

VÍRUS PREDADORES DE BACTÉRIAS

são aliados no combate à salmonela

VIRUSES THAT PREY ON BACTERIA

are our allies in the fight against *Salmonella*

Por/By: Guilherme Profeta
Foto/Photo: Fernando Rezende

Na ilustração, vários bacteriófagos (destacados em vermelho) predam uma bactéria
In the illustration, several bacteriophages (highlighted in red) prey on a single bacterium

Os vírus são organismos microscópicos desprovidos de metabolismo, o que abre um amplo debate — para o qual ainda não existe consenso — voltado a responder se eles podem ser considerados seres vivos ou não. Isso também significa que, para que possam se reproduzir, os vírus precisam obrigatoriamente parasitar as células de outros organismos, que podem variar desde bactérias até seres humanos. Nesse processo, diferentes vírus podem causar diferentes doenças, eventualmente até mesmo levando os seus hospedeiros à morte. O SARS-CoV-2, vírus causador da Covid-19, é provavelmente um dos exemplos mais memoráveis, mas está longe de ser o único: outros exemplos de doenças virais incluem a gripe comum, a gripe aviária, a febre amarela, a dengue, a Aids (ou Síndrome da Imunodeficiência Humana), a febre hemorrágica ebola, entre inúmeras outras. Mas isso quer dizer que *todos* os vírus são necessariamente vilões quando o assunto é saúde?

Definitivamente não.

Os chamados bacteriófagos — termo que vem do grego e significa “comedor de bactérias” — compreendem um tipo específico de vírus que, como o nome já diz, são especializados em predação bacterianas. Na ilustração da página 22, eles estão destacados em vermelho, representados enquanto atacam um desses organismos, também microscópicos. “Os bacteriófagos (ou simplesmente fagos) são vírus que infectam única e exclusivamente as células bacterianas”, explica a professora mestra Thais Jardim Oliveira, que atua em diversos cursos da área da Saúde na Universidade de Sorocaba (Uniso). “Eles não possuem maquinaria metabólica própria, sendo por isso parasitas intracelulares obrigatórios, que necessitam de uma célula hospedeira bacteriana viável para se replicar”. Isso quer dizer que — ainda que os fagos possam gerar reações imunogênicas se forem colocados diretamente em contato com o sistema imune de um animal (ou de um ser humano) — eles são consideravelmente seguros, uma característica que os torna objeto de diversas pesquisas desenvolvidas na Uniso.

Viruses are microscopic organisms devoid of metabolism, which opens up a broad debate—for which there is no consensus to this day—aimed at answering whether they can be considered living beings or not. This also means that, in order to replicate, viruses need to parasitize the cells of other organisms, that can range from bacteria to humans. In this process, different viruses can cause different diseases, eventually even leading their hosts to death. SARS-CoV-2, the virus that causes Covid-19, is probably one of the most memorable examples, but it is far from being the only one: other examples of viral diseases include the common flu, avian flu, yellow fever, dengue fever, AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), Ebola hemorrhagic fever, among countless others. But does this mean that *all* viruses are villains when it comes to human health?

Definitely not.

The so-called bacteriophages—a word that comes from Greek and means “bacteria eater”—are a specific type of virus that, as the name suggests, specialize in preying on bacteria. In the illustration on page 22, they are highlighted in red, represented as they attack one of these organisms, also microscopic. “Bacteriophages (or simply phages) are viruses that infect only and exclusively bacterial cells,” explains professor Thais Jardim Oliveira, who is a faculty member in many of Uniso’s undergraduate programs related to health. “They do not possess their own metabolic machinery, therefore being obligatory intracellular parasites that require a viable bacterial host cell in order to replicate.” This means that—even though phages can generate immunogenic reactions if they come into direct contact with the immune system of an animal (which includes humans)—they are considerably safe, a characteristic that makes them the subject of various research projects developed at Uniso.

It is possible, for example, to use phages to treat diseases caused by bacteria, since these viruses, if inoculated into a patient affected by a bacterial disease (such as pneumonia), will combat

É possível usar fagos para tratar doenças causadas por bactérias, por exemplo, já que esses vírus, se inoculados num paciente acometido por uma doença bacteriana (como a pneumonia), combaterão as bactérias responsáveis pela infecção sem causar nenhum dano ao paciente em si. Foi disso que tratou **UMA REPORTAGEM** publicada na edição piloto da revista Uniso Ciência (jun./2018), a partir de pesquisas desenvolvidas no PhageLab, o Laboratório de Biofilmes e Bacteriófagos da Uniso. Mas essa não é a única aplicação possível; em sua pesquisa de mestrado, defendida em 2021 no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade, Oliveira pesquisou a viabilidade de usar fagos para o controle da bactéria *Salmonella enterica*, uma das principais responsáveis por contaminações na indústria de alimentos.

the bacteria responsible for the infection without causing any harm to the patients themselves. This was the subject of **A STORY** published as part of the pilot issue of the Science @ Uniso magazine (June/2018), based on a research developed at Uniso’s PhageLab, the university’s Biofilm and Bacteriophages Laboratory. But this is not the only possible application; as part of her Master’s research, defended in 2021 at Uniso’s graduate program in Pharmaceutical Sciences, Oliveira investigated the possibility of using phages to control *Salmonella enterica*, one of the bacteria that causes the most concern when it comes to contamination in the food industry.



Na edição 1 (jun./2018) da revista Uniso Ciência, você pode ler a reportagem “Bacteriófagos são alternativa no combate às bactérias multiresistentes”, sobre pesquisas voltadas à terapia fágica para o combate a outra bactéria, a *Pseudomonas aeruginosa*, muito comum nos hospitais. Siga o link pelo QR code para ler na íntegra

In issue #1 (June/2018) of the Science @ Uniso magazine, you can read the story “Bacteriophages are an alternative in the fight against multiresistant bacteria,” which covers research focused on phage therapy aimed at combating another species of bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, commonly found in hospitals. Use the QR code to follow the link and read the full story



“As doenças transmitidas por alimentos são uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que apenas as doenças que causam diarreia (geralmente devido ao consumo de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos) matam 1,9 milhões de crianças todos os anos”, destaca Oliveira. As salmoneloses, como são chamadas as infecções causadas por diferentes variações da *Salmonella*, bem como a febre tifóide (doença mais grave, também causada pela mesma bactéria), compreendem categorias importantes dentre as doenças causadas por alimentos, fazendo delas um grave problema de saúde pública, no Brasil e em todo o mundo, ao qual as indústrias de processamento de alimentos estão constantemente atentas.

“Foodborne illnesses are one of the leading causes of mortality worldwide. According to the World Health Organization (WHO), it is estimated that diseases that cause diarrhea (usually due to the consumption of food contaminated by pathogenic microorganisms) kill 1.9 million children every year,” Oliveira emphasizes. Among all foodborne illnesses, the infections caused by different variations of *Salmonella*, as well as the typhoid fever (which is a more severe disease, also caused by *Salmonella*), constitute significant categories. They are a serious public health issue both in Brazil and worldwide, to which food processing industries pay serious attention.



Foto/Foto: Natalia (Adobe Stock)

A bactéria *Salmonella enterica* é uma grande preocupação para a indústria de processamento de alimentos, em especial de carne de aves

Salmonella enterica is a species of bacteria that poses a major threat when it comes to the food processing industry, especially the processing of poultry meat

Mas, se esse é um problema tão grave, por que, então, não usar antibióticos químicos para se livrar das bactérias e resolvê-lo de uma vez? Na verdade, essa é uma das alternativas preferidas hoje em dia. A grande questão é que, com o tempo, as bactérias tendem a se tornar **RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS**, o que justifica a necessidade de as indústrias alimentícias terem alternativas à mão. É exatamente aí que entra o biocontrole por meio de fagos, especialmente por eles serem muito fáceis de isolar. É claro que as bactérias sempre podem ganhar resistência aos próprios fagos, como já fazem com os antibióticos, mas, como é muito mais rápido e barato isolar um novo fago do que desenvolver um novo antibiótico, utilizá-los acaba sendo, também, uma vantagem do ponto de vista financeiro.

But if this is such a serious problem, why not just use chemical antibiotics to get rid of the bacteria and solve it once and for all? In fact, that is precisely one of the preferred alternatives nowadays. The big issue with that solution is that bacteria tend to become **RESISTANT TO ANTIBIOTICS** over time, which justifies the need to have alternatives at hand. This is where biocontrol through phages comes into play, especially because phages are quite easy to isolate. Of course bacteria can still develop resistance to phages, just as they do with antibiotics, but since it is much faster and cheaper to isolate a new phage in comparison to developing a new antibiotic, using them also becomes advantageous from a financial perspective.



Na edição 3 (jun./2019) da revista Uniso Ciência, você pode ler a reportagem “Resistência bacteriana: solução perpassa restrição de uso de antibióticos e educação”, sobre a evolução de bactérias multirresistentes, como são chamadas aquelas que resistem a vários antibióticos simultaneamente. Siga o link pelo *QR code* para ler na íntegra



In issue #3 (June/2019) of the Science @ Uniso magazine, you can read the story “Antimicrobial resistance: solution implicates restriction on antibiotics, and education,” about the evolution of multiresistant bacteria, namely those that grow resist to multiple antibiotics simultaneously. Use the *QR code* to follow the link and read the full story

COMO ENCONTRAR UM FAGO?

Para encontrar um fago específico e isolá-lo de seu ambiente natural, Oliveira explica que é preciso saber onde procurar: “A bactéria que nós selecionamos para esse estudo é conhecida por ser um dos principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos, especialmente por carne de aves e ovos. Acontece que os bacteriófagos específicos (aqueles que predam somente uma bactéria) costumam estar justamente onde existe o maior foco dessas bactérias específicas. Foi por isso que, para encontrar os fagos, nós procuramos nas águas residuais de uma indústria de pasteurização de ovos, pois é nesse tipo de esgoto em que há maior probabilidade de encontrá-los, justamente junto às bactérias que foram eliminadas no processo de pasteurização, e que eles estão predando.”

À água residual, depois de recolhida, foi acrescentada uma quantidade ainda maior da bactéria alvo, para motivar a multiplicação das partículas virais. Depois disso, a amostra foi filtrada, de modo a remover quaisquer contaminantes (como restos de outras células presentes no esgoto e a própria *Salmonella enterica*), deixando assim apenas os bacteriófagos isolados — no caso da pesquisa de Oliveira, duas variações diferentes. O próximo passo foi cultivá-los em ambiente controlado, listar suas características e colocá-los à prova, para testar se eles são, de fato, viáveis para o biocontrole da *Salmonella enterica* em escala industrial. “Nesse processo, foram determinados

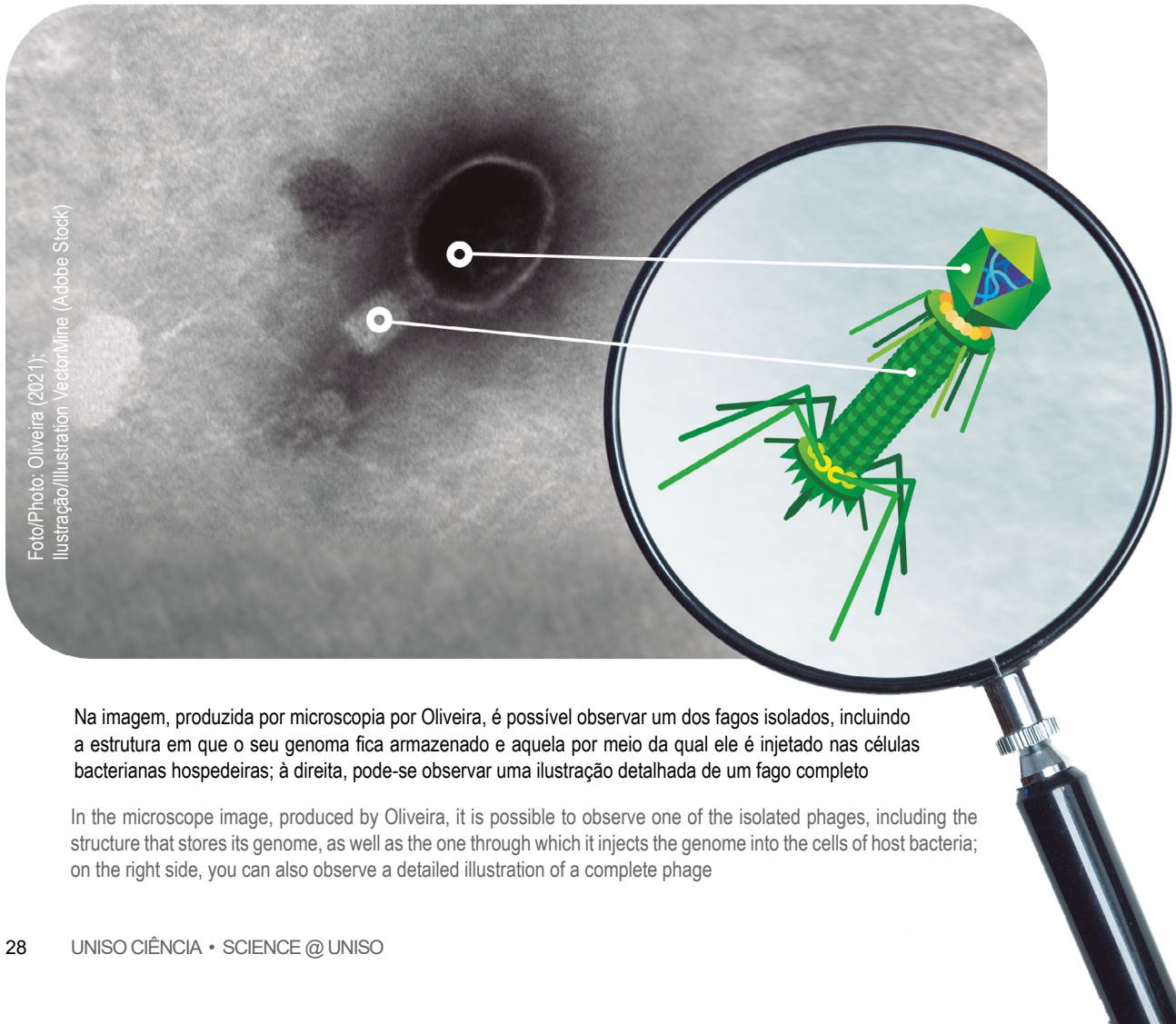
HOW TO FIND A PHAGE?

Oliveira explains that, in order to find a specific phage and isolate it from its natural environment, one needs to know where to look: “The target bacterium we selected for this study is known to be one of the main agents related to foodborne illnesses, especially caused by the ingestion of poultry and egg products. Specific bacteriophages (namely, those that prey solely on one kind of bacteria) are usually found exactly where there is the greatest concentration of this specific species of bacteria. And that is why we searched in the wastewater of an egg pasteurization facility, since this type of sewage is where there is the highest probability of finding them, while they are preying on the bacteria that were eliminated in the pasteurization process.”

To the collected wastewater, an even greater amount of the target bacteria was added, in order to promote the multiplication of viral particles even further. Afterward, the sample was filtered to remove any contaminants (such as remnants of other cells present in the sewage water, as well as the *Salmonella enterica* itself), leaving only the isolated bacteriophages—two different variations, in the case of Oliveira’s research. The next step was to cultivate them in a controlled environment, record their characteristics, and put them to the test to see if they are indeed viable for the biocontrol of *Salmonella enterica* on an industrial scale. “In this process, many things were determined: the size of the viral particles, how long they took to



A professora mestra Thais Jardim Oliveira, no PhageLab, o Laboratório de Biofilmes e Bacteriófagos da Uniso
 Professor Thais J. Oliveira, at Uniso's PhageLab, the university's Biofilm and Bacteriophages Laboratory



Foto/Photo: Oliveira (2021);
 Ilustração/Illustration: VectorMine (Adobe Stock)

Na imagem, produzida por microscopia por Oliveira, é possível observar um dos fagos isolados, incluindo a estrutura em que o seu genoma fica armazenado e aquela por meio da qual ele é injetado nas células bacterianas hospedeiras; à direita, pode-se observar uma ilustração detalhada de um fago completo

In the microscope image, produced by Oliveira, it is possible to observe one of the isolated phages, including the structure that stores its genome, as well as the one through which it injects the genome into the cells of host bacteria; on the right side, you can also observe a detailed illustration of a complete phage

o tamanho das partículas virais, o tempo que elas levam para infectar e causar a ruptura das bactérias, qual o tipo de material genético de cada partícula, a especificidade dos fagos para a salmonela e, por fim, a melhor concentração de fagos para inibir o crescimento da bactéria”, conta Oliveira.

A conclusão é que ambos os fagos, quando combinados num coquetel, se mostraram promissores no controle da bactéria hospedeira, mesmo considerando o fato de ela não ter sido completamente eliminada nos ensaios desenvolvidos. Para ampliar essa eficácia, a ideia é que, em estudos futuros, mais fagos capazes de predação a *Salmonella enterica* sejam isolados e acrescentados ao coquetel, de modo a aumentar o espectro de sua ação e, assim, impedir que surjam bactérias resistentes.

“No que diz respeito ao processamento de alimentos, embora a prática ainda não seja adotada em escala industrial, o potencial desse tipo de biocontrole é imenso”, Oliveira conclui. “O custo é baixo e não há contraindicações, além de ser sempre mais interessante para as indústrias utilizar tratamentos de origem natural, como é o caso dos fagos, que não danificam as propriedades dos alimentos e nem contribuem para a seleção de bactérias multirresistentes a antibióticos.” Ela acredita, assim, que é apenas uma questão de tempo até que o biocontrole por meio de fagos — método provavelmente eficaz e seguro, de acordo com pesquisas como a sua — seja incorporado à indústria.

infect and cause the rupture of bacteria, the type of genetic material of each particle, how specialized these phages are when it comes to preying on *Salmonella*, and finally, the best concentration of phages to inhibit the growth of the bacteria,” Oliveira explains.

The conclusion is that, even though the target bacterium was not completely eliminated during the experiments performed by Oliveira, both phages, when combined into a blend, were considered promising in controlling the host bacterium. The idea is that, in order to enhance effectiveness, future studies should be focused on isolating and including more phages capable of preying on *Salmonella enterica*. Furthermore, adding them to the mix should broaden the spectrum of their action, thus preventing the emergence of resistant bacteria.

“When it comes to food processing, although this practice is not yet adopted on an industrial scale, the potential of this type of biocontrol is huge,” Oliveira concludes. “The cost is low and there are no contraindications. Besides that, it is always more interesting for industries to use treatments of natural origin, such as phages, which do not damage the properties of food nor contribute to the selection of multiresistant bacteria.” Therefore, she believes it is only a matter of time until phage biocontrol—a method proven to be effective and safe, according to research like hers—is incorporated into the industry.

Com base na dissertação “Isolamento, caracterização e avaliação in vitro de bacteriófagos líticos para o biocontrole de *Salmonella enterica*”, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba (Uniso), com orientação do professor doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão e coorientação da professora doutora Marta Maria Duarte Carvalho Vila, aprovada em 3 de agosto de 2021.

Accesse o texto completo da pesquisa (em português):
 Follow the link to access the full text of the original research (in Portuguese):

