão (*burst size*) refere-se ao número de partículas virais produzidas por célula infectada (progenia fágica). Os dados experimentais obtidos foram representados graficamente e ajustados por regressão não linear utilizando um modelo matemático sigmoidal de quatro parâmetros (modelo 4-PL — *Four-Parameter Logistic Regression*), conforme descrito na Equação 5 (Balcão e Vila, 2023; Harada *et al.*, 2022).

$$\text{Log} ( P_t ) = P_\infty + \frac{P_0 - P_\infty}{1 + \left( \frac{t}{A} \right)^B}$$

**(Equação 5)**

Onde:  $P_t$  representa a concentração de fago (UFP/mL) no momento  $t$ ;  $P_0$  representa a concentração de fago em  $t = 0$ ;  $P$  representa concentração de fago em  $t = \infty$ ;  $A$  é o ponto de inflexão da curva;  $B$  é o declive que define a inclinação da curva e;  $t$  é o tempo (min).

#### 4.2.7.4 Curvas de inativação bacteriana *in vitro* a vários valores de MOI, utilizando os bacteriófagos isoladamente e em coquetel

A inativação bacteriana pelos bacteriófagos isolados foi avaliada por meio de ensaios laboratoriais *in vitro*, utilizando multiplicidades de infecção (MOI) de 0,01, 1, 10 e 100. Os testes foram realizados individualmente para cada fago e também com um coquetel contendo ambos, nos mesmos valores de MOI.

A cultura bacteriana hospedeira foi preparada a uma concentração de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, enquanto as suspensões fágicas foram ajustadas para alcançar os MOIs desejados. Para cada condição, suspensões bacterianas e fágicas foram inoculadas em tubos de vidro esterilizados contendo 10 mL de meio TSB e incubadas a 37 °C, sem agitação. As proporções utilizadas foram as seguintes:

- MOI 0,01: bactéria ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) e fago ( $1 \times 10^3$  UFP/mL);
- MOI 1: bactéria ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) e fago ( $1 \times 10^5$  UFP/mL);
- MOI 10: bactéria ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) e fago ( $1 \times 10^6$  UFP/mL);
- MOI 100: bactéria ( $1 \times 10^5$  UFC/mL) e fago ( $1 \times 10^7$  UFP/mL).

Para a formulação do coquetel fágico, foram adicionados os volumes congruentes de cada fago até que a concentração final do coquetel fosse de  $1 \times 10^{10}$  UFP/mL. Em seguida foram adicionados às bactérias para se atingir os MOIs previamente estabelecidos.

Em cada ensaio, foram preparados dois controles: (i) um contendo apenas a suspensão fágica e (ii) outro contendo apenas a cultura bacteriana. A amostra experimental foi composta pela adição simultânea da bactéria e do(s) fago(s), conforme o MOI correspondente. As amostragens foram realizadas nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h de incubação. Em cada intervalo, coletaram-se 50 µL de cada tubo, transferidos para microtubos contendo 450 µL de tampão fágico, nos quais foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-8}$ . Para a quantificação bacteriana, 5 µL das amostras do controle bacteriano e dos tratamentos foram plaqueados em meio TSA. Para a quantificação das partículas fágicas, o mesmo volume (5 µL) foi plaqueado em placas de Petri com ágar em dupla camada, contendo um tapete bacteriano recém-semeado (100 µL de cultura bacteriana adicionados a 4,5 mL de meio MTA-TSB). Todas as placas foram incubadas a 37 °C para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) e unidades formadoras de placa (UFP).

#### **4.2.7.5. Frequência de mutantes bacterianos espontâneos resistentes aos fagos**

Foram isoladas dez colônias de cada amostra de *Salmonella* spp. sensíveis aos respectivos fagos, as quais foram inoculadas individualmente em 5 mL de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*). Os inóculos foram incubados por 18 h, sob condições adequadas, para a realização do experimento. Em seguida, tubos tipo Eppendorf contendo 450 µL de

PBS foram preparados para a obtenção de diluições seriadas até  $10^{-7}$ , as quais foram realizadas individualmente a partir de cada inóculo.

As diluições seriadas entre  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$  das bactérias sensíveis foram plaqueadas em meio TSA (*Tryptic Soy Agar*) pelo método de incorporação. Paralelamente, as diluições seriadas de  $10^0$  a  $10^{-4}$  foram plaqueadas utilizando 100  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana, adicionados a 200  $\mu\text{L}$  da suspensão de fagos ( $1 \times 10^8$  UFP/mL), em 4,0 mL de meio MTA-TSB, sendo a mistura vertida sobre placas contendo TSA.

Todas as placas de Petri foram incubadas por 24 h, e as colônias formadas na superfície do ágar foram posteriormente contadas. A frequência de emergência de mutantes espontâneos do hospedeiro bacteriano resistentes aos fagos foi calculada pela razão entre o número de bactérias resistentes semeadas em ágar de dupla camada (obtidas a partir das bactérias que emergiram na presença das partículas de fagos) e o número total de bactérias sensíveis semeadas por incorporação (preparadas a partir da cultura sem fagos), conforme descrito por Balcão e Vila (2023). Foram realizados três ensaios independentes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Salmonella* spp. é uma bactéria de interesse em saúde, uma vez que é uma das principais bactérias causadoras das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Estas doenças espalham-se pelo mundo inteiro, levando a diferentes surtos, hospitalizações e óbitos (Knodler; Elfenbein, 2019; Silva *et al.*, 2019).

A preocupação torna-se ainda maior ao se verificar os índices de resistência de diferentes tipos de bactérias causadoras das DTAs, incluindo a *Salmonella* spp. Diante desse cenário, torna-se imprescindível a busca por novos métodos de tratamento. Nesse contexto, destaca-se o crescente interesse no uso de bacteriófagos, devido à sua especificidade e eficiência como agentes terapêuticos alternativos (Benevides, 2019; Ricke *et al.*, 2020).

### 5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

As amostras de fezes de frangos foram coletadas próximas de propriedades com características de criação familiar, ou seja, sem caráter industrial, com manejo sanitário limitado e sujeitas a fiscalizações menos frequentes dos produtos ali originados. Essa escolha baseou-se, principalmente, na maior ocorrência de falhas de manejo sanitário em pequenas granjas, fator que pode favorecer a disseminação de *Salmonella* spp. tanto entre os animais quanto nos produtos derivados (Maia *et al.*, 2011; Schwartz; Abreu, 2014). Destaca-se ainda o estudo de Miranda *et al.* (2020), que analisando amostras de fezes de um plantel industrial de frangos destinados ao consumo humano, não encontraram índices significativos de *Salmonella* spp., atribuindo esse resultado ao rigoroso controle sanitário da propriedade.

No presente estudo, foram coletadas 44 amostras de fezes de frangos visando à detecção de *Salmonella*, seguidas de isolamento e identificação do agente. O reservatório mais comum de *Salmonella* é o trato gastrointestinal de uma ampla gama de animais domésticos e selvagens, por isto, a escolha de fezes de frangos como amostras (Ferrari *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de métodos eficientes e confiáveis para a detecção de *Salmonella* é essencial, considerando a relevância da salmonelose para a saúde pública. Os testes utilizados para a identificação do patógeno podem ser classificados em





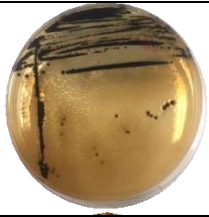


diferentes categorias, de acordo com o princípio analítico empregado, incluindo métodos de cultura convencionais, ensaios imunológicos, testes baseados em ácidos nucléicos, ensaios bioquímicos miniaturizados e biossensores (Lee *et al.*, 2015).


Inicialmente, todas as amostras foram incubadas em meio nutritivo BHI (*Brain Heart Infusion*). Destaca-se que, embora esse caldo não seja seletivo para *Salmonella* spp., ainda é o recomendado pela Portaria nº 126 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 1995) por apresentar bons resultados, conforme observado por Miranda *et al.* (2020). No entanto, o uso do BHI é questionado por pesquisadores como Stoppa *et al.* (2015), que demonstraram maior eficiência no uso de meios seletivos, como Tetrionato, Selenito e Rappaport-Vassiliadis. Em seus estudos, esses meios apresentaram desempenho superior na recuperação de *Salmonella* spp., reforçando a importância da seletividade no processo de isolamento bacteriano.

As amostras que apresentaram turvação no meio BHI, indicativo de crescimento bacteriano, foram semeadas em ágar *Shigella-Salmonella* (SS) e incubadas a 37 °C por 24 h, como etapa inicial do processo de identificação microbiológica. Utilizou-se o meio ágar SS, que é um meio de cultura seletivo e diferencial, permitindo a identificação visual das colônias de *Salmonella* spp. O ágar SS é capaz de inibir o crescimento de bactérias indesejadas e evidenciar características típicas de *Salmonella* spp. O ágar SS contém sais biliares, verde brilhante e citrato de sódio, que atuam como agentes seletivos, inibindo o crescimento de microrganismos Gram-positivos. A presença de lactose no meio permite a diferenciação entre bactérias fermentadoras e não fermentadoras desse açúcar. As bactérias lactose-positivas, ao fermentarem a lactose, produzem ácido, o qual, na presença do indicador vermelho de fenol, promove a formação de colônias de coloração rosa. Já as bactérias lactose-negativas formam colônias incolores ou transparentes. Além disso, a presença de tiosulfato de sódio e citrato férrico permitem a detecção da produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), evidenciada pelo aparecimento de centros enegrecidos nas colônias. A presença de colônias incolores ou com centro enegrecido (devido à produção de H<sub>2</sub>S) é indicativa da possível presença de bactérias do gênero *Salmonella*, uma vez que o ágar SS apresenta coloração original vermelho-alaranjada. O escurecimento ocorre pela ação do tiosulfato de sódio e do citrato férrico, que reagem com o sulfeto de hidrogênio produzido por algumas cepas, formando um precipitado negro. Já as colônias incolores, que não fermentam lactose nem produzem H<sub>2</sub>S, também podem representar cepas de *Salmonella* ou *Shigella* (Brasil, 2020).

Das 44 amostras coletadas, quatorze (14) apresentaram crescimento compatível com o de *Salmonella* spp. em meio ágar *Shigella-Salmonella*, e os resultados estão expressos na Tabela 7.

**Tabela 7** - Morfologia e coloração das colônias de amostras cultivadas em ágar *Shigella-Salmonella* (SS) sugestivas de *Salmonella* spp.

| Amostra    | Foto   |
|------------|--|
| Amostra 4  |    |
| Amostra 6  |    |
| Amostra 7  |   |
| Amostra 11 |  |
| Amostra 12 |  |
| Amostra 13 |  |
| Amostra 18 |  |

|            |  |
|------------|--|
| Amostra 20 |    |
| Amostra 22 |    |
| Amostra 23 |    |
| Amostra 29 |   |
| Amostra 34 |  |
| Amostra 36 |  |
| Amostra 39 |  |

**Legenda:** Cor original do meio: vermelho-alaranjado. Colônias incolores ou com centro negro (H<sub>2</sub>S): suspeita de *Salmonella*

**Fonte:** Elaboração própria.

Conforme apresentado na Tabela 7, quatorze (14) amostras apresentaram crescimento compatível com as características típicas de colônias de *Salmonella* spp., as quais se distinguem pelo centro enegrecido, resultante da produção de sulfeto de

hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (Lee, 2015; Embrapa, 2016). Apesar de duas amostras (41 e 42) terem apresentado produção de H<sub>2</sub>S, não houve o aparecimento de colônias isoladas para serem consideradas suspeitas de *Salmonella* spp., como indica o fabricante (TM Media, 2022).

O ágar SS é um meio de cultura seletivo que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e de algumas Enterobacteriaceae que não pertencem aos gêneros *Shigella* e *Salmonella*. É considerado o principal meio para o isolamento e identificação de *Salmonella* spp. a partir de amostras fecais, uma vez que, existem meios mais específicos para *Shigella*. Apesar de sua seletividade, é possível observar o crescimento de outras bactérias, como *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. No entanto, essas colônias geralmente apresentam características morfológicas distintas no meio, o que permite sua diferenciação visual (Titan Biotec, 2024).

No ágar SS, as colônias de *Salmonella* spp. apresentam-se intensamente enegrecidas devido à produção de H<sub>2</sub>S. As colônias de *Shigella* spp. são tipicamente transparentes, enquanto *Proteus* spp. formam colônias também transparentes, porém com centro escurecido pela produção de H<sub>2</sub>S. As colônias de *Escherichia coli* têm coloração rosada e aspecto purulento; *Klebsiella* spp. apresentam colônias rosadas, com textura cremosa e; *Enterococcus* spp. formam colônias transparentes. A *Salmonella* spp. é a que apresenta melhor crescimento em mais de 50% dos cultivos. Já *Shigella* tem crescimento entre 40 a 50% dos casos, *Proteus* spp. entre 30 a 40%, *E. coli* e *Klebsiella* com crescimento entre 20 a 30% dos casos e *Enterococcus* spp. menos de 10% dos casos (TM Media, 2022).

Os aspectos das colônias foram observados também nas pesquisas de Alamos *et al.* (2018), Laranjeira *et al.* (2020), Rezende *et al.* (2016) e Rodrigues (2016), nos quais amostras ambientais foram cultivadas em ágar SS, utilizando o método de esgotamento.

Esses trabalhos obtiveram resultados positivos para *Salmonella* spp., com padrões de crescimento semelhantes aos observados neste estudo, demonstrando, assim, a efetividade do ágar SS na diferenciação de culturas com base na coloração das colônias.

Como etapa inicial para a identificação bacteriana, foi realizada a coloração de Gram nas 14 amostras que apresentaram crescimento compatível com *Salmonella* spp. em ágar SS. As amostras testadas apresentaram coloração Gram-negativa (coloração rosa/vermelha), conforme esperado na literatura para *Salmonella* spp. (Brasil, 2011).

A teoria mais aceita para explicar a coloração de Gram baseia-se nas diferentes propriedades de permeabilidade da parede celular dos microrganismos, que resultam na distinção das cores observadas ao microscópio entre bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas. As bactérias Gram-positivas são caracterizadas pela coloração roxa ou violeta, enquanto as Gram-negativas apresentam coloração rosa ou vermelha (Brasil, 2001; Tanaka, 2024). Segundo essa teoria, todas as células são inicialmente coradas com violeta de genciana. Em seguida, é aplicado o lugol, que promove a fixação do corante por meio da formação do complexo iodo-pararosanilina. Após a aplicação do álcool como descolorante, as bactérias com parede celular rica em peptidoglicano (mureína) retêm o corante violeta, permanecendo roxas ou violeta. Já as bactérias cuja parede celular é composta predominantemente por lipídios, como os ácidos graxos, perdem o corante violeta e adquirem a coloração do corante secundário, a safranina, apresentando-se em tons de rosa ou vermelho (Brasil, 2001).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família das Enterobacteriaceae, como acontece com grande parte das bactérias de interesse da saúde pública (Brasi, 2011; Carneiro, Costa, 2020; Miranda *et al.*, 2020; Oliveira, Paula; 2021; Silva, 2014; Silva, 2018). Dessa forma, todas as amostras foram consideradas como potenciais *Salmonella* dando sequência aos ensaios de identificação.

As amostras foram inicialmente enriquecidas em meio BHI seguindo a indicação do MAPA, pela portaria nº126 (Brasil, 1995). Porém pesquisadores como Stoppa *et al.* (2015) e Silva (2023) evidenciaram a maior eficiência do caldo Rappaport Vassiliadis para o crescimento seletivo para amostras suspeitas de *Salmonella*. Assim, como uma forma de confirmação, antes de testes mais específicos, todas as 14 amostras foram inoculadas em caldo Rappaport Vassiliadis que é um caldo nutritivo específico e seletivo da *Salmonella* (Laborclin, 2019). As amostras que mostraram turvação do caldo Rappaport Vassiliadis, foram reconfirmadas como positivas para *Salmonella* spp.

A próxima etapa foi o emprego de testes bioquímicos, usando-se o *Enterokit B*® da empresa Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda (São Paulo, SP, Brasil). De acordo com o fabricante, o Enterokit B® é composto por meios específicos com a finalidade de testar nove (9) características bioquímicas, permitindo assim identificar a grande maioria das enterobactérias isoladas de amostras clínicas ou ambientais. Foram testadas as amostras positivas crescidas em ágar SS e caldo Rappaport Vassiliadis e constatadas como Gram-negativas. Os resultados observados após de 24 h à temperatura de 37 °C estão compilados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados das amostras incubadas no *Enterokit B* ®

| <b>Amostra 4</b>  |                    |               |                    |               |                    |
|---|--------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 1</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 2</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 3</b> |
| Lactose   | 0                  | Urease        | 0                  | Indol         | 0                  |
| Gás   | 0                  | LTD           | 0                  | Lisina        | 2                  |
| H <sub>2</sub> S  | 1                  | Motilidade    | 1                  | Citrato       | 0                  |
| Resultado = 1   |                    | Resultado = 1 |                    | Resultado = 2 |                    |
| <b>Interpretação (112) → <i>Salmonella typhi</i></b>  |                    |               |                    |               |                    |
| <b>Amostra 6</b>  |                    |               |                    |               |                    |
| <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 1</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 2</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 3</b> |
| Lactose   | 0                  | Urease        | 0                  | Indol         | 0                  |
| Gás   | 2                  | LTD           | 0                  | Lisina        | 0                  |
| H <sub>2</sub> S  | 1                  | Motilidade    | 1                  | Citrato       | 0                  |
| Resultado = 3   |                    | Resultado = 1 |                    | Resultado = 0 |                    |
| <b>Interpretação (310) → <i>Salmonella paratyphi</i></b>  |                    |               |                    |               |                    |
| <b>Amostra 7</b>  |                    |               |                    |               |                    |
| <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 1</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 2</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 3</b> |
| Lactose   | 0                  | Urease        | 0                  | Indol         | 0                  |
| Gás   | 2                  | LTD           | 0                  | Lisina        | 2                  |
| H <sub>2</sub> S  | 0                  | Motilidade    | 1                  | Citrato       | 0                  |
| Resultado = 2   |                    | Resultado = 1 |                    | Resultado = 2 |                    |
| <b>Interpretação (212) → <i>Salmonella cholerae</i>usis, <i>Hafnia alvei</i>, <i>Serratia liquefacius</i></b> |                    |               |                    |               |                    |
| <b>Amostra 11</b>   |                    |               |                    |               |                    |
| <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 1</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 2</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 3</b> |
| Lactose   | 0                  | Urease        | 0                  | Indol         | 0                  |
| Gás   | 0                  | LTD           | 0                  | Lisina        | 2                  |
| H <sub>2</sub> S  | 1                  | Motilidade    | 1                  | Citrato       | 0                  |
| Resultado = 1   |                    | Resultado = 1 |                    | Resultado = 2 |                    |
| <b>Interpretação (112) → <i>Salmonella typhi</i></b>  |                    |               |                    |               |                    |
| <b>Amostra 12</b>   |                    |               |                    |               |                    |
| <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 1</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 2</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 3</b> |
| Lactose   | 0                  | Urease        | 0                  | Indol         | 0                  |
| Gás   | 2                  | LTD           | 0                  | Lisina        | 0                  |
| H <sub>2</sub> S  | 1                  | Motilidade    | 1                  | Citrato       | 0                  |
| Resultado = 3   |                    | Resultado = 1 |                    | Resultado = 0 |                    |
| <b>Interpretação (310) → <i>Salmonella paratyphi</i> A.</b>   |                    |               |                    |               |                    |
| <b>Amostra 13</b>   |                    |               |                    |               |                    |
| <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 1</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 2</b> | <b>Teste</b>  | <b>Algarismo 3</b> |
| Lactose   | 0                  | Urease        | 4                  | Indol         | 4                  |
| Gás   | 2                  | LTD           | 2                  | Lisina        | 0                  |
| H <sub>2</sub> S  | 1                  | Motilidade    | 1                  | Citrato       | 1                  |
| Resultado = 3   |                    | Resultado = 7 |                    | Resultado = 5 |                    |
| <b>Interpretação (112) → <i>Salmonella typhi</i></b>  |                    |               |                    |               |                    |

| <b>Amostra 18</b> |             |               |             |               |             |
|-------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Teste             | Algarismo 1 | Teste         | Algarismo 2 | Teste         | Algarismo 3 |
| Lactose           | 0           | Urease        | 0           | Indol         | 0           |
| Gás               | 2           | LTD           | 0           | Lisina        | 0           |
| H <sub>2</sub> S  | 1           | Motilidade    | 1           | Citrato       | 0           |
| Resultado = 3     |             | Resultado = 1 |             | Resultado = 0 |             |

**Interpretação (310) → *Salmonella paratyphi***

| <b>Amostra 20</b> |             |               |             |               |             |
|-------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Teste             | Algarismo 1 | Teste         | Algarismo 2 | Teste         | Algarismo 3 |
| Lactose           | 0           | Urease        | 4           | Indol         | 4           |
| Gás               | 2           | LTD           | 2           | Lisina        | 0           |
| H <sub>2</sub> S  | 1           | Motilidade    | 1           | Citrato       | 1           |
| Resultado = 3     |             | Resultado = 7 |             | Resultado = 5 |             |

**Interpretação (375) → *Proteus vulgaris***

| <b>Amostra 22</b> |             |               |             |               |             |
|-------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Teste             | Algarismo 1 | Teste         | Algarismo 2 | Teste         | Algarismo 3 |
| Lactose           | 0           | Urease        | 0           | Indol         | 0           |
| Gás               | 2           | LTD           | 0           | Lisina        | 0           |
| H <sub>2</sub> S  | 1           | Motilidade    | 1           | Citrato       | 0           |
| Resultado = 3     |             | Resultado = 1 |             | Resultado = 0 |             |

**Interpretação (310) → *Salmonella paratyphi***

| <b>Amostra 23</b> |             |               |             |               |             |
|-------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Teste             | Algarismo 1 | Teste         | Algarismo 2 | Teste         | Algarismo 3 |
| Lactose           | 0           | Urease        | 4           | Indol         | 4           |
| Gás               | 0           | LTD           | 2           | Lisina        | 0           |
| H <sub>2</sub> S  | 1           | Motilidade    | 1           | Citrato       | 1           |
| Resultado = 1     |             | Resultado = 7 |             | Resultado = 5 |             |

**Interpretação (175) → *Proteus vulgaris***

| <b>Amostra 29</b> |             |               |             |               |             |
|-------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Teste             | Algarismo 1 | Teste         | Algarismo 2 | Teste         | Algarismo 3 |
| Lactose           | 0           | Urease        | 0           | Indol         | 0           |
| Gás               | 0           | LTD           | 0           | Lisina        | 0           |
| H <sub>2</sub> S  | 0           | Motilidade    | 1           | Citrato       | 1           |
| Resultado = 0     |             | Resultado = 1 |             | Resultado = 1 |             |

**Interpretação (011) → *Citrobacter freundii***

| <b>Amostra 34</b> |             |               |             |               |             |
|-------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Teste             | Algarismo 1 | Teste         | Algarismo 2 | Teste         | Algarismo 3 |
| Lactose           | 0           | Urease        | 0           | Indol         | 0           |
| Gás               | 0           | LTD           | 0           | Lisina        | 0           |
| H <sub>2</sub> S  | 1           | Motilidade    | 1           | Citrato       | 1           |
| Resultado = 1     |             | Resultado = 1 |             | Resultado = 1 |             |

**Interpretação (111) → *Citrobacter freundii***

| <b>Amostra 36</b> |             |               |             |               |             |
|-------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Teste             | Algarismo 1 | Teste         | Algarismo 2 | Teste         | Algarismo 3 |
| Lactose           | 0           | Urease        | 0           | Indol         | 0           |
| Gás               | 2           | LTD           | 0           | Lisina        | 2           |
| H <sub>2</sub> S  | 1           | Motilidade    | 1           | Citrato       | 0           |
| Resultado = 3     |             | Resultado = 1 |             | Resultado = 2 |             |

**Interpretação (312) → *Salmonella spp.***

| Amostra 39   |             |               |             |               |             |
|--|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| Teste  | Algarismo 1 | Teste         | Algarismo 2 | Teste         | Algarismo 3 |
| Lactose  | 0           | Urease        | 0           | Indol         | 4           |
| Gás  | 2           | LTD           | 0           | Lisina        | 2           |
| H <sub>2</sub> S                                       | 1           | Motilidade    | 1           | Citrato       | 0           |
| Resultado = 3  |             | Resultado = 1 |             | Resultado = 6 |             |
| <b>Interpretação (316) → <i>Edwardsiella tarda</i></b> |             |               |             |               |             |

**Legenda:** LTD = desaminação do triptofano; H<sub>2</sub>S = produção de sulfato de hidrogênio.

**Fonte:** Elaboração própria.

Como é possível observar (Tabela 8), das amostras suspeitas verificou-se que somente nove (9) positivaram para *Salmonella spp.*

Apesar das amostras apresentarem características compatíveis com *Salmonella spp.* no ágar SS, observou-se alguma incongruência nos resultados obtidos com o Enterokit B®. Esse fato não é inédito, tendo sido relatado também por Sales *et al.* (2021), que identificaram problemas semelhantes em suas pesquisas.


Essas divergências podem ser explicadas pelas igualdades nas características bioquímicas entre *Salmonella spp.* e *Proteus spp.* Ambas são negativas para lactose, lisina e oxidase, produzem gás, são urease positivas, realizam a desaminação do triptofano e produzem sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (Pozza *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2019; Zappa, 2015). Diante dessas semelhanças, é plausível supor que ocorra uma reação cruzada nos testes bioquímicos, resultando em positividade para ambas as bactérias em alguns testes.

Com o objetivo de esclarecer as dúvidas quanto à identificação dos microrganismos pelo Enterokit B®, recorreu-se a outro método de avaliação das características bioquímicas. Desta forma, optou-se pela utilização das galerias API 20E®, da empresa bioMérieux do Brasil (Rio de Janeiro, Brasil).

As galerias API 20E® são sistemas qualitativos utilizados para a identificação de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e de outros bacilos Gram-negativos não fastidiosos. Para isso, foram utilizados 20 microtubos contendo substratos desidratados, nos quais foi inoculada a suspensão bacteriana a ser testada, promovendo a reconstituição do meio. As reações produzidas, após o período de incubação à temperatura ideal, constituem mudanças de colorações nesses microtubos, permitindo identificação das bactérias, de acordo com o Quadro de Leitura, fornecido no Manual das Galerias (BioMérieux, 2024), e disponibilizado no Anexo 11.

Todas as quatorze (14) amostras foram testadas em galerias API20E®, e os resultados positivos estão apresentados abaixo (Figuras 4, 5 e 6).

**Figura 4** - Perfil bioquímico obtido pela galeria API20E ® e interpretação dos resultados da amostra 12



| Poço              | Teste            | Reagente | Resultado | Interpretação   | Código |
|-------------------|------------------|----------|-----------|---|--------|
| 1                 | ONPG             | Não      | +         | Produz β-galactosidase  | 1      |
| 2                 | ADH              | Não      | +         | Hidrolisa arginina  | 2      |
| 3                 | LDC              | Não      | +         | Descarboxila lisina   | 4      |
| 4                 | ODC              | Não      | +         | Descarboxila ornitina   | 1      |
| 5                 | CIT              | Não      | +         | Usa citrato   | 2      |
| 6                 | H <sub>2</sub> S | Não      | +         | Produz H <sub>2</sub> S   | 4      |
| 7                 | URE              | Não      | +         | Produz urease   | 1      |
| 8                 | TDA              | TDA      | +         | Possui atividade de TDA   | 2      |
| 9                 | IND              | James    | +         | Produz indol  | 4      |
| 10                | VP               | VP1+VP2  | -         | Não produz acetoina   | 0      |
| 11                | GEL              | Não      | +         | Gelatinase  | 2      |
| 12                | GLU              | Não      | +         | Fermenta glucose  | 4      |
| 13                | MAN              | Não      | +         | Fermenta manitol  | 1      |
| 14                | INO              | Não      | -         | Não fermenta Inositol   | 0      |
| 15                | SOR              | Não      | +         | Fermenta sorbitol   | 4      |
| 16                | RHA              | Não      | +         | Fermenta ramnose  | 1      |
| 17                | SAC              | Não      | -         | Não fermenta sacarose   | 0      |
| 18                | MEL              | Não      | +         | Fermenta melibiose  | 4      |
| 19                | AMY              | Não      | -         | Não fermenta amigdalina   | 0      |
| 20                | ARA              | Não      | +         | Fermenta arabinose  | 2      |
| <b>FINAL</b>      |                  |          |           |   |        |
| 7776552           |                  |          |           | <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>Arizonae</i> (100,0%)                      |        |
| Outros resultados |                  | 3776552  |           | <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>Arizonae</i><br><i>Citrobacter braakii</i> |        |

**Legenda:** ONPG = β-galactosidase (Ortonitrofenil- βD- galactopiranosidase); ADH = arginina dihidrolase; LDC = lisina descabroxilase; ODC = Ornitina descarboxilase; CIT = citrato; H<sub>2</sub>S = produção de sulfato de hidrogênio; URE = urease; TDA = triptofano desaminase; IND = produção de indol; VP = produção de acetoina (Voges Proskauer); GEL = gelatinase; GLU = fermentação – oxidação (glucose); MAN = fermentação – oxidação (manitol); INO = fermentação – oxidação (inositol); SOR = fermentação – oxidação (sorbitol); RHA = fermentação – oxidação (ramnose); SAC = fermentação – oxidação (sacarose); AMY = fermentação – oxidação (amigdalina); ARA = fermentação – oxidação (arabinose); James = reagente p-dimetilaminocinamaldeído dissolvido em álcool e ácido clorídrico.

**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 5** - Perfil bioquímico obtido pela galeria API20E ® e interpretação dos resultados da amostra 29




| Poço                        | Teste            | Reagente | Resultado | Interpretação  | Código |
|-----------------------------|------------------|----------|-----------|--|--------|
| 1                           | ONPG             | Não      | +         | Produz β-galactosidase   | 1      |
| 2                           | ADH              | Não      | +         | Hidroliza arginina   | 2      |
| 3                           | LDC              | Não      | -         | Não descarboxila lisina  | 0      |
| 4                           | ODC              | Não      | +         | Descarboxila ornitina  | 1      |
| 5                           | CIT              | Não      | +         | Usa citrato  | 2      |
| 6                           | H <sub>2</sub> S | Não      | +         | Produz H <sub>2</sub> S  | 4      |
| 7                           | URE              | Não      | -         | Não produz urease  | 0      |
| 8                           | TDA              | TDA      | -         | Não possui atividade de TDA  | 0      |
| 9                           | IND              | James    | -         | Não produz indol   | 0      |
| 10                          | VP               | VP1+VP2  | -         | Não produz acetoina  | 0      |
| 11                          | GEL              | Não      | -         | Não gelatinase   | 0      |
| 12                          | GLU              | Não      | +         | Fermenta glucose   | 4      |
| 13                          | MAN              | Não      | +         | Fermenta manitol   | 1      |
| 14                          | INO              | Não      | -         | Não fermenta Inositol  | 0      |
| 15                          | SOR              | Não      | +         | Fermenta sorbitol  | 4      |
| 16                          | RHA              | Não      | +         | Fermenta ramnose   | 1      |
| 17                          | SAC              | Não      | +         | Fermenta sacarose  | 2      |
| 18                          | MEL              | Não      | +         | Fermenta melibiose   | 4      |
| 19                          | AMY              | Não      | -         | Não fermenta amigdalina  | 0      |
| 20                          | ARA              | Não      | +         | Fermenta arabinose   | 2      |
| <b>FINAL</b>                |                  |          |           |  |        |
| 3704572                     |                  |          |           | <i>Citrobacter freundii</i> (70,3%)<br><i>Salmonella enterica spp. arizonae</i> (25,2%)<br><i>Citrobacter braakii</i> (3,8%) |        |
| Outros possíveis resultados | 3700572          |          |           | <i>Citrobacter freundii</i> (69,9%)<br><i>Salmonella enterica spp. arizonae</i> (25%)  |        |
|                             | 3700552          |          |           | <i>Salmonella enterica spp. arizonae</i> (84,2%)<br><i>Citrobacter braakii</i> (12,7%)<br><i>Salmonella spp.</i> (2,7%)      |        |

**Legenda:** ONPG = β-galactosidase (Ortonitrofenil- βD- galactopiranosidase); ADH = arginina dihidrolase; LDC = lisina descabroxilase; ODC = Ornitina descarboxilase; CIT = citrato; H<sub>2</sub>S = produção de sulfato de hidrogênio; URE = urease; TDA = triptofano desaminase; IND = produção de indol; VP = produção de acetoina (Voges Proskauer); GEL = gelatinase; GLU = fermentação – oxidação (glucose); MAN = fermentação – oxidação (manitol); INO = fermentação – oxidação (inositol); SOR = fermentação – oxidação (sorbitol); RHA = fermentação – oxidação (ramnose); SAC = fermentação – oxidação (sacarose); AMY = fermentação – oxidação (amigdalina); ARA = fermentação – oxidação (arabinose); James = reagente p-dimetilaminocinamaldeído dissolvido em álcool e ácido clorídrico.

**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 6** - Perfil bioquímico obtido pela galeria API20E ® e interpretação dos resultados da amostra 36



| Poço                        | Teste            | Reagente | Resultado | Interpretação   | Código |
|-----------------------------|------------------|----------|-----------|---|--------|
| 1                           | ONPG             | Não      | -         | Não produz β-galactosidase  | 0      |
| 2                           | ADH              | Não      | -         | Não hidroliza arginina  | 0      |
| 3                           | LDC              | Não      | +         | Descarboxila lisina   | 4      |
| 4                           | ODC              | Não      | +         | Descarboxila ornitina   | 1      |
| 5                           | CIT              | Não      | +         | Usa citrato   | 2      |
| 6                           | H <sub>2</sub> S | Não      | +         | Produz H <sub>2</sub> S   | 4      |
| 7                           | URE              | Não      | -         | Não produz urease   | 0      |
| 8                           | TDA              | TDA      | -         | Não possui atividade de TDA   | 0      |
| 9                           | IND              | James    | -         | Não produz indol  | 0      |
| 10                          | VP               | VP1+VP2  | -         | Não produz acetoina   | 0      |
| 11                          | GEL              | Não      | -         | Não gelatinase  | 0      |
| 12                          | GLU              | Não      | +         | Fermenta glucose  | 4      |
| 13                          | MAN              | Não      | +         | Fermenta a manitol  | 1      |
| 14                          | INO              | Não      | -         | Não fermenta Inositol   | 0      |
| 15                          | SOR              | Não      | +         | Fermenta sorbitol   | 4      |
| 16                          | RHA              | Não      | -         | Não fermenta ramnose  | 0      |
| 17                          | SAC              | Não      | -         | Não fermenta sacarose   | 0      |
| 18                          | MEL              | Não      | +         | Fermenta melibiose  | 4      |
| 19                          | AMY              | Não      | -         | Não fermenta amigdalina   | 0      |
| 20                          | ARA              | Não      | +         | Fermenta arabinose  | 2      |
| <b>FINAL</b>                |                  |          |           |   |        |
| 4704542                     |                  |          |           | <i>Salmonella spp. (99,4%)</i><br><i>Salmonella enterica spp. Arizonae (0,5%)</i> |        |
| Outros possíveis resultados |                  |          | 6704542   | <i>Salmonella spp. (98,6%)</i><br><i>Salmonella enterica spp. Arizonae (1,3%)</i> |        |

**Legenda:** ONPG = β-galactosidase (Ortonitrofenil- βD- galactopiranosidase); ADH = arginina dihidrolase; LDC = lisina descabroxilase; ODC = Ornitina descarboxilase; CIT = citrato; H<sub>2</sub>S = produção de sulfato de hidrogênio; URE = urease; TDA = triptofano desaminase; IND = produção de indol; VP = produção de acetoina (Voges Proskauer); GEL = gelatinase; GLU = fermentação – oxidação (glucose); MAN = fermentação – oxidação (manitol); INO = fermentação – oxidação (inositol); SOR = fermentação – oxidação (sorbitol); RHA = fermentação – oxidação (ramnose); SAC = fermentação – oxidação (sacarose); AMY = fermentação – oxidação (amigdalina); ARA = fermentação – oxidação (arabinose); James = reagente p-dimetilaminocinamaldeído dissolvido em álcool e ácido clorídrico.

**Fonte:** Elaboração própria.

Como é possível evidenciar, após os ensaios realizados com as galerias API20E® constatou-se a identificação de três (3) cepas de *Salmonella spp.* (amostras 12, 29 e 36). No Apêndice 1 é possível visualizar as fichas de identificação devidamente preenchidas.

A interpretação de cada galeria é colorimétrica, exigindo uma análise individual e única e, portanto, sujeitas a erros. Assim, resultados indicativos como “perfil inválido” podem ser justificados através da interpretação divergente da escala colorimétrica ou pela bactéria não ser da família *Enterobacteriaceae*.

Faustino (2020) utilizando galerias API20E® constatou sua sensibilidade e efetividade na identificação bacteriana. Contudo, também deixou claro a necessidade de outros métodos de confirmação, dada a semelhança bioquímica da *Salmonella* spp. com outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*, em função, principalmente, da produção de H<sub>2</sub>S. Diversos pesquisadores como Nunes e Gianani (2020), Brandão, Umeda e Fillipis (2018) e Alves *et al.* (2015) em suas respectivas pesquisas, também discutiram o uso das galerias API20E® e compararam a semelhança entre *Proteus* spp. e *Salmonellas* spp. Desta forma é possível expandir as mesmas observações feitas nas interpretações dos Enterokits B®, para possíveis reações cruzadas em função de características bioquímicas semelhantes em diferentes bactérias.

Para eliminar quaisquer dúvidas, as amostras que apresentaram resultados positivos tanto no Enterokit B® quanto nas galerias API20E®, bem como aquelas com percentual de identificação superior a 25% nas galerias API20E®, foram encaminhadas ao laboratório VetLab – Centro de Diagnóstico Laboratorial Veterinário (Sorocaba, SP) para análise por PCR qualitativo (amostras 12, 29 e 36).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica amplamente utilizada em pesquisa e diagnóstico, destinada à amplificação de sequências específicas de DNA. Trata-se de um método rápido, sensível e altamente específico, capaz de gerar milhões de cópias de um fragmento-alvo a partir de quantidades mínimas de material genético (Analytical Methods Committee, 2013; Khehra; Padda.; Swift, 2023; Valones *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos identificaram a amostra 29 como negativa para *Salmonella* spp. e as amostras 12 e 36 como positivas, sendo chamadas no presente trabalho de *Salmonella* spp. 12 e *Salmonella* spp. 36. Os resultados foram inseridos no Anexo 12.

## **5.2 CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DAS SALMONELLA SPP.**

Após a confirmação das duas (2) cepas bacterianas isoladas com *Salmonella* foram feitas as análises genômicas com o objetivo de identificar as características genéticas dos microrganismos isolados. Este procedimento é essencial para compreensão do seu potencial patogênico, variabilidade genética e possíveis mecanismos de resistência a antibióticos (Holmes *et al.*, 2018; Török, Peacock, 2012). A partir disto, buscou-se

bacteriófagos líticos específicos, capazes de reconhecer e infectar as cepas-alvo, visando o desenvolvimento de estratégias eficazes para seu controle.

Na primeira etapa da análise genômica, foi feita a extração do DNA bacteriano. Para isto, foi utilizado o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. O protocolo de extração de DNA é baseado na lise celular, seguida pela adsorção seletiva do DNA em uma membrana sílica, em meio concentrado com solução salina (Qiagen, 2023). A quantificação do DNA foi realizada utilizando o sistema Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, EUA), que utiliza sondas fluorescentes específicas para DNA de fita dupla, o que permite a mensuração da concentração de DNA sem interferências de proteínas, RNA ou resíduos. Por fim, o controle de qualidade do DNA extraído foi avaliado quanto à integridade e à pureza, as quais foram determinadas, respectivamente, por eletroforese em gel de agarose e pela razão de absorbância (A260/A280).

A análise dos genomas bacterianos foi realizada utilizando a plataforma Illumina MiSeq, amplamente reconhecida pela rapidez e precisão no sequenciamento de genomas completos (Quick *et al.*, 2015; MiSeq™ System Illumina, 2024). O sequenciamento de genomas procarióticos seguiu a abordagem *Whole Genome Shotgun* (WGS), que compreende quatro etapas principais: (i) extração e purificação do DNA, (ii) sequenciamento *shotgun*, (iii) montagem computacional do genoma, e (iv) anotação e finalização do genoma (Silva, 2021). A montagem genômica envolve a união de leituras sobrepostas para formar *contigs*, que podem ser posteriormente organizados em *scaffolds*, representando sequências contínuas e ordenadas, com possíveis regiões desconhecidas preenchidas por lacunas (Silva, 2021; Wick; Holt, 2019).

As informações utilizadas para avaliar a qualidade das montagens genômicas das amostras *Salmonella* spp. 12 e *Salmonella* spp. 36 estão apresentadas na Tabela 9. O número reduzido de *contigs* (16 e 20, respectivamente) e os valores elevados de N50 (2.506.382 pares de bases e 2.490.316 pares de bases) (pb) indicam montagens contínuas, com grande parte do genoma representada em poucos fragmentos. O N50 é um parâmetro utilizado para avaliar o comprimento dos *contigs* montados, correspondendo ao menor tamanho de *contig* a partir do qual o somatório de todas as sequências de consenso representa 50% do tamanho total do genoma. Esse índice é fundamental para a avaliação da qualidade de montagens genômicas bacterianas, pois valores mais elevados de N50 indicam maior continuidade e, conseqüentemente, maior qualidade da montagem do genoma (Silva, 2021).

O valor de L50 igual a 1 em ambas as amostras demonstrou que um único *contig* foi responsável por metade do tamanho total da montagem, o que evidenciou a presença de um *contig* principal extenso. O tamanho total dos genomas montados foi de aproximadamente 4,95 Mbp para *Salmonella* spp. 12 e 4,89 Mbp e de para *Salmonella* spp. 36, valores compatíveis com o genoma típico de *Salmonella enterica* (Jacobsen *et al.*, 2011). O conteúdo GC foi de 52% em ambas as amostras, conforme esperado para o gênero (Reen *et al.*, 2005). Além disto os resultados indicaram baixa ocorrência de bases indefinidas (“N’s”), apenas 2 por 100 kpb em ambas as bactérias isoladas, o que reforçou a qualidade das montagens obtidas (Gurevich *et al.*, 2013).

**Tabela 9** - Métricas de qualidade das montagens genômicas das amostras *Salmonella* 12 e *Salmonella* 36

| Parâmetro          | <i>Salmonella</i> spp. 12 | <i>Salmonella</i> spp. 36 |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| Nº de contigs      | 16                        | 20                        |
| Maior contig (pb)  | 2.506.382                 | 2.490.316                 |
| Tamanho total (pb) | 4.951.264                 | 4.898.516                 |
| N50 (pb)           | 2.506.382                 | 2.490.316                 |
| L50                | 1                         | 1                         |
| GC (%)             | 52                        | 52                        |
| N's por 100 kbp    | 2                         | 2                         |

**Legenda:** Nº = número; pb= pares de bases; kbp = 1000 pares de bases; N50= 50% do tamanho total do genoma; L50 = número mínimo de *contigs* (ou *scaffolds*) necessários para cobrir 50% do tamanho total do genoma; GC (%) = relação em porcentagem da guanina- citocina; N's por 100 kbp =quantidade de bases indefinidas (representadas pela letra N) a cada 100 mil pares de bases.

**Fonte:** Elaboração própria

Na sequência, utilizou-se a plataforma *on-line* Proksee (<https://proksee.ca>) para elaboração dos mapas genômicos. As Figuras 7 e 8 ilustram os mapas genômicos das bactérias isoladas (*Samonella* spp. 12 e *Salmonella* spp. 36, respectivamente). Os mapas genômicos das amostras apresentam a organização circular do genoma, com anotação das regiões codificantes e elementos genéticos de interesse. Existem vários métodos para representar resultados de dados da anotação genômica, contudo ferramentas de visualização circular do genoma são cruciais, pois proporcionam interpretação rápida e visualização simplificada de dados gerais (Parveen *et al.*, 2019; Grant *et al.*, 2023).



Em um cenário de crescente preocupação com a saúde pública, a identificação de cepas bacterianas com diferentes perfis de resistência a antibióticos é de extrema importância. Cada gene pode conferir resistência a uma classe específica de antibióticos ou a um mecanismo de ação particular, existindo grande diversidade de determinantes de resistência a antibióticos e fatores de virulência (Escudeiro *et al.*, 2019).

Como indicado pelos mapas genômicos ambas as cepas, isoladas de fezes de frangos semidomiciliados, apresentaram genes de resistência *acrD*, *mdtC*, *mdtB* e *acrB*, achados muito comuns para bactérias do gênero *Salmonella*, como indicaram os pesquisadores Punchihewage-Son, Ranaweera e Parveen (2024). Esses genes geralmente são associados a bombas de efluxo, que são proteínas transmembranas que ativamente expulsam compostos tóxicos (antibióticos inclusos) para fora da célula bacteriana. Tal mecanismo está associado à resistência a múltiplas classes de antibióticos, como  $\beta$ -lactâmicos, fluorquinolonas, tetraciclina e macrolídeos (Punchihewage-Son; Ranaweera; Parveen, 2024; Yamasaki *et al.*, 2023).

Dentre os genes de resistência destacados, é importante frisar a presença do gene *acrB*. Esse gene é determinante para a configuração da resistência a múltiplos antibióticos em *Salmonella enterica*, uma vez que ele codifica o principal componente funcional do sistema de efluxo em bactérias Gram-negativas. Esse gene atua como transportador da família Resistance-Nodulation-Division (RND), sendo responsável pela captação e expulsão ativa de grande parte dos antibióticos como fluorquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina e macrolídeos (Baucheron *et al.*, 2002; Ricci; Piddock, 2009; Wang-Kan *et al.*, 2017).

Estudos experimentais demonstram que a inativação do gene *acrB* resulta em aumento significativo da suscetibilidade bacteriana a diferentes classes de antibióticos, evidenciando sua contribuição direta para fenótipos de resistência clínica (Baucheron *et al.*, 2002). Além disso, a expressão desse gene está integrada a complexas redes regulatórias, podendo ser modulada em resposta ao estresse ambiental e à exposição a antimicrobianos, o que favorece a adaptação bacteriana no ambiente do hospedeiro. Assim, a presença desse gene em ambas as cepas analisadas reforça o potencial dessa bactéria em persistir sob pressão seletiva e representa um fator crítico a ser considerado diante das possíveis limitações das opções terapêuticas disponíveis (Wang-Kan *et al.*, 2017; WHO, 2023).

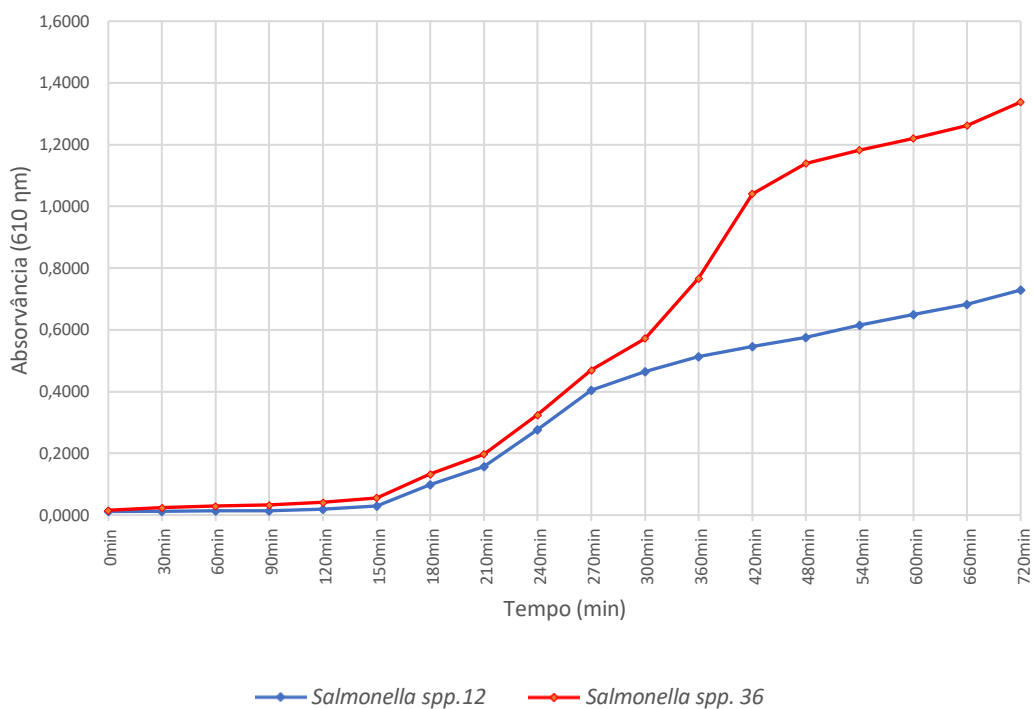
Portanto, esse achado acende um alerta, uma vez que essas bactérias podem representar um desafio significativo ao uso de antibióticos, resultando na limitação das

opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções por elas causadas (WHO, 2023). Nesse contexto, destaca-se a importância do desenvolvimento e da avaliação de estratégias terapêuticas alternativas.

### 5.3 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A medição da curva de crescimento baseada na densidade óptica (OD) é um dos métodos mais comumente utilizados em microbiologia para monitorar o crescimento e a proliferação de microrganismos ao longo do tempo. Esse método fornece uma abordagem simples, confiável e rotineira para a compreensão de diversos aspectos do comportamento bacteriano (Krishnamurthi *et al.*, 2021). Além disso, para o isolamento de partículas fágicas é fundamental a avaliação da curva de crescimento bacteriano, a fim de determinar o momento mais adequado para a infecção fago/bactéria. O ponto ideal ocorre durante a fase exponencial de crescimento, período em que as células bacterianas estão metabolicamente ativas e mais suscetíveis à infecção fágica, o que maximiza a eficiência da replicação viral (Santos, 2025).

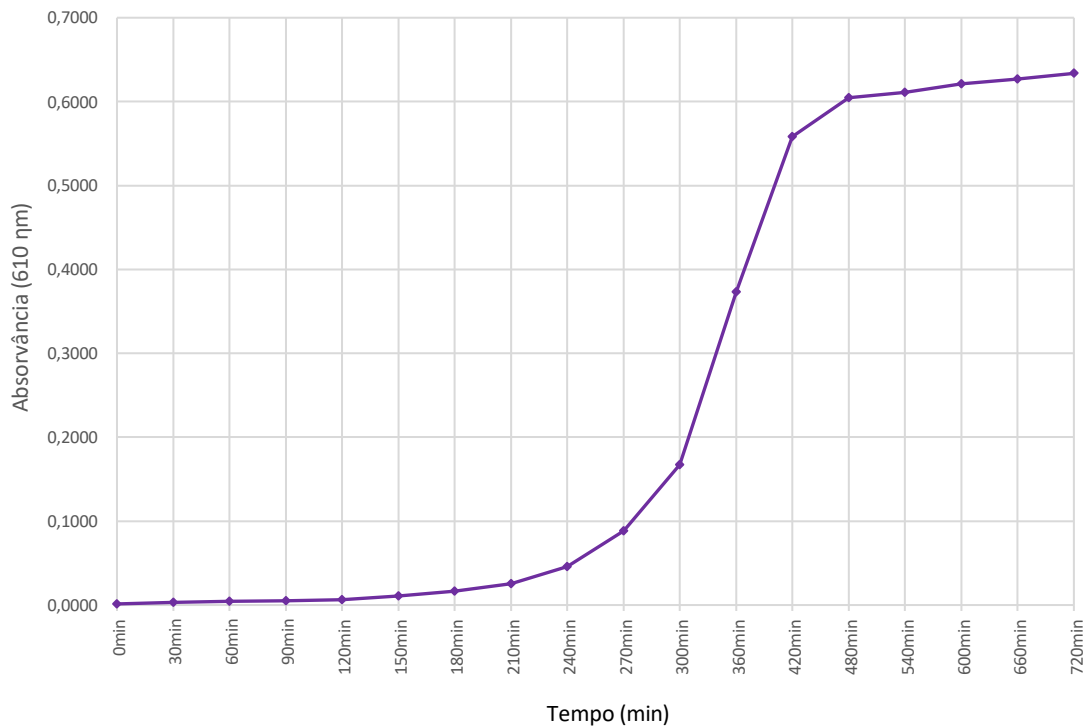
Foram realizadas curvas para cada uma das cepas identificadas como *Salmonella* spp. (amostras 12 e 36) (Figura 9) e, mais uma curva com um coquetel das duas cepas (Figura 10). O objetivo do coquetel bacteriano foi para observar se a curva de crescimento se alteraria quando as cepas entrassem em competição por recursos. Sistemas biológicos compartilham diversas características fundamentais, como a capacidade de perceber e responder a estímulos externos, regular processos internos, absorver substratos, processar energia e crescer (ou se reproduzir). Muitas dessas propriedades, senão todas, influenciam diretamente a taxa de crescimento e reprodução dos microrganismos (Fernández-Martínez; Javelle; Hoskisson, 2024). Contudo, algumas vezes, os microrganismos, mesmo dentro da mesma espécie, apresentam funções diferentes devido à plasticidade fenotípica em função dos subgrupos distintos (Kumakura *et al.*, 2023). Desta forma, as curvas de crescimento foram realizadas com as duas bactérias isoladas, e com um coquetel, para observar se o crescimento entre elas poderia ser afetado, uma vez que, espera-se poder utilizar bacteriófagos isolados e/ou em coquetel para combater estas bactérias.

**Figura 9** - Curvas de crescimento da *Salmonella* spp. 12 e *Salmonella* spp. 36

**Fonte:** Elaboração própria

As curvas de crescimento apresentaram comportamento semelhante, permanecendo em fase de latência nas primeiras 2 h (0 a 120 min). Em seguida, foi iniciada a fase de crescimento exponencial, momento em que foi observada diferença entre as duas cepas. A *Salmonella* 12 manteve-se nessa fase por aproximadamente 2,5 h (150 a 300 min), enquanto a *Salmonella* 36 permaneceu por cerca de 4,5 h (150 a 420 min), apresentando ainda um crescimento mais acentuado em comparação à *Salmonella* 12. Posteriormente, ambas entraram na fase estacionária que demorou cerca de 7 h para *Salmonella* 12 (300 a 720 min) e 5 h para *Salmonella* 36 (420 a 720 min). A fase estacionária é caracterizada pela desaceleração do crescimento e posterior morte celular, em decorrência do esgotamento dos nutrientes no meio (Manna *et al.*, 2023).

**Figura 10** - Curva de crescimento do coquetel bacteriano contendo a *Salmonella* spp. 12 e a *Salmonella* spp. 36



**Fonte:** Elaboração própria

Ao analisar o comportamento das bactérias em coquetel crescendo nas mesmas condições (125 mL de caldo TSB estéril, sendo incubada a 37 °C por 36 h), podem ser observadas respostas semelhantes. Permaneceram em fase de letargia por 2,5 h (0 a 150 min), entraram em fase de crescimento exponencial por 5,5 h, permaneceram em fase estacionária por 4 h e entraram em fase de morte em 720 min. A pequena diferença apresentada entre as bactérias crescendo individualmente e crescendo no coquetel, pode ocorrer pela competição por nutrientes entre as cepas, inibições diretas de uma cepa sobre a outra e, diferenças fisiológicas entre elas (Ram *et al.*, 2019).

#### **5.4 ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E PROPAGAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS E DETERMINAÇÃO DO TÍTULO FÁGICO**

Os bacteriófagos são vírus altamente específicos para diferentes tipos de bactérias, capazes de infectá-las e provocar sua lise e consequente morte celular. A principal característica dos fagos, sendo essa também a sua maior vantagem, é a especificidade de infecção (Vaz *et al.*, 2022).

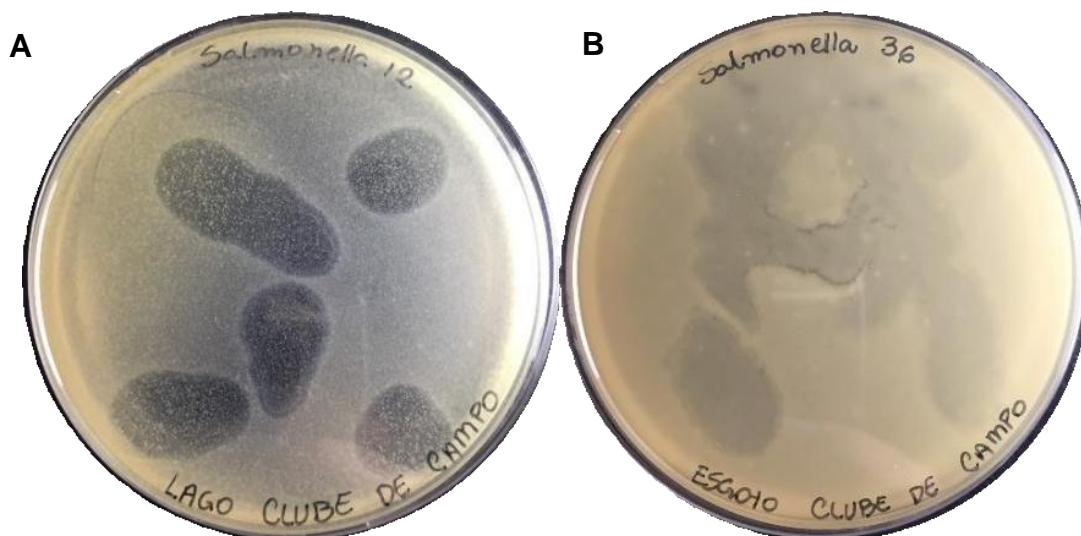
*Salmonella* spp. é um patógeno prevalente que causa grande preocupação em saúde pública em todo o mundo e o uso de bacteriófagos, entre outras possibilidades, surgiu como uma alternativa aos antibióticos para inibir o crescimento de *Salmonella* spp. (Wessels *et al.*, 2021). Neste sentido, a busca por bacteriófagos para o combate a *Salmonella* spp. em granjas pode ser interessante.

O uso de bacteriófagos é bastante versátil. Eles podem ser aplicados para combater infecções em humanos e animais, atuar como agentes de biocontrole em plantas ou alimentos, e até mesmo em biossensores. No entanto, todas essas aplicações seguem etapas de trabalho semelhantes, sendo isolamento, purificação, caracterização e, se possível, a análise do genoma. Os bacteriófagos são a forma de vida mais abundante na Terra e podem ser encontrados em quase todos os habitats, como solo, água e alimentos.

A escolha da fonte ambiental para o isolamento é baseada em um princípio simples, os fagos são encontrados onde seus hospedeiros bacterianos estão presentes. O solo é uma fonte ideal porque contém uma grande diversidade e quantidade de bactérias, o que aumenta a chance de encontrar fagos (Abdelsattar *et al.*, 2022; Santos, 2025). Por isso, coletou-se uma amostra de solo próximo às criações de frangos, com o objetivo de isolar fagos líticos específicos contra a bactéria *Salmonella*, que é um patógeno comum nesse tipo de ambiente. Na sequência, foram realizadas as etapas de enriquecimento da amostra, *spot test*, ampliação, purificação e determinação do título fágico.

Para a detecção de bacteriófagos em amostras ambientais, as mesmas foram submetidas a um processo de enriquecimento, seguido da realização do *spot test* sobre um tapete bacteriano. A formação de halos translúcidos nas áreas de inoculação indicou a presença de fagos líticos. Foram isolados três (3) fagos líticos para *Salmonella* spp. 12 e três (3) para *Salmonella* spp. 36. Contudo, considerando a morfologia das placas (placas claras, não turvas), título elevado e sua estabilidade de propagação no laboratório (Weber-Dąbrowska *et al.*, 2016) foram selecionados dois (2) bacteriófagos, para os ensaios seguintes. A Figura 11 apresenta imagens de halos de lise dos fagos isolados e selecionados, tendo como hospedeiras as bactérias oriundas das amostras 12 e 36.

**Figura 11** - Spot-tests para *Salmonella* spp. tendo como hospedeiras as bactérias isoladas das amostras 12 e 36



**Legenda:** As amostras para isolamento dos fagos líticos contra *Salmonella* spp. 12 (A) e *Salmonella* spp. 36 (B) foram coletadas em: **A**= lago do Clube de Campo Sorocaba (23°29'37.63"S, 47°26'46.89"W); **B** = esgoto do Clube de Campo Sorocaba (23°31'14.30"S, 47°29'13.53"W)

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Os bacteriófagos selecionados, para dar segmento aos experimentos, foram os isolados das amostras de lago e esgoto, cujas coordenadas são 23°28'54.43" S, 47°25'48.19" W e 23°28'52.24" S, 47°25'43.12" W, respectivamente. A denominação dos mesmos se deu de acordo com as orientações de Adriaenssens e Brister (2017). O bacteriófago isolado tendo como bactéria hospedeira *Salmoellella* ssp. extraída da amostra 12 foi denominado *Salmonella* phage Vb\_SentM\_S $\phi$ 12 ou simplesmente SENT-12A. O bacteriófago isolado tendo como bactéria hospedeira *Salmonella* ssp. obtida da amostra 36 foi denominado *Salmonella* phage Vb\_SentM\_S $\phi$ 36 ou simplesmente SENT-36A.

Para a amplificação, isto é, para o aumento do número de células viáveis, a estratégia mais adequada consiste no uso das bactérias hospedeiras. Contudo, a escolha da técnica de purificação ideal para os bacteriófagos pode variar conforme a aplicação pretendida. No presente estudo, empregou-se centrifugação em baixa velocidade associada ao uso de clorofórmio (0,1–1% v/v) (Abdelsattar *et al.*, 2022). Embora a metodologia não promova a remoção de endotoxinas, o processo é apropriado para aplicações voltadas ao biocontrole.

A quantificação de fagos em amostras biológicas, por meio da determinação do título fágico, constitui uma etapa fundamental na condução de pesquisas envolvendo bacteriófagos. O título fágico permite estimar a quantidade de partículas fágicas presentes

em suspensões concentradas após os processos de purificação. A enumeração de fagos é essencial tanto para a produção e o desenvolvimento de produtos baseados em bacteriófagos quanto para sua aplicação em fagoterapia e em estratégias de biocontrole na área de alimentos (Ács et al., 2020). Além disso, o título de bacteriófagos é um dos fatores que podem influenciar diretamente sua eficácia na terapia fágica, uma vez que o uso terapêutico requer elevados títulos de fagos líticos, geralmente próximos a  $10^9$  UFP/mL (Artawinata et al., 2023).

Os métodos laboratoriais baseados em cultivo em placa são geralmente preferidos, pois permitem a visualização e a contagem de unidades formadoras de placas (UFPs) (Vaz et al., 2024). Entre esses, destaca-se o método clássico do ensaio de dupla camada de ágar, que é praticado no nosso laboratório.

No presente trabalho obteve-se títulos de  $5,43 \times 10^{15}$  para o bacteriófago denominado SENT-12A e  $1,40 \times 10^{13}$  para o SENT-36A, adequados para vários propósitos.

## **5.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS BACTERIÓFAGOS**

Os bacteriófagos são a “matéria escura” do universo biológico devido à sua vasta diversidade genética e à grande quantidade de genes com funções desconhecidas. Presentes em diversos ambientes, eles formam uma população antiga e dinâmica, porém pouco se sabe sobre suas relações evolutivas e filogenéticas. Para melhor compreendê-los, diferentes características físicas e biológicas são avaliadas, como morfologia estrutural, tipo de material genético, espectro de hospedeiros e ciclo de vida. Esses dados são essenciais para classificá-los e para aplicações em terapia fágica, biocontrole e biotecnologia (Pope et al., 2015).

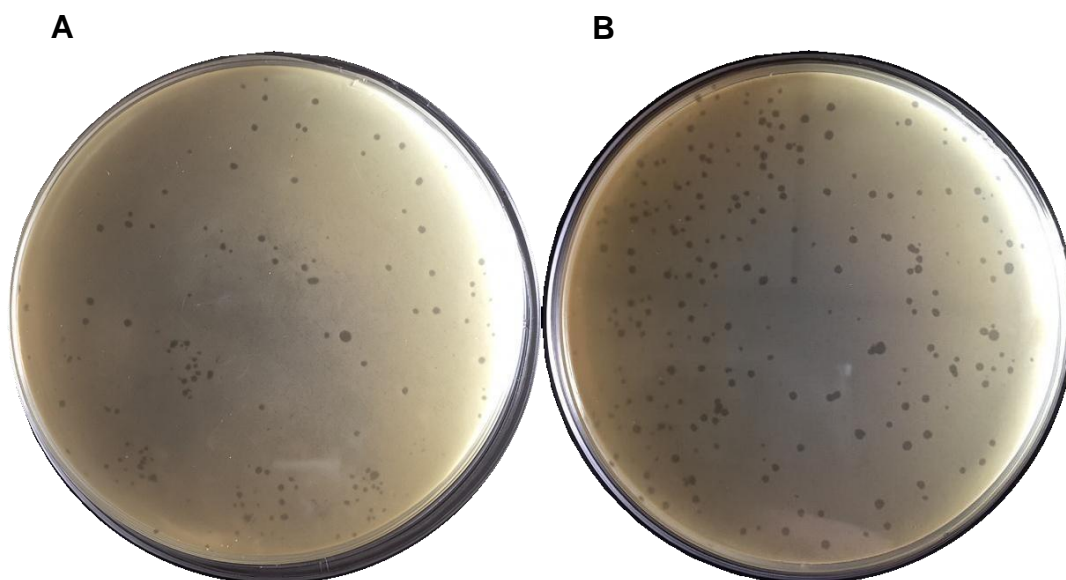
### **5.5.1 Observação da morfologia das placas de lise**

A técnica de sobreposição dupla em ágar é um ensaio clássico, de baixo custo e fácil execução, utilizado para determinar a concentração de fagos em uma amostra e analisar a morfologia das placas formadas pela sua atividade sobre bactérias hospedeiras. Nesse método, os fagos são misturados às bactérias em um meio de ágar de baixa concentração (ágar mole), que é então sobreposto a uma camada de ágar sólido em placa de Petri.

Após a incubação, as placas de lise resultantes tornam-se visíveis, possibilitando a quantificação dos fagos e a observação de diferentes padrões morfológicos. Essas informações são valiosas para a caracterização e diferenciação entre bacteriófagos (Ramesh *et al.*, 2019). A Figura abaixo (Figura 12) apresenta as placas dos bacteriófagos isolados.

O fago SENT-12A, produziu placas de diâmetro em torno de 1,2 mm, algumas apresentando bordas difusas e menos translúcidas. Já o fago SENT-36A produziu placas fágicas menores (diâmetro entre 1,0 a 0,7mm), com bordas bem definidas e aspecto translúcido.

**Figura 12** - Placas de Petri com halos de lise dos bacteriófagos isolados



**Legenda:** A – Fago SENT-12A; B – Fago SENT-36A

**Fonte:** Elaboração própria.

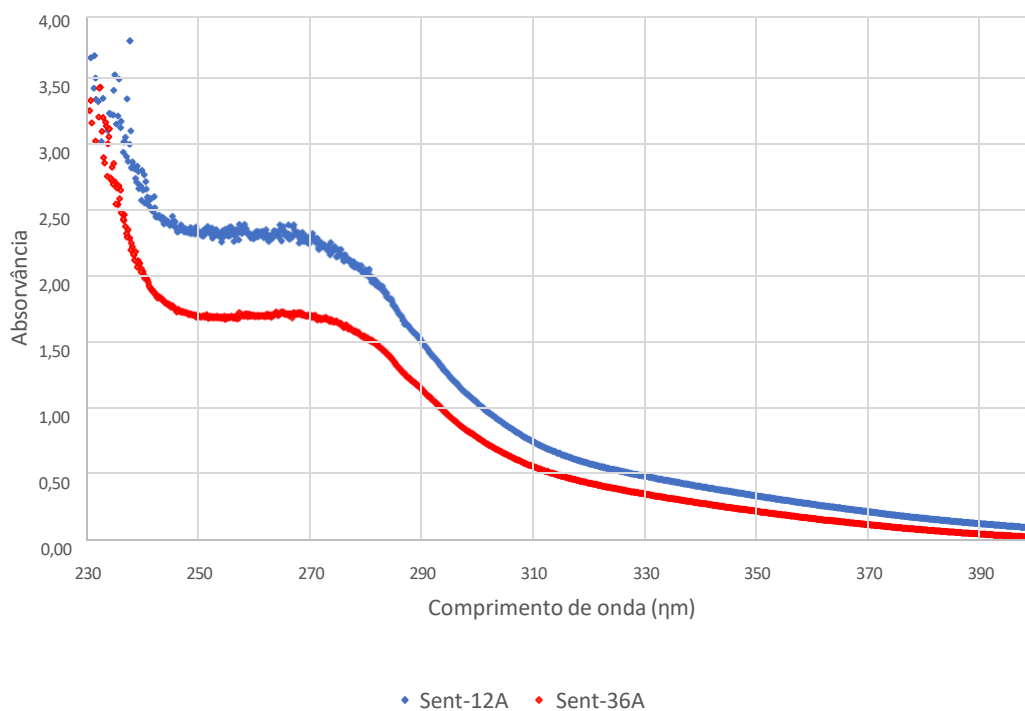
### 5.5.2 Varredura espectral UV-VIS e coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ )

A análise espectral na faixa UV-Vis permite diferenciar bacteriófagos com base em seus cromóforos. Os cromóforos são grupos químicos ou regiões de uma molécula capazes de absorver energia luminosa e, quando excitados, podem induzir alterações conformacionais que possibilitam a distinção entre diferentes moléculas (Shukla *et al.*, 2012). As proteínas estruturais dos bacteriófagos são as principais contribuidoras para o espectro de absorção na faixa UV. O coeficiente de extinção molar também é uma característica físico-química que diferencia os bacteriófagos entre si (Santos, 2025)

As curvas das varreduras espectrais dos fagos SENT-12A e SENT- 36 A estão disponibilizadas na Figura 13. A absorvância máxima do fago SENT-12A foi em torno de 257 nm e a mínima próxima a 240nm, o que é um indicativo de ausências de *debris* oriundos de células bacterianas. A varredura espectral do fago SENT- 36A indicou pico máximo de absorvância em aproximadamente 264 nm e mínimo em torno de 240 nm, valores que também sugerem a ausência de detritos provenientes de células bacterianas.

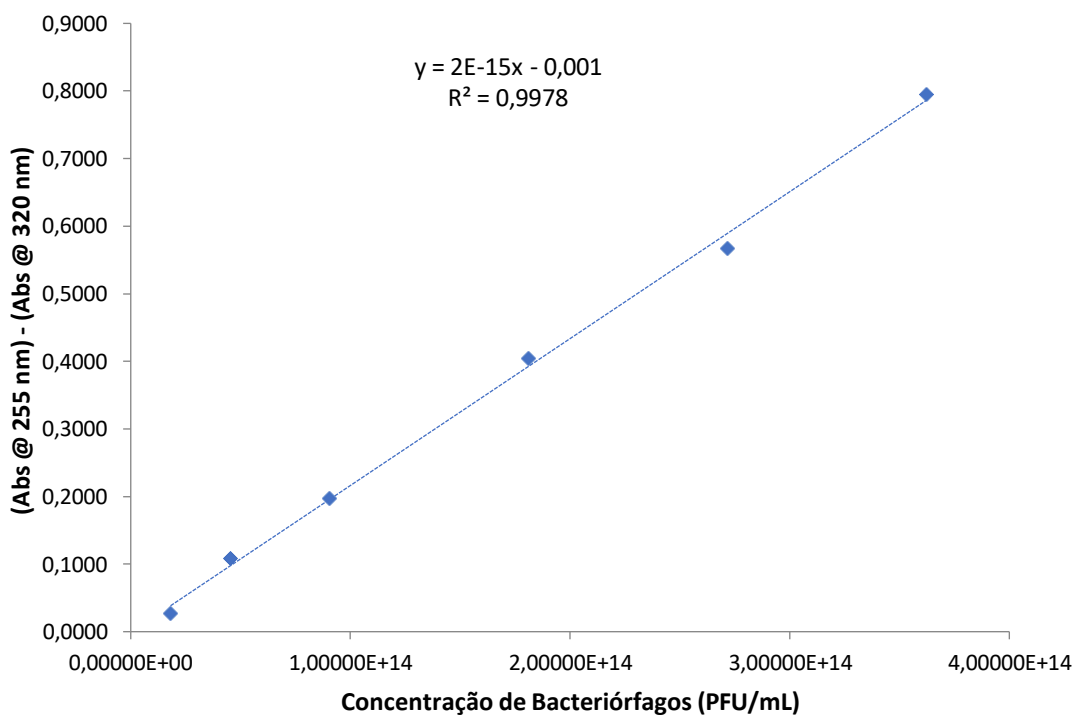
O coeficiente de extinção molar do fago SENT-12A está apresentado na Figura 14, sendo calculado em  $2,168 \times 10^{-15} \text{ (UFP/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A Figura 15 mostra o coeficiente de extinção molar do fago SENT-36A estimado em  $1,067 \times 10^{-12} \text{ (UFP/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Figura 13** - Espectro de absorção na região UV-Vis obtido para o bacteriófago SENT-12A e SENT-36A

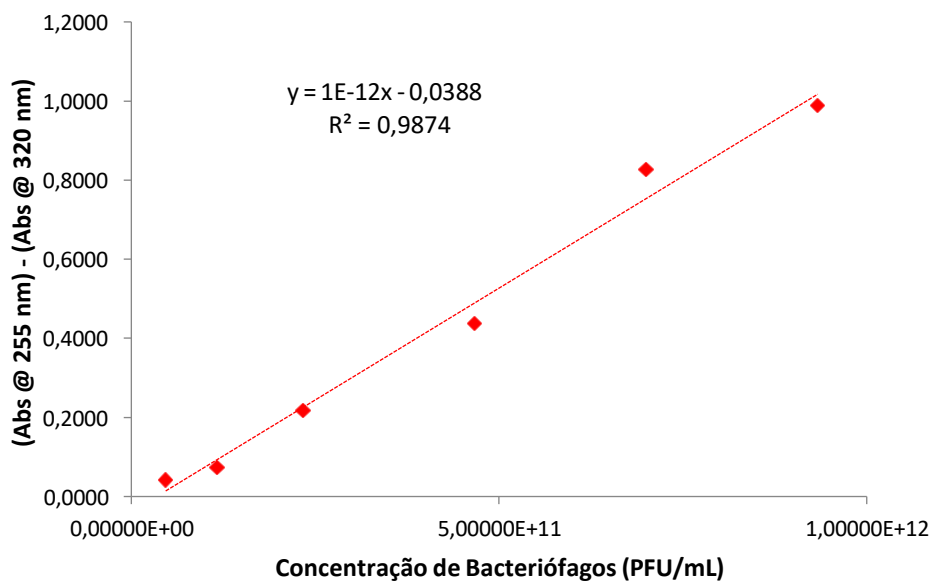


**Legenda:** — Espectro de absorção na região UV-Vis obtido para o bacteriófago SENT-12A; — Espectro de absorção na região UV-Vis obtido para o bacteriófago SENT-36A.

**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 14** - Curva de extinção molar ( $\epsilon$ ) do bacteriófago SENT-12A

Fonte: Elaboração própria

**Figura 15** - Curva de extinção molar ( $\epsilon$ ) do bacteriófago SENT-36A

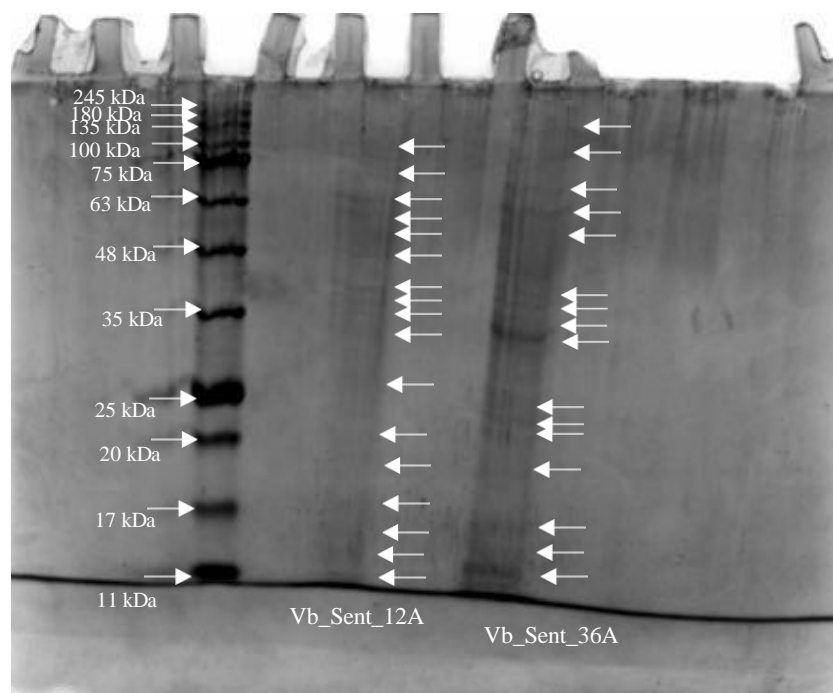
Fonte: Elaboração própria

### 5.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE (do inglês SDS - sodium dodecyl sulfate \ PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis) é uma técnica muito usada na separação e análise de proteínas estruturais dos bacteriófagos com base em seu peso molecular, permitindo a visualização de proteínas com baixas concentrações. O SDS desnatura as proteínas e confere uma carga negativa uniforme, permitindo que elas migrem no gel. Através dessa técnica é possível realizar estudos bioquímicos, identificando a pureza, o peso molecular e análise de expressão gênica em diferentes condições experimentais (Oliveira *et al.*, 2015). Portanto, essa é uma técnica essencial para a diferenciação de bacteriófagos.

Na Figura 16, é possível ver que os fagos isolados apresentam diferentes perfis protéicos, como bandas distribuídas em distintas faixas de peso molecular, variando de 11 a 135 kDa. A presença de múltiplas bandas indica a complexidade estrutural fágica, indicando que cada isolado possui um conjunto característico de proteínas estruturais.

**Figura 16** - Imagem de gel de eletroforese SDS-PAGE após coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 com as bandas das proteínas estruturais dos bacteriófagos e as bandas das proteínas dos marcadores de peso



**Lengenda:** kDa: kilodalton.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

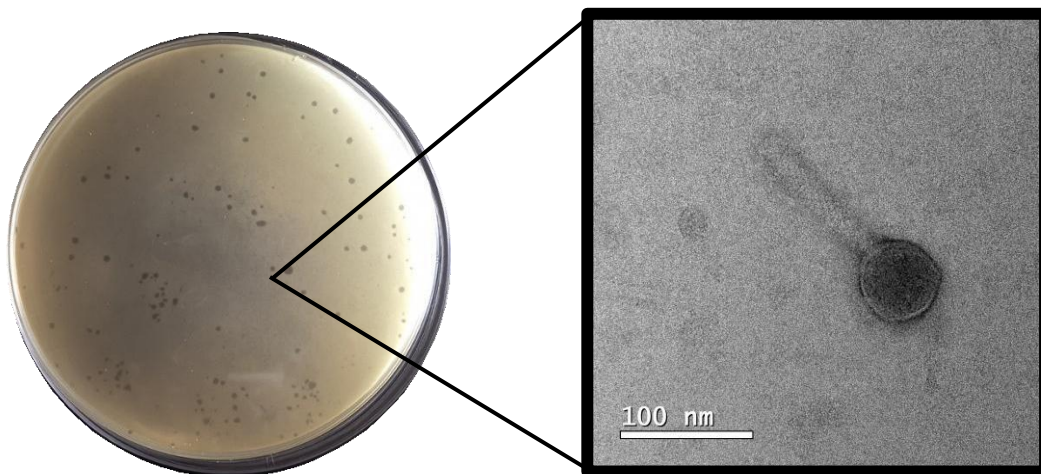
#### 5.5.4 Determinação das características morfológicas dos bacteriófagos por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os bacteriófagos são diferenciados com base em diversas características físico-químicas e biológicas, sendo a morfologia, observada por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET), uma das mais relevantes (Thung *et al.*, 2018). A MET colabora com a classificação de fagos, sendo a natureza do bacteriófago deduzida pela morfologia viral (Aprea *et al.*, 2015).

O método utilizado para a visualização foi por microscopia de transmissão eletrônica por coloração negativa. É um método simples para examinar partículas virais isoladas, na qual uma gota da suspensão de bacteriófagos é espalhada sobre um suporte e, em seguida, incorporada em uma solução de sal de metal pesado, tipicamente acetato de uranila. O método é chamado de coloração negativa porque a forma macromolecular é vista pela exclusão do corante, e não pela ligação do corante (Orlova, 2019).

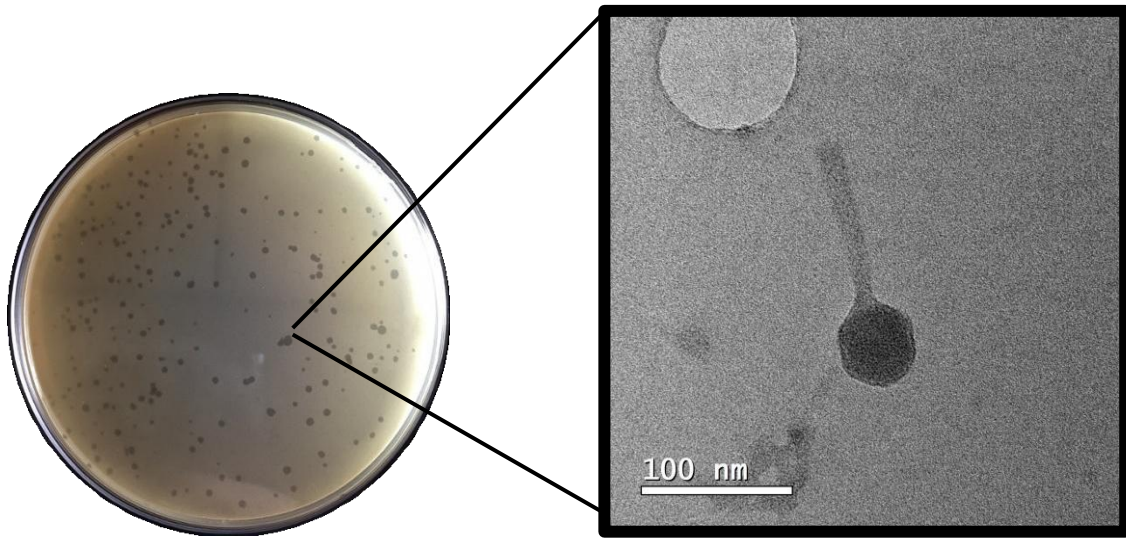
As Figuras 17 e 18 apresentam fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos bacteriófagos isolados. Pelas imagens ambos pertencem à classe Caudoviricetes, uma vez que apresentaram cauda longa e contrátil (Turner *et al.*, 2023).

**Figura 17** - Microfotografia do fago isolado para a bactéria hospedeira a *Salmonella* spp. 12 por microscopia eletrônica de transmissão



**Fonte:**Elaboração própria

**Figura 18** - Microfotografia do fago isolado para a bactéria hospedeira a *Salmonella* spp. 36 por microscopia eletrônica de transmissão



Fonte:Elaboração própria

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DO BACTERÍOFAGO

A diversidade dos bacteriófagos é considerada extremamente ampla, embora ainda haja conhecimento limitado a seu respeito. Dessa forma, a caracterização morfológica, físico-química e biológica desses vírus constitui um conjunto de parâmetros fundamentais para sua aplicação em diferentes áreas biotecnológicas (Jurczak-Kurek *et al.*, 2016).

### 5.6.1 Determinação da gama de hospedeiros (*host range*) e da eficiência de plaqueamento (EOP)

Bacteriófagos são parasitas obrigatórios de bactérias, caracterizados pela amplitude de hospedeiros que podem infectar. Essa “gama de hospedeiros” depende tanto dos genótipos e morfologias do fago e do hospedeiro bacteriano, quanto do ambiente em que interagem. A gama de hospedeiros corresponde à diversidade taxonômica de bactérias que um fago é capaz de infectar com sucesso e, constitui uma das características centrais a serem compreendidas nesses vírus (Holtappels *et al.*, 2019). Essa especificidade é determinada por uma série de interações moleculares entre o fago e o hospedeiro ao longo do ciclo de infecção. Embora muitos fagos-modêlo bem estudados apresentem uma gama

estreita de hospedeiros, estudos ecológicos e metagenômicos recentes têm revelado que existem fagos com especificidades variando de altamente restritas até relativamente amplas (Jonge *et al.*, 2019). Enquanto alguns fagos podem infectar apenas uma ou algumas cepas bacterianas, outros podem infectar muitas espécies ou até mesmo bactérias de diferentes gêneros (Ross *et al.*, 2016). Há muitas pesquisas voltadas à compreensão dos mecanismos moleculares que permitem a infecção de múltiplos hospedeiros, bem como de sua evolução. Esses mecanismos são fundamentais para esclarecer o papel ecológico dos fagos em comunidades microbianas naturais e, ao mesmo tempo, avaliar sua utilidade em diferentes contextos de aplicação, como na terapêutica, na indústria e na biotecnologia (Jonge *et al.*, 2019).

A tabela abaixo (Tabela 10) apresenta o *rost range* e a eficiência de plaqueamento (EOP) dos bacteriófagos isolados. A eficiência de plaqueamento é a razão entre o número de placas observadas em um determinado hospedeiro e o número de placas observadas em um hospedeiro de referência. Embora houve a formação de halos de lise por ação dos fagos em contato com algumas bactérias (*P. aeruginosa* por ambos os fagos e *S. agalactiae* pelo fago SENT-36A) não podem ser considerados fagos eficientes. Considerando os valores de eficiência de plaqueamento obtidos, e que i)  $EOP = 1 \rightarrow$  vírus/plasmídeo tem a mesma eficiência no hospedeiro testado e no de referência; ii)  $EOP < 1 \rightarrow$  há menor eficiência (menos placas formadas) e; iii)  $EOP \approx 0 \rightarrow$  o vírus praticamente não consegue infectar esse hospedeiro, pode-se afirmar que o fago SENT-12A é ineficiente para *Pseudomonas aeruginosa* e com eficiência moderada para *Streptococcus agalactiae*, assim como fago SENT-36A é ineficiente para a *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tabela 10** - Determinação da gama de hospedeiros do bacteriófago isolado (*host range*) e da sua eficiência de plaqueamento (EOP) em cepas bacterianas suscetíveis

| Cepa bacteriana  | Fago SENT-12A<br>(5,43x10 <sup>15</sup> ) |                       |         | Fago SENT-36 <sup>a</sup><br>(1,40x10 <sup>13</sup> ) |                      |         |
|--|---|-----------------------|---------|---|----------------------|---------|
|  | <i>Host range</i>                         | EOP                   | %       | <i>Host range</i>                                     | EOP                  | %       |
| <i>Salmonella enterica</i><br>(CCCD-S004)                      | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Escherichia coli</i><br>(CCCD-E003)                         | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Escherichia coli</i><br>(CCCD-E004)                         | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Enterococcus faecalis</i><br>(CCCD-E002)                    | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>(CCCD-P004)                   | (+)                                       | 3,76x10 <sup>5</sup>  | <0,001% | (+)   | 4,01x10 <sup>5</sup> | <0,001% |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>(DSM-19871)                   | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Streptococcus agalactiae</i><br>(CCCD-S015)                 | (+)                                       | 3,14x10 <sup>11</sup> | 0,6%    | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>(CCCD-K001)                    | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Enterococcus cloacae</i><br>(CCCD-E010)                     | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Proteus mirabilis</i><br>(CCCD-P001)                        | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>(CCCD-S009)                    | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Acinetobacter baumannii</i><br>(ATCC-19606)                 | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv.<br><i>garcae</i> (IBSBF- 152)  | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv.<br><i>garcae</i> (IBSBF- 2212) | (-)                                       | (-)                   |         | (-)   | (-)                  |         |

**Legenda:** IBSBF - Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico do Estado de São Paulo; ATCC - American Type Culture Collection; CCCD- Coleção de Cultura Cefar Diagnóstica; (-): Zona sem lise; (+): Zona com lise.

**Fonte:** Elaboração própria

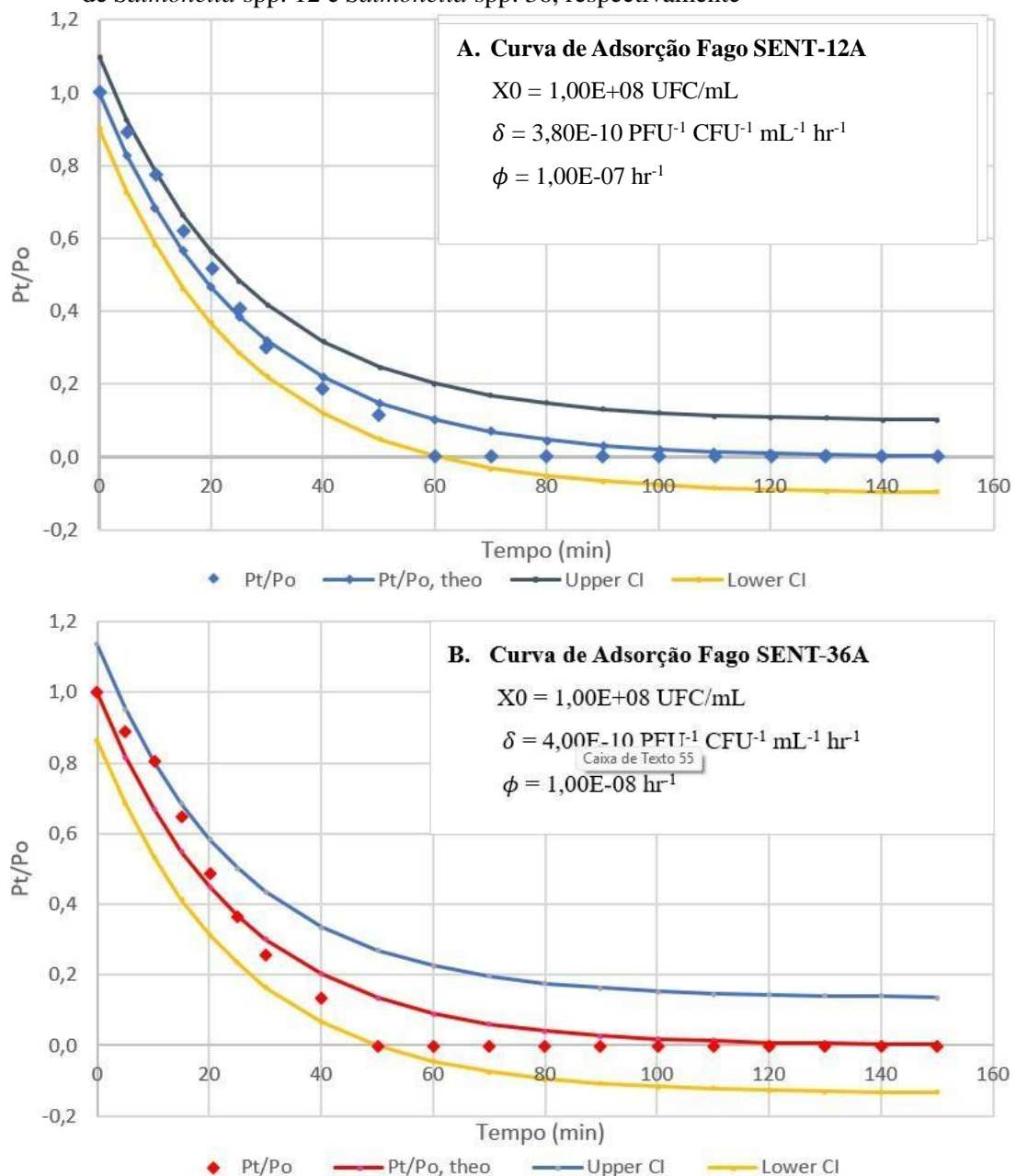
### 5.6.2 Curva de adsorção das células bacterianas hospedeiras

O primeiro passo da infecção por um bacteriófago (fago) é a fixação do vírion à bactéria hospedeira suscetível. Esse processo de adsorção é geralmente descrito pela cinética de ação de massa, que pressupõe, de forma implícita, que tanto a densidade do hospedeiro quanto a taxa de adsorção influenciam igualmente a eficiência do processo. Essa forma é fundamental para determinar a eficiência de infecção e o potencial lítico do fago, uma vez que, cepas de fagos com maior taxa de adsorção teriam um tempo de lise ideal mais curto e vice-versa (Shao; Wang, 2008).

Os resultados obtidos (Figura 19) demonstraram que as partículas do bacteriófago SENT-12A foram totalmente adsorvidas às células de *Salmonella* spp. 12

após 60 min de contato, enquanto o bacteriófago SENT-36A apresentou adsorção completa em 50 min. A taxa de adsorção, determinada por ajuste não linear, foi de  $3,80 \times 10^{-10} \text{ UFP}^{-1} \cdot \text{UFC}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para o fago SENT-12A e  $4,00 \times 10^{-10} \text{ UFP}^{-1} \cdot \text{UFC}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para o fago SENT-36A.

**Figura 19** - Curva de adsorção dos fagos SENT-12A(A) e SENT-36A(B) nas células bacterianas de *Salmonella* spp. 12 e *Salmonella* spp. 36, respectivamente



**Legenda:**  $X_0$  = Concentração inicial de células bacterianas não infectadas;  $\delta$  = Taxa de adsorção das partículas fágicas;  $\phi$  = taxa de dessorção das partículas fágicas dos complexos reversíveis fago-bactéria; Pt/Po= proporção de fagos em relação ao total inicial; Theo= curva teórica; Upper CI= limite superior; Lower CI= limite inferior.

**Fonte:** Elaboração própria.

Esses resultados indicam que ambos os fagos apresentaram alta capacidade de reconhecimento e ligação às células hospedeiras, embora o fago SENT-36A tenha demonstrado cinética de adsorção ligeiramente mais rápida. Diferenças nesse parâmetro podem estar associadas à variação na densidade ou acessibilidade dos receptores bacterianos, bem como à estrutura das fibras caudais e outras proteínas envolvidas na ancoragem (Ge *et al.*, 2023).

A taxa de adsorção observada para ambos os fagos está dentro da faixa relatada para fagos líticos de *Salmonella* spp., que geralmente varia entre  $10^{-8}$  e  $10^{-11}$  mL·min<sup>-1</sup>·UFC<sup>-1</sup>. Esses resultados assemelham-se com o estudo de Pereira (2023), que isolou dois bacteriófagos para *Salmonella enterica*, ambos se comportando de maneira muito similar. Isso reforça que os fagos isolados neste estudo apresentam afinidade adequada aos receptores bacterianos, característica desejável para potenciais aplicações biotecnológicas e terapêuticas.

Além disso, o tempo relativamente curto de adsorção completa ( $\leq 60$  min) sugere que o processo ocorre de forma eficiente, permitindo rápida iniciação do ciclo lítico (Ge *et al.*, 2023). Essa característica é relevante, especialmente em contextos de biocontrole, nos quais fagos com adsorção mais rápida podem resultar em menor tempo de lise bacteriana e maior eficiência de infecção em ambientes complexos (Zemb *et al.*, 2013).

### 5.6.3 Curva em um só ciclo síncrono de crescimento (OSGC)

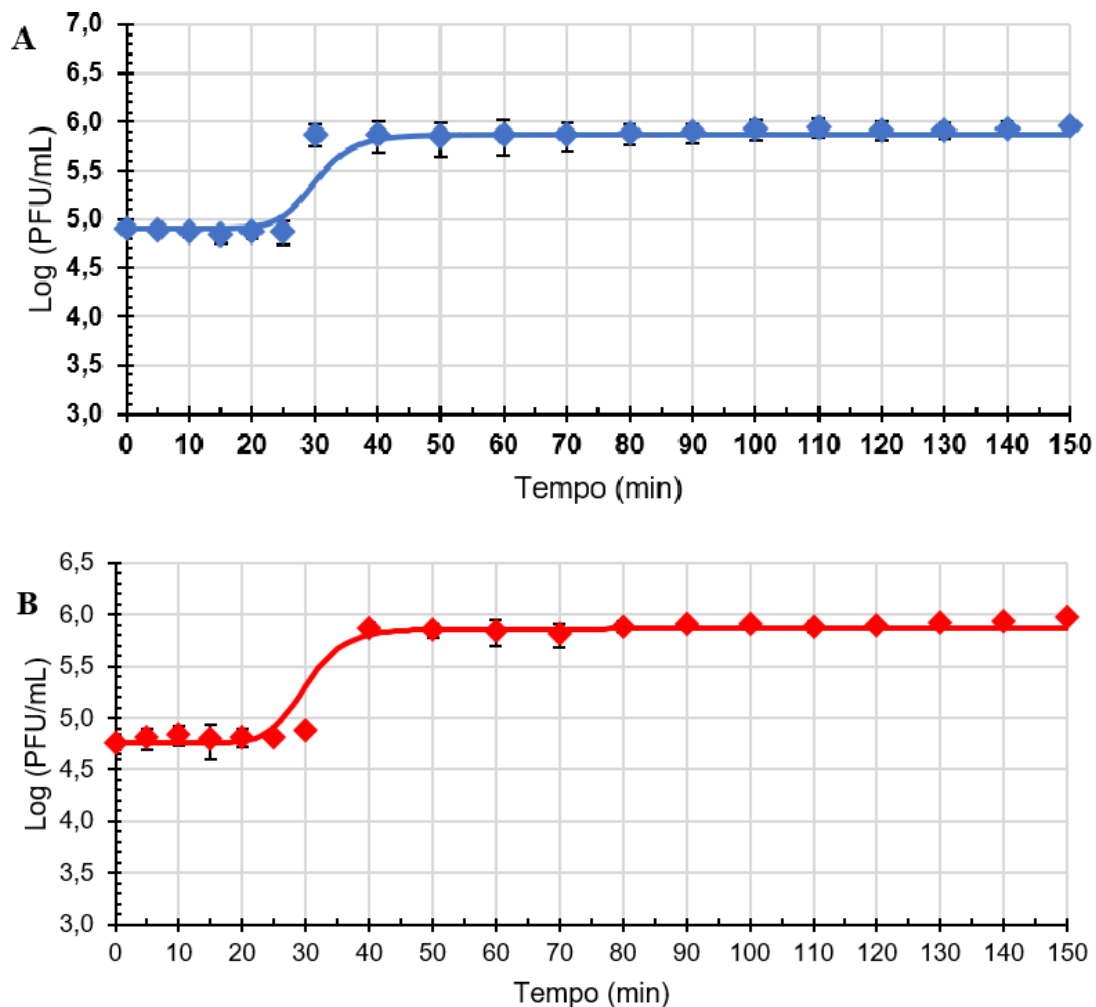
A curva em um só ciclo síncrono de crescimento (OSGC) permite determinar parâmetros do ciclo de vida dos bacteriófagos como o período de eclipse, que consiste no processo de síntese e montagem interna dentro da célula hospedeira, onde não há partículas virais detectáveis fora das células; o período de latência, que é o intervalo de tempo entre infecção e a liberação de novas partículas fágicas e; o *burst size*, que representa o número médio de partículas fágicas produzidas pela célula infectada. Os impactos virais sobre as populações microbianas dependem dos fenótipos de interação, que incluem características virais como a taxa de adsorção, o período latente e o *burst size*, sendo assim, são parâmetros importantes no estudo de bacteriófagos (Dominguez-Mirazo *et al.*, 2024).

Bacteriófagos com longos períodos de latência podem ser menos úteis como fagos terapêuticos. Porém, é válido ressaltar que taxas de crescimento em laboratório

podem não refletir com precisão as taxas de crescimento em pacientes, biofilmes ou outros locais de potencial aplicação terapêutica (Hyman, 2019).

O bacteriófago SENT-12A (Figura 20 A) apresentou período de eclipse de 25 min, período de latência de 30 min; período de acumulação intracelular (diferença entre período latente e período de eclipse) de 5 min; e produziu 9,87 bacteriófagos/célula hospedeira. Já o bacteriófago SENT-36A (Figura 20 B) apresentou período de eclipse de 25 min; período de latência de 40 min; período de acumulação intracelular (diferença entre período latente e período de eclipse) de 15 min; e produziu 9,64 bacteriófagos/célula hospedeira.

**Figura 20** - Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) do bacteriófago SENT-12A (A) e SENT-36A (B) em cultura com crescimento em fase exponencial de *Salmonella* spp. 12 e *Salmonella* spp. 36, respectivamente



**Legenda:** PFU/ mL = Plaque Forming Units/mL; min = minutos.

**Fonte:** Elaboração própria

O fago SENT-12A e SENT-36A apresentaram períodos de eclipse bastante semelhantes (25 min), indicando que ambos necessitam de quase meia hora para sintetizar e montar novas partículas fágicas dentro da célula hospedeira. Essa similaridade pode significar que as estratégias de replicação de cada bacteriófago são semelhantes ou dependem das mesmas vias metabólicas no hospedeiro.

Apesar das semelhanças, os períodos de latência são distintos, visto que o fago SENT-36A é mais tardio (40 min) em comparação ao fago SENT-12A (30 min). Esse comportamento pode estar relacionado com a eficiência dos mecanismos de lise, à estabilidade do capsídeo, ou com a afinidade das proteínas líticas com a parede bacteriana. Fagos com períodos de latência mais longos, como o caso, podem sugerir produção de partículas virais mais estruturadas e estáveis, ainda que isso reduza a velocidade de disseminação (Cao *et al.*, 2022).

O *burst size* observado para ambos os bacteriófagos foi semelhante, indicando que apresentam capacidade comparável de produção de novas partículas virais por célula hospedeira. Embora esses valores possam ser considerados modestos, quando comparados aos relatados por Li *et al.* (2024), que caracterizaram um bacteriófago com *burst size* de 495 partículas por célula hospedeira, eles permanecem consistentes com o comportamento replicativo esperado para fagos com características semelhantes. Essa diferença de produção de partículas virais pode estar relacionada às variações nas condições fisiológicas da bactéria durante a infecção. Diversos estudos demonstraram que fatores ambientais, como disponibilidade de nutrientes e taxa de crescimento da célula hospedeira também influenciam diretamente a replicação viral, podendo resultar em *burst sizes* menores e períodos de latência mais longos (Kannoly *et al.*, 2022; Lisac; Podgornik, 2025). Dessa forma, os valores observados refletem a adaptação do ciclo de replicação fágica às condições experimentais empregadas, sem que isso indique redução de eficiência biológica.

Pereira (2023) descreveu valores semelhantes de tempo de latência e *burst size* em fagos isolados contra *Salmonella enterica*, observando-se, desta forma, consistência entre os resultados. Essa concordância reforça a hipótese de que tais parâmetros se encontram dentro das faixas esperadas para fagos líticos que atuam sobre essa espécie bacteriana. Essa convergência de dados sugere que os bacteriófagos isolados neste estudo apresentam potencial para integrar formulações de biocontrole de *Salmonella* spp. em alimentos e/ou ambientes avícolas.

#### 5.6.4 Curvas de inativação bacteriana *in vitro* a vários valores de MOI

A multiplicidade celular de infecção (MOI) é um parâmetro essencial para descrever as interações entre vírions e células hospedeiras e prever a dinâmica de infecções. Especificamente, multiplicidade celular de infecção indica a razão entre concentração de vírus por concentração de células bacterianas. Nesse sentido, os ensaios de inativação bacteriana *in vitro* em diferentes MOI permitem indicar em quais proporções os bacteriófagos apresentam maior eficiência frente à bactéria-alvo (Zwart *et al.*, 2013).

Considerando as duas cepas distintas de *Salmonella* spp. e um fago específico para cada uma delas, os experimentos foram conduzidos individualmente nos MOI 0,01, 1, 10 e 100. Posteriormente, os mesmos ensaios foram realizados utilizando a combinação das bactérias em coquetel e dos respectivos fagos, também em coquetel, a fim de avaliar o comportamento dos microrganismos em condições de interação.

Os resultados estão representados na Figura 21 (bacteriófago SENT-12A em *Salmonella* spp. 12), na Figura 22 (bacteriófago SENT-36A em *Salmonella* spp. 36) e na Figura 24 (coquetel de fagos e bactérias).

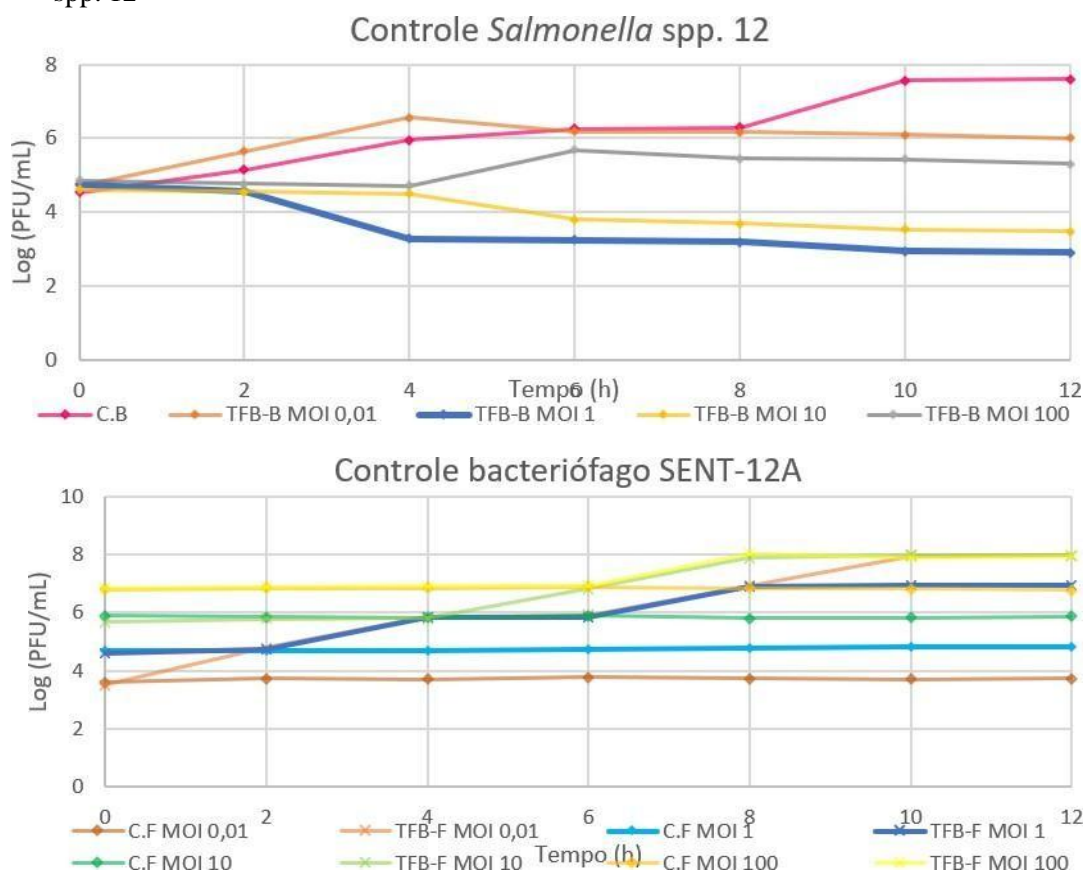
Observou-se que, tanto nos ensaios individuais quanto nos realizados em coqueteis, o MOI 1 apresentou a melhor inativação bacteriana. Isso indicou que proporções equivalentes entre fagos e bactérias favoreceram o contato fago-hospedeiro e otimizaram a lise celular.

Valores muito baixos de MOI, como 0,01, tendem a resultar em menor taxa de infecção inicial, retardando a lise populacional (Abedon, 2011). Enquanto em valores elevados de MOI (100), a redução da eficiência da infecção fágica pode estar relacionada a um fenômeno conhecido como *lysis from without* (Abedon, 2011; Panteleev; Kulbachinskiy; Gelfenbein, 2025). Nessa condição, múltiplas partículas fágicas adsorvem simultaneamente à superfície de uma mesma célula bacteriana, promovendo danos extensivos à membrana celular e levando à morte bacteriana antes que o ciclo replicativo do fago seja completo (Hyman; Abedon, 2009; Adebbon, 2011). Como consequência, embora ocorra a inativação bacteriana, não há produção efetiva de novos vírions, o que compromete a amplificação fágica no sistema e reduz a eficiência global da infecção. Esse tipo de lise não produtiva tem sido amplamente descrita em situações de MOI elevados e representa um fator limitante para estratégias de biocontrole baseadas em altas doses iniciais de bacteriófagos (Hyman; Abedon, 2009; Adebbon, 2011).

A superioridade do MOI 1 observada nesse estudo está de acordo com os modelos teóricos e experimentais que indicam que MOIs intermediários frequentemente maximizam a eficiência de inativação bacteriana, ao permitir uma disseminação progressiva da infecção fágica por meio de múltiplos ciclos líticos (Chen *et al.*, 2025). Esse comportamento é particularmente relevante em sistemas aplicados ao biocontrole, nos quais a manutenção da atividade fágica ao longo do tempo pode ser mais vantajosa do que uma infecção inicial excessivamente agressiva (Wiebe *et al.*, 2024).

Dessa forma, os resultados obtidos contribuem para o entendimento da dinâmica de infecção fágica em diferentes condições de multiplicidade de infecção e reforçam a importância da escolha adequada do MOI para o desenvolvimento de estratégias eficazes de biocontrole de *Salmonella* spp., tanto em contextos experimentais quanto em aplicações ambientais e produtivas.

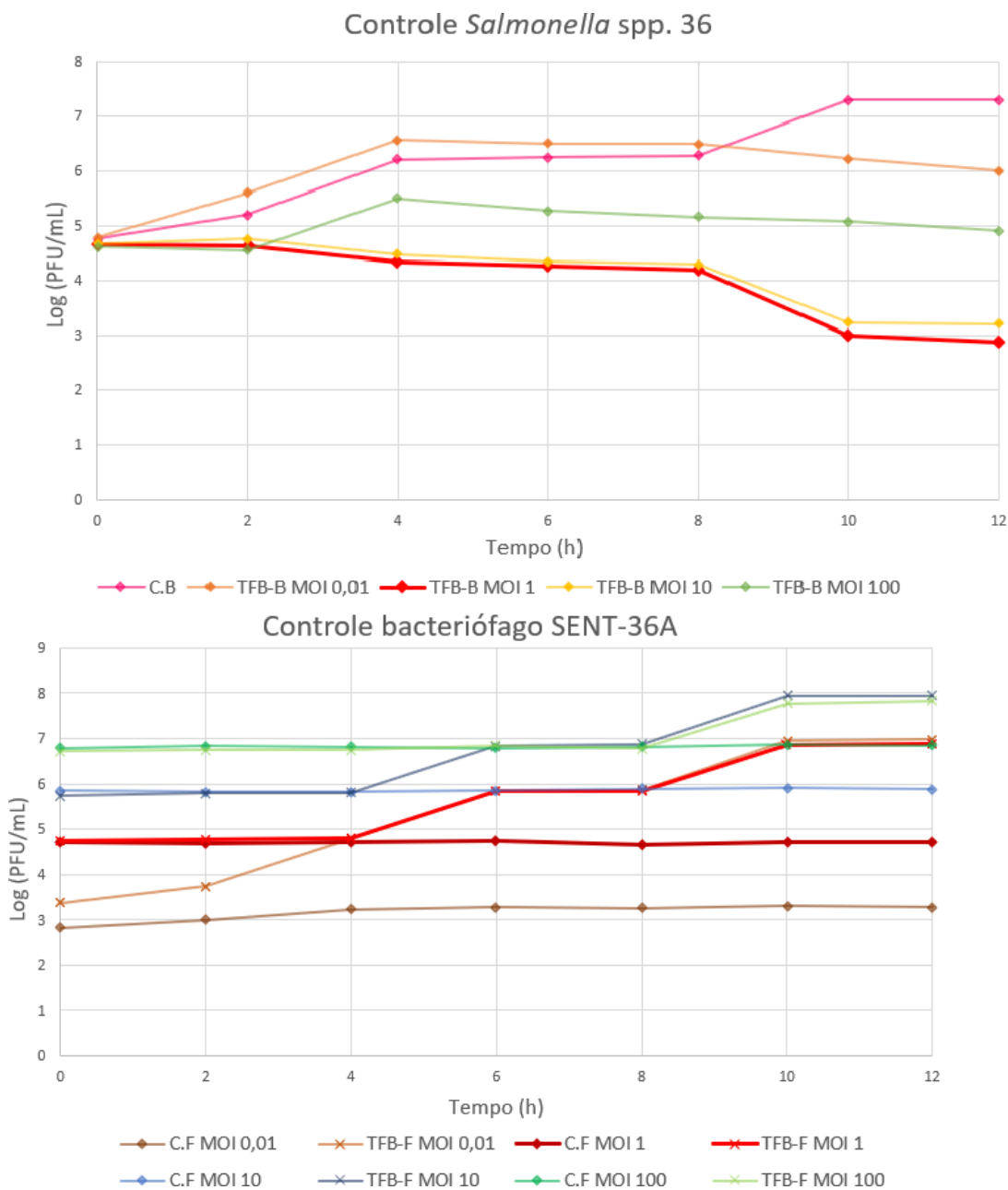
**Figura 21** - Curva de inativação bacteriana *in vitro*. Bacteriófago SENT-12A, bactéria *Salmonella* spp. 12



**Legenda:** C.B = Controle de Bactéria; TBF-B = bactéria mais fago, concentração de bactéria; TBF-F = bactéria mais fago, concentração de fago; CF = Concentração de fago; PFU/ mL = Plaque-Forming Units/mL; h = horas.

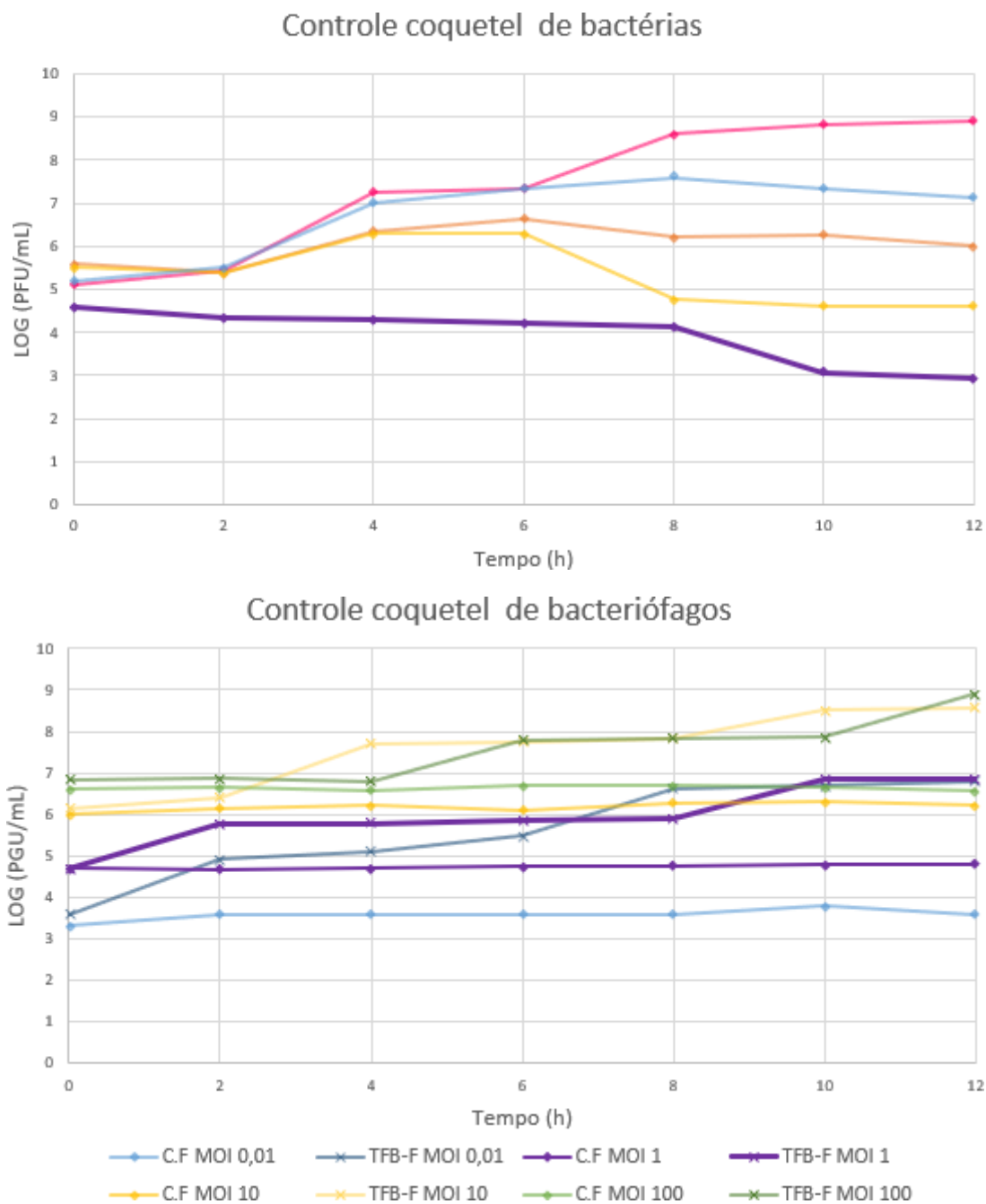
**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 22** - Curva de inativação bacteriana *in vitro*. Bacteriófago SENT-36A, bactéria *Salmonella* spp. 36



**Legenda:** C.B = Controle de Bactéria; TBF-B = bactéria mais fago, concentração de bactéria; TBF-F = bactéria mais fago, concentração de fago; CF = Concentração de fago; PFU/ mL = Plaque-Forming Units/mL; h = horas.

**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 23** - Curva de inativação bacteriana *in vitro* - Coquetel

**Legenda:** C.B = Controle de Bactéria; TBF-B = bactéria mais fago, concentração de bactéria; TBF-F = bactéria mais fago, concentração de fago; CF = Concentração de fago; PFU/ mL = Plaque-Forming Units/mL; h = horas.

**Fonte:** Elaboração própria.

### 5.6.5 Emergência de células bacterianas mutantes resistentes aos fagos

O surgimento espontâneo de bactérias resistentes aos bacteriófagos constitui um fenômeno esperado em ensaios de biocontrole que utilizam esses agentes. Nesse contexto, a determinação da frequência de emergência de mutantes resistentes é fundamental para o monitoramento da eficiência do biocontrole e, para a avaliação da manutenção da capacidade lítica dos fagos ao longo do tempo (Silva; Wolff, 2020).

A resistência bacteriana aos bacteriófagos pode ocorrer por diferentes mecanismos moleculares e fisiológicos. Entre os mais frequentes, destacam-se as estratégias que impedem a adsorção do fago à célula bacteriana, como a modificação, perda ou mascaramento dos receptores presentes na superfície celular. Outros mecanismos incluem a proteção conferida pela formação de biofilmes; o bloqueio da injeção do DNA fágico por meio da expressão de proteínas específicas, como a GP15; e a atuação dos sistemas de restrição-modificação, compostos por endonucleases de restrição associadas a metiltransferases, responsáveis pela degradação do material genético viral não metilado. Adicionalmente, muitas bactérias apresentam sistemas CRISPR-Cas, considerados mecanismos adaptativos de defesa, funcionalmente análogos a um sistema imunológico, capazes de reconhecer e neutralizar infecções fágicas recorrentes. Em bactérias Gram-negativas, mecanismos adicionais podem estar envolvidos, como a liberação de vesículas da membrana externa, capazes de sequestrar partículas fágicas no meio extracelular, reduzindo a eficiência da infecção (Samson *et al.*, 2013; Rostøl; Marraffini, 2019).

No presente estudo, mutantes bacterianos resistentes foram observados após 24 h de incubação. As frequências de emergência foram de  $1,01 \times 10^{-3}$  (0,1015%) para o bacteriófago VB\_Sent12A e de  $0,99 \times 10^{-3}$  (0,0990%) para o bacteriófago VB\_Sent36A. Esses valores encontram-se descritos na Tabela 11 e indicam uma baixa, porém mensurável taxa de emergência de resistência.

**Tabela 11** - Determinação da frequência de emergência espontânea de células bacterianas mutantes resistentes ao bacteriófago

|            | Amostra controle<br>(UFC/mL) | Amostra tratada com<br>bacteriófago<br>(UFC/mL) | Frequência de mutantes<br>bacterianos resistentes ao<br>bacteriófago |
|------------|------------------------------|---|--|
| VB_Sent12A | $4,7 \times 10^9$            | $0,477 \times 10^7$                             | $1,01 \times 10^{-3}$  |
| VB_Sent36A | $4,9 \times 10^9$            | $0,49 \times 10^7$                              | $0,99 \times 10^{-3}$  |

Fonte: Elaboração própria

As baixas frequências observadas indicam que o surgimento espontâneo de resistência ocorre, neste caso, em proporções reduzidas. Esses resultados sugerem que os bacteriófagos avaliados mantêm elevada eficiência lítica frente às populações de *Salmonella* spp., sendo capazes de infectar e lisar a maior parte das células bacterianas sensíveis ao longo do período de incubação de 24 h.

## 6 CONCLUSÃO

O trabalho desenvolvido alcançou seus objetivos ao isolar, caracterizar e avaliar o potencial de bacteriófagos líticos específicos contra cepas de *Salmonella* spp. obtidas na região de Sorocaba/SP, demonstrando a relevância desses fagos como alternativas promissoras para o controle biológico de *Salmonella*. Tal abordagem mostra-se relevante diante do crescente aumento da resistência antimicrobiana e da necessidade de estratégias sustentáveis voltadas à biossegurança alimentar.

A partir das análises genômicas das bactérias isoladas de fezes de frangos, foram identificados genes de resistência a diferentes classes de antibióticos o que reforça a urgência na adoção de alternativas biotecnológicas para o controle de *Salmonella* em contextos produtivos e de saúde pública.

Os resultados obtidos demonstram o potencial de aplicação dos bacteriófagos isolados como agentes de biocontrole de *Salmonella* spp., sobretudo em sistemas avícolas nos quais o uso de antimicrobianos ainda é recorrente. Além disso, o emprego de fagos regionais evidencia a importância da pesquisa aplicada à realidade local, contribuindo para o desenvolvimento de soluções sustentáveis e ambientalmente seguras.

Dessa forma, este trabalho oferece bases para o avanço no desenvolvimento de formulações fágicas voltadas à redução da contaminação bacteriana em cadeias produtivas de alimentos, bem como abre perspectivas para novas investigações sobre sinergismos entre fagos, elaboração de coquetéis personalizados e aplicações em diferentes matrizes alimentares. Em um cenário global de crescente resistência bacteriana, os achados desta pesquisa reafirmam a relevância da fagoterapia como uma estratégia promissora, sustentável e eficaz para o controle de patógenos de importância zoonótica.

## 7 TRABALHOS FUTUROS

O trabalho aqui desenvolvido não contemplou a avaliação de fatores abióticos que podem influenciar a estabilidade e a eficiência dos bacteriófagos, tais como variações de temperatura, pH e exposição à radiação ultravioleta (UV). A análise desses parâmetros é fundamental para a compreensão da viabilidade e da persistência das partículas fágicas em diferentes condições ambientais e industriais. Dessa forma, recomenda-se que estudos futuros incluam a investigação desses fatores, a fim de aprofundar o entendimento sobre o comportamento dos fagos aqui isolados frente a distintas condições físico-químicas, bem como de ampliar a compreensão de seu real potencial de aplicação prática em sistemas de biocontrole.

Além disto, recomenda-se a caracterização genômica dos fagos SENT-12A e SENT-36A, a fim de confirmar a ausência de genes associados à resistência a antibióticos ou à virulência, garantindo segurança para aplicações biotecnológicas.

Torna-se relevante ainda avaliar a eficácia desses fagos em modelos *in vivo* e em diferentes matrizes alimentares, permitindo verificar seu desempenho em condições mais próximas às encontradas nos sistemas produtivos.

Também se destaca a importância de investigar o potencial sinérgico entre fagos e antibióticos, visando maximizar a eficiência de lise bacteriana e reduzir o risco de surgimento de resistência.

Outra linha promissora consiste no estudo de estratégias de imobilização e encapsulamento, com o objetivo de aumentar a estabilidade e a vida útil das formulações fágicas em aplicações comerciais.

Por fim, recomenda-se a ampliação do monitoramento da diversidade fágica regional, de modo a estabelecer bancos de fagos representativos e adaptados às cepas locais de *Salmonella* spp., fortalecendo a base para programas contínuos de biocontrole e vigilância microbiológica.

Pelo exposto, percebe-se que os desafios permanecem expressivos, mas delinham oportunidades promissoras para o desenvolvimento de pesquisas inovadoras.

## REFERÊNCIAS

ABDELSATTAR, A.; DAWOUD, A.; MAKKY, S.; NOFAL, R.; AZIZ, R.; EL-SHIBINY, A. Bacteriophages: From isolation to application. **Current Pharmaceutical**, v.23, n. 3, p.337-360, 2022.

ABEDON, S. T.; Lysis from without. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 46 – 49, 2011.

ÁCS N.; GAMBINO, M.; BRØNDSTED, L. Bacteriophage enumeration and detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 23, n.11, p.594868, 2020 doi: 10.3389/fmicb.2020.594868.

ADRIAENSSENS, E.; BRISTER, J.R. How to name and classify your phage: An informal guide. **Viruses**, v. 9, n.4, p.70, 2017. doi: 10.3390/v9040070.

AGRIMIDIA, 2017. <https://www.agrimidia.com.br/negocios/agroindustrias/tres-municipios-da-regiao-de-sorocaba-se-destacam-no-setor-avicola/> Acesso em: 13 out 2023

AJMERA. A.; SHABBIR, N. Salmonella. [Updated 2023 Aug 8]. *In: StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing;

ALAMOS, C. E. V.; MELLO, S. K. O.; CARDOSO, B. F.; BATISTA, S. B. **Análise da presença de *Salmonella spp.* em maioneses caseiras das regiões universitárias de Cuiabá e Várzea Grande – MT.** Tese (Trabalho de Conclusão de Curso). Centro Universitário de Várzea Grande, UNIVAG, Graduação em Biomedicina, 2018.

ALESSA, O.; AIBA, Y.; ARBHHA, M. HIDAHA, Y.; WATANABE, S.; MIYANAGA, K.; WANNIGAMA, D. L.; CUI, L. Synthetic and functional engineering of bacteriophages: approaches for tailored bactericidal, diagnostic and delivery platforms. **Molecules**, v. 30, n. 15, p. 3132, 2025.

ALMEIRA, A. PERERIRA, C.; MOREIRINHA, C. Phage therapy to inactivate pathogenic bacteria in aquaculture. *In: Global Summit on Aquaculture & Fisheries, Journal of Aquaculture Research & Development.* Kuala Lumpur, 2016.

ALTAMIRANO, F. L. G.; BARR, J. J. Phage therapy in the postantibiotic era. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 10, p. 1128, 2019.

ARTAWINATA, P.C.; LORRAINE, S.; WATURANGI, D.E. Isolation and characterization of bacteriophages from soil against food spoilage and foodborne pathogenic bacteria. **Science Report** v. 13, p. 9282, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36591-6>

ALVES, T. S.; SIQUEIRA, A, K.; FERRAZ, M. M. G.; LEITE, D. S. Identificação e perfil de sensibilidade de *Enterobacter spp.* isolados de leite bovino cru. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n. 1, p. 114 – 122, 2015.

ALVI, I. A.; ASIF, M.; REHMAN, S. U. A single dose of a virulent bacteriophage vB PaeP-SaPL rescues bacteremic mice infected with drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Virus Research**, v. 15, n. 292, p. 198250, 2021.

AMERICAN ACADEMY OF MICROBIOLOGY. **Harnessing the Power of Microbes as Therapeutics: Bugs as Drugs: Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in San Diego, CA, in April 2014.** Washington, DC: American Society for Microbiology, 2014.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE AMCTB NO. PCR – the polymerase chain reaction. **Analytical Methods**. v. 6, n. 2, p. 333 – 336, 2013.

ASWANI, V. H.; SHUKLA, S. K. An early history of phage therapy in the United states: is it time to reconsider? **Clinical Medicine & Research**, v. 19, n. 2, p. 82 – 89, 2021.

APREA, G.; D'ANGELO, A.R.; PRENCIPE, V.A.; MIGLIORATI, G. Bacteriophage morphological characterization by using transmission electron microscopy. **Journal of Life Sciences**, v.9, p. 214-220, 2015.

BAKIN, B. C.; STOLTE-CARROLL, K.; SIGMAN, J.; RITCHIE, S. M.; TILLMAN, G. E.; BILANOVIC, I.; KOWALCYK, B. B. A systematic review on preharvest interventions used to control *Salmonella* in poultry rearing in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 88, n. 4, p.100474, 2025.

BALCÃO, V.M.; BELLINE, B.G.; SILVA, E.C.; ALMEIDA, P.F.F.B.; BALDO, D.Â.; AMORIM, L.R.P.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.M.; VILA, M.M.D.C.; DEL FIOLO, F.S. Isolation and molecular characterization of two novel lytic bacteriophages for the biocontrol of *Escherichia coli* in uterine infections: in vitro and ex vivo preliminary studies in veterinary medicine. **Pharmaceutics** v. 14, n. 11, p. 2344- 2386, 2022a.

BALCÃO, V. M.; MORELI, F. C.; SILVA, E. C.; BELLINE, B. G.; MARTINS, L. F.; ROSSI, F. P. N.; PEREIRA, C.; VILA, M. M. D. C.; DA SILVA, A. M. isolation and molecular characterization of a novel lytic bacteriophage that inactivates MDR *Klebsiella pneumoniae* strains. **Pharmaceutics**, n.14, v.7, p. 1421-1444, 2022b.

BALCÃO, V.M; VILA, M.M.D.C. **Explorando o universo viral dos predadores bacterianos: procedimentos laboratoriais básicos.** E-book, Sorocaba: Eduniso, 2023, 181 p.

BAUCHERON, S.; IMBERECHTS, H.; CHASLUS-DANCLA, E.; CLOECKAERT, A. The *acrB* multidrug transporter plays a major role in high-level fluorquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimrium phage type DT204. **Microbial Drug Resistance**, v. 8, n. 4, p. 281 – 289, 2002.

BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; FICHT, T. A.; ADAMS, L. G. Evolution of host adaptaton in *Salmonella enterica*. **American Society for Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4579 – 4587, 1998.

BENEVIDES, V. P. **Perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* spp. isoladas de aves produtoras de ovos de mesa na região de Bastos-SP.** (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticaba, SP. 2019.

BIOMERIEUX. Manual Galerias API20E. Disponível em [galerias API20E® BioMérieux do Brasil:pdf - Pesquisar](#) Acesso em: 08 ago 2025

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 126 de 03 de novembro de 1995. Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). **Diário Oficial da União**, p. 17694 – 17698, 1995.

BRASIL. **Ministério da Saúde. ProGrama Nacional de DST/AIDS. Técnica de coloração de Gram.** Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2001. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br>. Acesso em: 28 nov 2024.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Módulo 5: Tecnologia em Serviços de Saúde: Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos.** Atualizado em 26/11/2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-5-tecnologias-em-servicos-de-saude-descricao-dos-meios-de-cultura-empregados-nos-exames-microbiologicos/view>. Acesso em: 05 ago 2025

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteccção e Identificação de bactérias de Importância Médica.** In: Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: ANVISA, v. 9, p. 149, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella spp.*: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos.) Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doencas-diarreicas-agudas/manual-tecnico-de-diagnostico-laboratorial-das-salmonella-spp.pdf/view>. Acesso em: 3 jul 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 50, de 24 de setembro de 2013.** Estabelece as normas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 25 set. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe sobre surtos notificados de doenças transmitidas por águas e alimentos – Brasil, 2016 – 2019.** *Boletim epidemiológico*, Brasília, v. 21, n. 32, 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria GM/MS Nº 6.734/2025, de 18 de março de 2025.** Dá nova redação e estabelece diretrizes (ou ementa da portaria). *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 mar. 2025a.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Salmonella (Salmonelose).** Portal da saúde – Saúde de A a Z. 2025b.

BRANDÃO, M. L. L.; UMEDA, N. S.; FILLIPPIS, I. *Cronobacter spp.*: Infecções, ocorrência e regulação em alimentos – uma revisão no Brasil. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 21, 2018.

CAO, S.; YANG, W.; ZHU, X.; LIU, C.; LU, J.; SI, Z.; PEI, L.; ZHANG, L.; HU, W.; LI, Y.; WANG, Z.; PANG, Z.; XUE, X.; LI, Y. Isolation and identification of the broad-

spectrum high-efficiency phage vB\_SalP\_LDW16 and its therapeutic application in chickens. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 386, p. 1 – 13, 2022.

CHANISHVILLI, N. Phage therapy – history from Twort and d’Herelle through Soviet experience to current approaches. **Advances in Virus Research**, v. 83, n. 3, p. 40, 2012.

CHANTHAVONG, V.; VIGAD, N.; PELYUNTHA, W.; YAMIK, D. Y.; VONGKAMJAN, K.; YINGKAJORN, M. CHAISOWWONG, W.; TIPPAYA, K.; TADEE, P.; CHUKIATSIRI. Effectiveness of a single – dose phage cocktail on the reduction of multidrug-resistant *Escherichia coli* in suckling piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 302, p. 110395, 2025.

CHAVES, R. D.; KUMAZAWA, S. H.; KHANEGHAH, A. M.; ALVARENGA, V. O.; HUNGARO, H. M.; SANT’ANA, A. S. Comparing the susceptibility to sanitizers, biofilm-forming ability, and biofilm resistance to quaternary ammonium and chlorine dioxide of 43 *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, v.117, p.104380, 2024 doi: 10.1016/j.fm.2023.104380.

CHEN, X.; MA, Z.; FENG, G.; SUN, Z.; ZENG, TY.; LI, D.; QIAN, Y.; PENG, Q. Isolation and characterization of two novel phages with lytic activity against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains: potential for phage therapy. **Nature**, v. 15, n 43520, 2025.

CHOPRA, A. K.; HUANG, J. H.; XU, X.; BURDEN, K.; NIESEL, D. W.; ROSENBAUM, M. W.; POPOV, V. L.; PETERSON, J. W. Role of *Salmonella* enterotoxin in overall virulence of organism. **Microbiology Pathology**, v. 27, n. 3; p. 155 – 171, 1999.

CONDELL, O.; INVERSEN, C.; COONEY, S.; POWER, A.; WALSH, C.; BURGESS, C.; FANNING, S. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control salmonella enterica, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 9, p. 3087 – 3097, 2012.

DIALLO, K.; DUBLANCHET, A. A century of clinical use of phages: a literature review. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 751, 2023.

DEROUX, S.; EFFANTIN, G.; LINARES, R.; SCHOEHN, G.; BREYTON, C. Deciphering bacteriophage T5 host recognition mechanism and infection trigger. **Journal of Virology**, v. 97, p. e01584 – 22, 2023.

DOMINGUEZ-MIRAZO, M.; HARRIS, J.D.; DEMORY, D.; WEITZ, J.S. Accounting for cellular-level variation in lysis: implications for virus–host dynamics. **mBio**, v.15, n.8, p. e0137624, 2024. doi: 10.1128/mbio.01376-24.

DUNNE, M.; HUPFLED, M.; KLUM, J.; LOESSNER, M. J. Molecular basis of bacterial host interactions by gram-positive targeting bacteriophages. **Viruses**, v. 10, n. 8, p. 397, 2018.

EGIDO, J. E.; COSTA, A. R.; APARICIO-MALDONADO, C.; HAAS, P.-J.; BROUNS, S. J.J. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. **FEMS Microbiology Review**, v. 46, n. 1, p. fuab048, 2022.

ENDERSEN, L.; COFFEY, A. The use of bacteriophages for food safety. **Current Opinion in Food Science**, v. 36, p. 1 – 8, 2020

ENTEROKIT B. PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda. 3 p, 2024. Disponível em: <https://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Identifica%C3%A7%C3%A3o/Enterokit%20B%20rev.03.pdf>. Acesso em: 20 ago 2024.

ESCUDEIRO, P.; POTHIER, J; DIONISIO, F.; NOGUEIRA, T. Antibiotic resistance gene diversity and virulence gene diversity are correlated in human gut and environmental microbiomes. **mSphere** v.4, n.3, p.e00135-19, 2019. doi: 10.1128/mSphere.https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance Acesso em: 15 ago 2025

EVANGELOPOULOU, G. D.; BOURRIEL, A; SPYROU, V. A concise history of *Salmonella* spp. nomenclature. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. n.61, p. 323-329, 2018. doi: 10.12681/jhvms.14905

FATIMA, A.; SALEEM, M.; NAWAZ, S.; KHALID, L.; RIAZ, S.; SAJID, I. Prevalence and antibiotics resistance status of *Salmonella* in raw meat consumed in various áreas of Lahore, Pakistan. **Scientific Reports**, v. 13, p. 22205, 2023.

FAUSTINO, A. S. M. **Validação de pesquisa de *Salmonella* em 375g em amostra de várias matrizes pela ISSO 6579-1** (Dissertação de mestrado). Universidade do Porto, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Porto, Portugal, 2020.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, L.T.; JAVELLE A.; HOSKISSON, P.A. Microbial primer: Bacterial growth kinetics. **Microbiology** (Reading) v.170, n.2, p.001428, 2024. doi: 10.1099/mic.0.001428.

FERRARI, R. G., ROSARIO, D. K. A., CUNHA-NETO, A., MANO, S. B., FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE-JUNIORA, C. A. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: A meta-analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.85, n. 14, p.e00591-19, 2019. <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>

FURFARIM L. L.; PAYNE, M. S.; CHANG, B. J. Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 23, b. 8, p. 376, 2018.

FÜRST-WILMES, M.; RESPONDEK, V.; LILIENTHAL, N.; BUSS, K.; DÜCHTING, A. Regulation of phage therapy medicinal products: developments, challenges and opportunities. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz**, v. 68, n. 6, p. 645 – 652, 2025.

FURUICHI, M.; KAWAGUCHI, T.; PUST, M. M.; YASUMA-MITOBÉ, K.; PLICHTA, D. R.; HASEGAWA, N.; OHYA, T.; YAGINUMA, M.; UEDA, M.; OKAHASHI, N.; AMAFUGI, K.; KIRIDISHO, Y.; SUGITA, K.; STRAZAR, M.; AVILA-PACHECO, J.;

PIERCE, K.; CLISH, C. B.; SKELLY, A. N.; HATTORI, M.; NAKAMOTO, N.; CABALLERO, S.; NORMAN, J. M.; OLLE, B.; TAKESHI, T.; SUDA, W.; ARITA, M.; BUCCI, V.; ATARASHI, K.; XAVIER, R. J.; HONDA, K. Commensal consortia de colonize Entetobacteriaceae via ecological control. **Nature**, v. 633, n.1, p. 878 – 886, 2024.

GALÁN-RELAÑO, A.; DÍAZ, A. V.; LORENZO, B. H.; GÓMEZ-GASCÓN, L.; RODRÍGUEZ, A. M.; JIMÉNEZ, W. C.; RODRÍGUEZ, F. P.; MÁRQUEZ, R. J. A. *Salmonella* and salmonellosis: na update on publix health implications and control strategies. **Animals (Basel)**, v. 13, n. 23, p. 3666, 2023.

GANG, H.; NITIN, N. Edible bacteriophage based antimicroial coating on fish feed for Enhanced tratment of bacterial infections in auaculture industry. **Aquaculture**, v. 502, p. 18 – 25, 2019.

GAST, R. K.; PORTER JUNIOR, R. E. *Salmonella* infections. In SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**, 14. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2020. P. 1451. ISBN 978-1119371168

GE, H.; YE, L.; CAI, Y.; GUO, H.; GU, D.; XU, Z.; HU, M. ALLISON, H. E.; JIAO, X.; CHEN, X. Efficient screening of adsorbed receptors fo *Salmonella* phafe LP31 and indetification of receptor-binding protein. **Microbiology Spectral**, v. 11, n. 5, p. e026043, 2023.

GEINORO, T.; GEBEYEHU, A.; NGUSIE, G.; HUNDERRA, G. G.; TOLOSSA, T.; ALEMAYEHU, H.; EGUALE, T.; ABEBE, R. Detection of *Salmonella* from ray cow milk and beef and its antibiotic suscptibility profile in selected districts of the Sidama Regional State, Ethiopia. **BMC Microbiology**, b. 25, n. 402, 2025.

GOMÉZ-OCHOA, S. A.; PITTON, M.; VALENTE, L. G.; VESGA, C. D. S.; LARGO, J.; QUIROGA-CENTENO, A. C.; VARGAS, J. A. H.; TRUJILLO-CÁCERES, S. J.; MUKA, T.; CAMERON, D. R.; QUE, Y-A. Efficacy of phage therapy in preclinical models of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet. Microbe**, v. 3, n. 12, p. e. 956 – 968; 2022.

GONÇALVES, G. A. M. **Utilização de bacteriófagos ambientais em assiciação com o bacteriófago P22 na redução de *Salmonella enteritidis* em ovos, frangos e carcaças e recortes**. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, SP, 2013.

GRANT, J.R.; ENNS, E.; MARINIER, E.; MANDAL, A.; HERMAN, E.K.; CHEN, C.; GRAHAM, M.; VAN DOMSELAAR, G.; STOTHARD, P. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, 2023, gkad326, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. Paris: Institut Pasteur. 2007.

GUEDES, T. C.; **Perfil epidemiológico dos surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar causados por *Salmonella spp.*, Brasil, 2004 a 2023**. 2024, 21. Dissertação (Trabalho de conclusão de curso especialização em vigilância laboratorial em saúde pública), Instituto Adolfo Lutz, São José do Rio Preto, 2024.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatica**, v. 29, n.8, p.1072-5, 2013. DOI: 10.1093/Bioinformática/BTT086

GUERRERO, B. R. **Isolamento, caracterização e estabilização estrutural e funcional, de bacteriófagos líticos em lipossomas para *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase: avaliação do potencial terapêutico para infecções pulmonares.** (Dissertação de Mestrado), Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba. Sorocaba, 2024.

HARADA, L., K.; SILVA, E., C.; ROSSI, F., P., N., I.; CIEZA, B.; OLIVEIRA, T., J.; PEREIRA, C.; TOMAZETTO, G.; SILVA, B., B.; SQUINA, F., M.; VILA, M., M., D., C.; SETUBAL, J., C., I.; HA, T.; SILVA, A., M.; BALCÃO, V., M. Characterization and *in vitro* testing of newly isolated lytic bacteriophages for biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa*, **Future Microbiology**, v. 17, n.2, p 11-118, 2022.

HAMILTON, A. N.; JONES, S. L.; BAKER, C. A.; LIANG, X.; SIEPIELSKI, A.; ROBINSON, A.; DHULAPPANAVAR, G. R.; GIBSON, K. E. A systematic review and meta-analysis of chemical sanitizer efficacy against biofilms of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and STEC on food processing surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 88, n. 5, p. 100495, 2025

HARADA, L. K.; SILVA, E. C.; CAMPOS, W. F.; DEL FIOL, F. S.; VILA, M. M. D. C.; DĄBROWSKA, K.; KRYLOV, V. N.; BALCÃO, V. M. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research** v.212-213, p. 38-58, 2018

HOLMES, A.; DALLMAN, T. J.; SHABAAN, S.; HANSON, M.; ALLISON, L. Validation of whole-genome characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* to produce standardized data to enable data sharing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, 2018.

HOLSCHABCH, C. L.; PEEK, S. F. *Salmonella* in dairy cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**. v. 34, n. 1, p. 133 – 154, 2018.

HOLTAPPELS, D.; ALFENAS-ZERBINI P.; KOSKELLA, B. Drivers and consequences of bacteriophage host range. **FEMS Microbiological Review**. 2023 v.47, n.4, p.fuad038, 2019. doi: 10.1093/femsre/fuad038. PMID: 37422441

HOWARD-VARONA, C.; HARGREAVES, K. R.; ABEDON, S. T.; SULLIVAN, M. B. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. **The ISME Journal**, v. 11, n. 7, p. 1511 – 1520, 2017.

HUANG, D.; XIA, R.; CHEN, C.; LIAO, J.; CHEN, L.; WANG, D.; ALVAREZ, P. J. J.; YU, P. Adaptive strategies and ecological roles of phages in habitats under physicochemical stress. **Trends in Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 902 – 916, 2024.

HYGiena. **BAX System Q7 Real Time Assay *Salmonella* – Instructions.** HYGiena, 2025. Disponível em: <https://www.hygiena.com/pt-br/documents/63061/bax-system-q7-real-time-pcr-assay-salmonella-instructions-en.pdf>. Acesso em: 28 out 2025.

HYMAN P. Phages for phage therapy: Isolation, characterization, and host range breadth. **Pharmaceuticals (Basel)** v.12, n.1, p. 35, 2019. doi: 10.3390/ph12010035

HYMAN, P.; ABEDON, S. T. Practical methods for determining phage growth parameters. **Methods in Molecular Biology**, v. 201, n. 1, p. 175 – 202. 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Cidades e estados. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp/sorocaba.html>. Acesso em: 11 out 2025.

JACOBSEN, A.; HENDRIKSEN, R.S.; AARESTURP, F.M.; USSERY, D.W.; FRIIS, C. The *Salmonella enterica* Pan-genome. **Microbial Ecology** v. 62, p.487–504, 2011

JONGE, P.A.; NOBREGA, F.L.; BROUNS, S.J.J.; DUTILH, B.E. Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range. **Trends in Microbiology**. v.27, n.1, p.51-63, 2019. doi: 10.1016/j.tim.2018.08.006.

JURCZAK-KUREK, A.; GAŚSIOR, T.; NEJMAN-FALEŃCZYK, B.; BLOCH, S.; DYDECKA, A.; TOPKA, G.; NECEL, A.; JAKUBOWSKA-DEREDAS, M.; NARAJCZYK, M.; RICHERT, M.; MIESZKOWSKA, A.; WRÓBEL, B.; WĘGRZYN, G.; WĘGRZYN, A. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. **Scientific Reports**, v.6, p.34338, 2016

KANNOLY, S.; OKEN, G.; SHADAN, J.; MUSHEYEV, D.; SINGH, K.; SINGH, A.; DENNEHY, J. J. Single-cell approach reveals intercellular heterogeneity in phage-producing capacities. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 1, p. e02663-21, 2022.

KHAN, A.; JOSHI, H. Isolation and characterization of stress-tolerant bacteriophages for effective biocontrol of foodborne pathogen. **Food and bioprocess technology**, v. 18, n. 1; p. 7443 – 7457, 2025.

KHEHRA, N.; PADDA, I. S.; SWIFT, C. J. Polymerase chain reaction (PCR). **StatPerals** [internet] Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/> Acesso em: 03 jul 2025.

KNODLER, L. A.; ELFENBEIN, J. R. *Salmonella enterica*. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 11, p. 964 – 965, 2019.

KOCZERKA, M.; DOUARRE, P-E.; KEMPF, F.; HOLBERT, S.; MISTOU, M-Y.; GRÉPINET, O.; VIRLOGEUX-PAYANT, I. The invasin and complement-resistance protein RCK of *Salmonella* is more widely distributed than previously expected. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n.2, p. e0145721, 2021.

KRISHNAMURTHI, V. R., NIYONSHUTI, I. I., CHEN, J., & WANG, Y. A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers. **PLoS ONE**, v. 16, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245205>

KUMAKURA, D.; YAMAGUCHI, R.; HARA, A.; NAKAOKA, S.; Disentangling the growth curve of microbial culture. **Journal of Theoretical Biology**, v 573, p. 111597, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2023.111597>

KUMAR, G.; KUMAR, S.; JANGID, H.; DUTTA, J.; SHIDIKI, A. The rise of non-typhoidal *Salmonella*: an emerging global public health concern. **Frontiers Microbiology**, v. 16, n. 1, 2025.

KUŹMIŃSKA-BAJOR, M.; ŚLIWKA, P.; UGORSKI, M.; KORZENIOWSKI, P.; SKARADZIŃSKA, A.; KUCZKOWSKI, M.; NARAJACZYK, M.; WIELICZKO, A.; KOLENDA, R. Genomic and functional characterization of five novel *Salmonella*-targeting bacteriophages. **Virology Journal** v.18, n.1, p.183, 2021. doi: 10.1186/s12985-021-01655-4.

LABORCLIN. **Rappaport Vassiliadis Soja - ficha técnica** – 11/2019. Disponível em: <https://cdn.media.interlabdist.com.br/uploads/2021/01/510160-RAPPAPORT-VASS-SOJA-10mL-TB16X150-CX10TB-2019.pdf>. Acesso em: 3 out 2025.

LAMICHHANE, B.; MAWAD, A. M. M.; SALEH, M.; KELLEY, W. G.; HARRINTON II, P. J.; LOVESTAD, C. W.; AMEZCUA, J.; SARHAN, M. M.; EL ZOWALATY, M. E.; RAMADAN, H.; MORGAN, M. HELMY, Y. A. Salmonellosis: na overview of epidemiology, pathogenesis and innovative approaches to mitigate the antimicrobial resistant infections. **Antibiotics**, v. 13, n. 1, p. 76, 2024.

LARANJEIRA, F. D. L.; MONTEIRO, M. F. G.; SARAIVA, C. R. N.; AQUINO, P. E. A.; LIMA, M. M.; SOUSA JÚNIOR, D. L.; LEANDRO, M. K. N. S.; SILVA, R. O. M.; LEANDRO, L. M. G. Pesquisa de *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus* em maionese caseira comercializadas no município de Juazeiro do Norte – CE. **Revista Interfaces**, v. 8, n. 2, p. 554 – 560, 2020.

LEE, K-M; RUNYONA, M.; HERRMAN, T.; PHILLIPS, R.; HSIEH, J. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapide mergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264 -276, 2015

LISAC, A.; PODGORNIK, A. Bacteriophage T4 propagation in *E. coli* exposed to severe substratate limitation. **Virology Journal**, v. 22, n. 304, 2025.

LI, S-H.; WANG, R-Y.; ZHANG, J-K.; YI, K-F.; LIU, J-H.; WU, H.; YAUN, L.; ZHAI, Y-J.; HU, G-J. Biological and genomic characterization of a polyvalent phage PSH-1 aganist multidrug-resistant *Salmonella enteritidis*. **BMC Microbiology**, v. 24, n. 349, 2024.

LI, Y-J.; YANG, Y-F.; ZHOU, Y-J.; ZHANG, R-H.; LIU, C-W.; LIU, H.; LI, X-G.; CHEN, W.; CHE, Y.; WU, Y-N. Estimating the burden of foodborne gastroenteritis due to nontyphoidal *Salmonella entérica*, *Shigella* and *Vibrio parahemolyticus* in China. **PLoS One**, v. 17, n. 11, p. e0277203, 2022.

LU, X.; LUO, M.; WANG, M.; ZHOU, Z.; XU, J.; LI, Z.; PENG, Y.; ZHANG, Y.; DING, F.; JIANG, D.; ZHOU, C.; YANG, L.; ZHAO, W.; MA, T.; PANG, B.; YAN, M.; WU, Y.; WU, Y.; KAN, B. High carriage and possible hidden spread of multidrug-resitant *Salmonella* among asymptomatic Workers in Yulin, Chine. **Nature Communications**, v. 15, n. 10238, 2024.

MAIA, T. A. C.; RIBAS, J. R. L.; MOURA, L. G.; BATISTA, M. B.; GARRIDO, I.; SANTOS, J. C. M. Aves de quintal reagentes a *Salmonella* criadas no entorno de matriseiros no polo avícola de Feira de Santana, Bahia. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 38, p. 1- 3, 2011.

- MANNA, K.; BHATTACHARJEE, R.; MAJUMDER, P.; ACHARJEE, J.; PAU, K. A composite review on: Microbial culture and growth curve of bacteria. **Acta Scientific Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 27-30, 2023
- MARONGIU, L.; BURKARD, M.; LAUER, U. M.; HOELZLE, L. E.; VENTURELLI, S. Reassessment of historical clinical trials supports the effectiveness of phage therapy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. e00062-22, 2022.
- MARZEL, A.; DESAI, P. R.; GOREN, A.; SCHORR, Y. I.; NISSAN, I.; PORWOLLIK, S.; VALINSKY, L.; MCCLELLAND, M.; RAHAV, G.; GAL-MOR, O. Persistent infections by nontyphoidal *Salmonella* in humans: epidemiology and genetics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 7, p. 879- 886, 2016.
- MASTRANTONIO, E. C.; PEREIRA, D. A.; MODESTO, T. C. Ocorrência de endoparasitas gastrointestinais em cães da associação protetora animal e ambiental da cidade de Patos de Minas, MG, Brasil. **Veterinária Notícias**, v. 27, n. 3, p. 48 – 60, 2021.
- MAYORGA-RAMOS, A.; CARRERA-PACHECO, S. E.; BARBA-OSTRIA, C.; GUAMÁN, L. P. Bacteriophage-mediated approaches for biofilm control. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 14, p. 1428637, 2024.
- MELO, E. S.; AMORIN, W. R.; PINHEIRO, R. E. E.; CORRÊA, P. G. N.; CARVALHO, S. M. R.; SANTOS, A. R. S. S.; BARROS, D. S.; OLIVEIRA, E. T. C.; MENDES, C. A.; SOUZA, F. V. Doenças transmitidas por alimentos e principais agente bacterianos envolvidos em surtos no Brasil: revisão. **PubVet**, v. 12, n. 10, p 1 - 9, 2018.
- MIRANDA, V. S.; FERREIRA, N. L.; TOMAZ, L. D.; SILVA, V. S.; SILVA, K. S.; SILVA, S. E. L. Isolamento e identificação bioquímica de *Salmonella* spp. em frangos de corte. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 89982-89993, 2020
- MISEQ™ SYSTEM ILLUMINA. Folha de especificações, M-GL-00006 PTB v4.0, 2024. Disponível em: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembly-assets/marketing-literature/miseq-system-data-sheet-m-gl-00006/miseq-data-sheet-m-gl-00006-ptb.pdf> Acesso em: 14 nov 2025
- MTHEMBU, T.P.; ZISHIRI, O.T.; EL ZOWALATY, M.E. Genomic characterization of antimicrobial resistance in food chain and livestock-associated *Salmonella* species. **Animals** v.11, p 872, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11030872>
- MOTA, L. C. **Isolamento e caracterização de um bacteriófago lítico para *Pseudomonas syringae* pv. *garcae***. (Dissertação de mestrado) Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba. Sorocaba, 2023.
- MYELNIKOV, D. An alternative cure: the adoption and survival of bacteriophage therapy in the USSR, 1922 – 1955. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 73, n. 4, p. 385 – 411, 2018.
- NARAYANAN, K. B.; BHASKAR, R.; HAN, S-S. Bacteriophages: natural antimicrobial bioadditives for food preservation in active packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 276, p. 133945, 2024.

NAUREEN, Z.; DAUTAJ, A.; ANPILOGOV, K.; CAMILLERI, G.; DHULI, K.; TANZI, B.; MALTESE, P. E.; CRISTOFOLI, F.; ANTONI L. D.; BECCARI, T.; DUNDAR, M.; BERTELLI, M. Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. **ACTA Biomedica**, v. 91, n. 13, p. e2020024, 2020.

NIAZI, S. K. Bacteriophages therapy: Discovery, development, and FDA approval pathways. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 8, p. 1115, 2025.

NIKOLICH, M. P.; FILIPPOV, A. A. Bacteriophage therapy: Developments and directions. **Antibiotics**, v. 9, n. 135, p. 1 – 13, 2020.

NUNES, L. C.; GANGIANI, E. E. Pesquisa de *Salmonella spp.* em frangos congelados destinados a consumo humano. **Journal Health Science Institution**, v. 38, n. 2, p. 117 – 121, 2020.

NUNES, N. B.; CASTRO, V. S.; DA CUNHA-NETO, A.; CARVALHO, F. T.; CARVALHO, R. C. T.; FIGUEIREDO, E. E. D. S. Integrated Whole-Genome Sequencing and In Silico Characterization of *Salmonella* Cerro and Schwarzengrund from Brazil. **Genes**, v. 16, n. 8, p. 880, 2025.

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document for the regulatory framework for the microorganism group: bacteriophages**. Paris: OEDVD Publishing, 2022.

OH, H.; CHOI, Y.; LEE, J. Antibiotic-resistant *Salmonella* in animal products jeopardize human health. **Food Science of Animal Resources**, v. 45, n. 2, p. 409- 428, 2025.

OLIVEIRA, E.; TRENTIN, T.C.; CAMARGO, F.; PINTO, I.A.P.; MARTINS, D.B. Eletroforese: conceitos e aplicações. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer** v.11 n.22; p.1129-1147, 2015

OLIVEIRA, J. W. A.; PAULA, C. C. Bactérias Gram-negativas multirresistentes: revisão sobre os desafios e demais discussões. **Caderno de Publicações UNIVAG**, v. 1, n. 11, p. 74 – 88, 2021.

OLUDAIRO, O.; KWAGA, J.; KABIR, J.; ABDU, P.; GITANJALI, A.; PERRETS, A.; CIBIN, V.; LETTINI, A.; A. JULIUS. Review of *Salmonella* characteristics, history, taxonomy, nomenclature, Non Typhoidal Salmonellosis (NTS) and Typhoidal Salmonellosis (TS). **Zagazig Veterinary Journal** v.50, p. 160-171, 2022. doi: 10.21608/zvzj.2022.137946.1179.

ORLOVA, E.V. Bacteriophages and their structural organisation. In: ORLOVA, E.V.; WHITE, H.E. **Bacteriophage: Their structural organisation and function**. E-book, 2019. doi: 10.5772/intechopen.85484 Disponível em: <https://www.intechopen.com/search?query=bacteriophage>. Acesso em: 01 nov 2025

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella spp.* isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 20, n. 10, p. 1 – 6, 2014.

PANTELEEV, V.; KULBCHINSKIY, A.; GELFENBEIN, D. Evaluating phage lytic activity: from plaque assays to single-cell Technologies. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, n. 1, 2025.

PARVEEN, A.; KHURANA, S.; KUMAR, A. Overview of genomic tools for circular visualization in the next-generation genomic sequencing era. **Current Genomics**, v.20, n.2, p.90-99, 2019. doi: 10.2174/1389202920666190314092044.

PASSOS, A., C., S. **Uso de bacteriófagos no biocontrole de *Salmonella entérica***. (Dissertação de Mestrado) Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2020.

PATEL, A.; WOLFRAM, A.; DESIN, T. S. Advancements in detection methods for *Salmonella* in food: a comprehensive review. **Pathogens**, v. 13, n. 12, p. 1075, 2024.

PEREIRA, A. O. **Isolamento, caracterização e estabilização em micropartículas de bacteriófagos para *Salmonella entérica* potencial para biocontrole em aves de granja**. 2023, 135 f. (Dissertação de Mestrado) Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2023.

PEREIRA, A. O.; BARROS, N. M. A.; GUERRERO, B. R.; EMENCHETA, S. C.; BALDO, D. Â.; OLIVEIRA, JÚNIOR, J. M.; VILA, M. M. D. C.; BALCÃO, V. M. An edible biopolymeric microcapsular wrapping integrating lytic bacteriophage particles for *Salmonella enterica*: Potential for integration into poultry feed. **Antibiotics**, v. 12, n. 6, p. 988, 2023.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SOROCABA, SECRETARIA DE PLANEJAMENTO E PLANEJAMENTO URBANO. **PLOA 2020 PPA 2020-2023**. Disponível em: [Planejamento.sp.gov.br/static/arquivos/audiencias/caracterizacao2020/SOROCABA\\_Caracterizacao.pdf](http://Planejamento.sp.gov.br/static/arquivos/audiencias/caracterizacao2020/SOROCABA_Caracterizacao.pdf). Acesso em: 03 maio 2025.

PINO, M.; MUJICA, K.; MORA-URIBE, P.; GARCIA-PAPAYANI, H.; PAILLAVAIL, B.; AVENDAÑO, C.; FLORES-CRISOSTO, D.; NORAMVUENA, R.; ROJAS-MARTÍNEZ, V.; AGUILERA, M.; MUÑOZ, N. C.; CIFUENTES, P.; PIERINGER, H.; ULLOA, S. Research note: reduction of salmonella load in brazilian comercial chicken farms using INSPEKTOR®: a bacteriophage-based product. **Poultry Science**, v. 104, n. 1, p. 104544, 2025.

PINTO, A.C.; RIBEIRO, K.T.S. **Guia Prático de Orientações Básicas em Microbiologia**. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

POPE, W.; BOWMAN, C.; RUSSELL, D.; JACOBS-SERA, D.; ASAI, D.; CRESAWN, S.; JACOBS, W.; HENDRIX, R.; LAWRENCE, J.; HATFULL, G.; WALCH, E.; LEBLANC-STRACESKI, J.; KIRKPATRICK, E.; TRIEU, M.; UDAYAKUMAR, N.; ZELLMER, L.; CHOTUN, N.; HENRY, R.; MAYA, J. Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity. **eLife**, v.4, p. e06416, 2015. doi: 10.7554/eLife.06416

POZZA, J.; VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S. L. *Proteus mirabilis* como contaminante no isolamento de *Campylobacter*. In: **6ª Jornada de Iniciação Científica Embrapa, II Seminário de Pesquisa e Extensão da UnC**, Concórdia, SC, 2012.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SOROCABA (PMS). Porta da Prefeitura, 2025. Disponível em: <https://www.sorocaba.sp.gov.br> Acesso em: 11 out 2025

PUNCHIHEWAGE-DON, A. J.; RANAWEERA, P. N.; PARVEEN, S. Defense mechanisms of *Salmonella* Against antibiotics: a review. **Frontiers**, v. 3, 2024.

PUROHIT, P. K.; INAMDAR, M. M.; GRAYSON, P. D.; SQUIRES, T. M.; KONDEV, J.; PHILLIPS, R. Forces during bacteriophage DNA packaging and ejection. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 2, p. 851 – 866, 2005

QUIAGEN. **DNeasy® Blood & Tissue Handbook**. Hilden: QUIAGEN, 2023.

QUICK, J.; ASHTON, P.; CALUS, S.; CHATT, C.; GOSSAIN, S.; HAWKER, J.; NAIR, S.; NEAL, K.; NYE, K.; PETERS, T.; PINNA, E.; ROBINSON, E.; STRUTHERS, K.; WEBBER, M.; CATTO, A.; DALLMAN, T.J.; HAWKEY, P.; LOMAN, N.J. Rapid draft sequencing and real-time nanopore sequencing in a hospital outbreak of *Salmonella*. **Genome Biology**, v.16, p114, 2015. doi: 10.1186/s13059-015-0677-2

RAM, Y.; DELLUS-GUR, E.; BIBI, M.; KARKARE, K.; OBOLSKI, U.; FELDMAN, M. W.; COOPER, T. F.; BERMAN, J.; HADANY, L. Predicting microbial growth in a mixed culture from growth curve data. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 116, n. 29, p. 14698 – 14707, 2019.

RAMESH, N.; ARCHANA L.; MADURANTAKAM ROYAM, M.; MANOHAR, P.; ENIYAN, K. Effect of various bacteriological media on the plaque morphology of *Staphylococcus* and *Vibrio* phages. **Access Microbiology** v.1, n.4, p.e000036, 2019. doi: 10.1099/acmi.0.000036

RANVEER, S. A.; DASRIYA, V.; AHMAD, M. F.; DHILON, H. S.; SAMTIYA, M.; SHAMA, E.; ANAND, T.; DHEWA, T.; CHAUDHARY, V.; CHAUDHARY, P.; BEHARE, P.; RAM, C.; PUNIYA D. V.; KHEDKAR, G. D.; RAPOSO, A.; HAN, H.; PUNIYA, A. K. Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. **NPJ Science of Food**, v. 8, n. 1, p. 1 – 13, 2024.

REZENDE, C.; FONTANA, E. A.; FREITAS, A. C. P.; COLLETES, J. H. G. Avaliação de portadores assintomáticos de *Salmonella* em manipuladores de alimentos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 6, n. 48, p. 32 – 35, 2016.

REEN, F.J.; BOYD, E.F.; PORWOLLIK, S.; MURPHY, B.P.; GILROY, D.; FANNING, S.; MCCLELLAND, M. Genomic comparisons of *Salmonella enterica* serovar Dublin, Agona, and Typhimurium strains recently isolated from milk filters and bovine samples from Ireland using a *Salmonella* microarray. **Applied Environment Microbiology**, v. 71, n.3, p.1616-25, 2005. doi: 10.1128/AEM.71.3.1616-1625.2005. PMID: 15746367; PMCID: PMC1065154.

RICCI, V.; PIDDOCK, L. J. V. Only for substrate antibiotics are a functional acrAB-tolC efflux pump and rama required to select multirug-resistant *Salmonella*

Typhimurium. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. 654 – 657, 2009.

RICKE, S.C.; LEE, S.I.; AE, K.S.; HONG, P.S.; ZHAOHAO, S. Prebiotics and the poultry gastrointestinal tract microbiome. **Poultry Science**, v. 99, n 2, p. 670, 677, 2020

RODRIGUES, C. F. **Pesquisa de coliformes e *Salmonella* spp. em ovos comercializados em feira livre, no município de Espigão do Oeste – Rondônia.** (Dissertação de mestrado). Mestrado profissional o em Produção Animal, Universidade Brasil, Descalvado, 2016.

ROGOVSKI, P. CADAMURO, R. D.; SILVA, R.; SOUZA, E. B.; BONATTO, C.; VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; ELMAHDY, E. M.; TREICHEL, H.; RODRIGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G. Uses of bacteriophages as bacterial control tools and envirtonmnetal safety indicators. **Frontiers**, v. 12, 2021.

ROSS, A.; WARD, S.; HYMAN, P. More is better: Selecting for broad host range bacteriophages. **Frontiers in Microbiology** v.7, p1352, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.01352.

ROSTØL, J.T.; MARRAFFINI, L. (Ph)ighting Phages: how bacteria resist their parasites. **Cell Host & Microbe**, v. 25, n. 2, p. 184-194, 2019.

SALES, B. C. F.; SILVA, C. P.; LAPORTA, M. Z.; SILIANO, P. R. Identificação de enterobactérias em sushi embalados. **UNISANTA Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 7 – 11, 2021.

SAMSON, J.E.; MAGADÁN, A.H.; SABRI, M.; MOINEAU, S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. **Bacteriófagos**. V. 11, n.10, p.675-87, 2013.

SANTOS, M.A. **Isolamento e caracterização de bacteriófago lítico para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*: potencial para o biocontrole da mancha bacteriana do maracujazeiro** (Dissertação de Mestrado), Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2025.

SÃO PAULO. Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo. **Lei Complementar n° 1.241, de 08 de maio de 2014.** Cria a Região Metropolitana de Sorocaba e dá providências correlatas, São Paulo, 2014

SCHWARTZ, F. F.; ABREU, L. S. Bem-estar animal na produção de ovos orgânicos no Estado de São Paulo: percepção social e avaliação técnica nas granjas. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 35, p. 385 – 396, 2015.

SEGUNDO-ARIZMENDI, N.; GÓMEZ-GARCÍA, J.; FLORES-CUEVAS, K.; DUQUE-MONTAÑO, B., E.; LÓPEZ-VILLEGAS, E., O.; BALTAZAR-HERNÁNDEZ, E.; TORRES-ANGELES, O. Caracterización parcial del bacteriófago S1, lítico contra *Salmonella enterica*, com posible uso farmacêutico. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacêuticas**, v. 48, n. 8, p. 36 – 48, 2017.

SEGUNDO-ARIZMENDI, N.; FLORES-CORIA, A.P.; GÓMEZ-GARCIA, J.; HERNÁNDEZ-BALTAZAR, E.; MENESES-ACOSTA, A. Bacteriophages against

Salmonella enterica: challenges and opportunities. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.13, p.1605263, 2025. doi: 10.3389/fbioe.2025.1605263

SHANG, J.; WANG, K.; ZHOU, Q.; WEI, Y. The role of quórum sensing in phage lifecycle decision: a switch between lytic and lysogenic pathways. **Viruses**, v. 17, n. 3, p. 317, 2025.

SHAO Y.; WANG, I-N. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. **Genetics**, v.180, n.1, p. 471-82, 2008. doi: 10.1534/genetics.108.090100.

SHAH, D. H.; PAUL, N. C.; SISCHO, W. C.; CRESPO, R.; GUARD, J. Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. **Poultry Science**, v. 96, n. 3, p. 687 – 702, 2017.

SHIVARAM, K. B.; BHATT, P.; APPLGATE, B.; SIMSEK, H. Bacteriophage-based biocontrol technology to enhance the efficiency of wastewater treatment and reduce target bacterial biofilms. **Science of the total environment**, v. 862, 2023.

SHUKLA, R.; DUBEY, A.; PANDEY, V.; GOLHANI, D.; JAIN, A.P. Chromophore- An utility in UV spectrophotometer. **Inventi Rapid: Pharm Analysis & Quality Assurance**, v. 2012, n. 3, p1-4, 2012

SILVA, B. G. B. **Isolamento, caracterização e aplicação terapêutica de bacteriófagos líticos para *Escherichia coli* em medicina veterinária.** (Dissertação de Mestrado). Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2025

SILVA, C. F. **Padrão de resistência a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella enteritidis* formadoras de biofilme.** (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2014.

SILVA, E. C. S. **Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos líticos contra *Pseudomonas coronafaciens* pv. *garcae* para combater a mancha aureolada do cafeeiro: uma alternativa eficiente e amiga do ambiente.** (Tese de Doutorado). Universidade de Sorocaba, Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, Sorocaba/SP, 2024.

SILVA, G.J.N. **Ferramentas computacionais para a montagem de genomas bacterianos: um estudo comparativo.** (Trabalho de Conclusão de Curso). Curso Técnico em Informática do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, Campus Seabra, Seabra, BA, 2021

SILVA, N. J. **Método de detecção de *Salmonella enterica* em amostras de água.** (Trabalho de Conclusão de Curso). Centro de Ciências Agrárias, Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2023.

SILVA, D.C.C.; SIMONETTI, V.C.; OLIVEIRA, R.A.; SALES, J.C.A.; LOURENÇO, R.W. Spatial autocorrelation proposal of the relationship between the socioeconomic conditions in Metropolitan Region of Sorocaba, SP, Brazil. **Ciência e Natura**, v. 43, e42, 2021. doi:10.5902/2179460X39332.

- SILVA, J. B.; STORMS, Z.; SAUVAGEAU, D. Host receptors for bacteriophage adsorption. **FMES Microbiology Letters**, v. 363, n. 4, p. fnw 002, 2016.
- SILVA, A. C.; IACUZIO, R.; CÂNDIDO, T. J. S.; RODRIGUES, M. X.; SILVA, N. C. C. Resistência antimicrobiana de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados de carcaças de frangos: resistência a antibióticos e óleos essenciais. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 8, n. 1, p. 95 – 103, 2018.
- SILVA, A. J. H.; ANJOS, C. P.; NOGUEIRA, L. S.; RIBEIRO, A. C. R.; FRAGA, E. G. S. *Salmonella spp.* um agente patogênico veiculado em alimentos. **Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica**, v. 5, n. 1, p. 1 – 7, 2019.
- SILVA, C.; SÁ, S.; GUEDES, C.; OLIVEIRA, C.; LIMA, C.; OLIVEIRA, M.; MENDES, J.; NOVAIS, G.; BAYLINA, P.; FERNANDES, R. The history and applications of phage therapy in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology Research**, v. 13, n; 1, 9. 14 – 37, 2022.
- SILVA, M.K.P.; NICOLETI, V. Y. U.; RODRIGUES, B. P.P., ARAUJO, A.S.F.; ELLWANGER, J.H.; DE ALMEIDA, J.M.; LEMOS, L.N. Exploring deep learning in phage discovery and characterization. **Virology**, v. 609, p.110559, 2025. doi: 10.1016/j.virol.2025.110559.
- SILVA, K.C.D.; WOLFF, J.L. C. **Geração de mutantes resistentes a fagos e análise da resistência cruzada**. XVI Jornada de Iniciação Científica e X Mostra de Iniciação Tecnológica da Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo/ SP, 2020.
- SIVANANDY, P.; YUK, L. S.; YI, C. S.; KAUR, I.; ERN, F. H. S.; MANIRAJAN, P. A systematic review of recente outbreaks and the efficacy and safety of drugs approved for the treatment of *salmonella* infections. **IJID Regions**, v. 14, n. 1, p.100516, 2024.
- SOTO-LOPEZ, M. E. **Caracterização do bacteriófago UFV-AREG1: potencial para o biocontrole de *Escherichia coli* O157:H7**. 2018. 75 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- STELLA, A., E.; COSTA, A., O.; VENTURA, G., F.; SCHIMMUNECH, M., S.; LIMA, D., A.; PAULA, E., M., N. Salmonelose aviária. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p.1-13, 2021.
- STEVENS, M. P.; KINGSLEY, R. A. *Salmonella* pathogenesis and host-adaptation in farmed animals. **Current Opinion in Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 52 – 58, 2021.
- STOPPA, G. F. Z.; CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; LUCIANO, R. L.; KANASHIRO, A. M. I. Avaliação de meios de cultura e temperaturas de incubação no isolamento de *Salmonella spp.* em suabes. **Enciclopédia Bioesfera – Centro Científico Conhecer**, v. 11., n. 21, p. 2037 – 2044, 2015.
- SUTHERLAND, I. W.; HUGHER, K. A.; SKILLMAN, L. C.; TAIT, K. The interaction of phage and biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 1, p. 1 – 6, 2004.
- TANAKA, T.L (org.) **Manual de microbiologia: técnicas de coloração**. São Paulo: Centro Universitário São Camilo 2024. Disponível em: <https://www.saocamilo-sp.br>. Acesso em: 28 nov 2024.

THOMPSON, T.; KILDERS, V.; WIDMAR, N.; EBNER, P. Consumer acceptance of bacteriophage technology for microbial control. **Scientific Reports**, v. 25, n. 14, p. 25279, 2024.

THUNG, T.; LEE, E.; PREMARATHNE, K.; MAZLAN, N.; KUAN, C. H.; ELEXSON, N.; TAN, C.; MALCOLM, T.T.H.; NEW, C.Y.; RAMZI, O.S.B.; NUZUL, J.; MUTALIB, A.; AZIRA, N.; UNGKU, U.Z.A.; SON, R. Bacteriophages and their applications. **Food Research**, v. 2., p.404-414, 2018.

TIBA-CASAS, M. R.; ALMEIDA, E. A.; COSTA, G. L.; BERTANI, A. M. J.; VIEIRA, T.; CAMARGO, C. H. Trends in antimicrobial susceptibility patterns in *Salmonella* from human and nonhuman sources in Sao Paulo State, Brazil, 2016 – 2023. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 66, p. 64, 2024.

TM MEDIA, TMP 058 – SALMONELLA SHIGELLA AGAR PLATE (SS AGAR PLATE) Titan Biotec Ltd. 3 p., 2022. Disponível em: <https://www.tmmmedia.in/wp-content/uploads/TD/TD-TMP-058.pdf>. Acesso em: 20 ago 2024.

TÖRÖK, M. E.; PEACOCK, S. J. Rapid whole-genome sequencing of bacterial pathogens in the clinical microbiology laboratory – pipe dream or reality? **Journal of Antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 10, p.2307 – 2308, 2012

TURNER, D.; SHKOPOROV, A.N.; LOOD, C.; MILLARD, A.D.; DUTILH, B.E.; ALFENAS-ZERBINI, P.; VAN ZYL, L.J.; AZIZ, R.K.; OKSANEN, H.M.; PORANEN, M.M.; KROPINSKI, A.M.; BARYLSKI, J.; BRISTER, J.R.; CHANISVILI, N.; EDWARDS, R.A.; ENAULT, F.; GILLIS, A.; KNEZEVIC, P.; KRUPOVIC, M.; KURTBÖKE, I.; KUSHKINA, A.; LAVIGNE, R.; LEHMAN, S.; LOBOCKA, M.; MORARU, C.; MORENO SWITT, A.; MOROZOVA, V.; NAKAVUMA, J.; REYES MUÑOZ, A.; RŪMNIĒKS, J.; SARKAR, B.L.; SULLIVAN, M.B.; UCHIYAMA, J.; WITTMANN, J.; YIGANG, T.; ADRIAENSSENS, E.M. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. **Archives of Virology**, v. 168, n.2, p. 74, 2023. doi: 10.1007/s00705-022-05694-2.

VALONES, M. A. A.; GUIMARÃES, R. L.; BRANDÃO, L. A. C.; SOUZA, P. R. E.; CARVALHO, A. A. T.; CROVELA, S. Principales and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1. p. 1 – 11, 2009.

VAZ, C., S., L.; VOSS-RECH, D. Bacteriófagos: uma perspectiva de produto biológico para controle de *Salmonella Heidelberg* em frangos de corte. **Embrapa Suínos e Aves**, 2020.

VAZ, C. S.L.; VOSS-RECH, D.; FONSECA, F. N.; MORÉS, M. A. Z.; COLDEBELLA, A. Redução de *Salmonella Heidelberg* em frangos pelo uso de bacteriófagos. **Avicultura Industrial**, v. 112, n. 2, p. 16 – 18, 2021.

VAZ, C., S., L.; VOSS-RECH, D.; COLDEBELLA, A. Bacteriófagos: estudo da ação lítica sobre *Salmonella minnesota* isoladas de camas de frango. **Avicultura Industrial**, n. 2, v. 113, p. 18-22, 2022.

VAZ, S.C.L.; VOSS-RECH, D.; FONSECA, F.N.; COLDEBELLA, A. Quantificação de bacteriófagos em amostras biológicas: comparação de métodos com plaqueamento em ágar. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n 16, p-1-16, 2024.

VENTURINI, C.; FABIJAN, A.P.; LUBIAN, A. F.; BARBIRZ, S.; IREDELL, J. Biological foundations of successful bacteriophage therapy. **EMBO Molecular Medicine**, v. 14, n. 1, p. e12435, 2022.

VIEIRA, G., M.; PIVA, D. O.; DAMASCENO, R., L.; JAPIASSU, R., V., N.; MACEDO, A., C.; JAPIASSU, C., V., N.; PEREIRA, M., A. Eficácia da fagoterapia para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes e suas aplicações. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 10728 - 10744, 2021.

VILA, M. M. D. C.; CINTO, E. C.; PEREIRA, A. O.; BALDO, D. Â.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. M.; BALCÃO, V. M. An edible antibacterial coating integrating lytic bacteriophage particles for the potencial biocontrol of *Salmonella enterica* in ripened cheese. **Polymers**, v. 16, n. 5, p. 680, 2024.

WANG, R. V.; PRIYADARSHI, R.; RHIM, J-W. Novel bacteriophage-based food packaging: na innovative food safety approach. **Coatings**, v. 13, n. 3, p. 609, 2023.

WANG-KAN, X.; BLAIR, J. M. A.; CHIRULLO, B.; BETTS, J.; RAGIONE, R. M. L.; IVENS, A.; RICCI, V.; OPPERMAN, T. J.; RIDDOCK, L. J. V. Lack of *acrB* efflux function confers loss of virulence on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **mBio**, v. 8, n. 4, p. 968 - 1017, 2017.

WDOWIAK, M.; PACZESNY, J.; RAZA, S. Enhancing the stability of bacteriophages using physical, chemical, and nano-based approaches: a review. **Pharmaceutis**, v. 14, n. 1, p. 1 – 19, 2022.

WEBER-DĄBROWSKA, B.; JOŃCZYK-MATYSIAK, E.; ŻACZEK, M.; ŁOBOCKA, M.; ŁUSIAK-SZELACHOWSKA, M.; GÓRSKI, A. Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. **Frontiers in Microbiology**, v 12, n.7, p.1177, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.01177.

WEERASOORIYA, G.; DULAKSHI, H. M. T.; ALWIS, P. S.; BANDARA, S.; PREMARATHNE, K. R. P. S.; DISSANAYAKE, N.; LIYANAGUNAWARDENA, N.; WIJEMUNI, M. I.; PRIYANTHA, M. A. R. Persistence of *Salmonella* and *Campylobacter* on Whole Chicken carcasses under the different chlorine concentrations used in the chill tank of processing plants in Sri Lanka. **Pathogens**, v. 13, n. 8, p. 664, 2024.

WEI, H. Bacteriophages, revitalized after 100 years in the shadow of antibiotics. **Virologia Sinica**, v. 30, n. 1, p. 1 - 2, 2015.

WESSELS, K.; RIP, D.; GOUWS, P. *Salmonella* in chicken meat: Consumption, outbreaks, characteristics, current control methods and the potential of bacteriophage use. **Foods** v.10, n. 1742, p. 2-21, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10081742>

WICK, R.R.; HOLT, K.E. Benchmarking of long-read assemblers for prokaryote whole genome sequencing. **F1000Research** v 8, p.2138, 2019. doi: 10.12688/f1000research.21782.4.

WIEBE, K. G.; COOK, B. W. M.; LIGHTLY, T. J.; COURT, D. A.; THERIAULT, S. S. Investigation into scalable and efficient enterotoxigenic *Escherichia coli* bacteriophage production. *Scientific Report* v. **14**, p. 3618, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53276-w>

WIENS, K. E.; MILLER, M. H.; COSTELLO, D. J.; SOLOMON, A. P.; HILBERT, S. M.; SHIPPER, A. G.; LEE, E. C.; AZMAN, A. S. Care seeking diarrheal illness: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Global Public Health*, v. 5, n. 4, p. e0004483, 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial resistance**, 2023 batê-la. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> Acesso em: 15 ago 2025

YAMASAKI, S.; ZWAMA, M.; YONEDA, T.; HAYASHI-NISHINO, M.; NISHINO, K. Drug resistance and physiological roles of RND multidrug efflux pumps in *Salmonella entérica*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, v. 169, n. 6, p. 001322, 2023.

YOUNG, I.; WILHELM, B. J.; CAHILL, S.; NAKAGAWA, R.; DESMARCHELIER, P.; RAJIC, A. A rapid systematic review and meta-analysis of the efficacy of slaughter and processing interventions to control non-typhoidal *Salmonella* in beef and pork. *Journal of Food Protection*, v. 79, n. 12, p. 2196 – 2210, 2016.

ZAPPA, V. **Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos, concentração inibitória mínima e beta-lactamases de espectro estendido em linhagens de *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos.** (Tese de doutorado). Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2015.

ZEMB, O.; MANEFIELD, M.; THOMAS, F.; JACQUET, S. Phage adsorption to bacteria in the light the electrostatics: a case study using *E. coli*, T2 and flo cytometry. *Journal of Virology Methods*, v.189, n.2, p.283-289. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.02.007.

ZENG, Y.; LI, P.; LIU, S.; SHEN, M.; LIU, Y.; ZHOU, X. *Salmonella enteritidis* acquires phage resistance through a point mutation in *rfbD* loses some of its environmental adaptability. *Veterinary Research*, v. 55, n. 85, 2024.

ZWART, M.P.; TROMAS, N.; ELENA, S.F. Model-selection-based approach for calculating cellular multiplicity of infection during virus colonization of multi-cellular hosts. *PLoS One*, v.8, n.5, p. e64657, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0064657.



**ANEXO 1 – Certificado V Brazilian Congress of Development**



**ANEXO 3 – Certificado 27º Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica - EPIC**

The certificate is presented on a dark blue background with a large red circular graphic on the left side. At the top right, there are logos for UNISO and a 'NOTA 5' badge. The main text is in white, and the word 'CERTIFICADO' is in large, bold, white letters. The event details and the work being certified are also in white text. The date and location are at the bottom center. Two signatures are at the bottom, with their names and titles below them.

**CERTIFICADO**

 **27º** Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica • EPIC

Certificamos que o trabalho "**IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE SALMONELLA SPP. A PARTIR DE AMOSTRAS AMBIENTAIS.**" de autoria de Renata Lopes Simões da Silva, orientado por Marta Maria Duarte Carvalho Vila, foi apresentado, nesta data, no 27º Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica (EPIC), evento realizado entre os dias 16 e 18 de outubro de 2024 pela Universidade de Sorocaba - Uniso.

Sorocaba, 16 de outubro de 2024.

  
Prof. Dr. José Martins de Oliveira Jr.  
Pró-Reitor de Pós-Graduação, Pesquisa, Extensão e Inovação- Propein

  
Profa. Dra. Cristiane de Cássia Bergamaschi  
Presidente do 27º EPIC

## ANEXO 4 – Certificado 21º Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas

21º Congresso Nacional de  
**MEIO AMBIENTE**  
 de Poços de Caldas  
 22 a 25 DE OUTUBRO | 2024

Temática 2024  
**EXTREMOS CLIMÁTICOS  
 IMPACTOS ATUAIS  
 E RISCOS FUTUROS**

# CERTIFICADO

Certificamos que a submissão intitulada **ANÁLISE DA EFICÁCIA DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE SALMONELLA SPP. EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE PRODUÇÕES AVÍCOLAS DE PEQUENO PORTE** foi apresentada por **Renata Lopes Simões da Silva**, durante o **21º Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas**, apresentando nas Modalidade(s) **Modelo de Resumo Expandido e Área(s) Temática(s) Promoção da saúde**.

Poços de Caldas, 24 de outubro de 2024.

Prof. Dr. Claudiomir Silva Santos  
 Presidente da Comissão  
 Técnico Científica

Gisele Correa Ferreira  
 Diretora da GSC  
 Eventos Especiais

Realização

**GSC**  
 Eventos Especiais  
 Instituto Federal de Minas Gerais

**INSTITUTO FEDERAL**  
 Sul de Minas Gerais  
 Campus Murambinho

**INSTITUTO FEDERAL**  
 DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
 Sul de Minas Gerais

ANEXO 5 – Anais do evento I Colóquio Interdisciplinar PPGCF e PPGPTA, IV  
Simpósio em Ciências Farmacêuticas e II Simpósio em Processos Tecnológicos  
e Ambientais.



**I Colóquio Interdisciplinar PPGCF e PPGPTA  
IV Simpósio em Ciências Farmacêuticas  
II Simpósio em Processos Tecnológicos e Ambientais**

**Estudo comparativo entre formas de identificação de *Salmonella spp***

Renata Lopes Simões da Silva, renata.96@outlook.com<sup>1</sup>; Marta Maria Duarte Carvalho Vila, marta.vila@prof.uniso.br<sup>1</sup>; Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão, victor.balcao@prof.uniso.br<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Sorocaba (Uniso), Sorocaba, SP, Brasil

**Resumo:** A *Salmonella spp.* é uma bactéria zoonótica que afeta a saúde pública, principalmente, por meio de alimentos contaminados, com inúmeros casos no Brasil. A melhor maneira de realizar a prevenção é através do diagnóstico e notificação dos casos positivos junto aos órgãos competentes. Assim, a identificação desta bactéria é fundamental. Comparar três métodos de detecção de *Salmonella spp.*, sendo: i) ágar *Shigella-Salmonella*, ii) Enterokit B<sup>®</sup>, e iii) Galerias API 20E<sup>®</sup>. Amostras de fezes de galinha, oriundas de granjas de criação familiar de Sorocaba/SP e região, foram coletadas e incubadas em meio de cultura nutritivo *Brain Heart Infusion* (BHI). Na sequência, as amostras foram semeadas por meio de esgotamento em placas com Ágar *Shigella-Salmonella* e realizados os testes bioquímicos do Enterokit B<sup>®</sup> e Galeria API20 E<sup>®</sup>. No meio ágar *Shigella-Salmonella* as amostras apresentaram crescimento de colônias enegrecidas, indicativo de resultado positivo. Os testes bioquímicos realizados nos Enterokit B<sup>®</sup> indicaram, em alguns casos, a presença de *Proteus spp.*, uma bactéria com características bioquímicas semelhantes à *Salmonella spp.* Essa semelhança também foi observada nas galerias API 20E<sup>®</sup>. Dadas as possíveis reações cruzadas e semelhanças bioquímicas entre *Proteus spp.* e *Salmonella spp.*, se faz necessário a utilização de métodos complementares para garantir identificação precisa. Essa prática é especialmente importante em ambiente de produção familiar, onde o manejo sanitário é menos rigoroso, para evitar surtos de salmonelose e garantir a segurança alimentar.

**Palavras-chave:** reações cruzadas; identificação bacteriana; *Salmonella spp.*

**ANEXO 6 – Certificado 1º Encontro de Pesquisadores do Observatório de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Sorocaba – EPO/2025.**



× × × **Certificado**

UNISO

NOTA MÁXIMA NO MEC

5

OBSERVATÓRIO

de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Sorocaba

Certifico que o trabalho “ *PROPECÇÃO DE SALMONELLA SSP. EM SOROCABA E REGIÃO E ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS PARA SEU COMBATE*”, de autoria de **Renata Simões Lopes da Silva e Marta Maria Duarte Carvalho Vila**, foi apresentado, neste dia, no **1º Encontro de Pesquisadores do Observatório de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Sorocaba**, evento realizado pela Universidade de Sorocaba - Uniso, com carga horária de 3 horas.

Sorocaba, 23 de abril de 2025.



---

**Profa. Dra. Maria Ogécia Drigo**  
Docente do Programa de Pós-Graduação em Comunicação e Cultura  
e do Programa de Pós-Graduação em Educação

ANEXO 7 – Certificado II Congresso Nacional de Agronomia On-line..



**II CONAGRO**  
II Congresso Nacional de Agronomia  
on-line  
03 e 06 de junho 2025

# Certificado

**APRESENTAÇÃO DE TRABALHO**

Certificamos que o trabalho intitulado

**EFICÁCIA DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE Salmonella spp. EM AMOSTRAS DE PRODUÇÕES AVÍCULAS DE PEQUENO PORTE**

de autoria de **Renata Lopes Simões da Silva, Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão e Marta.Vila Maria Duarte Carvalho**, foi submetido, **APROVADO E APRESENTADO**, na modalidade **Resumo Simples**, no evento **II Congresso Nacional de Agronomia On-line (II CONAGRO)**, realizado em **03/06/2025 a 06/06/2025**, organizado pela Bio10 Digital Cursos (CNPJ: 37.612.857/0001-72, com apoio científico da Wissen Editora e Journal of Education Science and Health - JESH, contabilizando carga horária total de **40** horas.

Verifique o código de autenticidade 36833808.3072634.6617872.6.8899414917089688574708 em <https://www.even3.com.br/documentos>

*Denise dos Santos Vila Verde*  
Prof. Dra. Denise dos Santos Vila Verde  
Coordenadora geral do II CONAGRO

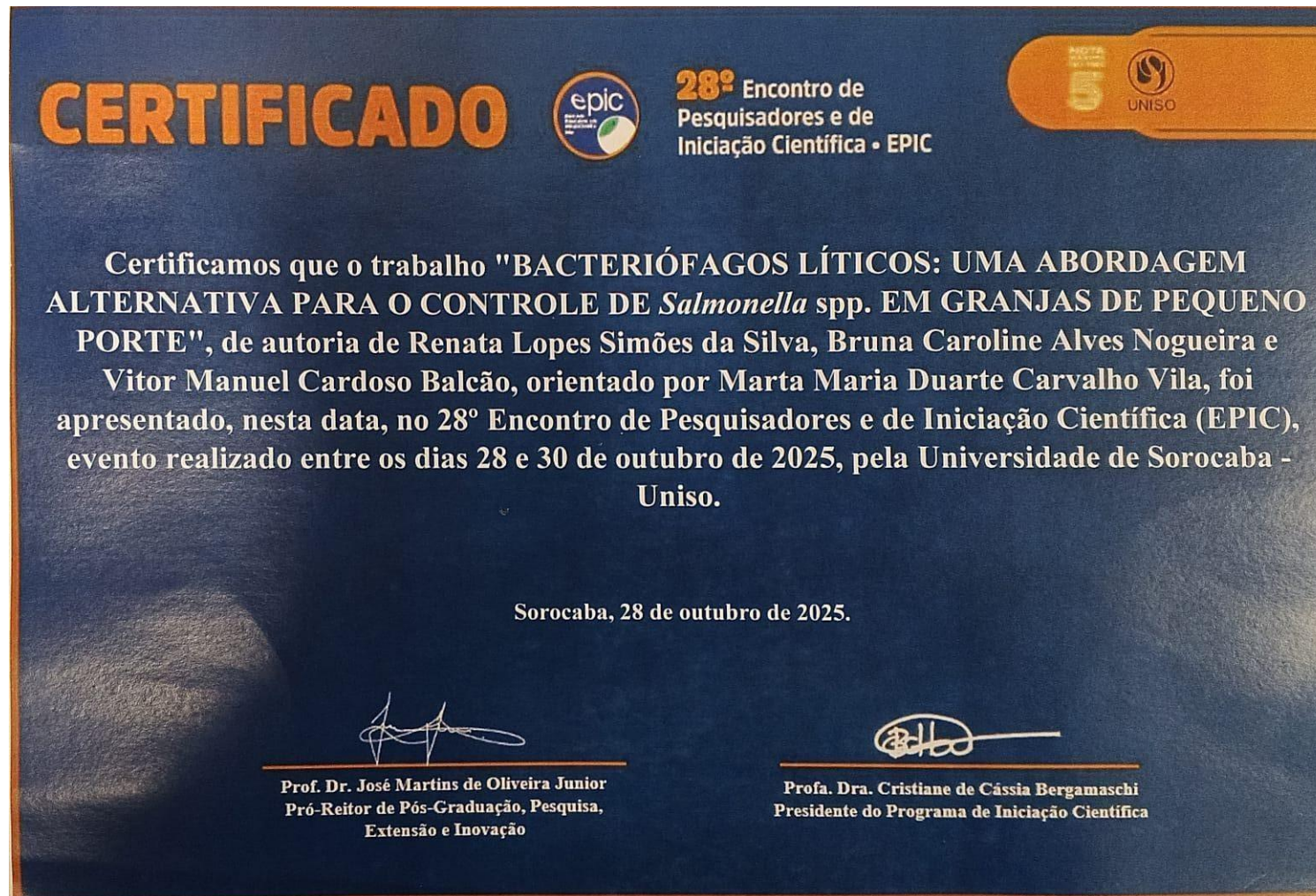
*Luanna Alves Miranda*  
Ma. Luanna Alves Miranda  
Coordenadora da Comissão Científica do II CONAGRO

Prof. Me. Junilson Soares da Silva  
Teresina - Piauí, 09 de junho de 2025.

BIO10 DIGITAL CURSOS  
CNPJ: 37.612.857/0001-72  
R. Tereza Maria de Carvalho, 475  
Ininga, CEP: 64.048-480

BIO10 DIGITAL CURSOS | Wissen | JESH



**ANEXO 9 – Certificado 28º Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica.**

**ANEXO 10– Certificado 36º Congresso Brasileiro de Virologia e 20º Encontro de Virologia do Mercosul.**

## 36th Brazilian Congress of Virology 20th Mercosur Virology Meeting

20- 23<sup>rd</sup> November 2025  
Campus UFMG  
Belo Horizonte, Brazil

**Certificate of participation**

The Brazilian Society for Virology (SBV) certify that **Renata Lopes Simões da Silva** presented the work entitled **Isolation and characterization of lytic phages for Salmonella spp. from Sorocaba and region**, coauthored by **Renata Lopes Simões da Silva; Bruna Caroline Alves Nogueira; Fernanda de Campos Moreli; Júlio Cesar Mescoloto; Alessandro Marques; Lucas Mateus Rivero Rodrigues; Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão; Marta Maria Duarte Carvalho Vila** during the Poster Session at the 36th Brazilian Congress of Virology & 20th Mercosur Virology Meeting (36CBV/20EVM), held from November 20th to 23rd, 2025, at the Federal University of Minas Gerais (UFMG), in Belo Horizonte, MG, Brazil.

  
 Betânia Paiva Drumond  
 President of SBV and 36CBV/20EVM

  
 Tatiana Domitrovic  
 First Secretary SBV







## ANEXO 11 – Quadro de Leitura das Galerias API20E

API® 20 E

07584 - L - 2019-06 - pt

### Quadro de Leitura

| TESTES | COMPONENTES ATIVOS                               | QTD (mg/ cúpula) | REAÇÕES/ENZIMAS  | RESULTADOS                                       |                                     |
|--------|--|------------------|--|--|-------------------------------------|
|        |  |                  |  | NEGATIVO   | POSITIVO                            |
| ONPG   | 2-nitrofenil-βD-galactopiranosida                | 0,223            | β-galactosidase (Orto nitrofenil-βD-galactopiranosidase) | Incolor  | Amarelo <sup>1)</sup>               |
| ADH    | L-arginina                                       | 1,9              | Arginina dihidrolase                                     | Amarelo  | Vermelho alaranjado <sup>2)</sup>   |
| LDC    | L-lisina   | 1,9              | Lisina descarboxilase                                    | Amarelo  | Vermelho alaranjado <sup>2)</sup>   |
| ODC    | L-ornitina                                       | 1,9              | Ornitina descarboxilase                                  | Amarelo  | Vermelho alaranjado <sup>2)</sup>   |
| [CIT]  | Citrato de trisódio                              | 0,756            | Utilização de citrato                                    | Verde pálido/ amarelo                            | Azul-esverdeado/ azul <sup>3)</sup> |
| H2S    | Tiosulfato de sódio                              | 0,075            | Produção de H <sub>2</sub> S                             | Incolor/acinzentado                              | Depósito preto/linha fina           |
| URE    | Ureia  | 0,76             | Urease   | Amarelo  | Vermelho alaranjado <sup>2)</sup>   |
| TDA    | L-triptofano                                     | 0,38             | Triptofano desaminase                                    | TDA imediato                                     |                                     |
|        |  |                  |  | Amarelo  | Castanho avermelhado                |
| IND    | L-triptofano                                     | 0,19             | Produção de indol  | JAMES imediato                                   |                                     |
|        |  |                  |  | Incolor/verde-amarelado pálido                   | Rosa                                |
| [VP]   | Piruvato de sódio                                | 1,9              | Produção de acetoína (Voges Proskauer)                   | VP 1 + VP 2 / 10 min                             |                                     |
|        |  |                  |  | Incolor/rosa pálido                              | Rosa/vermelho <sup>5)</sup>         |
| [GEL]  | Gelatina (origem bovina)                         | 0,6              | Gelatinase   | Sem difusão                                      | Difusão de pigmento preto           |
| GLU    | D-glucose  | 1,9              | Fermentação - oxidação (glucose) <sup>4)</sup>           | Azul/azul-esverdeado                             | Amarelo/amarelo acinzentado         |
| MAN    | D-manitol  | 1,9              | Fermentação - oxidação (manitol) <sup>4)</sup>           | Azul/azul-esverdeado                             | Amarelo                             |
| INO    | Inositol   | 1,9              | Fermentação - oxidação (inositol) <sup>4)</sup>          | Azul/azul-esverdeado                             | Amarelo                             |
| SOR    | D-sorbitol                                       | 1,9              | Fermentação - oxidação (sorbitol) <sup>4)</sup>          | Azul/azul-esverdeado                             | Amarelo                             |
| RHA    | L-ramnose  | 1,9              | Fermentação - oxidação (ramnose) <sup>4)</sup>           | Azul/azul-esverdeado                             | Amarelo                             |
| SAC    | D-sacarose                                       | 1,9              | Fermentação - oxidação (sacarose) <sup>4)</sup>          | Azul/azul-esverdeado                             | Amarelo                             |
| MEL    | D-melibiose                                      | 1,9              | Fermentação - oxidação (melibiose) <sup>4)</sup>         | Azul/azul-esverdeado                             | Amarelo                             |
| AMY    | Amigdalina                                       | 0,57             | Fermentação - oxidação (amigdalina) <sup>4)</sup>        | Azul/azul-esverdeado                             | Amarelo                             |
| ARA    | L-arabinose                                      | 1,9              | Fermentação - oxidação (arabinose) <sup>4)</sup>         | Azul/azul-esverdeado                             | Amarelo                             |
| OX     | Consultar o folheto informativo do teste oxidase |                  | Citocromo oxidase  | Consultar o folheto informativo do teste oxidase |                                     |

## ANEXO 12 – Resultados do teste de PCR realizados pela empresa *VetLab* das amostras 12, 29 e 36.



Vetlab Medicina Diagnóstica Veterinária  
Rua Bernardo Guimarães 136, Jardim Vergueiro  
18030-050 - Sorocaba - SP  
(15) 99727-2218 / @vetlabsorocaba

|  |  |
|--|--|
| Protocolo .....: 012013                                      | Data Cadastro: 08/01/2025 15:32              |
| Animal .....: 012  | Microchip .....:                             |
| Espécie .....: Canina  | Raça .....: SRD                              |
| Sexo .....: Macho  | Idade .....: 2 ano(s) e 0 mes(es) e 6 dia(s) |
| Proprietário .....: RENATA LOPES S. DA SILVA                 | Tel .....:                                   |
| Requisitado M.V.: RENATA LOPES S. DA SILVA - CRMV<br>53883sp | Clinica .....: RENATA LOPES S. DA SILVA      |

### 023150 / 2025 - SALMONELLA SPP - REAL TIME PCR QUALITATIVO

Assinado eletronicamente por: FERNANDA FERREIRA DE OLIVEIRA CRMV 64211-SP em 14/01/2025.

#### Resultado(s)

#### Salmonella spp. Real Time PCR Qualitativo

Material utilizado: POOL DE AMOSTRAS - SWAB + ALÇA CALIBRADA

#### METODO:

Probe-based qPCR (PCR em Tempo Real com Sonda TaqMan)

#### RESULTADO:

DETECTADO

Cycle threshold (Ct): 27,85

#### Interpretação dos resultados:

. DETECTADO: detecção (amplificação) de DNA de Salmonella spp. na amostra analisada.  
Ct: n° de ciclos necessários (pode variar até 40) para evidenciar a amplificação em reação Real Time PCR. Pode ter aplicação semiquantitativa, com valor de magnitude inversamente proporcional à concentração inicial do alvo na amostra analisada (quanto menor o Ct, maior a carga do alvo).  
Atenção: O valor de Ct não substitui a análise quantitativa por qPCR. Valores de Ct somente são válidos para comparação a partir de mesmo ensaio qPCR, kits e equipamentos utilizados.

. NÃO DETECTADO: não houve detecção (amplificação) de DNA de Salmonella spp. na amostra analisada.  
Importante: casos negativos com persistência da suspeita clínica devem ser novamente avaliados a partir de amostragem representativa da patogenia do microrganismo investigado, correlacionada com o quadro clínico apresentado no momento da coleta. Caso haja dúvida quanto à amostra ideal, o teste admite pool de até 3 amostras na mesma reação. Certifique-se de avaliar os diagnósticos diferenciais aplicáveis ao caso clínico e a eventual necessidade de exames complementares.

#### Comentários técnicos:

. A Salmonella spp. acomete todos os animais, incluindo aves e o homem. Normalmente, pode causar distúrbios gastrointestinais, mas também pode estar relacionada com transtornos reprodutivos.  
. Para aves com distúrbios gastrointestinais, recomendamos o Painel Diarreia Aviária. Para aves com distúrbios reprodutivos, recomendamos o Painel Reprodução Aviária.  
. Para monitoramento infeccioso em aves sugerimos o Painel Triagem Psitacídeos Completo.  
. Quadros gastrointestinais em cães e gatos sugerimos o Painel Diarreia Canina ou Felina.

  
Dr. Carla G. de Camargo  
CRMV - 11.596



Vetlab Medicina Diagnóstica Veterinária  
Rua Bernardo Guimarães 136, Jardim Vergueiro  
18030-050 - Sorocaba - SP  
(15) 99727-2218 / @vetlabsorocaba

|                    |  |                 |                                 |
|--------------------|--|-----------------|---------------------------------|
| Protocolo .....    | 012014                                     | Data Cadastro:  | 08/01/2025 15:34                |
| Animal .....       | 029  | Microchip ..... |                                 |
| Espécie .....      | Canina                                     | Raça .....      | SRD                             |
| Sexo .....         | Macho                                      | Idade .....     | 2 ano(s) e 0 mes(es) e 6 dia(s) |
| Proprietário ..... | RENATA LOPES S. DA SILVA                   | Tel .....       |                                 |
| Requisitado M.V.:  | RENATA LOPES S. DA SILVA - CRMV<br>53883sp | Clinica .....   | RENATA LOPES S. DA SILVA        |

#### 023151 / 2025 - SALMONELLA SPP - REAL TIME PCR QUALITATIVO

Assinado eletronicamente por: FERNANDA FERREIRA DE OLIVEIRA CRMV 64211-SP em 14/01/2025.

#### Resultado(s)

#### Salmonella spp. Real Time PCR Qualitativo

Material utilizado: POOL DE AMOSTRAS - SWAB + ALÇA CALIBRADA

#### METODO:

Probe-based qPCR (PCR em Tempo Real com Sonda TaqMan)

#### RESULTADO:

NÃO DETECTADO

Cycle threshold (Ct): --

#### Interpretação dos resultados:

. DETECTADO: detecção (amplificação) de DNA de Salmonella spp. na amostra analisada.

Ct: nº de ciclos necessários (pode variar até 40) para evidenciar a amplificação em reação Real Time PCR. Pode ter aplicação semiquantitativa, com valor de magnitude inversamente proporcional à concentração inicial do alvo na amostra analisada (quanto menor o Ct, maior a carga do alvo). Atenção: O valor de Ct não substitui a análise quantitativa por qPCR. Valores de Ct somente são válidos para comparação a partir de mesmo ensaio qPCR, kits e equipamentos utilizados.

. NÃO DETECTADO: não houve detecção (amplificação) de DNA de Salmonella spp. na amostra analisada.

Importante: casos negativos com persistência da suspeita clínica devem ser novamente avaliados a partir de amostragem representativa da patogenia do microrganismo investigado, correlacionada com o quadro clínico apresentado no momento da coleta. Caso haja dúvida quanto à amostra ideal, o teste admite pool de até 3 amostras na mesma reação. Certifique-se de avaliar os diagnósticos diferenciais aplicáveis ao caso clínico e a eventual necessidade de exames complementares.

#### Comentários técnicos:

. A Salmonella spp. acomete todos os animais, incluindo aves e o homem. Normalmente, pode causar distúrbios gastrointestinais, mas também pode estar relacionada com transtornos reprodutivos.

. Para aves com distúrbios gastrointestinais, recomendamos o Painel Diarreia Aviária. Para aves com distúrbios reprodutivos, recomendamos o Painel Reprodução Aviária.

. Para monitoramento infeccioso em aves sugerimos o Painel Triagem Psitacídeos Completo.

. Quadros gastrointestinais em cães e gatos sugerimos o Painel Diarreia Canina ou Felina.

  
Dr. Carla G. de Camargo  
CRMV - 11.592



Vetlab Medicina Diagnóstica Veterinária  
Rua Bernardo Guimarães 136, Jardim Vergueiro  
18030-050 - Sorocaba - SP  
(15) 99727-2218 / @vetlabsorocaba

|                    |  |                 |                                 |
|--------------------|--|-----------------|---------------------------------|
| Protocolo .....    | 012015                                     | Data Cadastro:  | 08/01/2025 15:35                |
| Animal .....       | 036  | Microchip ..... |                                 |
| Espécie .....      | Canina                                     | Raça .....      | SRD                             |
| Sexo .....         | Macho                                      | Idade .....     | 2 ano(s) e 0 mes(es) e 6 dia(s) |
| Proprietário ..... | RENATA LOPES S. DA SILVA                   | Tel .....       |                                 |
| Requisitado M.V.:  | RENATA LOPES S. DA SILVA - CRMV<br>53883sp | Clinica .....   | RENATA LOPES S. DA SILVA        |

#### 023152 / 2025 - SALMONELLA SPP - REAL TIME PCR QUALITATIVO

Assinado eletronicamente por: FERNANDA FERREIRA DE OLIVEIRA CRMV 64211-SP em 14/01/2025.

#### Resultado(s)

#### Salmonella spp. Real Time PCR Qualitativo

Material utilizado: POOL DE AMOSTRAS - SWAB + ALÇA CALIBRADA

#### METODO:

Probe-based qPCR (PCR em Tempo Real com Sonda TaqMan)

#### RESULTADO:

DETECTADO

Cycle threshold (Ct): 16,50

#### Interpretação dos resultados:

. DETECTADO: detecção (amplificação) de DNA de Salmonella spp. na amostra analisada.

Ct: nº de ciclos necessários (pode variar até 40) para evidenciar a amplificação em reação Real Time PCR. Pode ter aplicação semiquantitativa, com valor de magnitude inversamente proporcional à concentração inicial do alvo na amostra analisada (quanto menor o Ct, maior a carga do alvo). Atenção: O valor de Ct não substitui a análise quantitativa por qPCR. Valores de Ct somente são válidos para comparação a partir de mesmo ensaio qPCR, kits e equipamentos utilizados.

. NÃO DETECTADO: não houve detecção (amplificação) de DNA de Salmonella spp. na amostra analisada.

Importante: casos negativos com persistência da suspeita clínica devem ser novamente avaliados a partir de amostragem representativa da patogenia do microrganismo investigado, correlacionada com o quadro clínico apresentado no momento da coleta. Caso haja dúvida quanto à amostra ideal, o teste admite pool de até 3 amostras na mesma reação. Certifique-se de avaliar os diagnósticos diferenciais aplicáveis ao caso clínico e a eventual necessidade de exames complementares.

#### Comentários técnicos:

. A Salmonella spp. acomete todos os animais, incluindo aves e o homem. Normalmente, pode causar distúrbios gastrointestinais, mas também pode estar relacionada com transtornos reprodutivos.

. Para aves com distúrbios gastrointestinais, recomendamos o Painel Diarreia Aviária. Para aves com distúrbios reprodutivos, recomendamos o Painel Reprodução Aviária.

. Para monitoramento infeccioso em aves sugerimos o Painel Triagem Psitacédeos Completo.

. Quadros gastrointestinais em cães e gatos sugerimos o Painel Diarreia Canina ou Felina.

  
Dr. Carla G. de Camargo  
CRMV - 11.592