

UNIVERSIDADE FEEVALE

Mestrado Acadêmico em Virologia

**BACTERIÓFAGO FEC.ESBL NO CONTROLE DE *Escherichia coli* EM CARNE
MOÍDA E PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA DE ISOLADOS DE *E. coli*
PERMISSIVOS AO FAGO**

CAROLINA GIL FELTES

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento em Virologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Simone Ulrich Picoli

Fevereiro de 2023

CAROLINA GIL FELTES

**BACTERIÓFAGO FEC.ESBL NO CONTROLE DE *Escherichia coli* EM CARNE
MOÍDA E PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA DE ISOLADOS DE *E. coli*
PERMISSIVOS AO FAGO**

Dissertação apresentada para obtenção do
grau de mestre em Virologia pela Universidade
Feevale.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Simone Ulrich Picoli

Fevereiro de 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Feltes, Carolina Gil

Bacteriófago fec.esbl no controle de escherichia coli em carne moída e perfil de resistência bacteriana de isolados de e. coli permissivos ao fago / Carolina Gil Feltes– 2023.

35 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Simone Ulrich Picoli

Dissertação (Mestrado) – Universidade Feevale – Pós-graduação em Virologia, Novo Hamburgo, 2023.

1. Bacteriófagos. 2. Drop Plate. 3. Biocontrole|em Alimentos. 4. Host Range. I. Picoli, Simone Ulrich, orient. II. Título.

CDU 57.08
CDD 579.26

Bibliotecária responsável
Lizete Flores da Silva CRB10/2724

RESUMO

Bactérias patogênicas em alimentos, tais como *Escherichia coli*, constituem um problema enfrentado pela indústria alimentícia, principalmente em alimentos de origem animal. Muitas técnicas usadas para controlar essas contaminações não são totalmente eficazes e podem alterar o cheiro, sabor, textura e valor nutricional dos alimentos. Os bacteriófagos, vírus que infectam e lisam bactérias, constituem uma alternativa de biocontrole interessante, pois não trazem malefícios para o ambiente ou para o ser humano. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade lítica do fago FEC.ESBL em carne moída intencionalmente contaminada com *E. coli* ATCC 13706 através da técnica de *Drop Plate* e determinar a gama de hospedeiros do fago através do ensaio *Host Range*. Foram utilizadas três concentrações distintas do fago (10^2 , 10^5 e 10^8 UFP/mL) para tratar o alimento contaminado e três tempos de análise (1, 3 e 8 dias). Verificou-se que a melhor ação bactericida foi obtida com o emprego da maior concentração do fago, resultando em média de lise de 95,26%. Junto disso, foram testados 100 isolados de *E. coli* frente ao fago para determinação da gama de hospedeiros. Observou-se que quatro isolados apresentavam prófago e foram excluídos do estudo, enquanto 32 foram permissivos à infecção fágica no teste *Host Range* (33,33%). Adicionalmente, foi realizado o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli* permissíveis ao fago frente a antibióticos de cinco classes distintas. Constatou-se que 18,75% eram bactérias multirresistentes e 90,62% eram resistentes a ampicilina/sulbactam. A perspectiva é que os resultados obtidos nesse estudo possam estimular a utilização de fagos como ferramenta para o biocontrole de *E. coli* em alimentos no Brasil.

Palavras-chave: Bacteriófagos. *Drop Plate*. Biocontrole em Alimentos. *Host Range*

ABSTRACT

Pathogenic bacteria in food, such as *Escherichia coli*, constitute a problem faced by the food industry, mainly in animal origin foods. Many techniques used to control these contaminations are not fully effective and can change the smell, taste, texture and nutritional value of food. Bacteriophages, viruses that infect and lyse bacteria, are an interesting alternative for biocontrol, as they do not harm the environment or human beings. Thus, the objective of this work was to evaluate the lytic activity of the FEC.ESBL phage in minced meat intentionally contaminated with *E. coli* ATCC 13706 through the *Drop Plate* technique and to determine the phage host range through the *Host Range* essay. Three different phage concentrations (10^2 , 10^5 and 10^8 PFU/mL) to treat the contaminated food and three analysis times (1, 3 and 8 days) were used. It was found that the best bactericidal action was obtained with the use of the highest phage concentration, resulting in an average lysis of 95.26%. In addition, 100 *E. coli* isolates were tested against the phage to determine the host range. It was observed that four isolates had prophage and were excluded from the study, while 32 were permissive to phage infection in the *Host Range* test (33.33%). Additionally, the antimicrobial susceptibility profile of phage-permissible *E. coli* isolates against antibiotics of five different classes was performed. It was found that 18.75% of the bacteria were multi-resistant and 90.62% of them were ampicillin/sulbactam resistant. The perspective is that the results obtained in this study may stimulate the use of phages as a tool for the biocontrol of *E. coli* in foods in Brazil.

Keywords: Bacteriophages. *Drop Plate*. Biocontrol in Food. *Host Range*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 ARTIGO.....	16
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

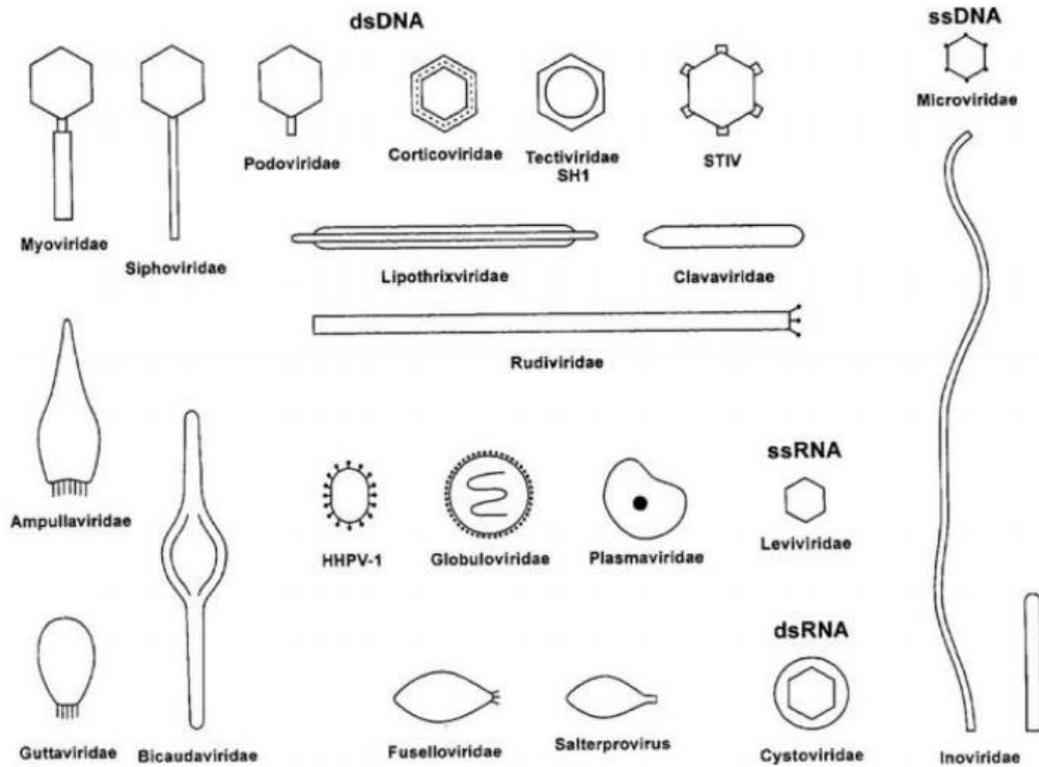
1 INTRODUÇÃO

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam especificamente bactérias, pois eles se ligam a receptores específicos presentes na superfície dos seus hospedeiros, tornando possível a lise do seu alvo. Eles são agentes ubíquos e são considerados as entidades mais abundantes do planeta, ou seja, encontram-se em ambientes inóspitos, como fontes termais vulcânicas, mas a grande maioria está presente nos oceanos e na superfície do solo. Além disso, eles podem estar presentes no trato gastrointestinal de humanos e animais e, dessa forma, são facilmente detectados nos esgotos de cidades e fazendas, pois os fagos compartilham uma ecologia comum com o seu hospedeiro (POLASKA; SOKOLOWSKA, 2019; TIWARI et al., 2014; YAN et al., 2020). A estimativa para a quantidade de fagos na biosfera é de 10^{31} partículas, contudo não se sabe o número exato desses agentes, pois não há pesquisas amplas que abrangem os diversos territórios do planeta, sendo difícil estimar com precisão (MOYE; WOOLSTON; SULAKVELIDZE, 2018; TIWARI et al., 2014).

A classificação taxonômica dos vírus é realizada pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), sendo o *Bacterial and Archaeal Subcommittee* (BAVS) o subcomitê encarregado pelos bacteriófagos. Esse subcomitê avalia as várias propriedades dos fagos, incluindo o genoma do vírus, a estrutura do capsídeo, se o vírus é ou não envelopado, a faixa de hospedeiros, a patogenicidade e a similaridade de sequência (CHIBANI et al., 2019; ICTV, 2023).

A estrutura dos bacteriófagos geralmente é composta pelo seu material genético empacotado em um capsídeo proteico que pode possuir diferentes conformações, como, poliédrico, filamentosos, pleomórfico ou ligado a uma cauda (Figura 1). Alguns fagos podem apresentar uma membrana lipídica externa ao capsídeo proteico, em contra partida, outros apresentam apenas a membrana lipídica (ZUPPI et al., 2022). O genoma dos fagos pode ser de DNA fita simples ou dupla (ssDNA, dsDNA) ou de RNA (ssRNA, dsRNA), sendo o tamanho entre 3,5 kb a 540 kb aproximadamente. Existe uma diversidade muito grande entre os fagos, contudo mais de 95% dos representantes estudados possuem genoma dsDNA com cauda e não são envelopados (DION; OECHSLIN; MOINEAU, 2020; SAUSSET et al., 2020; ZUPPI et al., 2022).

Figura 1: Diferentes formas dos capsídeos proteicos de bacteriófagos



Fonte: ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012.

O genoma dos bacteriófagos apresenta estrutura em mosaico devido a recombinações com as bactérias alvo e outros fagos. Esse mosaico consiste em sequências extremamente semelhantes justaposta com sequências que aparentemente não apresentam nenhuma similaridade. Devido a extrema variabilidade do genoma dos fagos a classificação taxonômica é um grande desafio e foi revisada recentemente pelo ICTV (CHIBANI et al., 2019; ZUPPI et al., 2022).

Os fagos também podem ser classificados de acordo com a estratégia de replicação aplicadas em seus hospedeiros, podendo ser lítico ou lisogênico. O início de ambos os ciclos é através do reconhecimento do fago pelos receptores celulares da bactéria hospedeira. Cada fago é específico para um tipo de bactéria, pois elas apresentam diferentes tipos de receptores em sua estrutura e os fagos conseguem se ligar com alto grau de especificidade, garantindo assim a ação seletiva do vírus frente a um tipo específico de bactéria (JORQUERA; GALARCE; BORIE, 2015; KASMAN; PORTER, 2022).

O ciclo lítico (Figura 2) é realizado por fagos denominados virulentos e ocorre através do reconhecimento da bactéria alvo pelos receptores de membrana, ou seja, ocorre a adsorção