

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/ GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Hyago Passe Pereira

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS
E SUAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES PARA CONTROLE DE
***Staphylococcus aureus* NA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE**

JUIZ DE FORA
2023

HYAGO PASSE PEREIRA

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS
E SUAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES PARA CONTROLE DE
Staphylococcus aureus NA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, área de concentração:
Genética e Biotecnologia, da Universidade
Federal de Juiz de Fora – MG para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Marta Fonseca Martins
Co-orientadora: Dr^a. Edna Froeder Arcuri

JUIZ DE FORA

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pereira, Hyago Passe.

Avaliação e caracterização de bacteriófagos líticos e suas endolisinas recombinantes para controle de *Staphylococcus aureus* na cadeia produtiva do leite / Hyago Passe Pereira. – 2023.
103 p. : il.

Orientadora: Marta Fonseca Martins

Coorientadora: Edna Froeder Arcuri

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. Fagoterapia. 2. Bacteriófagos. 3. Biofármaco. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. Endolisina Recombinante. I. Martins, Marta Fonseca, orient. II. Arcuri, Edna Froeder, coorient. III. Título.

HYAGO PASSE PEREIRA

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS
E SUAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES PARA CONTROLE DE
Staphylococcus aureus NA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em 16 de junho de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marta Fonseca Martins - Orientadora
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Cláudio Gallupo Diniz
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Felipe Alves de Almeida
Instituto de Laticínios Cândido Tostes - ILCT/EPAMIG

Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr^a. Emanuelle Baldo Gaspar
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Pecuária Sul

Juiz de Fora, 24/05/2023.



Documento assinado eletronicamente por **MARTA FONSECA MARTINS, Usuário Externo**, em 16/06/2023, às 13:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Galuppo Diniz, Professor(a)**, em 16/06/2023, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Alves de Almeida, Usuário Externo**, em 16/06/2023, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto Moreira Hungaro, Professor(a)**, em 16/06/2023, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emanuelle Baldo Gaspar, Usuário Externo**, em 20/06/2023, às 14:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uff (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1298574** e o código CRC **E46446A4**.

Dedico a Deus...

Aos meus pais Cristina Alves Passe e Jorge Soares Pereira, e a minha esposa Thalita, que não medem esforços para realizarem os meus sonhos, que se tornaram seus próprios sonhos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para a realização desta tese.

Em primeiro lugar, agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas por terem me proporcionado a oportunidade de realizar esse trabalho, com a concessão da bolsa de estudo, e adquirir conhecimentos valiosos para minha formação.

Agradeço também à Embrapa Gado de Leite pela estrutura disponibilizada para realização deste trabalho e o fomento para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora Dra. Marta Martins pela orientação, incentivo e paciência ao longo deste processo. Suas ideias e sugestões foram fundamentais para o desenvolvimento do meu projeto.

Agradeço à minha co-orientadora Dra. Edna Arcuri, pelo seu empenho, dedicação e valiosas contribuições para o sucesso deste trabalho.

Agradeço ainda aos membros da banca examinadora por dedicarem seu tempo e compartilharem suas opiniões e sugestões para melhorar este trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório e amigos, em especial Dani, Robert, Manu, Nicole, Clarissa e Marinna, que me apoiaram e encorajaram durante todo o período de pesquisa. Suas contribuições foram inestimáveis para o sucesso deste projeto.

Gostaria de agradecer especialmente à minha esposa Thalita, pelo amor, incentivo e compreensão durante todo o processo. Sem o seu apoio, essa conquista não seria possível.

Aos meus irmãos Daisy e Weslei, que sempre estiveram presentes e me apoiaram em todos os momentos.

Aos meus sogros Guto e Rosana, agradeço por estarem ao meu lado e por todo o apoio que me deram durante esta jornada.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus pais Jorge e Cristina por seu amor, apoio e encorajamento constantes ao longo de toda a minha jornada acadêmica. Sem o apoio de vocês, eu não teria chegado até aqui.

Obrigado a todos pelo papel importante que desempenharam na realização desta tese.

RESUMO

A mastite bovina é uma infecção que afeta os rebanhos leiteiros. Esta doença está frequentemente associada com *Staphylococcus aureus*, resultando em prejuízos econômicos para a cadeia produtiva do leite. Além disso, essas bactérias podem produzir enterotoxinas e causar intoxicação alimentar em humanos. O uso indiscriminado de antibióticos para controlar patógenos na pecuária e em humanos traz consigo riscos, como a seleção de bactérias resistentes, o que pode reduzir a eficácia desses medicamentos. Além disso, tais práticas têm gerado preocupações com a segurança dos alimentos e o impacto ambiental. Diante disso, um número cada vez maior de estudos científicos tem se dedicado a investigar novas opções terapêuticas que possam ser utilizadas como alternativas ou complementar ao tratamento convencional. Uma alternativa promissora para o controle biológico do *S. aureus* é a utilização de fagos líticos e suas endolisinas, que possuem a capacidade de lise bacteriana. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar fagos líticos e suas endolisinas recombinantes quanto à atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Os fagos foram submetidos a caracterização morfológica e bioquímica, bem como testados contra diferentes linhagens bacterianas de *S. aureus* e outras espécies. Além disso, as endolisinas dos Fagos 2 e 4 foram expressas, purificadas e avaliadas quanto ao espectro lítico. Elas também foram caracterizadas *in silico* em relação aos aspectos morfológicos, bioquímicos e de alergenicidade. Ao analisar a morfologia dos Fagos 2 e 4, foi possível concluir que ambos pertencem à família *Siphoviridae*. Dentre as linhagens de *S. aureus* testadas, o Fago 2 lisou 62,22% delas, enquanto o Fago 4 lisou 51,11%. O Fago 2 manteve sua estabilidade em uma faixa de temperatura entre 4°C e 37°C, bem como em concentrações de NaCl entre 50 mM e 250 mM. Além disso, no presente estudo, foi identificado que as duas endolisinas, EndF2 e EndF4, possuem um domínio CHAP, um domínio Amidase2 e um domínio de ligação à parede celular SH3, e ambas não apresentaram aspectos críticos de alergenicidade. Foi demonstrado que as endolisinas recombinantes exibem alta atividade lítica em relação a linhagens estafilocócicas, no qual, a EndF2 lisou 71,43% e a EndF4 76,20% das linhagens testadas de *S. aureus*. Conclui-se que os Fagos 2 e 4 e as suas respectivas endolisinas recombinantes EndF2 e EndF4 demonstraram ser ativos sobre linhagens de *S. aureus* e que podem constituir uma alternativa de controle deste patógeno.

Palavras-chave: Fagoterapia. Bacteriófagos. Biofármaco. *Staphylococcus aureus*. Endolisina Recombinante.

ABSTRACT

Bovine mastitis is an infection that affects dairy herds. This disease is often associated with *Staphylococcus aureus*, resulting in economic losses for the milk production chain. Furthermore, these bacteria can produce enterotoxins and cause food poisoning in humans. The indiscriminate use of antibiotics to control pathogens in livestock and humans carries with it risks, such as the selection of resistant bacteria, which can reduce the effectiveness of these drugs. In addition, such practices have raised concerns about food safety and environmental impact. Therefore, an increasing number of scientific studies have been dedicated to investigating new therapeutic options that can be used as alternatives to conventional treatment. A promising alternative for biological control of *S. aureus* is the use of lytic bacteriophages and their endolysins, which have the ability to lyse bacteria. Thus, the objective of this work was to evaluate and characterize lytic bacteriophages and their recombinant endolysins regarding their antimicrobial activity against *S. aureus*. The phages were submitted to morphological and biochemical characterization, as well as tested against different bacterial strains of *S. aureus* and other species. Furthermore, endolysins from Phage 2 and 4 were expressed, purified and evaluated for lytic spectrum. They were also characterized *in silico* in relation to morphological, biochemical and allergenicity aspects. By analyzing the morphology of Phages 2 and 4, it was possible to conclude that both belong to the *Siphoviridae* family. Among the strains tested, Phage 2 lysed 62.22% of them, while Phage 4 lysed 51.11%. Phage 2 maintained its stability in a temperature range between 4°C and 37°C, as well as in NaCl concentrations between 50 mM and 250 mM. Furthermore, in the present study, it was identified that the two endolysins, EndF2 and EndF4, have a CHAP domain, an Amidase2 domain and an SH3 cell wall binding domain, and both did not show critical aspects of allergenicity. It was demonstrated that recombinant endolysins exhibit high lytic activity against staphylococcal strains, in which EndF2 lysed 71.43% and EndF4 76.20% of the *S. aureus* strains tested. It is concluded that Phages 2 and 4 and their respective recombinant endolysins EndF2 and EndF4 proved to be active on *S. aureus* strains and that they may constitute an alternative to control this pathogen. To prove the results, *in vivo* tests are necessary.

Keywords: Phage therapy. Bacteriophages. Biopharmaceutical. *Staphylococcus aureus*. Recombinant Endolysin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática (A) e cultura de <i>Staphylococcus aureus</i> em Ágar Sal Manitol (B).	21
Figura 2 - Taxonomia das famílias pertencentes à ordem Caudovirales.....	26
Figura 3 - Morfologia das três principais famílias de fagos com cauda da ordem Caudovirales.	27
Figura 4 - Ciclo lítico do bacteriófago sobre uma célula hospedeira.	28
Figura 5 - Mecanismo de ação das proteínas fágicas VAPGH, holina e endolisina.	33
Figura 6 - Estrutura das células de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva.	34
Figura 7 - Estrutura modular das endolisinas e VAPGHs representada pelos domínios catalíticos e pelos domínios de ligação à parede celular.	34
Figura 8 - Esquema de placa utilizada para contagem de UFPs, como parte do processo de titulação do Fago 2.	39
Figura 9 - Esquema de placas com os possíveis resultados para o teste da gota com os Fagos 2 e 4.....	41
Figura 10 - Esquema da placa de diluição seriada dos fagos na placa de 96 poços.	45
Figura 11 - Placa de Petri com BHI ágar para determinação da CBM.	46
Figura 12 - Conjunto de tetos fixados em posição ortostática.	48
Figura 13 - Mapa do vetor pET21a(+) com os múltiplos sítios de ligações enzimáticas.	51
Figura 14 - Purificação e concentração de proteínas recombinantes.....	54
Figura 15 - Teste de atividade lítica das endolisinas com duas linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
Figura 16 - Fotomicrografia dos Fagos 2 e 4 em microscopia eletrônica de transmissão.	61
Figura 17 - A análise filogenética das endolisinas EndF2 e EndF4.....	62
Figura 18 - Estabilidade do Fago 2 em diferentes temperaturas.....	68
Figura 19 - Estabilidade do Fago 2 em diferentes concentrações de NaCl.....	69
Figura 20 - Estabilidade do Fago 2 em diferentes níveis de pH.	70
Figura 21 - Gel de eletroforese SDS-PAGE 8-16%, expressão de proteínas recombinantes.....	72

Figura 22 - Atividade lítica das endolisinas recombinantes em linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i>	73
Figura 23 - Teste para determinação da concentração de trabalho das endolisinas recombinantes.	74
Figura 24 - Representação da modelagem a partir das sequências proteicas das endolisinas recombinantes.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens utilizadas para determinação do espectro lítico dos Fagos 2 e 4.	41
Tabela 2 - Linhagens utilizadas para determinação do espectro lítico das endolisinas EndF2 e EndF4.	57
Tabela 3 - Sequências de aminoácidos das endolisinas recombinantes utilizadas para as análises.	59
Tabela 4 - Linhagens bacterianas susceptíveis à lise pelos Fagos 2 e 4.	63
Tabela 5 - Concentração bactericida mínima dos Fagos 2 e 4.	66
Tabela 6 - Contagem de colônias UFC/ mL nos tetos extracorpóreos.	67
Tabela 7 - Comparações de médias para o desdobramento da interação Temperatura x Tempo, para o número de fagos contabilizados ¹ em placas de Petri.	68
Tabela 8 - Comparações de médias para o desdobramento da interação Concentração de NaCl x Tempo, para o número de fagos contabilizados ¹ em placas de Petri.	69
Tabela 9 - Comparações de médias para o desdobramento da interação níveis de pH x Tempo, para o número de fagos contabilizados ¹ em placas de Petri.	71
Tabela 10 - Diâmetros (mm) dos halos de lise formados pelas endolisinas recombinantes.	74
Tabela 11 - Linhagens bacterianas susceptíveis à lise pelas endolisinas EndF2 e EndF4.	75
Tabela 12 - Análise dos parâmetros físico-químicos das endolisinas recombinantes.	77
Tabela 13 - Análise do potencial alergênico das endolisinas recombinantes.	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fatores de virulência, componentes e funções relacionadas a <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Quadro 2 - Estudos desenvolvidos em humanos e animais com a administração de fagos para o combate de diferentes patógenos.	29
Quadro 3 - Produtos aprovados à base de fagos disponíveis comercialmente.....	31
Quadro 4 - Estudos com a utilização exógena de endolisinas fágicas.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	20
2.2 FAGOS LÍTICOS	24
2.3.1 Ciclo lítico	27
2.3.2 Terapia com fagos	28
2.4 ENDOLISINAS DE FAGOS LÍTICOS	32
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS FAGOS 2 E 4	38
4.1.1 Propagação	38
4.1.2 Concentração por ultracentrifugação	38
4.1.3 Titulação	39
4.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão	40
4.2 DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO LÍTICO DOS FAGOS 2 E 4	40
4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	44
4.3.1 Preparo do inóculo bacteriano	44
4.3.2 Montagem da placa	44
4.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	45
4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FAGOS EM TETOS EXTRACORPÓREOS BOVINOS	46
4.4.1 Obtenção de tetos bovinos	46
4.4.2 Obtenção de células bacterianas	46

4.4.3 Inoculação da linhagem bacteriana e fago nos tetos extracorpóreos.....	47
4.5 ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO DE NaCl, ESTABILIDADE TÉRMICA E pH...	48
4.5.1 Estabilidade do Fago 2 em diferentes concentrações de NaCl.....	48
4.5.2 Estabilidade térmica do Fago 2.....	48
4.5.3 Estabilidade do Fago 2 em diferentes níveis de pH	49
4.5.3 Análise estatística	49
4.6 AVALIAÇÃO DO ESPECTRO LÍTICO DAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES EndF2 E EndF4.....	50
4.6.1 Clonagem do gene da proteína recombinante a partir dos fagos líticos ..	50
4.6.2 Expressão, purificação e concentração de proteínas recombinantes	52
4.6.2.1 Expressão das proteínas recombinantes	52
4.6.2.2 Tratamento de lise celular	52
4.6.2.3 Purificação e concentração das proteínas recombinantes	53
4.6.2.4 Quantificação das proteínas recombinantes	54
4.6.3 Eletroforese SDS-PAGE.....	55
4.6.3.1 Preparo das amostras	55
4.6.4 Determinação da concentração de trabalho das endolisinas recombinantes.....	56
4.6.5 Determinação do espectro lítico das endolisinas recombinantes	56
4.7 ASPECTOS BIOQUÍMICOS E DE ALERGENICIDADE DAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES <i>IN SILICO</i>.....	59
4.7.1 Aspectos bioquímicos	59
4.7.1 Predição de alergenicidade	59
4.7.2 Modelagem molecular das endolisinas recombinantes.....	60
5 RESULTADOS.....	61
5.1 MORFOLOGIA DOS FAGOS.....	61
5.2 ESPECTRO LÍTICO DOS FAGOS.....	62
5.3 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	66

5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM TETOS EXTRACORPÓREOS	67
5.5 ESTABILIDADE DO TÉRMICA	67
5.6 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl.....	68
5.7 EFEITO DOS DOERENTES NÍVEIS DE pH.....	70
5.8 ATIVIDADE LÍTICA DAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES.....	72
5.7.1 Expressão, purificação e concentração de endolisinas recombinantes...	72
5.7.2 Concentração de trabalho das endolisinas recombinantes	74
5.9 ESPECTRO LÍTICO DAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES.....	75
5.8 CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> DAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES.....	77
5.8.1 Aspectos bioquímicos	77
5.8.2 Predição de alergenicidade	77
5.8.3 Modelagem das endolisinas recombinantes	78
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
APÊNDICE - PUBLICAÇÕES NO PERÍODO	98

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria com formato de coco, Gram-positiva, mesófila com característica de tolerar ampla faixa de temperatura (4 a 44°C, ótima condição 37°C) e pH (4,5 a 8,0, ideal 7,0) (TORTORA et al., 2016). Algumas linhagens de *S. aureus* são capazes de produzir enterotoxinas responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica, uma das causas mais prevalentes de gastroenterite no mundo (GRISPOLDI et al., 2021). Esse patógeno é reconhecido como uma causa frequente de infecções intramamárias subclínicas em vacas leiteiras e é comumente isolado do leite cru de bovino leiteiro que são acometidos por mastite (HASAN; HOSHYAR 2019; TORRES et al., 2023). Além disso, *S. aureus* é capaz de causar uma variedade de doenças em humanos, como infecções da pele, pneumonia, osteomielite e septicemia (TIGABU; GETANEH 2021; AL-HUSSANIY; KADHIM 2022). Além disso, *S. aureus* é capaz de crescer em diversas condições e ambientes e sua presença nos alimentos é uma grande preocupação para a segurança e a qualidade dos produtos industrializados ou produzidos tradicionalmente (SCHOUSTRUP et al., 2022). É um patógeno anaeróbico facultativo e consegue crescer na presença de 15% v/v de NaCl (SILVA et al., 2022). Atualmente, a utilização de antibióticos como a principal medida para o tratamento da mastite bovina causada por bactérias como *S. aureus* tem sido questionada devido ao surgimento e aumento da frequência de linhagens resistentes aos antimicrobianos e aos possíveis efeitos negativos na qualidade do leite e na saúde pública.

O uso de antibióticos em animais de produção pode levar à seleção de bactérias resistentes e representa, assim, um risco à saúde pública (OLIVEIRA et al., 2020). No caso específico de *S. aureus*, a resistência aos antibióticos β -lactâmicos é uma preocupação crescente já que eles são utilizados para tratamentos de doenças em humanos (LADE; JOO; KIM 2022). Além disso, o uso de antibióticos ao longo da cadeia de produção de leite pode comprometer a qualidade e segurança dos produtos lácteos devido à possibilidade de resíduos contaminantes dessa classe de medicamentos (CHIESA et al., 2020; VIRTO et al., 2022). O uso indiscriminado e contínuo de antibióticos tem levado à seleção de linhagens bacterianas resistentes e ao aumento da disseminação desses micro-organismos, dificultando o controle por meio de métodos terapêuticos convencionais (PATEL et al., 2021). Diante disso, é

relevante desenvolver estratégias alternativas de tratamento, como o uso de fagos líticos ou de suas endolisinas, para assegurar o controle de *S. aureus* e a qualidade dos produtos alimentícios.

Bacteriófagos (fagos) são vírus que infectam bactérias (PRINCIPI; SILVESTRI; ESPOSITO 2019), e a aplicação terapêutica deliberada de fagos em infecções causadas por bactérias multirresistentes é uma alternativa promissora aos antimicrobianos. Os fagos são a entidade biológica mais abundante da Terra e desempenham um papel fundamental na ecologia das comunidades microbianas, incluindo a microbiota humana e o solo (NAVARRO; MUNIESA 2017). Os fagos são caracterizados por apresentarem um espectro estreito de hospedeiros e por uma partícula de fago típica pode infectar apenas um número limitado de espécies ou linhagens bacterianas intimamente relacionadas dentro da mesma espécie (ROSS; WARD; HYMAN 2016). Quando um fago entra na célula bacteriana, inicia um dos possíveis ciclos de infecção (pseudolisogênico, crônico, lisogênico, lítico, entre outros); os fagos virulentos seguem o ciclo de infecção lítico, onde rapidamente lisam sua célula hospedeira e liberam partículas virais, enquanto os fagos temperados podem integrar seu ácido nucleico no genoma do hospedeiro e seguir o ciclo lisogênico (ABDELSATTAR et al., 2021). O uso de fagos apresenta diversas vantagens, incluindo sua autorreplicação e autolimitação, o que significa que eles só se reproduzem enquanto a bactéria hospedeira estiver presente e gradualmente desaparecem no indivíduo ou ambiente. Além disso, eles são altamente específicos, infectando apenas a bactéria-alvo. Recentemente, as proteínas dos fagos (endolisinas) têm despertado grande interesse como agentes antimicrobianos, particularmente contra bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* (HO et al., 2022; HAMED; AWNI; ABDULAMIR 2023; KIM; SEO 2023).

As endolisinas são enzimas produzidas por fagos líticos capazes de clivar a parede celular bacteriana. Essas enzimas são codificadas pelo genoma do bacteriófago e são sintetizadas no final do ciclo lítico para promover a lise da célula hospedeira e liberar vírions recém-produzidos. Além disso, as endolisinas de fagos que infectam hospedeiros Gram-positivos também são capazes de lisar rapidamente as bactérias quando aplicadas de forma exógena (OECHSLIN et al., 2022).

Essas proteínas têm potencial como agentes antimicrobianos devido a várias características, como seu modo de ação distinto e altamente específico, sua atividade contra bactérias independentemente do padrão de suscetibilidade a

antibióticos e sua capacidade de não afetar outros micro-organismos que não sejam seus alvos (RAHMAN et al., 2021; SHANNON; RADFORD; BALAMURUGAN 2020). Diversos estudos têm avaliado a aplicação de endolisinas no controle de infecções bacterianas, destacando-se a eficácia dessas enzimas contra patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (KHAN et al., 2022; OECHSLIN et al., 2022; KIM; SEO 2023).

Desta forma, o objetivo do presente estudo é caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana de fagos líticos e suas endolisinas recombinantes contra *S. aureus*, utilizando isolados previamente identificados (LEITE et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

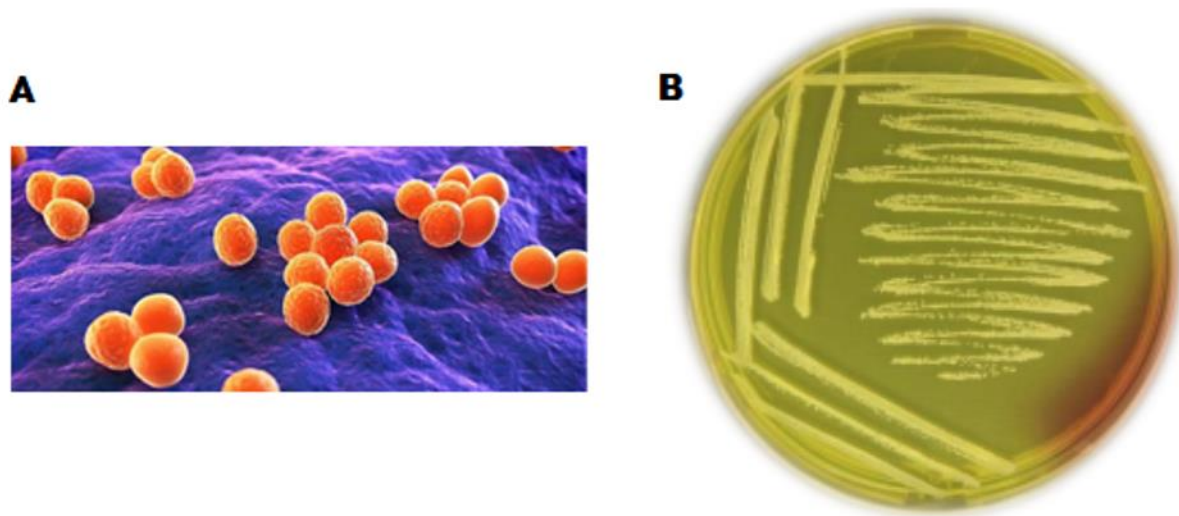
2.1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que pode causar infecções em animais e humanos (TORTORA 2016; TORRES et al., 2023). No caso da mastite bovina, essa bactéria é uma das principais causadoras da doença, afetando a saúde das glândulas mamárias das vacas e, conseqüentemente, a produção de leite (HASAN; HOSHYAR 2019; TORRES et al., 2023). A transmissão ocorre principalmente durante a ordenha, quando as bactérias presentes nas mãos do ordenhador ou no ambiente contaminado entram em contato com os tetos da vaca (SCHNITT; TENHAGEN 2020). O tratamento da mastite causada por *S. aureus* pode ser difícil, pois essa bactéria é capaz de formar biofilmes e desenvolver resistência a antimicrobianos (SAEED et al., 2022), sendo necessária a implementação de medidas de prevenção e controle da doença.

O gênero de bactérias *Staphylococcus* é um grupo de micro-organismos Gram-positivos em forma de cocos, sem flagelo, que possuem uma parede celular relativamente espessa (TORTORA 2016). As linhagens pertencentes a este gênero são capazes de crescer em condições aeróbicas e anaeróbicas e em ambientes como o solo, a água ou em diversos tecidos animais (SILVA et al., 2022).

Entre os estafilococos, existem três principais espécies patogênicas: *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. *S. aureus* é uma bactéria mesófila (10 a 44°C, temperatura ótima de crescimento 37°C), desenvolve-se em níveis diferentes de pH (4,5 a 8,0, ideal 7,0) e presença de NaCl (até 15% v/v), anaeróbica facultativa e é a única capaz de produzir uma exoenzima que coagula o plasma sanguíneo. Esta linhagem é geralmente chamada de *Staphylococcus* dourado por causa das colônias de cor amarela que são formadas quando cultivadas em ágar Sal Manitol (Figura 1A, B) (TORTORA 2016; SILVA et al., 2022).

Figura 1 - Representação esquemática (A) e cultura de *Staphylococcus aureus* em Ágar Sal Manitol (B).



Fonte: Google Imagens.

Além das características já citadas, *S. aureus* possui fatores de virulência (Quadro 1), que são estruturas utilizadas pelos patógenos para garantir a aderência, invasão e permanência na célula do hospedeiro. A expressão de virulências é resultado da interação entre o micro-organismo, o hospedeiro e o ambiente, o que torna este micro-organismo versátil e de difícil controle (HARPER *et al.*, 2018).

Quadro 1 - Fatores de virulência, componentes e funções relacionadas a *Staphylococcus aureus*.

Fatores	Componentes	Funções
Exoenzimas	Catalase	Neutraliza o efeito tóxico do peróxido de hidrogênio produzido durante o processo de bacteriófagocitose.
	Coagulase	Enzima que coagula o plasma e forma uma proteção ao redor do micro-organismos garantindo o início da infecção.
	Lipases	Promovem a propagação de <i>S. aureus</i> na pele (hidrolisando áreas sebáceas) e em tecido subcutâneo, a formação de biofilmes, aumento de abscessos e letalidade celular.
	Hialuronidases	Possibilitam a maior proliferação da célula bacteriana nos tecidos infectados.

Cont.

Fatores	Componentes	Funções
	Fibrinolisinase	Degrada a fibrina, permitindo que o patógeno se espalhe ao redor do tecido.
	Fosfatidil inositol - fosfolipase C	Aumenta a viabilidade do patógeno no sangue humano.
Exotoxinas	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico-1	Ativa as células T e anticorpos. Relacionada a infecções associadas a tampões menstruais e a infecções pós-cirúrgicas.
	Enterotoxinas estafilocócicas	Ativa as células T e anticorpos. Proteínas extracelulares produzidas no alimento, resistentes ao calor e causa de intoxicação alimentar.
	Toxina esfoliativa ou epidermolítica	Induz proliferação das células T na derme. Toxina produzida capaz de originar dermatites esfoliativas em crianças.
	Citotoxinas: Hemolisinas (a,b,d,g)	Caracterizam-se pela ação de lise sobre as células do sistema imunológico principalmente os neutrófilos, linfócitos e leucócitos.
	Citotoxinas: Leucocidina	Induzem lise nos leucócitos.
Estruturas de superfície	Cápsula	Polímero de polissacarídeo secretado que encapsula a parede celular da bactéria, protege superfície bacteriana de opsoninas e células imunológicas.
	Adesinas	Proteínas importantes à fase inicial de adesão do micro-organismo à célula por se associarem à fibronectina e a elastina.
	Proteína A	Interage com a região Fc da IgG e reduz efeito bacteriófagocitário.

Fonte: ARMITANO; LINDER, (2017); UKPANA; UPLA, (2017), adaptado.

Nos últimos anos, as exotoxinas, especialmente as enterotoxinas estafilocócicas, têm sido apontadas como um grande desafio para a saúde pública. Estas moléculas são resistentes ao calor e mesmo após o tratamento térmico de alimentos, sua eliminação é difícil (DARWISH et al., 2018). A ingestão destas toxinas pode resultar em intoxicação alimentar, causando sintomas como náusea, vômito, diarreia, cólica abdominal e febre, além de possíveis complicações como insuficiência renal e hepática, distúrbios cerebrais, neurais e paralisia, ou até mesmo óbito (WALKER-YORK-MOORE; MOORE; FOX, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera as Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) uma grande preocupação de saúde pública global. Segundo dados mais recentes, alimentos inseguros causam anualmente cerca de 600 milhões de casos de DTHA e mais de 420.000 mortes em todo o mundo. Dessas mortes, estima-se que 30% ocorram em crianças menores de 5 anos de idade (WHO, 2022). No entanto, é importante ressaltar que essas estimativas são provavelmente subestimadas, já que muitos casos de DTHA não são relatados ou notificados em vários países. Além disso, o impacto das DTHA na saúde pública pode ser ainda maior em grupos vulneráveis, como populações com baixa imunidade e idosos (WHO, 2022).

No Brasil, o Ministério da Saúde divulgou em 2021 que no período de 2007 a 2020, foram notificados, por ano, uma média de 662 surtos de DTHA, com o envolvimento de 156.691 doentes (média de 17 doentes/surto), 22.205 hospitalizados e 152 óbitos (BRASIL, 2023). A identificação dos alimentos envolvidos na doença e do patógeno causador ainda é um desafio no Brasil, já que a maioria dos casos são subnotificados. No entanto, os dados mostram que, entre os patógenos mais frequentes, a *Salmonella* ssp. continua sendo a principal causa de DTHA no Brasil, com 35,2% dos casos notificados, seguida por norovírus (17,7%), *E. coli* (8,8%), *S. aureus* (4,1%) e rotavírus (3,2%) (BRASIL, 2023).

Além da relação de *S. aureus* com as DTHA, outros fatores de virulência como a estrutura da membrana e suas associações, podem interferir diretamente na eficácia da administração de antibióticos (ANDRADE et al., 2021). Como dito anteriormente, o *S. aureus* é um dos principais agentes causadores de doenças em animais e humanos. Hoje, o tratamento mais utilizado para combater este patógeno é a base de antibióticos (JAYALAKSHMI et al., 2017; VERMA et al., 2021).

Na indústria alimentícia, é comum a detecção de resíduos de antibióticos em alimentos devido ao seu uso indiscriminado. Quando utilizados na produção de leite e derivados, podem prejudicar o processamento de lácteos, uma vez que inibem a ação do fermento na produção de queijos e iogurtes (JAYALAKSHMI et al., 2017).

Os resíduos de antibióticos, quando ingeridos, oferecem efeito nocivo à saúde humana, mesmo em baixas concentrações. A ingestão dos resíduos de antibióticos utilizados para o combate à infecção de *S. aureus* em rebanhos leiteiros, pode causar efeitos indesejáveis, como carcinogenicidade (sulfametazina, oxitetraciclina), mutagenicidade, nefropatia (gentamicina), hepatotoxicidade,

distúrbios reprodutivos, toxicidade da medula óssea (cloranfenicol) (PRIYANKA; SHEORAN; GANGULY, 2017). Além disso, os resíduos têm desencadeado a seleção de patógenos resistentes a vários fármacos, fato que dificulta o combate às infecções com a redução da eficácia do tratamento (KHAN et al., 2018; PANIGRAHI; SHEORAN; GANGULY, 2017; POIZAT et al., 2017; SHARIF et al., 2017). A exposição dos micro-organismos a várias classes de antibióticos por décadas, provocou a existência das bactérias multirresistentes (MRA) (grupo ESKAPE) ou superbactérias (KUMAR et al., 2021), considerado um sério problema de saúde pública.

Nos últimos anos, a preocupação com linhagens de *S. aureus* e outras bactérias patogênicas resistentes ao tratamento com antibióticos tem aumentado. Desta forma, têm sido realizados estudos para o desenvolvimento de diferentes alternativas de antimicrobianos. (WILLING et al., 2018; KUMAR et al., 2021).

2.2 FAGOS LÍTICOS

Os vírus representam os seres mais abundantes na Terra, e estão presentes em todos os ambientes em que existe vida, em escala superior aos procariotos (SUTTLE, 2005). Dentre os vírus, os fagos são os que estão mais diversamente distribuídos, devido aos seus hospedeiros serem os únicos com distribuição e abundância suficiente para sustentar a quantidade de vírus no planeta. Além disso, os fagos têm um papel fundamental na regulação das populações bacterianas e na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas (HAMBLY; SUTTLE, 2005). Estima-se que em 1 g de solo ou água, podem ser isoladas cerca de 10^8 a 10^9 partículas de fagos (SONI et al., 2010). Em 1915, o pesquisador Frederick William Twort foi o primeiro a observar os fagos. Posteriormente, em 1917, Felix d'Herelle reafirmou a descoberta e deu o nome às partículas virais como bacteriófagos ou fagos.

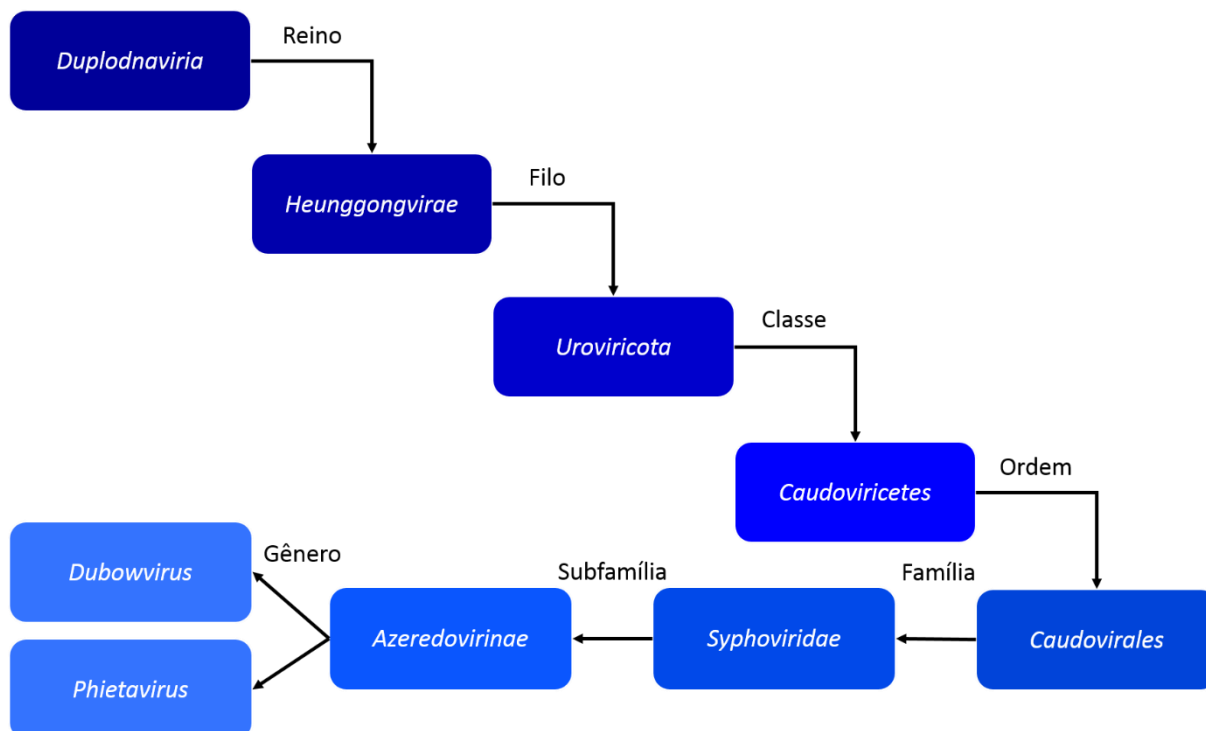
Os fagos se assemelham em vários passos com os demais vírus, alguns fagos possuem o ciclo lisogênico o qual está associado ao processo de transdução especializada (SCHNEIDER et al., 2021). Estes fagos podem transferir informações genéticas, que irão alterar características metabólicas, morfológicas e fisiológicas do hospedeiro, conferindo vantagens ou desvantagens competitivas, permitindo a adaptação das bactérias em novos nichos ecológicos. Outros fagos promovem infecção crônica nas bactérias, estabelecendo uma relação de parasitismo (WEINBAUER; RASSOULZADEGAN, 2004). Existem também aqueles que possuem

um ciclo lítico que está relacionado com o processo de transdução generalizada. Ao final deste ciclo, a célula hospedeira é lisada liberando as novas partículas virais (GREGORACCI; SILVEIRA; BROCCCHI, 2006; WEINBAUER; RASSOULZADEGAN, 2004).

Os fagos são vírus capazes de infectar células de hospedeiros pertencentes aos domínios Archea e Bactéria (GREGORACCI; SILVEIRA; BROCCCHI, 2006). Eles consistem em uma cápsula proteica (capsídeo) que envolve um ácido nucleico, podendo ou não estar envolvido por um envelope lipoprotéico (ELOIS et al., 2023). Os fagos são os organismos mais abundantes do planeta e são encontrados em diversos ambientes. Eles não conseguem se replicar de forma independente e dependem do hospedeiro para se replicarem. Dessa forma, sua presença é mais comum em ambientes onde seu hospedeiro está presente (ROHWER et al., 2002). Existem diferentes grupos de fagos, com variações em tamanho e morfologia, podendo ser constituídos por RNA ou DNA, fita simples ou dupla, linear ou circular e segmentado ou único (ACKERMANN, 2003; GREGORACCI; SILVEIRA; BROCCCHI, 2006).

Apesar da diversidade, cerca de 96% dos fagos são caudados e constituem a ordem *Caudovirales*. Os vírus da ordem *Caudovirales* são vírus icosaédricos, que apresentam DNA fita-dupla e possuem como estrutura diferencial a cauda, que é responsável pelo reconhecimento dos hospedeiros e injeção do material genético (LOPES et al., 2014). A classificação taxonômica das famílias integrantes à ordem *Caudovirales* pode ser observada na Figura 2 (WALKER et al., 2022).

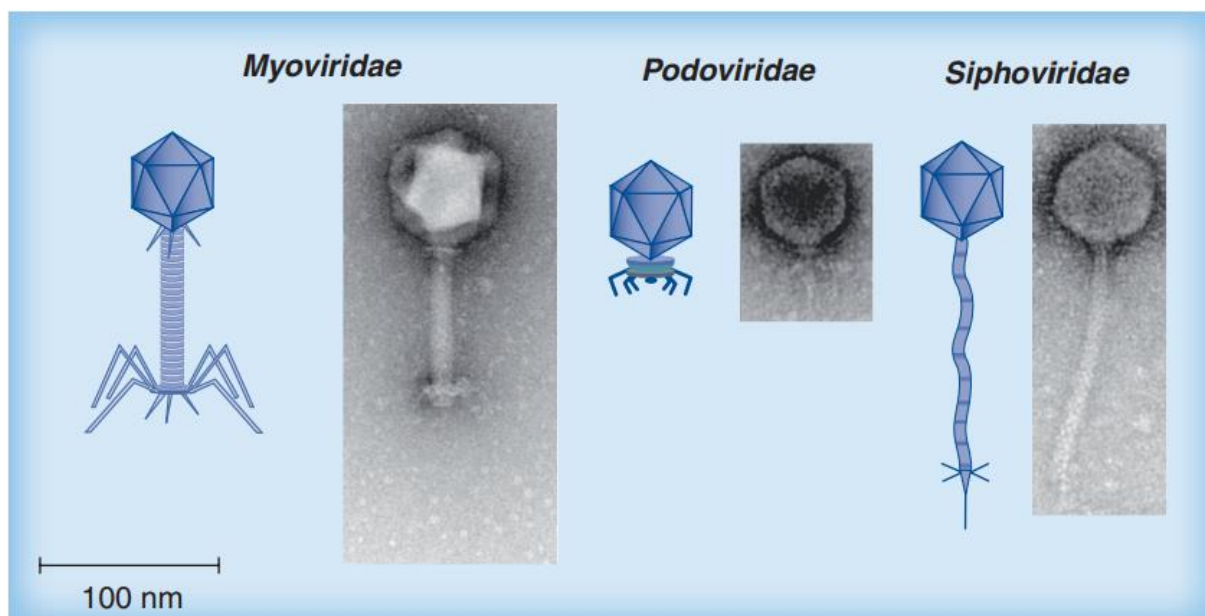
Figura 2 - Taxonomia das famílias pertencentes à ordem *Caudovirales*.



Fonte: WALKER et al. 2022.

Essa ordem é composta por três principais famílias: *Myoviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae*. A principal diferença entre elas reside na morfologia das caudas dos fagos. A família *Siphoviridae* apresenta caudas longas e não-contráteis, enquanto a *Podoviridae* possui caudas bem curtas. Já os fagos da família *Myoviridae*, que são os mais comuns dentre as três famílias, possuem caudas contráteis (Figura 3).

Figura 3 - Morfologia das três principais famílias de fagos com cauda da ordem *Caudovirales*.

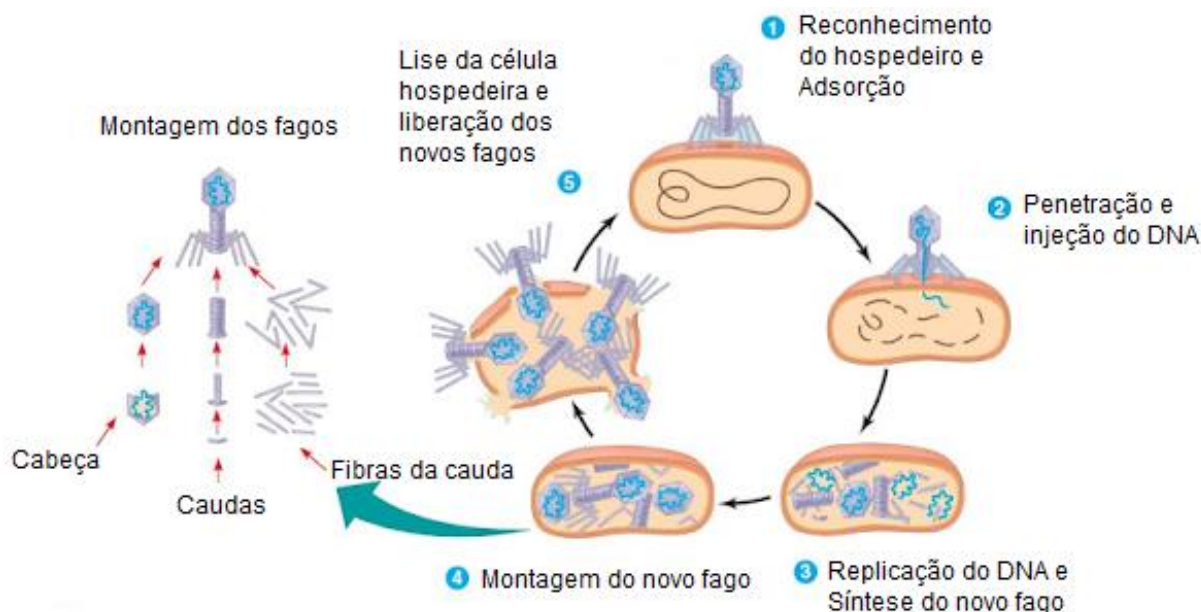


Fonte: HARPER; ENRIGHT, 2011.

2.3.1 Ciclo lítico

A primeira etapa do ciclo lítico é a adsorção que é o reconhecimento e a adesão da partícula viral à superfície bacteriana. Neste processo, proteínas ou hidrolases de peptidoglicano associadas a vírions (VAPGHs do inglês: *Virion-associated peptidoglycan hydrolases*) degradam a camada do peptidoglicano (PG) das células, auxiliando o bacteriófago na infecção (DOWAH; CLOKIE, 2018). Em seguida, o bacteriófago insere o seu material genético na célula bacteriana. O metabolismo da célula do hospedeiro, então, é utilizado a favor do DNA viral para replicação, transcrição do material genético e posterior, produção de proteínas líticas e estruturais. Em seguida, ocorre a lise celular, mediada pelas proteínas produzidas (endolisinas fágicas) e a progênie do bacteriófago é liberada no meio (OLIVEIRA et al., 2017; SQUIRES, 2018) (Figura 4).

Figura 4 - Ciclo lítico do bacteriófago sobre uma célula hospedeira.



Fonte: <https://hotzone4th1044518.weebly.com/>, adaptado.

2.3.2 Terapia com fagos

No passado, havia a crença de que os fagos não eram organismos capazes de exercer uma influência significativa nas cadeias ecológicas. No entanto, nos últimos anos, os fagos têm ganhado uma importância cada vez maior, principalmente no controle de patógenos e na transferência de genes, entre outras funções (QADIR; MOBEEN; MASOOD, 2018; ALOMARI; DEC; URBAN-CHMIEL, 2021; ELOIS et al., 2023).

Devido à sua alta especificidade em relação ao hospedeiro, os fagos não causam danos aos organismos eucarióticos. Essa característica os torna promissores como alternativas ou complementares aos antibióticos, já que há menor probabilidade de afetarem as bactérias não alvos (WILLING et al., 2018). A faixa de hospedeiros que eles conseguem alcançar varia de acordo com o tipo de receptor de superfície, o que promove a terapia com fagos mais eficiente (MACIEJEWSKA; OLSZAK; DRULIS-KAWA, 2018).

A crescente preocupação com a resistência bacteriana aos tratamentos convencionais com antibióticos tem motivado a busca por alternativas, e o controle de patógenos através de fagos líticos se apresenta como uma proposta bastante interessante. Isso se deve à capacidade autorreplicante dos fagos, que permite a

repetição do ciclo enquanto houver bactérias-alvo presentes. (DROND; JUSTRIBÓ, 2007).

Diante da possibilidade de controle de bactérias patogênicas a partir da terapia fágica, estudos foram desenvolvidos e revelaram resultados bem promissores no tratamento com fagos (Quadro 2).

Quadro 2 - Estudos desenvolvidos em humanos e animais com a administração de fagos para o combate de diferentes patógenos.

Patógeno	Modelo	Condição	Resultados	Autores
<i>Shigella dysenteriae</i>	Humano	Disenteria	Todos os quatro indivíduos tratados recuperaram-se após 24 h	CHANISHVILI (2012)
<i>Vibrio cholerae</i>	Humano	Cólera	68 de 73 sobreviveram no grupo de tratamento e apenas 44 de 118 no grupo controle	CHANISHVILI (2012)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Camundongo	Infecção severa	Redução de 66,7% de mortalidade	WATANABE et al., (2007)
<i>Clostridioides difficile</i>	Camundongo	Infecção intestinal	A co-administração com <i>C. difficile</i> preveniu a infecção	RAMESH; FRALICK; ROLFE (1999)
	Camundongo	Infecção intestinal	Redução de 92% da mortalidade	RAMESH; FRALICK; ROLFE (1999)
<i>Enterococcus faecium</i> (Resistente à vancomicina)	Camundongo	Bacteremia	Redução de 100% da mortalidade	BISWAS et al., (2002)
<i>Escherichia coli</i> (Produtor de β -lactamase)	Camundongo	Bacteremia	Redução de 100% da mortalidade	WANG et al., (2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Resistente à Imipenem)	Camundongo	Bacteremia	Redução de 100% da mortalidade	WANG et al., (2006)
<i>Escherichia coli</i>	Camundongo	Meningite e Infecção severa	Redução de 100% e 50% da mortalidade por meningite e infecção severa, respectivamente	POUILLOT et al., (2012)
MDR* <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Camundongo	Infecção severa	Redução de 92% e 84% da mortalidade com a administração Intraperitoneal e oral, respectivamente.	JUN et al., (2014)

Cont.

Patógeno	Modelo	Condição	Resultados	Autores
<i>S. aureus</i>	Camundongo	Infecção de ferida	A co-administração com <i>S. aureus</i> preveniu a infecção	WILLS; KERRIGAN; SOOTHILL (2005)
MDR <i>S. aureus</i>	Humano	Úlcera em diabético	Todos os 6 pacientes recuperaram-se.	FISH et al., (2016)
Disenteria bacteriana não classificada	Humano	Disenteria	O coquetel de bacteriófago melhorou os sintomas de 74% dos 219 pacientes.	CHANISHVILI; SHARP (2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Resistente à antibiótico)	Humano	Otite crônica	O tratamento com bacteriófagos é seguro e os sintomas melhoram nas fases do estudo.	WRIGHT et al., (2009)

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tendo em vista o êxito das pesquisas, a indústria investiu em produtos à base de fagos e atualmente estão comercialmente disponíveis para uso em alimentos (Quadro 3).

Quadro 3 - Produtos aprovados à base de fagos disponíveis comercialmente.

Produto	Aprovação regulatória	Aplicação
ListShield_ Intralytix, Inc. USA	Administração de Comidas e Remédios (FDA); Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA); Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA)	- Alimentos prontos para o consumo: salame, salsicha, etc. - Frutos do mar; - Superfícies de contato com alimentos e ambientes
EcoShield Intralytix, Inc. USA	Administração de Comidas e Remédios (FDA)	- Peças de carne vermelha e aparas destinadas a serem moídas
SalmoFresh Intralytix, Inc. USA	Administração de Comidas e Remédios (FDA); Conselho Islâmico de Alimentação e Nutrição da América (IFANCA); Instituto de Revisão de Materiais Orgânicos (OMRI)	- Avicultura - Peixe e marisco - Frutas e legumes frescos e processados
LISTEX_Microos EBI Food Safety Netherlands	Administração de Comidas e Remédios (FDA); Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA); Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA); Saúde Canadá; Escritório Federal de Saúde Pública - Suíça (BAG); Normas alimentares para a Austrália e a Nova Zelândia (FSANZ)	- Carne - Carne pronta para consumo - Peixe - Queijo
Agriphage Omnilytics USA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA)	- Na agricultura em frutas e legumes

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Embora a fagoterapia ainda não tenha sido amplamente adotada nos sistemas de produção animal, esta estratégia de controle tem demonstrado ser eficaz no controle de bactérias patogênicas em animais de produção. Estudos demonstram eficácia dos fagos no controle da colonização de *Campylobacter jejuni* (CARRILLO et al., 2005) e *Salmonella* (BARDINA; SPRICIGO; CORTÉS, 2012), enquanto diminui a mortalidade de galinhas durante a infecção por *Escherichia coli* (HUFF et al., 2002, 2006). Os fagos também foram eficazes na redução de infecção por *Salmonella* em porcos (SAEZ et al., 2011) e na redução de infecção por *E. coli* em ovinos (BACH et al., 2009; RAYA et al., 2011). No entanto, os esforços direcionados ao controle de infecção por *E. coli* em bovinos têm se mostrado menos bem-sucedidos (RIVAS et al., 2010; ROZEMA et al., 2009; STANFORD et al., 2010).

Como descrito anteriormente, os fagos apresentam potencial para o controle de bactérias patogênicas, porém, ainda são necessárias considerações

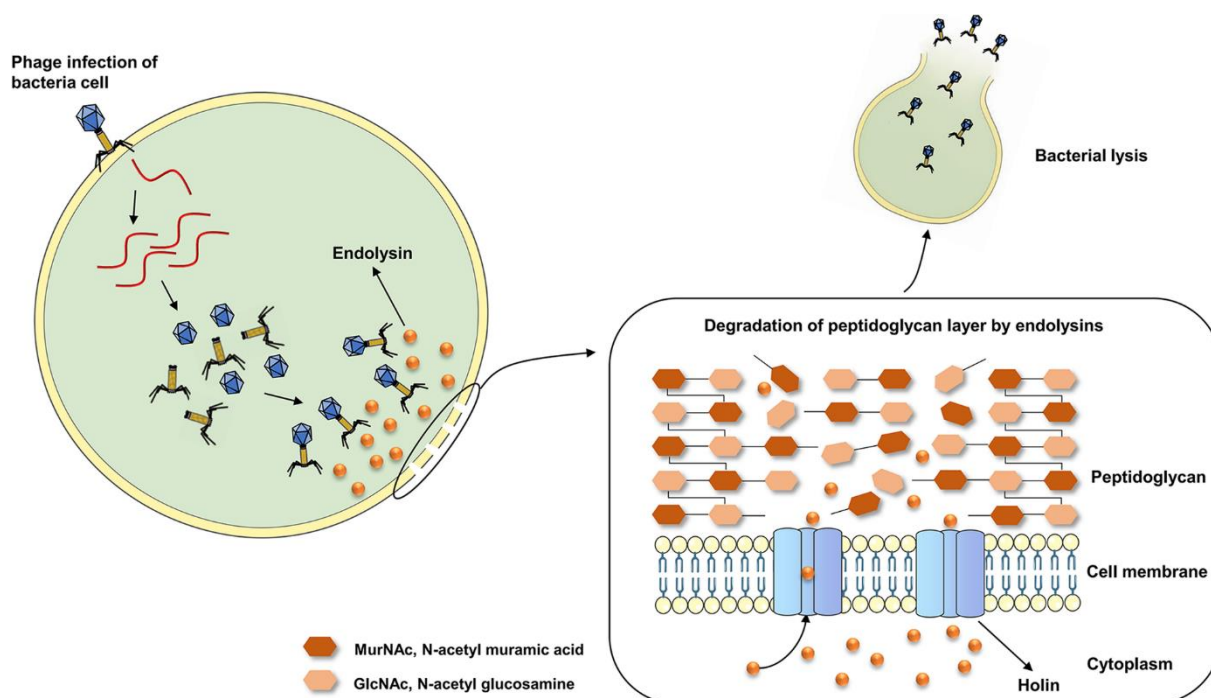
significativas quanto à sua implementação na produção animal. Assim como os antibióticos, as bactérias são capazes de adquirir resistência à infecção por fagos utilizando *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat* (CRISPR) como sistema pseudoimune ou sistema de infecção abortiva para matar células infectadas antes que o fago possa se espalhar (HRYHOROWICZ et al., 2017; MACIEJEWSKA; OLSZAK; DRULIS-KAWA, 2018).

Além disso, a superfície celular bacteriana pode sofrer alterações para remover ou bloquear o receptor ao qual o fago se liga (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010), o que pode afetar os fatores de virulência ou colonização (CRYZ et al., 1984). Tendo em vista essas estratégias desenvolvidas ao longo da evolução dos patógenos, que podem comprometer a eficácia do tratamento com fagos, estudos têm sido desenvolvidos com a utilização apenas das endolisinas fágicas para a aplicação exógena.

2.4 ENDOLISINAS DE FAGOS LÍTICOS

As endolisinas são moléculas complexas produzidas por fagos que demonstram atividade altamente potente quando atuam em seu contexto natural, lisando as células hospedeiras de dentro para fora em um período reduzido. A exploração dessas enzimas no combate a bactérias patogênicas baseia-se na observação de que uma ação lítica semelhante pode ocorrer quando as endolisinas atingem a parede celular do patógeno de fora para dentro (PROENÇA, 2015). Durante o ciclo lítico dos fagos, as proteínas chamadas de holina que estão presentes na membrana citoplasmática das células bacterianas são ativadas e formam poros na membrana, a fim de permitir o acesso das endolisinas que estão no citoplasma celular a parede celular, sobre o qual exercem a sua atividade catalítica (Figura 5).

Figura 5 - Mecanismo de ação das proteínas fágicas VAPGH, holina e endolisina.

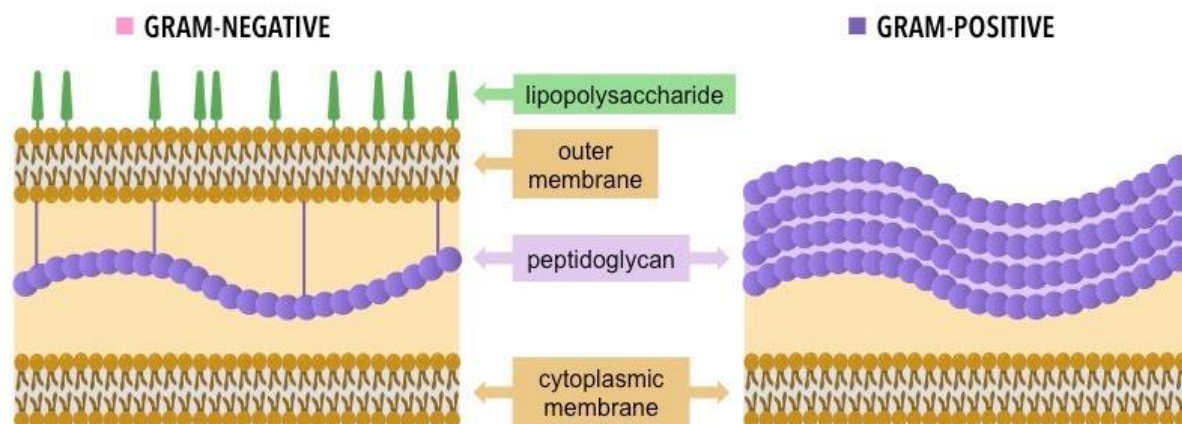


Fonte: LIU et al. (2023), adaptado.

A especificidade das endolisinas varia de acordo com o hospedeiro e com as características das enzimas e dos fagos que as derivaram. A análise da estrutura geral das endolisinas fágicas conhecidas geralmente leva a uma distinção entre aquelas que atingem bactérias Gram-positivas e aquelas que atuam em bactérias Gram-negativas (PROENÇA, 2015).

Nas bactérias Gram-negativas, o PG está entre a membrana externa (ME) e a membrana citoplasmática (CM) e é uma camada relativamente fina (Figura 6). Endolisinas de fagos que infectam esse tipo de bactéria geralmente são proteínas globulares que normalmente abrigam um único domínio catalítico (DC) (NELSON et al., 2012). Já os organismos Gram-positivos não possuem a OM e o PG é uma multicamada altamente reticulada, externa à ME. Como mencionado acima, as endolisinas Gram-positivas mostram uma estrutura modular (DIAZ; LOPEZ; GARCIA, 1990) (Figura 5) e são geralmente compostas por um ou dois DCs N-terminais conectados a uma ou várias repetições de domínio de ligação à parede celular do C-terminal, que reconhecem especificamente o PG hospedeiro ou outros componentes da parede celular (NELSON et al., 2012; SCHMELCHER; DONOVAN; LOESSNER, 2012).

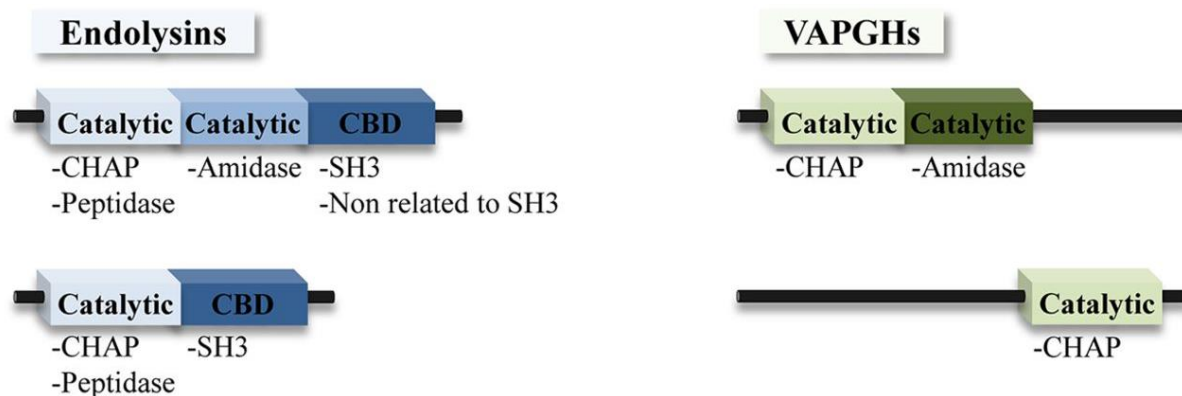
Figura 6 - Estrutura das células de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva.



Fonte: Google imagens.

A maioria das endolisinas estafilocócicas tem uma estrutura modular contendo uma cisteína N-terminal, domínio cisteína amido-hidrolases/ peptidase dependente de histidina (CHAP, do inglês, *Cysteine, Histidine-dependent Amidohydrolases/Peptidases*), um domínio amidase central e um domínio de ligação à parede celular C-terminal (CBD, do inglês, *cell wall-binding domain*). O domínio catalítico CHAP ocorre em aproximadamente 74% das endolisinas e o domínio de ligação SH3 (do inglês, *Src homology 3*) é o mais recorrente (Figura 7). A principal função do domínio CHAP é conferir a atividade catalítica, já a finalidade do domínio amidase é aumentar a afinidade de ligação do CBD, resultando em maior atividade lítica da endolisina (GUTIÉRREZ *et al.*, 2018; SON; KONG; RYU, 2018).

Figura 7 - Estrutura modular das endolisinas e VAPGHs representada pelos domínios catalíticos e pelos domínios de ligação à parede celular.



Fonte: GUTIÉRREZ *et al.* (2018).

As endolisinas fágicas podem ser classificadas como hidrolases e transglicosidades. As hidrolases degradam o PG via hidrólise. Estas enzimas clivam ligações glicosídicas na cadeia glicana formando o anel 1,6-anidro no resíduo ácido-acetilmurâmico. Dependendo da ligação química que foi hidrolisada, as enzimas podem ser classificadas em: amidases atuando sobre a ligação amida, endopeptidases clivando ligações dentro de cadeias peptídicas glucosaminidases e lisozimas (muramidases) que hidrolisam a cadeia de glicano (GUTIÉRREZ et al., 2018; MACIEJEWSKA; OLSZAK; DRULIS-KAWA, 2018).

Como descrito anteriormente, o PG nas Gram-positivas consiste em multicamadas lineares reticuladas por peptídeos. Essas camadas são compostas da alternância de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e N-ácido acetilmurâmico (MurNAc) ligadas por ligações glicosídicas. O grupo D-lactoil de cada resíduo de MurNAc é substituído por um radical peptídico, cuja composição no *S. aureus* é L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala, formando uma ligação cruzada. Os domínios catalíticos de proteínas líticas de fagos são classificados em seis tipos diferentes de acordo com suas atividades enzimáticas contra o PG: N-acetilmurâmico-L-alanina amidases, ponte interpeptídica endopeptidases, L-alanoil-D-glutamato endopeptidases, N-acetil- β -D-muramidases, transglicosilases e N-acetil- β -D-glucosaminidases (Figura 5 - Mecanismo de ação das proteínas fágicas VAPGH, holina e endolisina. Figura 5) (GUTIÉRREZ et al., 2018).

Diante das inúmeras especificidades descritas acima, a aplicação exógena das endolisinas é uma alternativa de controle biológico de patógenos interessante. Além disso, devido às estratégias de resistência desenvolvidas pelo hospedeiro com a administração de bacteriocinas ou da partícula viral inteira, a aplicação das endolisinas aumenta as chances de sucesso no combate às infecções, pois eventos de resistência são extremamente raros, devido à especificidade do hospedeiro que limita mecanismos de resistência (LOVE et al., 2018; SWIFT et al., 2018).

Desta forma, estudos com a utilização das endolisinas fágicas têm sido desenvolvidos e os resultados demonstram a possibilidade de um novo método eficiente de combate às infecções. Os experimentos se aplicam a diversos patógenos e diferem com relação à enzima utilizada e às doses administradas, que variam de acordo com o método de aplicação (administração intravenosa ou oral, por exemplo), o tipo de infecção e com o peso do indivíduo (Quadro 4) (MACIEJEWSKA; OLSZAK; DRULIS-KAWA, 2018).

Quadro 4 - Estudos com a utilização exógena de endolisinas fágicas.

Patógeno	Enzima	Modelo	Administração	Dose	Resultado	Referência
<i>Streptococcus agalactiae</i>	PlyGBS90-1 peptidase, lisozima (modificado PlyGBS)	Camundongo com bacteremia	Injeção intraperitoneal	Dose única de 2mg	Redução da infecção bacteriana	GILMER et al., 2013
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	80 α Lyt2 amidase, peptidase do bacteriófago estafilocócico phi80 α	Camundongo com bacteremia		Dose única de 200 μ g	100% de viabilidade	SCHMELCHER et al., 2015
	ClyQ lisina do fago <i>S. aureus</i> LysGH15	Camundongo com modelo de infecção sistêmica	Administração tópica Injeção intraperitoneal	15 mg/kg	Não houve sintomas adversos sérios	DUAN et al., 2023
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Artilysin® (PVP-SE1gp146 lisozima combinando um nonapeptídeo policatiônico)	Modelo de Caenorhabditis elegans com infecção intestinal	Administração oral e tópica	20 μ g /mL	40-63% dos animais protegidos da morte	BRIERS et al., 2014
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Lisozima PlyF307 do bacteriófago de <i>Acinetobacter</i> RL-2015	Camundongo com bacteremia	Injeção intraperitoneal e tópica no cateter sob a pele	Dose única de 1 mg na injeção intraperitoneal e duas doses tópica de 1 mg	50% dos animais protegidos da morte; redução de biofilme do cateter	LOOD et al., 2015
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Depolymerase da cápsula K64dep (bacteriófago <i>Klebsiella</i> K64-1)	Camundongo com bacteremia	Injeção intraperitoneal	Múltiplas doses de 18,75–150 μ g	100% dos animais protegidos da morte	PAN et al., 2015

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e caracterizar fagos líticos e suas endolisinas recombinantes quanto à atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar aspectos morfológicos dos Fagos 2 e 4.
2. Avaliar o espectro lítico dos Fagos 2 e 4 isolados de água de curral frente a linhagens de *S. aureus* e outras espécies bacterianas (Gram-positivas e Gram-negativas).
3. Avaliar a estabilidade dos Fagos 2 e 4 em diferentes temperaturas.
4. Determinar a concentração bactericida mínima dos Fagos 2 e 4.
5. Avaliar estabilidade do Fago 2 em diferentes concentrações de cloreto de sódio, diferentes temperaturas e níveis de pH.
6. Avaliar o efeito do Fago 2 em de tetos extracorpóreos infectados com *S. aureus*.
7. Avaliar o espectro lítico das endolisinas recombinantes EndF2 e EndF4 derivadas dos Fagos 2 e 4, frente a linhagens de *S. aureus* e outras espécies bacterianas (Gram-positivas e Gram-negativas).
8. Caracterizar *in silico* as endolisinas EndF2 e EndF4 quanto aos aspectos bioquímicos, moleculares e de alergenidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS FAGOS 2 E 4

4.1.1 Propagação

Em estudos anteriores, foram isolados seis fagos (denominados Fago 1, 2, 3, 4, 5 e 6) de água de curral coletada no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, situado em Coronel Pacheco - Minas Gerais, Brasil. Foi verificado que os Fagos 2 e 4 eram os que apresentavam maior atividade lítica frente a linhagens de *S. aureus* por meio de teste de atividade lítica (LEITE et al., 2010).

Desta forma, para a propagação dos fagos (Fagos 2 e 4), foi realizada a inoculação de uma mistura de bactéria-bacteriófago, 150 µL de *S. aureus* em meio BHI caldo (KASVI, Paraná, Brasil) e 150 µL de fago em tampão SM (NaCl 100 mM; MgSO₄.7H₂O 8 mM; Tris-HCl 50 mM; Gelatina 0,01%) em 7 mL de caldo BHI semissólido (7% de ágar) liquefeito a 50°C suplementado com CaCl₂ 1 M. Posteriormente, as misturas foram vertidas em placas de Petri contendo Ágar BHI (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) e incubadas a 37°C *overnight*.

No dia seguinte, as placas foram removidas da incubadora e se adicionou 5 mL de tampão SM em cada placa. As placas foram deixadas durante 18 h a 25°C em plataforma giratória (Marconi Equipamentos Para Laboratórios Ltda., São Paulo, Brasil) a 60 rpm. Logo após, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e centrifugou-se a 13.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,22 µm (KASVI, Paraná, Brasil) e então, armazenados a 4°C até o uso.

4.1.2 Concentração por ultracentrifugação

A partir do filtrado obtido na etapa de propagação, adicionou-se DNase (1 µg/ µL) e RNase (1 µg/ µL) e incubou por 1 h a 37°C. Após o período de incubação, adicionou-se polietilenoglicol (PEG 8000) e NaCl a uma concentração final de 10% (p/v) e 1 M, respectivamente e incubou por 16 a 24 h a 4°C. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas (30 min 13.000 × g, 4°C) e o pelete foi ressuspensionado em 2 mL de tampão SM. Por fim, as amostras de fagos foram purificadas por

ultracentrifugação (rotor SW28, 150.000 x g, 2 h, 4°C) em gradiente de glicerol (5-40%) e então, o pelete de fago foi armazenado a 4°C.

4.1.3 Titulação

Foram feitas diluições de 10^{-1} a 10^{-17} em tampão SM de cada fago (bacteriófago 2 e bacteriófago 4) em um volume final de 100 μ L a partir das amostras ultracentrifugadas e armazenadas a -20°C. Em seguida, foi adicionado 100 μ L de CaCl_2 1 M à cultura ativa de *S. aureus* e posteriormente, foi feita uma mistura de 100 μ L da cultura ativa mais 100 μ L de cada diluição dos fagos a serem titulados em microtubos e incubados a 37°C por 30 min no ThermoShaker (BIOBASE®, Karnataka, Índia). Essas misturas de bactéria-fago foram inoculadas em 7 mL de meio BHI semissólido suplementado com CaCl_2 1 M, vertido em placas de Petri, e incubadas a 37°C *overnight*.

Após o período de incubação, foi feita a contagem de placas lise (Figura 8) e calculou-se a titulação de cada bacteriófago em UFP (unidade formadora de placa/mL) com a seguinte equação:

$$\text{UFP/mL} = \text{número de placas de lise} \times \text{inverso da diluição} \times 10$$

Figura 8 - Esquema de placa utilizada para contagem de UFPs, como parte do processo de titulação do Fago 2.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

As concentrações alcançadas foram de 10^9 a 10^{20} UFP/ mL. As amostras foram armazenadas e identificadas com um código de letras mais numeração correspondente (Fago 2 e Fago 4).

4.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

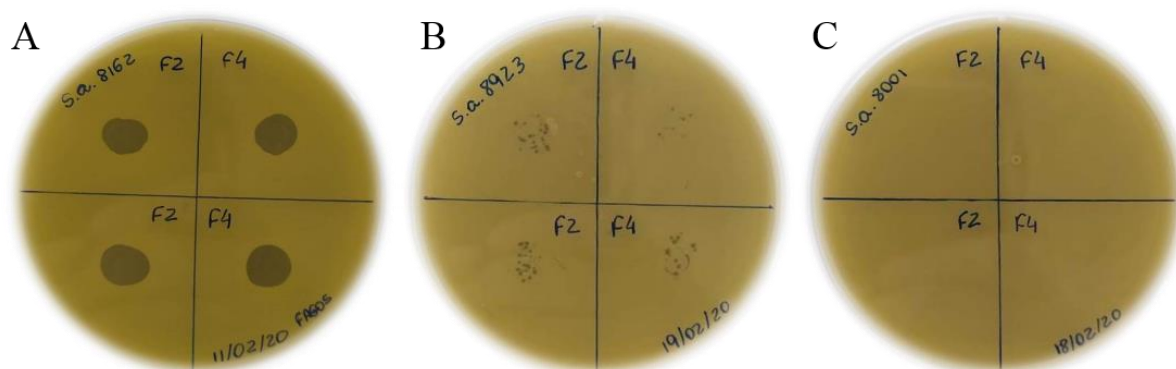
Os fagos purificados e concentrados por ultracentrifugação ($10\ \mu\text{L}$ a 10^{17} UFP/ mL) foram inoculados em *grids* de cobre revestida com Formvar 0,5% por 1 min e, em seguida, corado negativamente com acetato de uranila 0,5% por 15 seg. Em seguida, as *grids* contendo as amostras de fagos coradas foram incubadas a $25\ ^\circ\text{C}$ por 24 h. A morfologia do bacteriófago foi observada por microscopia eletrônica de transmissão (LIBRA®120 Transmission Electron Microscope, Zeiss, Alemanha) a uma tensão de aceleração de 80 Kv.

4.2 DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO LÍTICO DOS FAGOS 2 E 4

Para determinar o espectro lítico dos fagos líticos, foi utilizado o teste da gota (SVENSSON; CHRISTIANSSON, 1991). Foram testadas 104 linhagens bacterianas, sendo 91 de *S. aureus* e 13 de outras espécies pertencentes a Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa (Tabela 1). Inicialmente, todas as linhagens a serem testadas foram reativadas em 3 mL de meio BHI caldo a 37°C , *overnight* a 250 rpm.

Para realização do teste da gota, tubos contendo 5 mL de meio BHI semissólido 0,7% de ágar, foram liquefeitos e equilibrados a temperatura de 50°C em banho-maria. Em seguida, adicionou-se em cada tubo 100 μL de CaCl_2 1 M e 200 μL da cultura ativa das linhagens. Verteu-se a mistura sobre a camada de meio Ágar BHI. Após a solidificação do meio contendo a mistura, dividiu-se o fundo da placa em quatro partes (duas para o Fago 2 e duas para o Fago 4). Adicionou-se 5 μL de cada bacteriófago em duplicata sobre o meio, um bacteriófago por divisão da placa. As placas foram incubadas a 37°C em estufa do tipo B.O.D (*HydroSan*, Belo Horizonte, Brasil) por 24 h e então, observada a formação de halos de lise. Foram consideradas positivas, as placas que apresentaram lise completa ou parcial e negativas, as placas que não apresentaram lise. Todos os testes foram realizados em duplicata (Figura 9).

Figura 9 - Esquema de placas com os possíveis resultados para o teste da gota com os Fagos 2 e 4.



Legenda: (A) lise completa, (B) lise parcial; (C) sem lise; F2 - Fago 2; F4 - Fago 4.
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Tabela 1 - Linhagens utilizadas para determinação do espectro lítico dos Fagos 2 e 4.

Espécie	Código Local ^a	Origem
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4030	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4031	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4063	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4073	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4074	Isolada leite/ tanque refrigeração
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4077	Isolada leite/ tanque refrigeração
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4096	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4098	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4118	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4124	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4143	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4183	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4191	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4238	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4247	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4292	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4295	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4308	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4315	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4371	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4381	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4437	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4486	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4498	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4531	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4562	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4627	Isolada leite/mastite

Cont.

Espécie	Código Local^a	Origem
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4660	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4661	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4662	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4677	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4679	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4690	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4704	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4706	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5475	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5682	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5710	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5732	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5759	Isolada leite/tanque refrigeração
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5764	Isolada leite/ tanque refrigeração
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 6209	Portador sea
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 6210	Portador seb
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 6211	Portador sed e sej
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7234	Portador sea, seb
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7818	Portador sea
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7848	Portador seh
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7976	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7977	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7985	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8001	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8007	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8014	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8046	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8057	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8065	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8073	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8096	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8103	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8117	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8149	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8155	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8162	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8177	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8196	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8235	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8593	Isolada leite mastite, resistente à penicilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8608	Isolada leite mastite, resistente à penicilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8624	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8676	Isolada leite mastite

Espécie	Código Local ^a	Origem
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8678	Isolada leite mastite, susceptível à penicilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8724	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8748	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8792	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8798	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8820	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8848	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8880	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8922	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i> , <i>tetK</i> , <i>tetM</i> e <i>teto</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8923	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 9088	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 10025	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i> e <i>tetL</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 10035	Isolada leite mastite, tem <i>tetK</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 10037	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i> e <i>tetM</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5161	
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5559	
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5599	
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4444	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 51651	GL 7771	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC 25923	Isolado clínico
<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971	GL 8211	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	GL 8222	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970	GL 8223	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	GL 8225	
<i>Staphylococcus hyicus</i> ATCC 11249	GL 7761	Isolado de porco com epidermite exsudativa
<i>Staphylococcus intermedius</i> ATCC 29663	GL 7766	Isolado de nariz de pombo; produz endonuclease de restrição <i>SinMI</i> e <i>SinMII</i>
<i>Salmonella</i> Typhimurium IAL 1412	GL 5153	
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	GL 8286	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> ATCC 12388	GL 8289	
<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 700407	GL 8369	
<i>Listeria monocytogenes</i>	GL 7268	Isolada de queijo Minas frescal, PCR+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	GL 5786	
<i>Enterobacter (Cronobacter) sakasakii</i> CDC 7006	GL 5893	

Legenda: ^acódigo local da Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa.

Fonte: <https://am.cenargen.embrapa.br/amconsulta/colecao/catalogo?id=8>. Acesso em: 16/05/2023.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

4.3.1 Preparo do inóculo bacteriano

Foi utilizada para este teste a linhagem de *S. aureus* (GL5161). A linhagem da bactéria foi reativada em 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth* – KASVI, Itália), e a densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm (*Eon™ Microplate Spectrophotometer* - BioTek, Alemanha). Para o teste de microdiluição, foram feitas diluições para que em cada poço houvesse a concentração estimada de $2,0 \times 10^4$ UFC/ mL.

4.3.2 Montagem da placa

Para o teste foi realizada a técnica de diluição em microplacas de 96 poços. Os fagos foram ressuspensos em solução Tampão de Incorporação (TI) (NaH_2PO_4 25 mM; NaCl 250 mM) e distribuídos (100 μL) em diferentes concentrações (diluição seriada) e a linhagem bacteriana ressuspensa em Mueller Hinton 2x (100 μL - $2,0 \times 10^4$ UFC/ mL) em cada poço, totalizando 200 μL (Figura 10). As concentrações dos fagos com Mueller Hinton variaram de $1,95 \times 10^{11}$ UFP/ mL a $9,30 \times 10^4$ UFP/ mL. Neste experimento foram utilizados como controle negativo Mueller Hinton mais a linhagem bacteriana. Os testes foram realizados em duplicata biológica. A placa foi vedada com filme PVC e incubada a 37°C na estufa tipo B.O.D. e avaliadas nos tempos 1, 3 e 24 h.

Figura 10 - Esquema da placa de diluição seriada dos fagos na placa de 96 poços.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fago 2	A												
	B												
Fago 2	C												
	D												
Fago 4	E												
	F												
Fago 4	G												
	H												

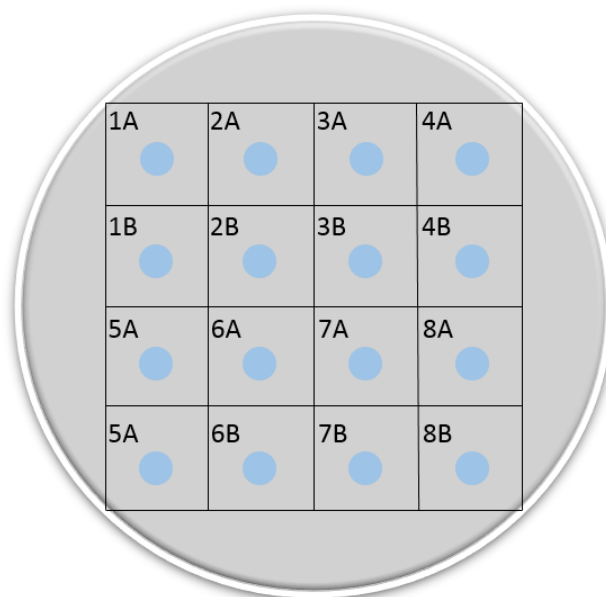
Legenda: Poços A1 e B1 maior [] do Bacteriófago 2 ($1,95 \times 10^{11}$ UFP/mL); poços C10 e D10 menor [] Bacteriófago 2 ($9,30 \times 10^4$ UFP/mL); poços E1 e F1 maior [] do Bacteriófago 4 ($4,05 \times 10^{10}$ UFP/mL); poços G10 e H10 menor [] Bacteriófago 4 ($1,93 \times 10^4$ UFP/mL); poços C11, D11, G11 e H11 - *S. aureus* + Mueller Hinton 2x; poços C12, D12, G12 e H12 - Tampão de Incorporação + Mueller Hinton 2x.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a avaliação visual das placas, 10 µL de cada poço foram semeados em placas contendo BHI ágar (Brain Heart Infusion Agar - KASVI, Itália) e incubadas por 24 h a 37°C em estufa do tipo B.O.D. (Figura 11). As células viáveis foram contadas e a CBM determinada considerando a menor concentração dos fagos capazes de impedir o crescimento bacteriano.

Figura 11 - Placa de Petri com BHI ágar para determinação da CBM.



Legenda: As letras e números representam os poços da microplaca utilizada para o teste.
 Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FAGOS EM TETOS EXTRACORPÓREOS BOVINOS

4.4.1 Obtenção de tetos bovinos

A avaliação dos fagos foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Watts et al. (1988) e Boddie et al. (2002) com adaptações.

Foram coletados conjuntos de tetos no Matadouro Municipal de Juiz de Fora - MG e transportados em caixas isotérmicas (4°C) para o Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite. Os tetos foram lavados por fricção com solução de detergente neutro e água morna a 30°C (1:1000) e enxaguados com água Milli-Q estéril, secos e tratados com álcool 70% por 1 min. Após o tratamento, os tetos foram armazenados em sacos plásticos contendo solução de glicerol a 20% (v/v) estéril a -20°C.

4.4.2 Obtenção de células bacterianas

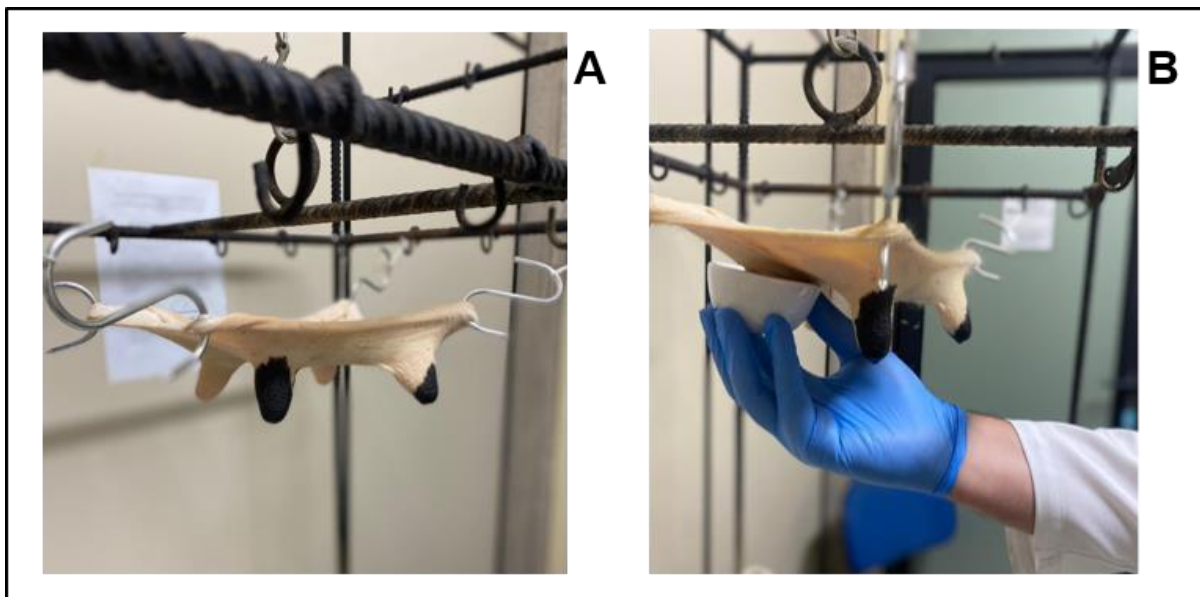
Com o auxílio de uma alça de platina, uma colônia da linhagem 5161 *S. aureus* foi repicada em 3 mL de caldo BHI e incubada a 37°C por 24 h. No dia seguinte,

transferiu-se 1 mL da cultura crescida para frascos erlenmeyer contendo 100 mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 18 h a 250 rpm. Após o período de incubação, a cultura de células foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, o pelete foi ressuspensionado em 30 mL de TI e centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pelete foi ressuspensionado com 5 mL de TI. Por fim, foram feitas suspensões bacterianas com $1,5 \times 10^5$ UFC/ mL mais CaCl_2 com o volume final de 20 mL.

4.4.3 Inoculação da linhagem bacteriana e bacteriófago nos tetos extracorpóreos

Um conjunto de quatro tetos foi descongelado em temperatura ambiente (25°C) e em seguida, foi suspenso em um suporte mimetizando a posição ortostática do animal (Figura 12A). Em seguida, os quatro tetos foram inoculados com a suspensão bacteriana ($1,5 \times 10^5$ UFC/ mL) por submersão em cultura bacteriana com profundidade de 2 a 3 cm por 1 min. Aguardou-se 20 min para secar/ escoar o inóculo bacteriano e então o teto 2 foi submerso (2 a 3 cm) com a solução de bacteriófago (1×10^{10} UFP/ mL) por 1 min e o teto 3 com solução de fago (1×10^{10} UFP/ mL + CaCl_2). O teto 1 foi submerso em TI e o teto 4 em solução *pré-dipping* a base de ácido láctico 2,5-3% (TNT Nitros Química - Brasil) (Figura 12B). Após 30 min das inoculações, coletou-se as amostras dos quatro tetos com o auxílio de um *spray* contendo 5 mL de TI. Em seguida, foram feitas diluições para as quatro amostras coletadas (10^0 ; 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} e 10^{-4}) e plaqueadas em placas de Petri contendo meio Ágar Sal Manitol (KASVI, Itália) com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C *overnight* em estufa do tipo B.O.D. Após o período de incubação foi realizada a contagem de colônias em UFC/ mL.

Figura 12 - Conjunto de tetos fixados em posição ortostática.



Legenda: A - Tetos fixados no suporte; B - Metodologia de inoculação dos tetos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

4.5 ENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO DE NaCl, ESTABILIDADE TÉRMICA E pH

4.5.1 Estabilidade do Fago 2 em diferentes concentrações de NaCl

Os experimentos foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas, com três repetições, tendo a concentração de NaCl, em 5 níveis (0, 50, 100, 250 e 500 mM), como fator principal, e o tempo, com 3 níveis (0, 3 e 24 h), como fator secundário.

Para o teste de estabilidade de concentração de NaCl, foi usado 100 μL de suspensão de fagos ($1,0 \times 10^8$ UFP/ mL) para inocular 900 μL de solução de Tampão SM ajustada para as concentrações de NaCl e incubados a 37°C. Alíquotas (100 μL) foram retiradas em cada tempo para determinar os títulos dos fagos nas diferentes concentrações de NaCl.

4.5.2 Estabilidade térmica do Fago 2

Foram realizados experimentos utilizando o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas, com três repetições. O fator principal testado foi a temperatura, em quatro níveis (4, 37, 65 e 75 °C), enquanto o fator secundário foi o tempo, em três níveis (0, 3 e 24 h).

Para o teste de estabilidade de térmica, foi usado 100 µL de suspensão de fagos ($1,0 \times 10^8$ UFP/ mL) para inocular 900 µL de solução de Tampão SM e incubados a 37°C. Alíquotas (100 µL) foram retiradas em cada tempo para determinar os títulos dos fagos nos diferentes níveis de temperatura.

4.5.3 Estabilidade do Fago 2 em diferentes níveis de pH

Foram conduzidos experimentos utilizando o delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas, compreendendo três repetições. O fator principal investigado foi o pH, com cinco níveis distintos (3, 4, 5, 6 e 7), enquanto o fator secundário foi o tempo, com três níveis (0, 3 e 24 horas).

No teste de estabilidade em diferentes níveis de pH, foram utilizados 100 µL de suspensão de fagos ($1,0 \times 10^8$ UFP/mL) para a inoculação em 900 µL de solução de Tampão SM, seguido de incubação a 37°C. Em intervalos de tempo determinados, foram retiradas alíquotas de 100 µL para a determinação dos títulos dos fagos nos diferentes níveis de pH.

4.5.3 Análise estatística

As contagens do número de fagos, uma vez restituída sua escala original de variação via correção pelo fator de diluição, foi transformada pela raiz quadrada previamente à análise, visando à normalidade da distribuição.

Os dados foram analisados por meio de um modelo misto incluindo os efeitos fixos do fator principal (concentração de NaCl, temperatura ou pH), do tempo e da interação concentração de NaCl $\times$ tempo; temperatura $\times$ tempo ou pH $\times$ tempo. Após a ANOVA, tendo sido detectado efeito significativo do termo de interação nos dois experimentos ($p < 0,0093$ em ambos os casos), procedeu-se à análise da interação perfazendo o desdobramento nos dois sentidos, empregando o Teste de Tukey nas comparações de médias.

As análises foram realizadas utilizando o *software* Statistical Analysis System (SAS versão 9.4, Cary, North Carolina) utilizando os procedimentos MIXED, PLM e UNIVARIATE, respectivamente, para o ajuste do modelo, as comparações de médias e o teste de normalidade dos resíduos (Teste de Shapiro-Wilk). Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 5%.

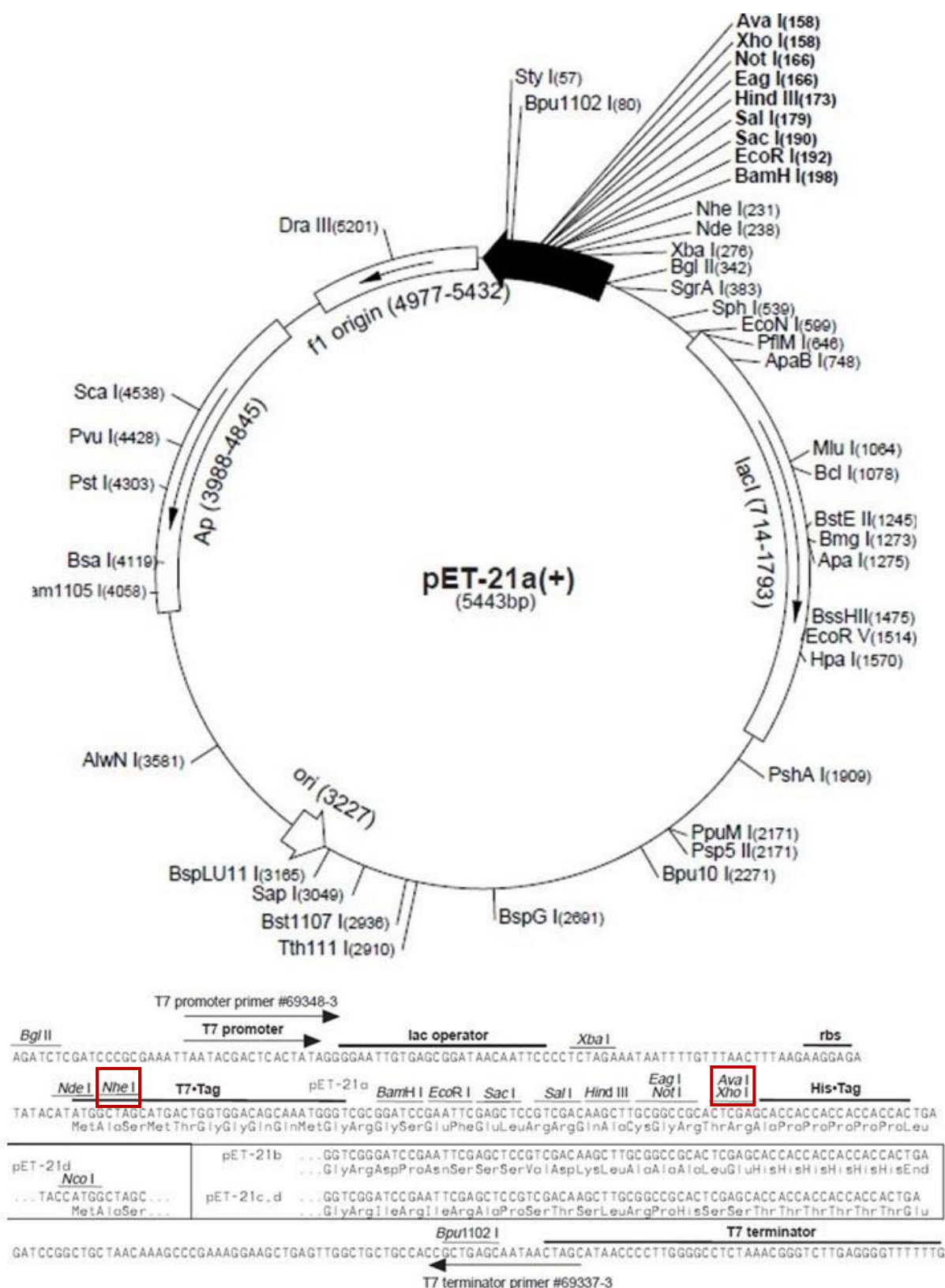
4.6 AVALIAÇÃO DO ESPECTRO LÍTICO DAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES EndF2 E EndF4

Em estudos anteriores, foram isolados seis fagos (denominados Fago 1, 2, 3, 4, 5 e 6) de água de curral coletada no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite, situado em Coronel Pacheco - Minas Gerais, Brasil. Em um estudo, Leite et al., (2019) sequenciaram os seis Fagos para o gene das endolisinas (GenBank GU722132, GU722134, GU722133, GU722135, GU722136 e GU722131). Concluiu-se que as endolisinas dos Fagos eram semelhantes a outras já estudadas para combate à *S. aureus* além de os Fagos 2 e 4 demonstrarem uma ampla gama de hospedeiros e potencial para o controle de *S. aureus*.

4.6.1 Clonagem do gene da proteína recombinante a partir dos fagos líticos

A partir dos dados de sequenciamento, o gene da endolisina dos Fagos 2 e 4 foi amplificado por PCR para obtenção dos amplicons. Em seguida, iniciou-se o processo de clonagem utilizando o vetor pET21a(+). Os amplicons e os plasmídeos foram digeridos com enzimas de alta fidelidade *Nde I* e *Xho I* para garantir que não haveria “mutação” e a atividade da endolisina estivesse preservada e semelhante aos dos Fagos originais (Figura 13). Posteriormente, iniciou-se o processo de transformação e obteve-se quatro isolados (pET21a(+)/FG2-1-NB, pET21a(+)/FG2-2-DH5 α , pET21a(+)/FG4-43-NB e pET21a(+)/FG4-45-DH5 α) em células competentes BL21(DE3) (Thermo Scientific™, Wilmington, EUA). Por fim, os isolados foram denominados *E. coli* BL21 (DE3)/pET21a-1F2-NB; *E. coli* BL21 (DE3)/pET21a-2F2-DH5 α ; *E. coli* BL21 (DE3)/pET21a-43F4-NB; *E. coli* BL21 (DE3)/pET21a-45F4-DH5 α (ALVES, 2019).

Figura 13 - Mapa do vetor pET21a(+) com os múltiplos sítios de ligações enzimáticas.



pET-21a-d(+) cloning/expression region

Legenda: O amplicon foi clonado entre os sítios de ligação das enzimas *Nde I* e *Xho I*, marcados de vermelho.

Fonte: <https://www.addgene.org/12604/>, adaptado.

4.6.2 Expressão, purificação e concentração de proteínas recombinantes

4.6.2.1 Expressão das proteínas recombinantes

Foram descongeladas em gelo, os micro-organismos recombinantes *E. coli* BL21 (DE3)/pET21a-1F2 e *E. coli* BL21 (DE3)/pET21a-43F4 a partir dos estoques mantidos a -80°C. Com o auxílio da alça de platina e seguido as recomendações de biossegurança, uma alçada dessas amostras foi estriada em placas com meio *Luria Bertani* (LB) (*Lennox*®, Richardson, EUA) suplementado com 7% de ágar e ampicilina a uma concentração final de 50 µg/ mL. As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 24 h em incubadora tipo B.O.D, a fim de se obter colônias isoladas. Posteriormente, uma colônia isolada de cada amostra foi inoculada em 3 mL de meio caldo LB (*Lennox*®, Richardson, EUA) com ampicilina (50 µg Amp/ mL). Os tubos foram mantidos a 37°C *overnight*.

No dia seguinte, foi transferido 375 µL da cultura ativa para tubos contendo 25 mL de caldo LB com ampicilina (50 µg/ mL) e incubados no Incubator Shaker a 37°C sob agitação de 250 rpm (*New Brunswick Scientific*, Enfield, EUA) por 4 h ou até obter uma densidade ótica (OD₆₀₀) de 0,5. Em seguida, 4 mL da cultura foi transferido para 250 mL de meio *Overnight Express™ Instant TB Medium* (*Novagen-MerckMillipore*, Darmstadt, Alemanha) previamente preparado de acordo com as instruções do fabricante em frascos Erlenmeyer de 250 mL. As amostras foram incubadas a 30°C sob agitação de 250 rpm por 24 h. Após o período de incubação, as culturas foram transferidas para tubos do tipo falcon de 50 mL e centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pelete foi mantido em gelo até seu uso.

4.6.2.2 Tratamento de lise celular

O pelete obtido de cada amostra foi ressuspendido em tampão *BugBuster*® *Master Mix* (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) conforme recomendações do fabricante, a fim de lisar as células. Incubou-se os tubos a temperatura ambiente sob agitação a 60 rpm por 25 min. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g por 20 min a 4°C. Coletou-se o sobrenadante e o transferiu para novos tubos previamente identificados.

Em seguida, 50 μ L do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para microtubos de 0,6 mL contendo o mesmo volume do tampão de amostra 2X *SDS-PAGE Sample Buffer* (Tris-HCl pH 6,8 240 mM; SDS 8% (v/v); glicerol 40% (v/v); azul de bromofenol 0,04% (v/v); β -Mercaptoetanol 5% (v/v)). As misturas foram aquecidas a 85°C por 3 min, em repouso, para desnaturar as proteínas. Essas amostras foram armazenadas à -20°C até a análise de proteínas por meio da técnica de SDS-PAGE (item 4.11). O restante das amostras foi armazenado a -20°C.

4.6.2.3 Purificação e concentração das proteínas recombinantes

Inicialmente, foi realizada a montagem do sistema de purificação *Amicon® Pro Affinity Concentration Kit Protein G with 3kDa Amicon® Ultra-0.5 Device* (Merck Millipore Ltd., Cork, Irlanda) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizada a preparação das *beads*. A *Ni-NTA Resin* foi homogeneizada cuidadosamente com o auxílio de um vórtex. Adicionou-se 200 μ L de *Ni-NTA Resin* ao dispositivo de troca e centrifugou a 1.000 x g por 1 minuto em rotor do tipo *swinging-bucket* a 4°C. Após a etapa de centrifugação, foi adicionado ao dispositivo 500 μ L de *4X Ni-NTA Bind Buffer* e centrifugado por mais 1 minuto a 1.000 x g a 4°C em rotor do tipo *swinging-bucket*.

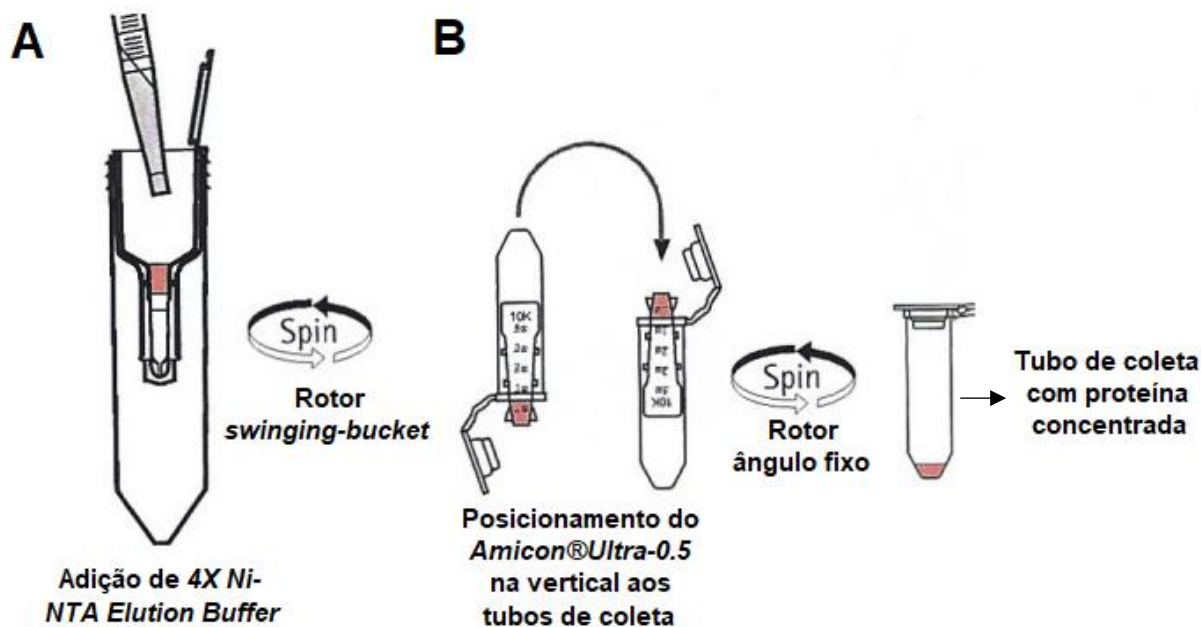
Em seguida, adicionou-se 9 mL de cada amostra ressuspendida em tampão *BugBuster® Master Mix* e se incubou a temperatura ambiente por 90 min a 60 rpm. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 1.000 x g por 1 min a 4°C. Logo depois, foi adicionado 1,5 mL de *2X Ni-NTA Wash Buffer*. Os tubos foram centrifugados mais uma vez a 1.000 x g por 1 min.

Logo após, removeu-se o dispositivo de troca do suporte e o inseriu no dispositivo *Amicon® Ultra-0.5*. Foi adicionado 500 μ L de *4X Ni-NTA Elution Buffer* e a resina foi ressuspendida suavemente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3260 x g por 20 min a 4°C (Figura 14A).

Por fim, coletou-se as amostras de proteínas por rotação reversa, no qual os dispositivos *Amicon® Ultra-0.5* foram retirados dos suportes de troca e foram posicionados na vertical aos tubos de coleta previamente identificados por EndF2 (*E. coli* BL21 (DE3)/pET21a-1F2) e EndF4 (*E. coli* BL21 (DE3)/pET21a-43F4). Estes tubos foram centrifugados em rotor de ângulo fixo a 1.000 x g por 2 min a 4°C (Figura 14B). Após a centrifugação, as proteínas concentradas em *4X Ni-NTA Elution Buffer*

estavam no fundo dos tubos de coleta. Os líquidos depositados no fundo dos dispositivos de troca foram descartados.

Figura 14 - Purificação e concentração de proteínas recombinantes.



Legenda: A - Adição de 4X Ni-NTA Elution Buffer; B - Coleta de amostras de proteínas concentradas.

Fonte: Amicon®Pro Affinity Concentrator - Quick-Start Guide, adaptado.

4.6.2.4 Quantificação das proteínas recombinantes

As proteínas purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop™1000 (ThermoScientific, Wilmington, EUA), no qual foi utilizado o módulo Protein A280. O processo de quantificação seguiu as instruções do fabricante usando a absorbância a 280nm (A280). A concentração de proteína foi calculada usando a equação de Beer-Lambert:

$$A_{280} = c \cdot \epsilon \cdot b$$

No qual, A280 é o valor de absorção, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar dependente do comprimento de onda (ou coeficiente de extinção) com unidades de litro/mol-cm, b é o comprimento do caminho em centímetros e c é a concentração do analito em moles/litro ou molaridade (M).

4.6.3 Eletroforese SDS-PAGE

4.6.3.1 Preparo das amostras

Os 50 μ L coletados de cada amostra de proteína EndF2 e EndF4 desnaturadas (*item 4.6.2.2 Tratamento de lise celular*) foram usados para a corrida eletroforética utilizando o sistema de eletroforese do tipo horizontal no suporte *Amersham ECL Box* (GE Healthcare Life Sciences, Bjorkgatan, Suécia). O gel com concentração de SDS 8-16% é do mesmo fornecedor e prontos para o uso, não necessitando de preparação prévia.

Antes da aplicação das amostras, foi realizada uma pré-corrida com o gel imerso em tampão de corrida *Amersham ECL Gel 10X* que foi diluído na proporção 1:10 em água destilada, de acordo com as instruções do fabricante. A pré-corrida ocorreu por 12 min a 160 V. Após esse tempo, as amostras anteriormente preparadas com tampão de amostra *2X SDS-PAGE Sample Buffer*, foram aplicadas no gel. Também foi aplicado o padrão de peso molecular *Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard* com intervalo entre 3,5 - 260 kDa (*ThermoScientific*, Wilmington, EUA). A separação eletroforética foi feita a 140 V por 60 minutos.

Após a corrida eletroforética, o gel, foi submerso em 1000 mL de solução fixadora (etanol 40% v/v; ácido acético 10% v/v; água destilada 50% v/v) por 30 min. Posteriormente, o gel foi transferido para solução de coloração (*Comassie Brilliant Blue R-250* 0,01% v/v; etanol 25% v/v; ácido acético 5% v/v) e foi submerso em 200 mL do corante por 10 min. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada para retirar o excesso de corante e então transferido para a solução descorante (ácido acético 8% v/v; etanol absoluto 25% v/v; água destilada 67% v/v) na qual permaneceu por aproximadamente 6 h ou até a visualização das bandas, sob agitação de 60 rpm em agitador de bandeja (*Marconi Equipamentos Para Laboratórios Ltda.*, São Paulo, Brasil). Após a etapa de descoloração, o gel foi transferido para a solução conservação (glicerol 87% v/v; água destilada 13% v/v) permanecendo submerso por 30 min. Logo após, foi seco em papel celofane transparente e feita a fotodocumentação.

4.6.4 Determinação da concentração de trabalho das endolisinas recombinantes

Para determinar a concentração de trabalho das endolisinas recombinantes foi utilizado células da linhagem de *S. aureus* 5161. A linhagem foi reativada e cultivada em 3 mL de meio caldo BHI a 37°C por 18 h em repouso.

Foram realizadas diluições das endolisinas recombinantes EndF2 e EndF4 nas seguintes concentrações: 4; 0,8; 0,16 e 0,032 µg/µL. As amostras foram diluídas em *4X Ni-NTA Elution Buffer*. Em seguida, preparou-se as placas de Petri com TI suplementado com Ágar a 0,7% mais 100 µL da suspensão celular da linhagem de *S. aureus* 5161. Após a solidificação do TI, as placas foram divididas em duas partes e então inoculou-se 5 µL de cada uma das diluições das endolisinas nas placas contendo células de *S. aureus*. As placas foram incubadas a 37°C e verificado a formação de halos de lise 24 h após a inoculação. Para a definir a concentração de trabalho, foi feita a medição dos halos de lise.

4.6.5 Determinação do espectro lítico das endolisinas recombinantes

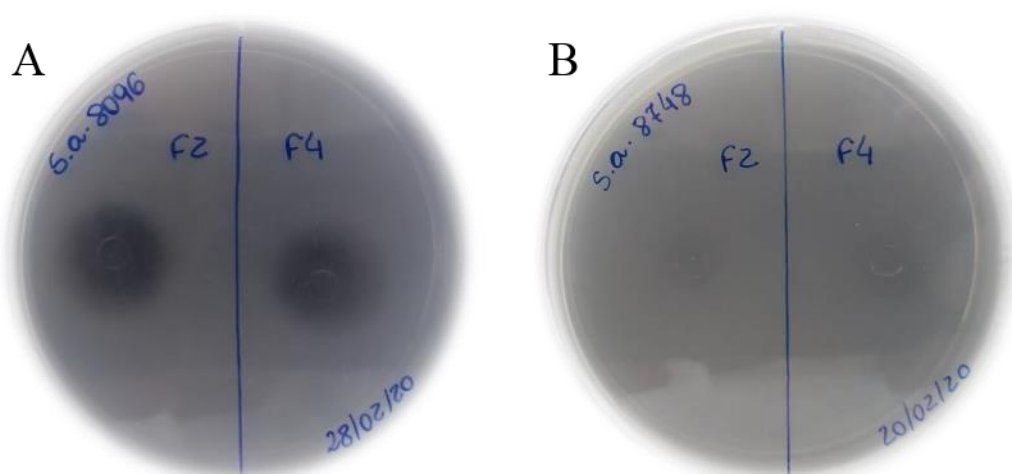
Para determinar o espectro lítico das endolisinas recombinantes, foi utilizado o teste da gota (item 4.2 Determinação do espectro lítico dos Fagos 2 e 4). Foram testadas 44 linhagens bacterianas, sendo 31 de *S. aureus* e 13 de outras espécies (Tabela 2). Após a repicagem, transferiu-se 1 mL das culturas ativas para frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo BHI e incubados a 37°C por 18 h sob agitação a 250 rpm.

No dia seguinte, aferiu-se a OD₆₀₀ das culturas que foram transferidas para frascos e centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se a massa celular com 30 mL de TI. A massa celular foi novamente centrifugada na mesma condição anterior, descartado o sobrenadante e os peletes de células foram ressuspensos em 4 mL de TI.

Posteriormente, para realização do teste da gota, tubos contendo 10 mL de TI suplementado com Ágar (0,7%) foram liquefeitos e equilibrados a temperatura de 50°C em banho-maria (FANEM - São Paulo). Em seguida, adicionou-se em cada tubo, 300 µL de suspensão celular das linhagens. Verteu-se a mistura em placas de Petri e aguardou-se a solidificação do meio. Após a solidificação do meio contendo a mistura,

dividiu-se o fundo da placa em duas partes (uma para a proteína EndF2 e uma para EndF4). Adicionou-se 5 µL com 4 µg de cada proteína sobre o meio, uma proteína por divisão da placa. As placas foram incubadas a 37°C em estufa do tipo B.O.D por 24 h e então, observada a formação de halos de lise e quantificou-se o diâmetro dos halos. Foram consideradas positivas as placas que houve a formação de halo e negativa as que não apresentaram a formação de halo de lise (Figura 15).

Figura 15 - Teste de atividade lítica das endolisinas com duas linhagens de *Staphylococcus aureus*.



Legenda: (A) formação de halo de lise; (B) sem formação de halo de lise; F2 - EndF2; F4 - EndF4.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Tabela 2 - Linhagens utilizadas para determinação do espectro lítico das endolisinas EndF2 e EndF4.

Espécie	Código Local ^a	Origem
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4381	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4486	Isolada leite/mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7234	Portador sea, seb
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7818	Portador sea
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7848	Portador seh
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7976	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7977	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7985	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8001	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8007	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8014	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8046	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8057	Isolada de queijo

Cont.

<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8065	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8073	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8096	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8103	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8117	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8149	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8155	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8162	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8177	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8196	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8235	Isolada de queijo
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8593	Isolada leite mastite, resistente à penicilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8624	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8678	Isolada leite mastite, susceptível à penicilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8724	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8748	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8792	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8798	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8820	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8848	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8880	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8922	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i> , <i>tetK</i> , <i>tetM</i> e <i>tetO</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8923	Isolada leite mastite
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 10037	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i> e <i>tetM</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5161	
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5559	
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5599	
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4444	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC 25923	Isolado clínico
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	GL 8222	
<i>Staphylococcus hyicus</i> ATCC 11249	GL 7761	Isolado de porco com epidermite exsudativa
<i>Staphylococcus intermedius</i> ATCC 29663	GL 7766	Isolado de nariz de pombo; produz endonuclease de restrição <i>SinMI</i> e <i>SinMII</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	GL 8286	
<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 700407	GL 8369	
<i>Listeria monocytogenes</i>	GL 7268	Isolada de queijo Minas frescal, PCR+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	GL 5786	

Legenda: ^aCódigo local da Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa.

Fonte: <https://am.cenargen.embrapa.br/amconsulta/colecao/catalogo?id=8>. Acesso em: 16/06/2023.

4.7 ASPECTOS BIOQUÍMICOS E DE ALERGENICIDADE DAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES *IN SILICO*

4.7.1 Aspectos bioquímicos

Para prever a composição dos fragmentos e suas principais características físicas e químicas, foi utilizada a ferramenta *ProtParam Tools* do *Software on line Expasy* (GASTEIGER et al., 2005). As sequências utilizadas como *input* (Tabela 3) no *software* foram as mesmas utilizadas para expressão das proteínas recombinantes.

Tabela 3 - Sequências de aminoácidos das endolisinas recombinantes utilizadas para as análises.

Proteína	Sequência de aminoácidos
EndF2 (GU722134)	MQAKLTIKEFIEWLKSSEGGKQFNVDLWYGFLRFDYANAANKVLFGLLLKGLGAKDI PFANNFDGLATVYQNTPDFLAKPGDMVVFGSNYGAGYGHVAWVIEATLDYIIVYE QNWLGGGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIRPKFKSETAPRSVQSP TQAPKKETAKPQPKAVELKIKDVVKGYDLPKRGSNPKGIVIHNDAGSKGATAEAY RNGLVNAALSRLEAGIAHSYVSGNTVCQALDESQVGWHTANQIGNKYYYGIEVCQ SMGADNATILKNEQATFQECARLLKKWGLPANRNTIRLHNEFTSTSCPHRSSVLH TGFDPVTRGLLPEDKQLQLKDYFIKQIRVYMDGKIPVATVSNESSASSNTVKPVAS AWKRKNKYGTYYMEESARFTNGNQIPITVRKIGPFLSCP VAYQFQPGGYCDYTEVM LQDGHVWVG YTWEGQRYLLPIRTWNGSGPPNQILGDLWGEISHHHHHH MQAKLTIKEFIEWLKSSEGGKQFNVDLWYGFLRFDYANAANKVLFGLLLKGLGAKDI PFANNFDGLATVYQNTPDFLAKPGDMVVFGSNYGAGYGHVAWVIEATLDYIIVYE QNWLGGGWTDGIEQPGWGWEKVTRRQHAYDFPMWFIRPKFKSETAPRSVQSP TQAPKKETAKPQPKAVELKIKDVVKGYDLPKRGSNPKGIVIHNDAGSKGATAEAY RNGLVNAPLSRLEAGIAHSYVSGNTVCQALDESQVGWHTANQIGNKYYYGIEVCQ SMGADNATILKNEQATFQECARLLKKWGLPANRNTIRLHNEFTSTSCPHRSSVLH TGFDPVTRGLLPEDKQLQLKDYFIKQIRVYMDGKIPVATVSNESSASSNTVKPVAS AWKRKNKYGTYYMEESARFTNGNQIPITVRKIGPFLSCP VAYQFQPGGYCDYTEVM LQDGHVWVG YTWEGQRYLLPIRTSNGSGPPNQILGDLWGEISHHHHHH
EndF4 (GU722135)	

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20/03/2020.

4.7.1 Predição de alergenicidade

Para prever a alergenicidade das proteínas recombinantes, utilizou-se as sequências correspondentes as endolisinas EndF2 e EndF4 para análise no *software online* AlgPred (SHARMA et al., 2021). Além disso, foi realizado um mapeamento de epítomos reconhecidos por IgE.

4.7.2 Modelagem molecular das endolisinas recombinantes

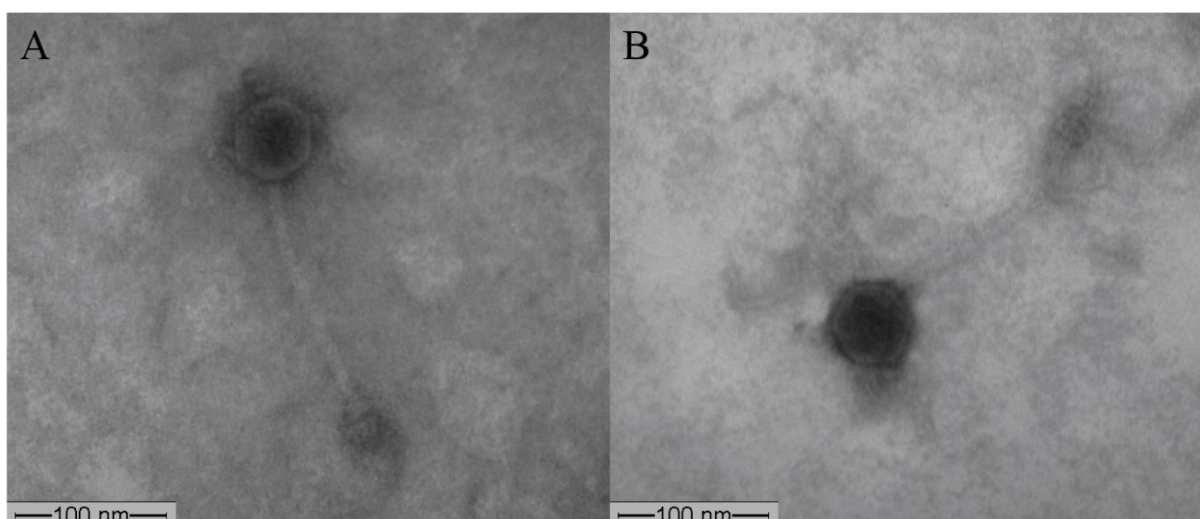
A modelagem molecular tridimensional das estruturas foi realizada utilizando-se o *software AlphaFold2* (JUMPER et al., 2021), seguindo o método de modelagem por homologia. O melhor modelo, de 100, foi selecionado por meio da sua avaliação no QMEAN (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011). As estruturas geradas foram observadas pelo programa *Pymol Molecular Graphics System* na versão 1.6 (Schrodinger, LLC).

5 RESULTADOS

5.1 MORFOLOGIA DOS FAGOS

A imagens obtidas por microscopia eletrônica demonstraram que os fagos isolados (Fago 2 e 4) não são envelopados. Eles possuem uma cabeça icosaédrica, um pescoço fino com cauda longa e não contrátil. Todos apresentando um tamanho aproximado de 200 nm. Essas características são decisivas para classificá-los na ordem *Caudovirales* e família *Siphoviridae* (Figura 16A, B).

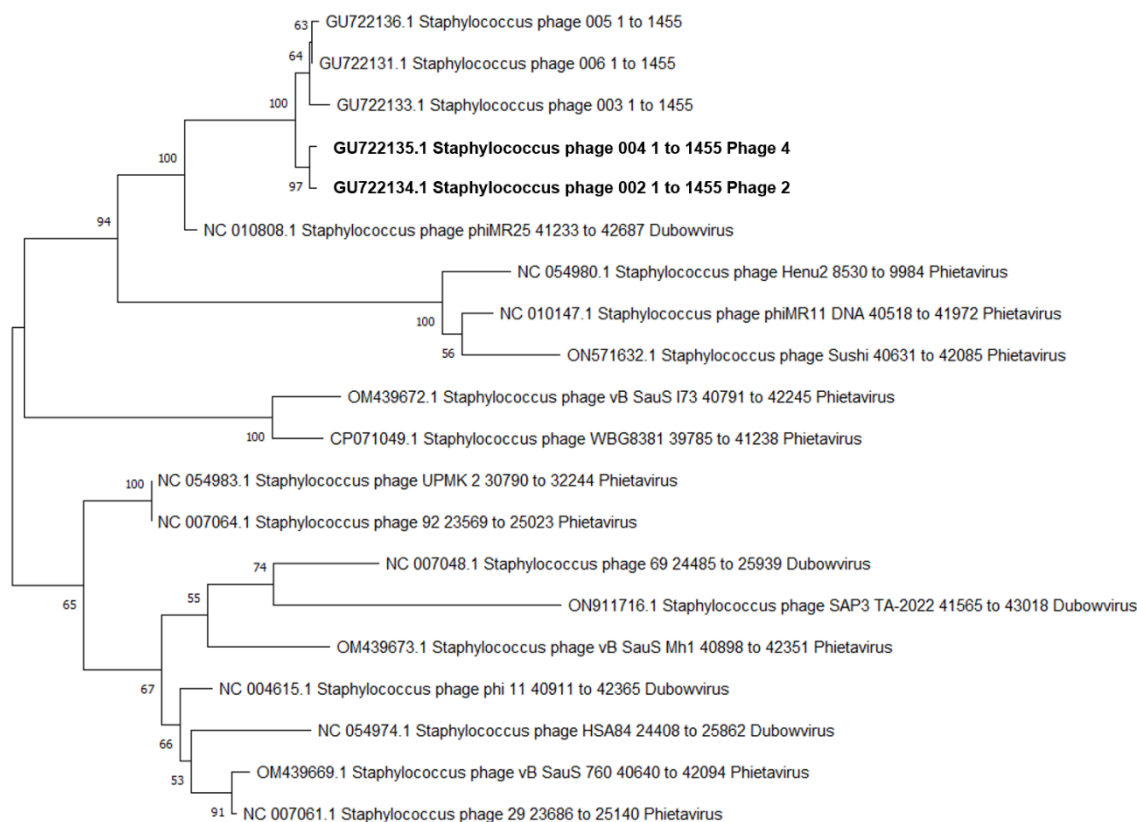
Figura 16 - Fotomicrografia dos Fagos 2 e 4 em microscopia eletrônica de transmissão.



Legenda: A - Fago 2; B - Fago 4.
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Além disso, com base na similaridade encontrada com outros fagos (BLAST), e a construção de uma árvore filogenética (Figura 17) a partir das sequências do gene que codificam as endolisinas, sugerimos que os fagos 2 e 4 são pertencentes a subfamília *Azeredovirinae* e aos gêneros *Dubowvirus* ou *Phietavirus*. Para confirmar essas informações é necessário o sequenciamento do genoma completo dos fagos.

Figura 17 - A análise filogenética das endolisinas EndF2 e EndF4.



Legenda: A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste bootstrap (2000 réplicas) são mostradas ao lado dos ramos. A árvore é desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. Esta análise envolveu 20 sequências de nucleotídeos. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA11 (TAMURA et al., 2021).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.2 ESPECTRO LÍTICO DOS FAGOS

Testes de atividade lítica foram realizados com 90 linhagens de *S. aureus* e outras 13 linhagens bacterianas para os fagos. As linhagens foram acessadas a partir da Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa, previamente isoladas a partir de amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica bovina, coletadas de tanque, ou a partir de amostra de queijo Minas Frescal, pele humana, urina, garganta entre outros.

Durante o teste de atividade lítica, para determinar o espectro de hospedeiro dos fagos, foram consideradas positivas as placas que apresentaram halos de lise completo ou parcial (Figura 9A, B) e negativo as placas que não apresentaram halos de lise.

O Fago 2 lisou 62,22 % (56/90) das linhagens de *S. aureus*, enquanto o Fago 4 foi capaz de lisar 51,11 % (46/90) linhagens *S. aureus* testadas. Os resultados dos testes de atividade lítica são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Linhagens bacterianas susceptíveis à lise pelos Fagos 2 e 4.

Espécie	Código Local ^a	Origem	Fagos ^b	
			F2	F4
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4030	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4031	Isolada leite/mastite	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4063	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4073	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4074	Isolada leite/ tanque refrigeração	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4077	Isolada leite/ tanque refrigeração	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4096	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4098	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4118	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4124	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4143	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4183	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4191	Isolada leite/mastite	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4238	Isolada leite/mastite	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4247	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4292	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4295	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4308	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4315	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4371	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4381	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4437	Isolada leite/mastite	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4486	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4498	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4531	Isolada leite/mastite	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4562	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4627	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4660	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4661	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4662	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4677	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4679	Isolada leite/mastite	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4690	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4704	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4706	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5475	Isolada leite/mastite	-	-

Cont.

Espécie	Código Local ^a	Origem	Fagos ^b	
			F2	F4
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5682	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5710	Isolada leite/mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5732	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5759	Isolada leite/tanque refrigeração	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5764	Isolada leite/ tanque refrigeração	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 6209	Portador sea	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 6210	Portador seb	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 6211	Portador sed e sej	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7234	Portador sea, seb	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7818	Portador sea	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7848	Portador seh	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7976	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7977	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7985	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8001	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8007	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8014	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8046	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8057	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8065	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8073	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8096	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8103	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8117	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8149	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8155	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8162	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8177	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8196	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8235	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8593	Isolada leite mastite, resistente à penicilina	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8608	Isolada leite mastite, resistente à penicilina	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8624	Isolada leite mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8676	Isolada leite mastite, susceptível à penicilina	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8678	Isolada leite mastite, susceptível à penicilina	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8724	Isolada leite mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8748	Isolada leite mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8792	Isolada leite mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8798	Isolada leite mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8820	Isolada leite mastite	-	-

Cont.

Espécie	Código Local ^a	Origem	Fagos ^b	
			F2	F4
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8848	Isolada leite mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8880	Isolada leite mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8922	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i> , <i>tetK</i> , <i>tetM</i> e <i>tetO</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8923	Isolada leite mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 9088	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 10025	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i> e <i>tetL</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 10035	Isolada leite mastite, tem <i>tetK</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 10037	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i> e <i>tetM</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5161		+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5559		+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5599		+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4444		-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 51651	GL 7771		+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC 25923	Isolado clínico	+	+
<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971	GL 8211		-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	GL 8222		-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970	GL 8223		-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	GL 8225		-	-
<i>Staphylococcus hyicus</i> ATCC 11249	GL 7761	Isolado de porco com epidermite exsudativa	-	-
<i>Staphylococcus intermedius</i> ATCC 29663	GL 7766	Isolado de nariz de pombo; produz endonuclease de restrição <i>SinMI</i> e <i>SinMII</i>	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium IAL 1412	GL 5153		-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	GL 8286		-	-
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> ATCC 12388	GL 8289		-	-
<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 700407	GL 8369		-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	GL 7268	Isolada de queijo Minas frescal, PCR+	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	GL 5786		-	-
<i>Enterobacter (Cronobacter) sakasakii</i> CDC 7006	GL 5893		-	-

Legenda: ^acódigo local da Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e ^bF2 - Fago 2; F4 - Fago 4: (+) lise completa; (+-) lise parcial (-) negativo, sem formação de halo.
 Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

5.3 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Culturas de *S. aureus* foram infectadas com diferentes quantidades de fagos, como planejado. As células viáveis de *S. aureus* foram contadas após 1 e 3 h de incubação. Os resultados indicaram que as concentrações bactericidas mínimas (CBM) do Fagos 2 foi de $1,19 \times 10^3$ MOI para os tempos 1 e 3 h e para o Fago 4, $7,91 \times 10^3$ MOI para 1 h e $3,16 \times 10^4$ MOI para 3 h (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração bactericida mínima dos Fagos 2 e 4.

MOI Fago 2	UFC de <i>S. aureus</i> em 10 μ L		MOI Fago 4	UFC de <i>S. aureus</i> em 10 μ L	
	1 hora	3 horas		1 hora	3 horas
9,75E+06	0,0	0,0	2,03E+06	0,0	0,0
4,88E+06	0,0	0,0	1,01E+06	0,0	0,0
2,44E+06	0,0	0,0	5,06E+05	0,0	0,0
1,22E+06	0,0	0,0	2,53E+05	0,0	0,0
6,09E+05	0,0	0,0	1,27E+05	0,0	0,0
3,05E+05	0,0	0,0	6,33E+04	0,0	0,0
1,52E+05	0,0	0,0	3,16E+04^b	0,0	0,0
7,62E+04	0,0	0,0	1,58E+04	0,0	1,5
3,81E+04	0,0	0,0	7,91E+03^a	0,0	1,5
1,90E+04	0,0	0,0	3,96E+03	0,5	0,5
9,52E+03	0,0	0,0	1,98E+03	1,5	4,5
4,76E+03	0,0	0,0	9,89E+02	4,5	25,0
2,38E+03	0,0	0,0	4,94E+02	11,5	62,0
1,19E+03^{ab}	0,0	0,0	2,47E+02	11,5	> 300
5,95E+02	3,0	0,5	1,24E+02	13,5	> 300
2,98E+02	3,5	1,5	6,18E+01	21,0	> 300
1,49E+02	11,5	9,0	3,09E+01	19,0	> 300
7,44E+01	9,0	30,5	1,54E+01	18,0	> 300
3,72E+01	17,0	60,0	7,72E+00	21,0	> 300
1,86E+01	12,0	76,5	3,86E+00	17,0	> 300
9,30E+00	11,5	> 300	1,93E+00	13,5	> 300
4,65E+00	22,0	> 300	9,66E-01	24,5	> 300
CN	27,5	> 300	CN	23,5	> 300
CP	0,0	0,0	CP	0,0	0,0

Legenda: CN - controle negativo; CP - controle positivo; ^aCBM 1 hora de incubação; ^bCBM 3 horas de incubação. Limite de detecção 100 UFC/mL. Média
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM TETOS EXTRACORPÓREOS

Após 30 min de desafio com *S. aureus*, uma carga bacteriana de aproximadamente 339 UFC/ mL foi detectada nos tetos extracorpóreos bovinos infectados e tratados com TI. Quando os tetos foram tratados com solução de Fago 2, observou-se uma taxa de redução bacteriana de 78,76% quando comparado com grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Contagem de colônias UFC/ mL nos tetos extracorpóreos.

Diluição	Teto 1	Teto 2	Teto 3	Teto 4
	10 ⁵ UFC + CaCl ₂ + TI	10 ⁵ UFC + CaCl ₂ + 10 ¹⁰ UFP	10 ⁵ UFC + CaCl ₂ + 10 ¹⁰ UFP	10 ⁵ UFC + CaCl ₂ + <i>pré-dipping</i>
10 ⁰	339,0	71,0	73,0	0,0
10 ⁻¹	34,5	9,5	10,5	0,0
10 ⁻²	3,0	0,0	0,0	0,0

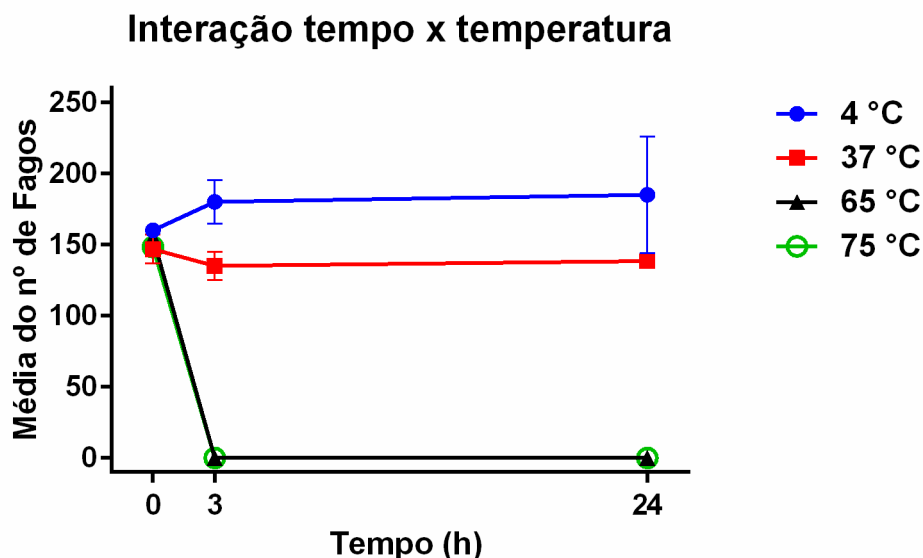
Legenda: Teto 1 - controle negativo; Tetos 2 e 3 - desafio com o Fago 2; Teto 4 - controle positivo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

5.5 ESTABILIDADE DO TÉRMICA

Para investigar a estabilidade térmica do fago 2 em diferentes condições ambientais, foram observadas as taxas de viabilidade do fago 2 em várias temperaturas. O fago 2 demonstrou estabilidade ($p>0,05$) quando exposto às temperaturas de 4 e 37°C de 0 a 24 h (Figura 18). No entanto, a taxa de viabilidade do fago diminuiu significativamente ($p<0,05$) quando incubado a 65 e 75°C por 3 ou 24 horas, o que indica que o fago 2 não possui boa estabilidade térmica nessa faixa de temperatura (Tabela 7).

Figura 18 - Estabilidade do Fago 2 em diferentes temperaturas.



Legenda: Todos os ensaios foram realizados em triplicata. (Teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).
 Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 7 - Comparações de médias para o desdobramento da interação Temperatura x Tempo, para o número de fagos contabilizados¹ em placas de Petri.

Temperatura (°C)	Tempo de exposição (h)			EP
	0	3	24	
4	160 ^{aA}	180 ^{aA}	185 ^{aA}	13,38
37	146 ^{aA}	135 ^{bA}	138 ^{aA}	
65	155 ^{aA}	0 ^{cB}	0 ^{bB}	
75	148 ^{aA}	0 ^{cB}	0 ^{bB}	

Legenda: ¹Contagens foram transformadas pela raiz quadrada previamente à análise, visando aproximar a distribuição dos resíduos da normalidade. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os níveis de temperatura, e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos (Teste de Tukey, $\alpha = 0,05$). EP = Erro padrão das médias.

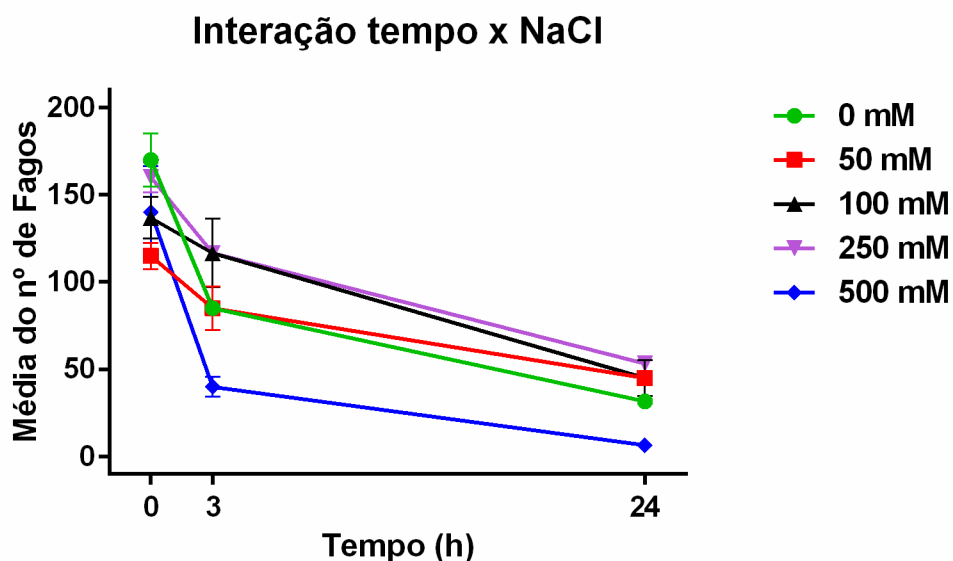
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.6 EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl

Durante a incubação em concentrações de NaCl variando de 0 a 500 mM por 3 h e 24 h, verificou-se uma redução na taxa de viabilidade do Fago 2 em função do tempo. Ao analisar a taxa de viabilidade do Fago 2 em relação ao fator concentração de NaCl, observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na concentração de 500 mM de NaCl quando comparada com as outras concentrações nos tempos de 3 ou 24 h (Figura 19). Em relação ao fator tempo, foi observada uma

diminuição significativa ($p < 0,05$) na taxa de viabilidade do Fago 2 nas concentrações de 0 e 500 mM de NaCl. Além disso, a interação entre o tempo de 3 horas e as concentrações de 50, 100 e 250 mM de NaCl apresentou estabilidade ($p > 0,05$) para o fago 2 (Tabela 8).

Figura 19 - Estabilidade do Fago 2 em diferentes concentrações de NaCl.



Legenda: Todos os ensaios foram realizados em triplicata. (Teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 8 - Comparações de médias para o desdobramento da interação Concentração de NaCl x Tempo, para o número de fagos contabilizados¹ em placas de Petri.

Conc. NaCl (mM)	Tempo de exposição (h)			EP
	0	3	24	
0	170 ^{aA}	85 ^{aB}	32 ^{aC}	11,38
50	115 ^{bA}	85 ^{aA}	45 ^{aB}	
100	137 ^{abA}	117 ^{aA}	45 ^{aB}	
250	160 ^{abA}	117 ^{aA}	53 ^{aB}	
500	140 ^{abA}	40 ^{bB}	7 ^{bC}	

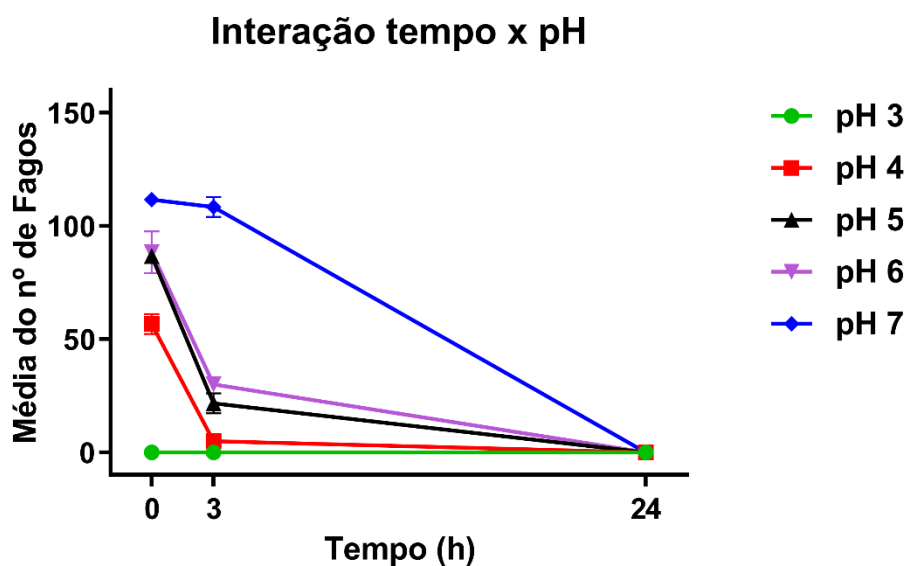
Legenda: ¹Contagens foram transformadas pela raiz quadrada previamente à análise, visando aproximar a distribuição dos resíduos da normalidade. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os níveis de concentração de sal, e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos (Teste de Tukey, $\alpha = 0,05$). EP = Erro padrão das médias.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.7 EFEITO DOS DOFERENTES NÍVEIS DE pH

Ao longo da incubação em diferentes níveis de pH, variando de 3 a 7, por períodos de 3 horas e 24 horas, foi observada uma diminuição na taxa de viabilidade do Fago 2, em relação ao tempo. Ao analisar a taxa de viabilidade do Fago 2 em relação ao fator níveis de pH, observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos níveis de 3 a 6 quando comparada com as outras concentrações nos tempos de 3 ou 24 h (Figura 20). Em relação ao fator tempo, foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na taxa de viabilidade do Fago 2 em todos os níveis testados. Porém, o Fago 2 demonstrou estabilidade no pH 7 quando comparado com os outros níveis entre 0 e 3 h ($p < 0,05$) (Tabela 9).

Figura 20 - Estabilidade do Fago 2 em diferentes níveis de pH.



Legenda: Todos os ensaios foram realizados em triplicata. (Teste de Tukey, $\alpha = 0,05$).
 Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 9 - Comparações de médias para o desdobramento da interação níveis de pH x Tempo, para o número de fagos contabilizados¹ em placas de Petri.

Níveis de pH	Tempo de exposição (h)			EP
	0	3	24	
pH 3	0,00 ^{dA}	0,00 ^{dA}	0,00 ^{aA}	3,25
pH 4	56,67 ^{cA}	5,00 ^{cB}	0,00 ^{aC}	
pH 5	86,67 ^{bA}	21,67 ^{bB}	0,00 ^{aC}	
pH 6	88,33 ^{bA}	30,00 ^{bB}	0,00 ^{aC}	
pH 7	111,67 ^{aA}	108,33 ^{aA}	0,00 ^{aB}	

Legenda: ¹Contagens foram transformadas pela raiz quadrada previamente à análise, visando aproximar a distribuição dos resíduos da normalidade. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os níveis de pH, e letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos (Teste de Tukey, $\alpha = 0,05$). EP = Erro padrão das médias.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.8 ATIVIDADE LÍTICA DAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES

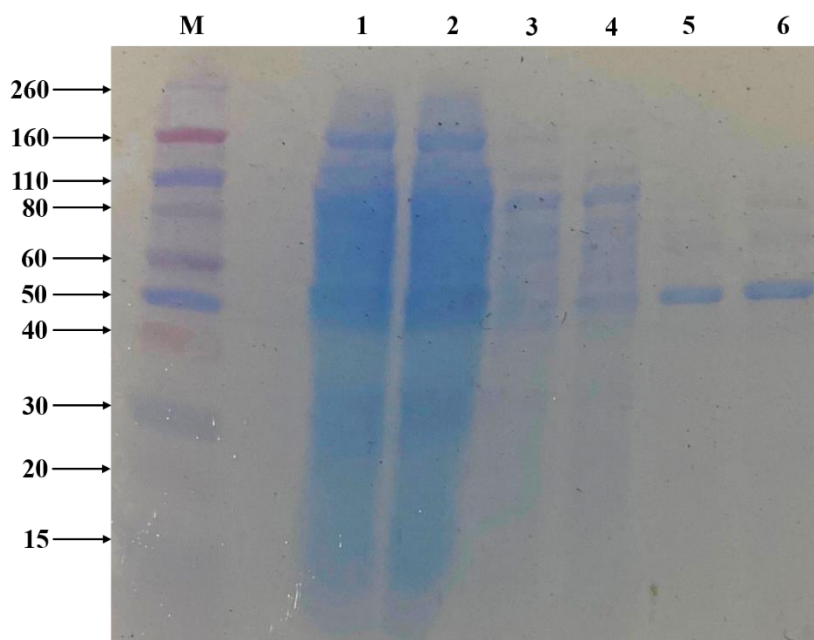
5.7.1 Expressão, purificação e concentração de endolisinas recombinantes

Neste estudo foi possível expressar, purificar e concentrar as endolisinas recombinantes, além de determinar o espectro lítico destas endolisinas recombinantes frente a linhagens de *S. aureus* e outras espécies bacterianas.

Com o objetivo de expressar e purificar as endolisinas EndF2 e EndF4, os clones recombinantes *E. coli* BL21 (DE3)/pET21a-1F2 e *E. coli* BL21 (DE3)/pET21a-43F4 foram descongelados a partir dos estoques mantidos a -80°C.

As amostras obtidas durante a expressão das endolisinas recombinantes foram analisadas em SDS-PAGE corado com *Comassie Brilliant Blue R-250*. Os resultados obtidos estão representados na Figura 21.

Figura 21 - Gel de eletroforese SDS-PAGE 8-16%, expressão de proteínas recombinantes.



Legenda: (M) Marcador Novex - kDa; (1) Eluido 1 EndF2; (2) Eluido 1 EndF4; (3) Eluido 2 EndF2; (4) Eluido 2 EndF4; (5) EndF2 purificada; (6) EndF4 purificada.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

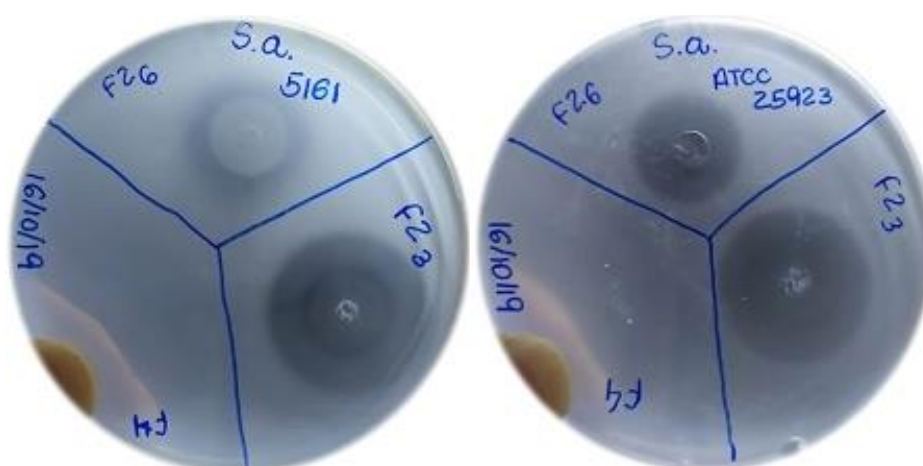
Observando os resultados obtidos da expressão proteica no gel de SDS-PAGE, é possível identificar a presença das bandas na faixa de 50 a 60 kDa, que

correspondem respectivamente às endolisinas EndF2 e EndF4. Sugere-se que o grau de pureza destas purificações foi elevado, tal como se pode observar nas canaletas 5 e 6, em que a presença de bandas inespecíficas é quase nula.

Dos resultados obtidos foi possível obter proteínas com elevado grau de pureza, permitindo a sua quantificação, para a qual se utilizou o método A280 (Nanodrop™1000). Com os valores de absorbância medidos para cada uma das endolisinas determinou-se uma concentração de 4,82 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a EndF2 e 6,42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a EndF4.

Para se verificar a existência de atividade lítica nos extratos proteicos, efetuou-se um ensaio preliminar em *S. aureus* 5161 e *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 22).

Figura 22 - Atividade lítica das endolisinas recombinantes em linhagens de *Staphylococcus aureus*.



Legenda: Concentrações inoculadas para EndF2₆, 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; EndF2₃, 11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e EndF4, < 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. representação esquemática halo de lise de endolisinas.

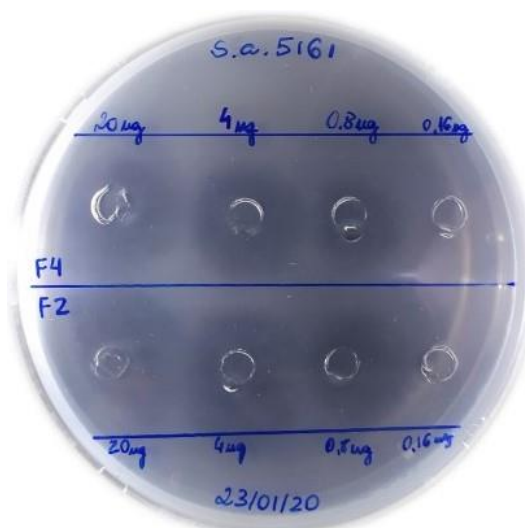
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Após 24 h de incubação a 37°C, houve o aparecimento de halos de lise no local da inoculação, com diâmetros de 17 e 22 mm para as EndF2₆ e EndF2₃ respectivamente para a linhagem *S. aureus* 5161. Já para a linhagem *S. aureus* ATCC 25923, houve o aparecimento de halos de lise com diâmetros de 16 e 21 para EndF2₆ e EndF2₃ respectivamente. Não houve o aparecimento de halos de lise para EndF4 para nenhuma das duas linhagens de *S. aureus*, provavelmente pela baixa concentração inoculada (<0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

5.7.2 Concentração de trabalho das endolisinas recombinantes

Para se determinar a concentração de trabalho das endolisinas recombinantes foi utilizado células da linhagem de *S. aureus* (5161) susceptível. Sobre as células incorporadas em meio sólido composto por TI suplementado com 0,7% de ágar, inoculou-se 5 µL de cada uma das diluições das endolisinas recombinantes EndF2 e EndF4. Os resultados obtidos estão representados na Figura 23.

Figura 23 - Teste para determinação da concentração de trabalho das endolisinas recombinantes.



Legenda: F4 - EndF4; F2 - EndF2. Quantidades inoculadas: 20; 4; 0,8 e 0,16 µg.
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Após 24 h de incubação a 37°C, houve o aparecimento de halos de lise no local da inoculação, com diâmetros de até 25 mm para as EndF2 e EndF4 para a linhagem de *S. aureus* (Tabela 10).

Tabela 10 - Diâmetros (mm) dos halos de lise formados pelas endolisinas recombinantes.

Endolisina	Quantidade (µg)			
	20	4	0,8	0,16
EndF2	22	14	8	-
EndF4	25	15	9	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Diante dos resultados obtidos, definiu-se 4 µg ou 0,8 µg/ µL como a concentração de trabalho já que, apresentou halo de lise visível para as duas endolisinas recombinantes (média de 14,5 mm).

5.9 ESPECTRO LÍTICO DAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES

Testes de atividade lítica foram realizados com 42 linhagens de *S. aureus* e outras 7 linhagens bacterianas para as endolisinas. As linhagens foram acessadas a partir da Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa, previamente isoladas a partir de amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica bovina, coletado de tanque, ou a partir de amostra de queijo Minas Frescal, pele humana, urina, garganta entre outros.

Durante o teste de atividade lítica, a EndF2 lisou 71,43 % (30/42) das linhagens de *S. aureus*, enquanto a EndF4 foi capaz de lisar 76,20 % (32/42) das linhagens de *S. aureus* testadas. Os resultados dos testes de atividade lítica são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Linhagens bacterianas susceptíveis à lise pelas endolisinas EndF2 e EndF4.

Espécie	Código Local ^a	Origem	Endolisinas ^b	
			EndF2	EndF4
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4381	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4486	Isolada leite/mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7234	Portador sea, seb	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7818	Portador sea	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7848	Portador seh	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7976	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7977	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 7985	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8001	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8007	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8014	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8046	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8057	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8065	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8073	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8096	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8103	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8117	Isolada de queijo	+	+

Cont.

Espécie	Código Local ^a	Origem	Endolisinas ^b	
			EndF2	EndF4
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8149	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8155	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8162	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8177	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8196	Isolada de queijo	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8235	Isolada de queijo	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8593	Isolada leite mastite, resistente à penicilina	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8624	Isolada leite mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8678	Isolada leite mastite, susceptível à penicilina	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8724	Isolada leite mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8748	Isolada leite mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8792	Isolada leite mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8798	Isolada leite mastite	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8820	Isolada leite mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8848	Isolada leite mastite	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8880	Isolada leite mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8922	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i> , <i>tetK</i> , <i>tetM</i> e <i>tetO</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 8923	Isolada leite mastite	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 10037	Isolada leite mastite, tem <i>blaZ</i> e <i>tetM</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5161		+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5559		+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 5599		+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	GL 4444		-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC 25923	Isolado clínico	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	GL 8222		-	-
<i>Staphylococcus hyicus</i> ATCC 11249	GL 7761	Isolado de porco com epidermite exsudativa	-	-
<i>Staphylococcus intermedius</i> ATCC 29663	GL 7766	Isolado de nariz de pombo; produz endonuclease de restrição <i>SinMI</i> e <i>SinMII</i>	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386	GL 8286		-	-
<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 700407	GL 8369		-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	GL 7268	Isolada de queijo Minas frescal, PCR+	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	GL 5786		-	-

Legenda: ^acódigo local da Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa. ^bEndolisinas EndF2 e EndF4: (+) positivo, formação de halo; (-) negativo, sem formação de halo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.8 CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DAS ENDOLISINAS RECOMBINANTES

5.8.1 Aspectos bioquímicos

A estrutura proteica das endolisinas, quando analisada no *software ProtParam* (GASTEIGER et al., 2005), apresenta 487 aminoácidos, totalizando 54,56 kDa. De acordo com os índices preditos pelo *software* a proteína se demonstra instável, porém apresenta um tempo de meia-vida de 30 h em organismos vivos, o que contribui com a sua atuação e efetividade como possível biofármaco. Além disso, pelo índice de GRAVY a proteína tem comportamento hidrofílico, ideal para sua veiculação. Os demais pontos obtidos pela análise estão dispostos na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise dos parâmetros físico-químicos das endolisinas recombinantes.

Parâmetros	EndF2	EndF4
Número de resíduos (aa)	487	487
Peso molecular (kDa)	54,77	54,70
Ponto isoelétrico	8,82	8,82
Fórmula molecular	C ₂₄₈₄ H ₃₇₅₅ N ₆₇₃ O ₇₀₇ S ₁₃	C ₂₄₈₄ H ₃₇₅₂ N ₆₇₂ O ₇₀₈ S ₁₃
Estimativa de meia-vida <i>in vivo</i> (h)	30	30
Índice de instabilidade	Estável	Estável
Índice alifático	73,25	73,10
GRAVY	Hidrofílico	Hidrofílico

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5.8.2 Predição de alergenicidade

As predições do potencial alergênico das proteínas recombinantes, bem como a busca por epítomos reconhecidos por anticorpos IgE, foram realizadas utilizando *software* AlgPred. De acordo com as análises, o mapeamento de epítomos não detectou nenhuma região considerada antigênica, sendo assim a proteína não apresenta nenhuma região potencialmente reconhecida por imunoglobulinas IgE. De acordo com o índice MAST; e o alinhamento por BLAST com outras sequências proteicas, as endolisinas não apresentam potencial alergênico. Porém, conforme o método SVM, baseado na composição de aminoácidos e dipeptídeos as proteínas apresentam potencial de alergenicidade. Todas as análises e seus respectivos resultados podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13 - Análise do potencial alergênico das endolisinas recombinantes.

Análise	Score EndF2	Score EndF4	Threshold	Resultado ¹
Mapeamento de epitopos igE	-	-	-	Não alergênica
MAST	-	-	-	Não alergênica
SVM-aminoácidos	0,41	0,37	-0,40	Alergênica
SVM-dipeptídeos	0,16	0,09	-0,20	Alergênica
BLAST	-	-	-	Não alergênica

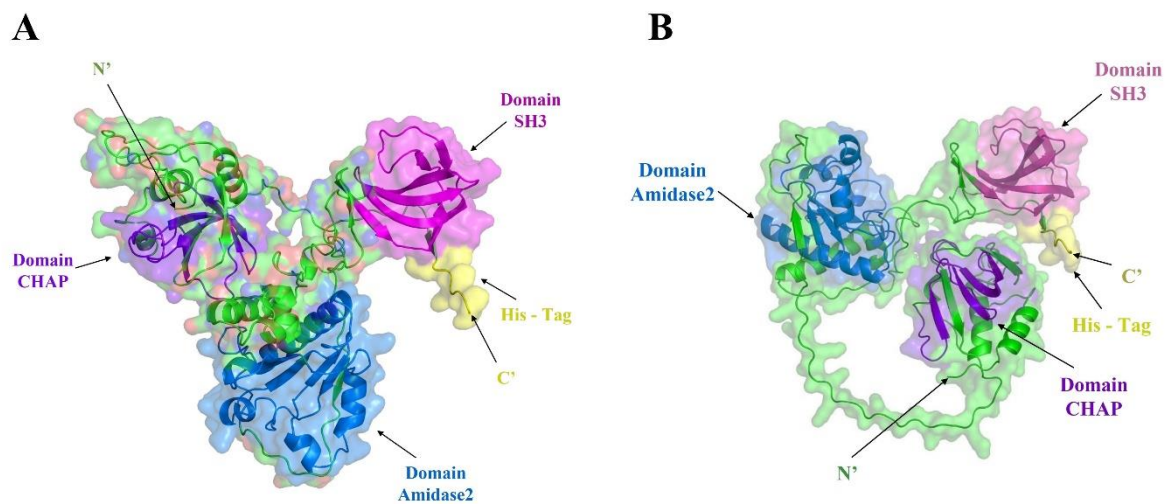
Legenda:¹Dados obtidos para EndF2 e EndF4.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5.8.3 Modelagem das endolisinas recombinantes

Foram selecionados 100 modelos entre os 2000 obtidos, com base em seus valores de DOPE score, com o objetivo de aprimorar as análises. Em seguida, esses modelos foram submetidos a análises de qualidade, e os modelos que apresentaram os melhores resultados foram escolhidos. Os modelos selecionados apresentaram o z-score obtido pela análise *Qmean* de $[-1,02]$ para EndF2 e $[-1,03]$ para EndF4, o que é considerado um valor ótimo para bons modelos, já que o *software* considera como bons modelos aqueles que apresentam valores entre -2 e 2 (modular). Os modelos obtidos para EndF2 e EndF4 podem ser visualizados na Figura 24 e a partir deles foi possível localizar os domínios SH3, CHAP e Amidase2 em cada endolisina recombinante.

Figura 24 - Representação da modelagem a partir das sequências proteicas das endolisinas recombinantes.



Legenda: A - EndF2; B - EndF4; N' - N' terminal; C' - C' terminal; His-Tag - cauda de histidina.
Fonte: Elaborado pelo autor.

6 Discussão

Em um estudo prévio, Leite et al. (2010) descreveram o isolamento de seis fagos a partir de água de curral, sendo que os Fagos 2 e 4 demonstraram um potencial lítico mais elevado em relação às linhagens de *S. aureus*. Assim sendo, no estudo atual, os Fagos 2 e 4 e suas endolisinas, foram avaliados e caracterizados tanto morfologicamente quanto bioquimicamente.

A partir das chaves taxonômicas obtidas no Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) e com base na similaridade encontrada em bancos de dados (NCBI – BLAST) com outros fagos, com base em sua morfologia apresentada na (Figura 16) e com a literatura (JI et al., 2020; KIM et al., 2021; NIKULINA et al., 2023), os fagos 2 e 4 foram atribuídos à família *Syphoviridae*.

A amplitude de hospedeiros e o potencial lítico dos candidatos à terapia fágica são características cruciais. Fagos específicos para lisar células de *S. aureus* de um estudo recente, foram capazes de lisar de 88% a 94% das linhagens testadas *in vitro* (LOGANATHAN; NACHIMUTHU 2023). Em nosso estudo, os dois fagos (Fago 2 e Fago 4) mostraram atividade lítica em 54,37 e 44,66% das linhagens de *S. aureus* testadas, respectivamente. Os dois fagos têm faixa de hospedeiros complementares além disso, não foram capazes de lisar linhagens bacterianas (n=13) que pertencem a outras espécies.

A cinética lítica dos fagos foi muito parecida em comparação com a tendência geralmente observada para outros fagos, isto é, a maioria dos fagos demonstra atividade lítica dependente da concentração (HAN et al., 2013; KALATZIS et al., 2016). Em nosso estudo, após o tratamento com baixas concentrações de fagos, o crescimento das bactérias não foi inibido. Em contraste, após o tratamento com altas concentrações de fagos, o crescimento bacteriano foi inibido durante as primeiras horas (Tabela 5). No primeiro momento, a necessidade de altas concentrações de fago para inibir o crescimento bacteriano, pode ser um problema. Porém, a propagação e concentração dos fagos pode ser considerada uma metodologia de fácil execução e de baixo custo. Neste estudo, obtivemos soluções de fagos com altas concentrações que variaram de 10^9 a 10^{20} UFP/ mL, assim como Yazdi et al. (2020).

A aplicação de fagos na indústria tem sido cada vez mais frequente, como evidenciado na literatura (ISSE et al., 2022; WU et al., 2023; IMKLIN et al., 2023). No

setor de laticínios, a produção e a qualidade do leite e seus derivados dependem de diversos parâmetros químicos, como teor de gordura e proteína, além da ausência de substâncias inibidoras, bem como da contagem de células microbianas e somáticas. Nesse sentido, nosso estudo avaliou a estabilidade térmica e a estabilidade frente a diferentes concentrações de NaCl do Fago 2. Essa avaliação é importante quando se pensa em utilizar fagos para controle de contaminação por *S. aureus* em derivados de leite. O leite é submetido à pasteurização (62 a 75 °C) durante o processo de produção, e os produtos derivados, como queijos, podem conter elevadas concentrações de NaCl em sua composição (SANT'ANA et al., 2013). Observou-se que o Fago 2 apresentou estabilidade térmica em temperaturas de até 37°C (Figura 18B). Esse achado é promissor, considerando que os fagos poderiam ser empregados como agentes de biocontrole em produtos como o queijo Minas Frescal, que é armazenado a aproximadamente 6°C durante o seu período de prateleira (BRASIL, 2011). Em contrapartida, o Fago 2 não foi estável quando submetido a temperaturas altas. Da mesma forma que observado em nosso estudo, outros trabalhos também descreveram a instabilidade dos fagos frente a temperaturas elevadas, resultando em uma redução significativa ou mesmo nula na taxa de viabilidade (LIU et al., 2020; LI et al., 2022; TEKLEMARIAM et al., 2023).

Quando submetido a diferentes concentrações de NaCl, verificou-se que a taxa de viabilidade do Fago 2 foi reduzida ao longo do tempo em todas as concentrações testadas (Figura 18A). Os resultados obtidos indicam que o fago apresenta estabilidade semelhante em concentrações de NaCl de 0 a 250 mM, mas a sua viabilidade é mais drasticamente reduzida quando exposto a 500 mM de NaCl. Desta forma, o Fago 2 apresenta potencial para ser utilizado como agente de biocontrole em produtos derivados do leite, como o queijo Minas Frescal, uma vez que esses queijos normalmente contêm cerca de 250 mM de NaCl em sua composição (SANT'ANA et al., 2013).

Além de serem utilizados no controle de patógenos em alimentos, os fagos também têm sido empregados na pecuária (WILLY et al., 2023; PALLAVALI et al., 2023). Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a ação do Fago 2 em tecido mamário *ex situ*. Os resultados demonstram a eficiência do uso de fagos na desinfecção ou controle de patógenos no tecido mamário, uma vez que o Fago 2 foi capaz de reduzir até 78,26% da carga bacteriana no modelo *ex situ* (Tabela 6). Estes resultados estão em concordância com outros estudos que também demonstraram a eficácia do uso

de fagos na cura de infecções intramamárias em bovinos (BROUILLETTE et al., 2023). Em um estudo com vacas da raça Holandesa, por exemplo, a taxa de cura foi de 16,7% em um grupo tratado com bacteriófago, enquanto nenhum dos quartos tratados com solução salina foi curado (3 de 18 quartos mamários tratados com fago e 0 de 20 quartos tratados com solução salina, respectivamente) (GILL et al., 2006). Outro estudo utilizando um modelo de coelho de infecção causada por *S. aureus*, verificou que os fagos impediram a formação de abscesso em coelhos (WILLS; KERRIGAN; SOOTHILL, 2005). Assim, sugere-se que os fagos possam representar uma alternativa valiosa para o tratamento da infecção estafilocócica *in vivo*. No entanto, para confirmar esses achados, são necessários estudos *in vivo*.

Além da utilização de fagos, outra estratégia de controle consiste na aplicação de proteínas recombinantes provenientes de fagos líticos. Sendo assim, realizamos testes com as endolisinas recombinantes produzidas pelos Fagos 2 e 4. A primeira fase do estudo foi executada por Alves, (2019) que consistiu em clonar as proteínas recombinantes EndF2 e EndF4. Para atingir este objetivo, clonaram-se os respectivos genes das endolisinas no vetor expressão pET21 α (+) e transformou em células competentes BL21(DE3). Neste sistema produzem-se proteínas em fusão com uma cauda de Histidinas em C-terminal, o que favorece o processo de purificação e em estudos de atividade lítica de endolisinas.

A partir dos clones gerados por Alves, (2019), foi possível expressar e purificar com alta pureza as proteínas recombinantes EndF2 e EndF4 (Figura 21). Utilizando o sistema de purificação *Amico®Pro Affinity Concentrator*, foram obtidas concentrações proteicas suficientes para os ensaios de atividade lítica de ambas as endolisinas.

Os resultados dos testes de atividade lítica *in vitro* foram satisfatórios, já que as duas endolisinas (EndF2 e EndF4) apresentaram atividade antibacteriana em grande parte das linhagens de *S. aureus* avaliadas, sendo que 61,22% delas foram sensíveis à EndF2 e 65,31% foram sensíveis à EndF4 (Tabela 11). Apesar da combinação dos domínios funcionais CHAP e Amidase-2 ter ampliado o espectro de ação das endolisinas, a EndF2 revelou uma ligeira perda de atividade da Amidase-2, evidenciada por uma redução no diâmetro do halo quando comparado com os halos resultantes da ação da EndF4 (Tabela 10) (15 mm e 14 mm, respectivamente). O fato de existir linhagens que apenas foi sensível à ação da EndF4, sugere que o domínio de ligação da EndF4 é mais eficaz na ligação ao substrato presente na parede celular.

Além disso, as duas endolisinas recombinantes não tiveram atividade lítica em bactérias Gram-negativas e outras espécies.

Adicionalmente, foram realizadas análises *in silico* das duas proteínas recombinantes (EndF2 e EndF4). Métodos de bioinformática estrutural, tais como a modelagem por homologia, vêm sendo utilizados na análise de proteínas recombinantes (FUJIKI et al., 2018; MELO-LÓPEZ et al., 2021; EASWARAN et al., 2022). Sabe-se que o domínio CHAP e um domínio SH3b desempenham papéis importantes para a atividade lítica. O reconhecimento de peptideoglicano por endolisinas determina seu espectro de atividade e é regulado pelo domínio SH3b que se liga a um ligante bacteriano altamente específico (SCHMELCHER et al., 2010). Além disso, as atividades líticas máximas de várias endolisinas, como Lys-phiK (BECKER et al., 2009), LytA (DONOVAN; LARDEO; FOSTER-FREY 2006) e lisostafina (BABA; SCHNEEWIND 1996) dependem de um domínio SH3b. Conforme mostrado na Figura 24, EndF2 e EndF4, ambas contêm os domínios CHAP-SH3b, e mostraram atividade lítica contra linhagens de *S. aureus*, sugerindo que o domínio SH3b é necessário para a atividade catalítica do domínio CHAP e desempenha um papel crítico na lise celular. Esses dados são consistentes com estudos anteriores sobre endolisinas estafilocócicas que abrigam um domínio SH3b (CHENG; FISCHETTI 2007; BECKER et al., 2015).

Quando submetidas à análise do *software ProtParam*, as sequências revelaram para EndF2 e EndF4, juntamente com os acessórios inseridos (cauda de histidina) em seu cassete de expressão, totalizam 487 aminoácidos com um peso molecular de 54,77 e 54,70 kDa, respectivamente. Embora seja uma proteína complexa, ela apresenta um tamanho relativamente padrão em comparação com outras endolisinas (BECKER et al., 2015).

A avaliação *in silico* sugeriu que as proteínas são estáveis, de acordo com o índice de instabilidade (38,47 e 38,93, respectivamente) obtido, que considera proteínas com índice de instabilidade <40 como estáveis. Além disso, o índice alifático também foi utilizado para avaliar a estabilidade das proteínas analisadas, sendo que o valor encontrado indicou um índice alifático alto. Esses resultados sugerem que as endolisinas EndF2 e EndF4 são estáveis em variações de temperatura.

As propriedades hidrofílicas ou hidrofóbicas de uma proteína em soluções aquosas podem ser indicadas pelo índice de GRAVY, sendo que valores negativos sugerem hidrofobicidade. As proteínas recombinantes em questão apresentam índice

de GRAVY igual a -0,423 para EndF2 e -0,430 para EndF4, indicando natureza hidrofílica e tornando-as potenciais para uso como um biofármaco (SATHORIA et al., 2023).

Após análises *in silico* do potencial alergênico das sequências de EndF2 e EndF4, não foram encontrados epítomos de IgE ou regiões de similaridade com proteínas antigênicas por meio da análise de BLAST. Segundo Sharma et al. (2021), o *software* AlgPred 2.0 é uma ferramenta útil para análises preliminares de alergenicidade em moléculas destinadas a fins terapêuticos. Com base na composição de aminoácidos presentes nas moléculas, o índice de alergenicidade MAST não identificou regiões potencialmente alergênicas. No entanto, ao ser avaliado pelos métodos SVM-aminoácidos e SVM-dipeptídeo, as sequências apresentaram regiões com potencial alergênico. O artigo menciona que o software utilizado para análises pode apresentar limitações em relação à revisão das sequências depositadas e à duplicidade dos dados. Como as moléculas são destinadas a serem utilizadas como biofármaco, será necessária uma reavaliação do potencial alergênico antes do ensaio *in vivo*.

7 Conclusão

Os Fagos 2 e 4, são membros da família *Siphoviridae* e sugerimos que eles pertençam a subfamília *Azeredovirinae* e ao gênero *Dubowvirus* ou *Phietavirus*.

Os Fagos 2 e 4, possuem eficácia contra várias linhagens de bactérias estafilocócicas *in vitro* e foram específicos para *S. aureus*.

O Fago 2 tem potencial para ser utilizado na desinfecção tecidos infectados por *S. aureus*.

As melhores condições para o Fago 2 foram de 4 a 37 °C, de 0 a 250 mM de NaCl e o pH 7.

As endolisinas recombinantes, EndF2 e EndF4, possuem eficácia contra várias linhagens de bactérias estafilocócicas *in vitro* e são específicas para *S. aureus*.

As duas endolisinas EndF2 e EndF4 possuem domínios catalíticos e de reconhecimento/ ligação em suas estruturas relacionados a atividade lítica e ambas as endolisinas não apresentam aspectos críticos de alergenicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELSATTAR, A. S.; DAWOUD, A.; REZK, N.; MAKKY, S.; SAFWAT, A.; RICHARDS, P. J.; EL-SHIBINY, A. How to train your phage: the recent efforts in phage training. **Biologics**, v. 1, n. 2, p. 70-88, 2021.
- ACKERMANN, H. W. Bacteriophage observations and evolution. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 4, p. 245-251, 2003.
- AL-HUSSANIY, H.; KADHIM, Z. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and New Delhi Metallo beta-lactamases-types of antibiotic resistance, methods of prevention. **Medical and Pharmaceutical Journal**, v. 1, n. 1, p. 14-24, 2022.
- ALOMARI, M. M. M.; DEC, M.; URBAN-CHMIEL, R. Bacteriophages as an alternative method for control of zoonotic and foodborne pathogens. **Viruses**, v. 13, n. 12, p. 2348, 2021.
- ALVES, Aryadne Andiará. **CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENDOLISINAS RECOMBINANTES DE *Staphylococcus aureus***. 2019. Qualificação (Mestrado Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.
- ANDRADE, N. C.; LARANJO, M.; COSTA, M. M.; QUEIROGA, M. C. Virulence factors in *Staphylococcus* associated with small ruminant mastitis: Biofilm production and antimicrobial resistance genes. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 633, 2021.
- ARMITANO, J.; LINDER, P. Article RNA metabolism in *Staphylococcus aureus* virulence. **Swiss Medical Weekly**, v. 147, p. w14527, 2017.
- BABA, T.; SCHNEEWIND, O. Target cell specificity of a bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 18, p. 4789-4797, 1996.
- BACH, S. J.; JOHNSON, R. P.; STANFORD, K.; MCALLISTER, T. A. Bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in experimentally inoculated sheep. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 89, n. 2, p. 285-293, 2009.
- BARDINA, C.; SPRICIGO, D. A.; CORTÉS, P. Significance of the Bacteriophage Treatment Schedule in Reducing *Salmonella* Colonization of Poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6600-6607, 2012.
- BECKER, S. C.; DONG, S.; BAKER, J. R.; FOSTER-FREY, J.; PRITCHARD, D. G.; DONOVAN, D. M. LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 294, n. 1, p. 52-60, 2009.
- BECKER, S. C.; SWIFT, S.; KOROBOVA, O.; SCHISCHKOVA, N.; KOPYLOV, P.; DONOVAN, D. M.; ABAEV, I. Lytic activity of the staphylococcal Twort phage endolysin CHAP domain is enhanced by the SH3b cell wall binding domain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 1, p. 1, 2015.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343-350, 2011.

BODDIE, R. L.; OWENS, W. E.; RAY, C. H.; NICKERSON, S. C.; BODDIE, N. T. Germicidal activities of representatives of five different teat dip classes against three bovine *Mycoplasma* species using a modified excised teat model. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 8, p. 1909-1912, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha>>. Acesso em: 5 mai. 2023.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 62 de 29/12/2011**. Instrução Normativa n.62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal, 30 de dezembro de 2011. Seção 1.

BRIERS, Y.; WALMAGH, M.; VAN PUYENBROECK, V.; CORNELISSEN, A.; CENENS, W.; AERTSEN, A.; ... LAVIGNE, R. Engineered endolysin-based “Artilynsins” to combat multidrug-resistant Gram-negative pathogens. **mBio**, v. 5, n. 4, p. e01379-14, 2014.

BROUILLETTE, E.; MILLETTE, G.; CHAMBERLAND, S.; ROY, J. P.; STER, C.; KIROS, T.; HICKEY, S.; HITTLE, L.; WOOLSTON, J.; MALOUIN, F. Effective Treatment of *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection in a Murine Model Using the Bacteriophage Cocktail StaphLyse™. **Viruses**, v. 15, n. 4, p. 887, 2023.

CARRILLO, C. L.; ATTERBURY, R. J.; EL-SHIBINY, A.; CONNERTON, P. L.; DILLON, E.; SCOTT, A.; CONNERTON, I. F. Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6554-6563, 2005.

CHENG, Q.; FISCHETTI, V. A. Mutagenesis of a bacteriophage lytic enzyme PlyGBS significantly increases its antibacterial activity against group B streptococci. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 1284-1291, 2007.

CHIESA, L. M.; DECASTELLI, L.; NOBILE, M.; MARTUCCI, F.; MOSCONI, G.; FONTANA, M.; CASTRICA, M.; ARIOLI, F.; PANSERI, S. Analysis of antibiotic residues in raw bovine milk and their impact toward food safety and on milk starter cultures in cheese-making process. **Food Science and Technology**, v. 131, p. 109783, 2020.

CRYZ, JR. S. J.; PITT, T. L.; FÜRER, E.; GERMANIER, R. Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 44, n. 2, p. 508-513, 1984.

DARWISH, W. S.; ATIA, A. S.; REDA, L. M.; ELHELALY, A. E.; THOMPSON, L. A.; SAAD ELDIN, W. F. Chicken giblets and wastewater samples as possible sources of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Prevalence, enterotoxin production, and antibiotic susceptibility. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 4, p. e12478, 2018.

DIAZ, E.; LOPEZ, R.; GARCIA, J. L. Chimeric phage-bacterial enzymes: A clue to the modular evolution of genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 8125-8129 , 1990.

DONOVAN, D. M.; LARDEO, M.; FOSTER-FREY, J. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, n. 1, p. 133-139, 2006.

DOWAH, A. S.; CLOKIE, M. R. Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. **Biophysical Reviews**, v. 10, p. 535-542 , 2018.

DROND, S. B.; JUSTRIBÓ, M. V. Will We Still Have Antibiotics Tomorrow? **Archivos de Bronconeumología**, v. 43, n. 8, p. 450–459 , 2007.

DUAN, X. C.; LI, X. X.; LI, X. M.; WANG, S.; ZHANG, F. Q.; QIAN, P. Exploiting Broad-Spectrum Chimeric Lysin to Cooperate with Mupirocin against *Staphylococcus aureus*-Induced Skin Infections and Delay the Development of Mupirocin Resistance. **Microbiology Spectrum**, p. e05050-22, 2023.

EASWARAN, M.; GOVINDARAJ, R. G.; NADERI, M.; BRYLINSKI, M.; ZOYSA, M.; SHIN, H. J.; HONG, E. J. The efficacy of bacteriophage-encoded endolysin relies on active residues: A molecular perspective. **Viruses**, v. 14, n. 3, 463, 2022.

ELOIS, M. A.; SILVA, R. D.; PILATI, G. V. T.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; FONGARO, G. Bacteriophages as biotechnological tools. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 349, 2023.

FUJIKI, J.; NAKAMURA, T.; FURUSAWA, T.; OHNO, H.; TAKAHASHI, H.; KITANA, J.; USUI, M.; HIGUCHI, H.; TANJI, Y.; TAMURA, Y.; IWANO, H. Caracterização da capacidade lítica de uma endolisina semelhante a LysK, Lys-phiSA012, derivada de um bacteriófago *Staphylococcus aureus* polivalente. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 25, 2018.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S. E.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. (2005). **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server** (pp. 571-607). Humana press.

GILL, J. J.; PACAN, J. C.; CARSON, M. E.; LESLIE, K. E.; GRIFFITHS, M. W.; SABOUR, P. M. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 9, p. 2912-2918, 2006.

GILMER, D. B.; SCHMITZ, J. E.; EULER, C. W.; FISCHETTI, V. A. Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2743-2750, 2013.

GREGORACCI, G.B.; SILVEIRA, W.D.; BROCCHI, M. **Modern bacteriophage biology and biotechnology**. In: GRZEGORZ, W. Ä. (Org.). Research Signpost. [S.l: s.n.], 2006. p. 1-36.

GRISPOLDI, L.; KARAMA, M.; ARMANI, A.; HADJICHARALAMBOUS, C.; CENCI-GOGA, B. T. *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food of animal origin and staphylococcal food poisoning risk assessment from farm to table. **Italian Journal of Animal Science**, v. 20, n. 1, 677-690, 2021.

GUTIÉRREZ, D.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, P. Are phage lytic proteins the secret weapon to kill *Staphylococcus aureus*? **mBio**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2018.

HAMBLY, E.; SUTTLE, C. A. The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 444-450, 2005.

HAMED, Z. O.; Awni, A. A.; ABDULAMIR, A. S. Novel recombinant endolysin ointment with broad antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from wounds and burns. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 4, p. 104, 2023.

HAN, J. E.; KIM, J. H.; HWANG, S. Y.; CHORESCA JR, C. H.; SHIN, S. P.; JUN, J. W.; CHAI, J. Y.; PARK, Y. H.; PARK, S. C. Isolation and characterization of a *Myoviridae* bacteriophage against *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 758-763, 2013.

HARPER, D. R.; ENRIGHT, M. C. Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-7, 2011.

HARPER, L.; BALASUBRAMANIAN, D.; OHNECK, E. A.; SAUSE, W. E.; CHAPMAN, J.; MEJIA-SOSA, B.; LHAKHANG, T.; HEGUY, A.; TSIRIGOS, A.; UEBERHEIDE, B.; BOYD, J. M.; LUN, D. S.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* Responds to the Central Metabolite Pyruvate To Regulate Virulence. **mBio**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2018.

HASAN, N. S.; HOSHYAR, D. F. Detecção de cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* em leite cru de vacas criadas na província de Erbil/Iraque. **Zanco Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 31, n. 4, p. 50-60, 2019.

HE, Y.; YUAN, Q.; MATHIEU, J.; STADLER, L.; SENEHI, N.; SUN, R.; ALVAREZ, P. J. Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. **NPJ Clean Water**, v. 3, n. 1, p. 4, 2020.

HO, M. K. Y.; ZHANG, P.; CHEN, X.; XIA, J.; LEUNG, S. S. Y. Bacteriophage endolysins against Gram-positive bacteria, an overview on the clinical development and recent advances on the delivery and formulation strategies. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 303-326, 2022.

HRYHOROWICZ, M.; LIPÍŃSKI, D.; ZEYLAND, J.; SŁOMSKI, R. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 3, p. 233-240, 2017.

HUFF, W. E.; HUFF, G. R.; RATH, N. C.; BALOG, J. M.; DONOGHUE, A. M. Prevention of *Escherichia coli* Infection in Broiler Chickens with a Bacteriophage Aerosol Spray. **Poultry Science**, v. 81, n. 10, p. 1486-1491, 2002.

HUFF, W. E.; HUFF, G. R.; RATH, N. C.; DONOGHUE, A. M. Evaluation of the Influence of Bacteriophage Titer on the Treatment of Colibacillosis in Broiler Chickens.

Poultry Science, v. 85, p. 1373-1377, 2006.

IMKLIN, N.; CHAENGPHANIAD, P.; ŠIMOLIŪNAS, E.; NASANIT, R. A novel *Staphylococcus* phage, vB_Sau-RP15, and its application in contaminated milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 76, n. 1, p. ovac003, 2023.

ISSE, Q. A.; AYAZ, F.; GÜVENMEZ, H. K.; KARABOYUN, M. A review on phage as biocontrol agent in food industry. **Advanced Engineering Days (AED)**, v. 4, p. 32-35, 2022.

JAYALAKSHMI, K.; PARAMASIVAM, M.; SASIKALA, M.; TAMILAM, T. V.; SUMITHRA, A. Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health. **J Entomol Zool Stud**, v. 5, n. 3, p. 1446-1451, 2017.

JI, J.; LIU, Q.; WANG, R.; LUO, T.; GUO, X.; XU, M.; YIN, Q.; WANG, X.; ZHOU, M.; LI, M.; HE, P. Identification of a novel phage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and *in vivo*. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104317, 2020.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.; MEYER, C.; KOHL, S. A. A.; BALLARD, A. J.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.; NIKOLOV, S.; JAIN, R.; ADLER, J.; BACK, T.; PETERSEN, S.; REIMAN, D.; CLANCY, E.; ZIELINSKI, M.; STEINEGGER, M.; PACHOLSKA, M.; BERGHAMMER, T.; BODENSTEIN, S.; SILVER, D.; VINYALS, O.; SENIOR, A. W.; KAVUKCUOGLU, K. KOHLI, P.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

KALATZIS, P. G.; BASTÍAS, R.; KOKKARI, C.; KATHARIOS, P. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. **PloS One**, v. 11, n. 3, p. e0151101, 2016.

KHAN, A.; AHMED, T.; RIZWAN, M.; KHAN, N. Comparative therapeutic efficacy of *Phyllanthus emblica* (Amla) fruit extract and procaine penicillin in the treatment of subclinical mastitis in dairy buffaloes. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 8-11, 2018.

KHAN, F. M.; GONDIL, V. S.; LI, C.; JIANG, M.; LI, J.; YU, J.; WEI, H.; YANG, H. A Novel *Acinetobacter baumannii* Bacteriophage Endolysin LysAB54 With High Antibacterial Activity Against Multiple Gram-Negative Microbes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 23-31, 2022.

KIM, H.; SEO, J. A Novel Strategy to Identify Endolysins with Lytic Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5772, 2023.

KIM, S. G.; GIRI, S. S.; YUN, S.; KIM, S. W.; HAN, S. J.; KWON, J.; KIM, J. Y.; PARK, S. C. Two novel bacteriophages control multidrug-and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* biofilm. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 524059, 2021.

KUMAR, P.; MEGHVANSI, M. K.; KAMBOJ, D. V. Isolation, phenotypic characterization and comparative genomic analysis of 2019SD1, a polyvalent enterobacteria phage. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 22197, 2021.

LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 317-327, 2010.

LADE, H.; JOO, H. S.; KIM, J. S. Molecular Basis of Non- β -Lactam Antibiotics Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1378, 2022.

LEITE, J. A.; PEREIRA, H. P.; BORGES, C. A. V.; ALVES, B. R. C.; RAMOS, A. I. A. P.; MARTINS, M. F.; ARCURI, E. F. Lytic bacteriophages as a potential alternative to control *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, 2019.

LEITE, J. D. A.; ARCURI, E.; RAMOS, A.; LANGE, C.; BRITO, M.; MENDONÇA, L.; ALVES, B. "Isolamento e avaliação in vitro da eficácia de bacteriófagos líticos específicos para *Staphylococcus aureus* associados a produtos lácteos e mastite bovina." In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DO LEITE, 11., 2010, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: FAEMG/FEPAL, 2010., 2010.

LI, F.; LI, L.; ZHANG, Y.; BAI, S.; SUN, L.; GUAN, J.; ZHANG, W.; CUI, X.; FENG, J.; TONG, Y. Isolation and characterization of the novel bacteriophage vB_SmaS_BUCT626 against *Stenotrophomonas maltophilia*. **Virus Genes**, v. 58, n. 5, p. 458-466, 2022.

LIU, J.; GAO, S.; DONG, Y.; LU, C.; LIU, Y. Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila*. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2020.

LOGANATHAN, A.; NACHIMUTHU, R. *In vitro* and in vivo therapeutical efficiency of the *staphylococcus* phages and the effect of phage infectivity in well-mixed and spatial environment. **Biologia**, v. 78, n. 1, p. 265-277, 2023.

LOOD, R.; WINER, B. Y.; PELZEK, A. J.; DIEZ-MARTINEZ, R.; THANDAR, M.; EULER, C. W.; DOCOBO-PÉREZ, F.; GIBBONS, C. M.; GILMORE, M. S.; HÖÖK, M.; KELLEY, W. L.; KULHANKOVA, K.; LEVIN, B. R.; LUNA, B. M.; MAIRA-LITRÁN, T.; MERRITT, J. H.; SCHNEEWIND, O.; STIBITZ, S.; TIAN, R.; WALL, E. A.; WANG, H.; WENREN, L. M.; FISCHETTI, V. A. Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant Gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 1983-1991, 2015.

LOPES, A.; TAVARES, P.; PETIT, M. A.; GUÉROIS, R.; ZINN-JUSTIN, S. Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1-17, 2014.

LOVE, M. J.; BHANDARI, D.; DOBSON, R. C.; BILLINGTON, C. Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production and clinical care. **Antibiotics**, v. 7, n. 1, p. 17, 2018.

MACIEJEWSKA, B.; OLSZAK, T.; DRULIS-KAWA, Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application?. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 2563-

2581, 2018.

MELO-LÓPEZ, F. N.; ZERMEÑO-CERVANTES, L. A.; BARRAZA, A.; LOERA-MURO, A.; CARDONA-FÉLIX, C. S. Biochemical characterization of LysVpKK5 endolysin from a marine vibriophage. **Protein Expression and Purification**, v. 188, p. 105971, 2021.

NAVARRO, F.; MUNIESA, M. Phages in the human body. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 566, 2017.

NELSON, D. C.; SCHMELCHER, M.; RODRIGUEZ-RUBIO, L.; KLUMPP, J.; PRITCHARD, D. G.; DONG, S.; DONOVAN, D. M. Endolysins as antimicrobials. **Advances in Virus Research**, v. 83, p. 299-365, 2012.

NIKULINA, A. N.; RYABOVA, N. A.; LU, Y.; ZIMIN, A. A. A New Bacteriophage Of The Family *Siphoviridae* Isolated From The Soddy-Podzolic Soils Of The Prioksko-Terrasny Nature Reserve. **Geography, Environment, Sustainability**, v. 16, n. 1, p. 111-118, 2023.

OECHSLIN, F.; ZHU, X.; DION, M. B.; SHI, R.; MOINEAU, S. Phage endolysins are adapted to specific hosts and are evolutionarily dynamic. **PLoS Biology**, v. 20, n. 8, p. e3001740, 2022.

OLIVEIRA, H.; COSTA, A. R.; KONSTANTINIDES, N.; FERREIRA, A.; AKTURK, E.; SILLANKORVA, S.; ... AZEREDO, J. Ability of phages to infect *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 12, p. 5060-5077, 2017.

OLIVEIRA, M.; PEREIRA, K. D. S. P. S.; ZAMBERLAM, C. R. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antibióticos: uma questão de saúde pública. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 6, n. 11, p. 183-201, 2020.

PALLAVALI, R.; SHIN, D.; CHOI, J. Phage-Based Biocontrol of Antibiotic-Resistant Bacterium Isolated from Livestock Wastewater Treatment Plant. **Water**, v. 15, n. 8, p. 1616, 2023.

PAN, Y. J.; LIN, T. L.; LIN, Y. T.; SU, P. A.; CHEN, C. T.; HSIEH, P. F.; WU, M. C.; WANG, J. T. Identification of capsular types in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains by *wzc* sequencing and implications for capsule depolymerase treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1038-1047, 2015.

PATEL, K.; GODDEN, S. M.; ROYSTER, E. E.; CROOKER, B. A.; JOHNSON, T. J.; SMITH, E. A.; SREEVATSAN, S. Prevalence, antibiotic resistance, virulence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk samples of US dairy herds. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, p. 367, 2021.

POIZAT, A.; BONNET-BEAUGRAND, F.; RAULT, A.; FOURICHON, C.; BAREILLE, N. Antibiotic use by farmers to control mastitis as influenced by health advice and dairy farming systems. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 146, p. 61-72, 2017.

PRINCIPI, N.; SILVESTRI, E.; ESPOSITO, S. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 513, 2019.

PRIYANKA, P. S.; SHEORAN, M. S.; GANGULY, S. Antibiotic residues in milk-a serious public health hazard. **Journal of Environment and Life Sciences**, v. 2, n. 4, p. 99-102, 2017.

PROENÇA, D.; LEANDRO, C.; GARCIA, M.; PIMENTEL, M.; SÃO-JOSÉ, C. EC300: A phage-based, bacteriolysin-like protein with enhanced antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 5137-5149, 2015.

QADIR, M. I.; MOBEEN, T.; MASOOD, A. Phage therapy: Progress in pharmacokinetics. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, 2018.

RAHMAN, M. U.; WANG, W.; SUN, Q.; SHAH, J. A.; LI, C.; SUN, Y.; LI, Y.; ZHANG, B.; CHEN, W.; WANG, S. Endolysin, a promising solution against antimicrobial resistance. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1277, 2021.

RAYA, R. R.; OOT, R. A.; MOORE-MALEY, B.; WIELAND, S.; CALLAWAY, T. R.; KUTTER, E. M.; BRABBAN, A. D. Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce *Escherichia coli* O157: H7 levels in sheep guts. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 15-24, 2011.

RIVAS, L.; COFFEY, B.; MCAULIFFE, O.; MCDONNELL, M. J.; BURGESS, C. M.; COFFEY, A.; ROSS, R. P.; DUFFY, G. *In vivo* and *Ex vivo* evaluations of bacteriophages e11/2 and e4/1c for use in the control of *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7210-7216, 2010.

ROHWER, F.; EDWARDS, R. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 16, p. 4529-4535, 2002.

ROSS, A.; WARD, S.; HYMAN, P. More is better: selecting for broad host range bacteriophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1352, 2016.

ROZEMA, E. A.; STEPHENS, T. P.; BACH, S. J.; OKINE, E. K.; JOHNSON, R. P.; STANFORD, K. I. M.; MCALLISTER, T. A. Oral and rectal administration of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157.-H7 in feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 241-250, 2009.

SAEED, S. I.; MAT YAZID, K. A.; HASHIMY, H. A.; DZULKIFLI, S. K.; NORDIN, F.; NIK HIM, N. A.; Omar, M. F. F.; Aklilu, E.; Mohamad, M.; Zalati, C. W. S.; KAMARUZZAMAN, N. F. Prevalence, antimicrobial resistance, and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in East Coast Malaysia. **Animals**, v. 12, n. 13, p. 1680, 2022.

SAEZ, A. C.; ZHANG, J.; ROSTAGNO, M. H.; EBNER, P. D. Direct feeding of microencapsulated bacteriophages to reduce *Salmonella* colonization in pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 12, p. 1269-1274, 2011.

SANT'ANA, A. M. S.; BEZERRIL, F. F.; MADRUGA, M. S.; BATISTA, A. S. M.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 12, p. 7442-7453, 2013.

SARHAN, W. A. Phage approved in food, why not as a therapeutic? **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 1, p. 91-101, 2015.

SAS. Institute Inc. 2013. Versão 9.4. **Procedures Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SATHORIA, P.; CHUPHAL, B.; RAI, U.; ROY, B. Molecular cloning, characterization and 3D modelling of spotted snakehead fbn1 C-terminal region encoding asprosin and expression analysis of fbn1. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 4470, 2023.

SCHMELCHER, M.; DONOVAN, D. M.; LOESSNER, M. J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. **Future Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 1147-1171, 2012.

SCHMELCHER, M.; POWELL, A. M.; CAMP, M. J.; POHL, C. S.; DONOVAN, D. M. Synergistic streptococcal phage λ SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 8475-8486, 2015.

SCHMELCHER, M.; SHABAROVA, T.; EUGSTER, M. R.; EICHENSEHER, F.; TCHANG, V. S.; BANZ, M.; LOESSNER, M. J. Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 17, p. 5745-5756, 2010.

SCHNEIDER, C.L. Bacteriophage-mediated horizontal gene transfer: transduction. **Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy**, p. 151-192, 2021.

SCHNITT, A.; TENHAGEN, B. A. Risk factors for the occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds: an update. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 10, p. 585-596, 2020.

SCHOUSTRA, S.; VAN DER ZON, C.; GROENENBOOM, A.; MOONGA, H. B.; SHINDANO, J.; SMID, E. J.; HAZELEGER, W. Microbiological safety of traditionally processed fermented foods based on raw milk, the case of Mabisi from Zambia. **Food Science and Technology**, v. 171, p. 113997, 2022.

SHANNON, R.; RADFORD, D. R.; BALAMURUGAN, S. Impacts of food matrix on bacteriophage and endolysin antimicrobial efficacy and performance. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 10, p. 1631-1640, 2020.

SHARIF, A.; UMER, M.; AHMAD, T. Production of quality milk from dairy animals. **Gomal University Journal of Research**, v. 33, n. 2, p. 48-57, 2017.

SHARMA, N.; PATIYAL, S.; DHALL, A.; PANDE, A.; ARORA, C.; RAGHAVA, G. P. AlgPred 2.0: an improved method for predicting allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 4, p. bbaa294, 2021.

SILVA, V.; PEREIRA, J. E.; MALTEZ, L.; POETA, P.; IGREJAS, G. Influence of Environmental Factors on Biofilm Formation of Staphylococci Isolated from Wastewater and Surface Water. **Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1069, 2022.

SON, B.; KONG, M.; RYU, S. The auxiliary role of the amidase domain in cell wall binding and exolytic activity of staphylococcal phage endolysins. **Viruses**, v. 10, n. 6, p. 1-12, 2018.

SONI, K. A.; NANNAPANENI, R. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 1, p. 32-38, 2010.

SOROMOU, L. W.; KESSE, F. S.; KONATE, Y.; CAMARA, M. F. A study on the reduction of antibiotic use by introducing organic acids in broiler chicken feed in the district of Abidjan-Ivory Coast. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 13, n. 1, p. 93-98, 2023.

SQUIRES, R. A. Bacteriophage therapy for management of bacterial infections in veterinary practice: what was once old is new again. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 66, n. 5, p. 229-235, 2018.

STANFORD, K.; MCALLISTER, T. A.; NIU, Y. D.; STEPHENS, T. P.; MAZZOCCO, A.; WADDELL, T. E.; JOHNSON, R. P. Oral Delivery Systems for Encapsulated Bacteriophages Targeted *Escherichia coli* O157: H7 in Feedlot Cattle. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 7, p. 1304-1312, 2010.

SUTTLE, C. Viruses in the sea. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 356-361, 2005.

SVENSSON, U. ; CHRISTIANSSON, A. Methods for phage monitoring. **International Dairy Federation of the Bulletin**, n. 263, p. 29-39, 1991.

SWIFT, S. M.; WATERS, J. J.; ROWLEY, D. T.; OAKLEY, B. B.; DONOVAN, D. M. Characterization of two glycosyl hydrolases, putative prophage endolysins, that target *Clostridium perfringens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 16, p. fny179, 2018.

TAMURA K.; STECHER G.; KUMAR S. MEGA 11: MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

TEKLEMARIAM, A. D.; AL-HINDI, R. R.; ALHARBI, M. G.; ALOTIBI, I.; AZHARI, S. A.; QADRI, I.; ALAMRI, T.; ESMAEL, A.; HARAKEH, S. Isolation and characterization of a novel lytic phage, vB_PseuP-SA22, and its efficacy against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 497, 2023.

TIGABU, A.; GETANEH, A. L. E. M. *Staphylococcus aureus*, ESKAPE bacteria challenging current health care and community settings: a literature review. **Clinical Laboratory**, v. 67, n. 7, p. 10.7754, 2021.

TORRES, G.; VARGAS, K.; REYES-VÉLEZ, J.; JIMÉNEZ, N.; BLANCHARD, A.; OLIVERA-ANGEL, M. High genetic diversity and zoonotic potential of *Staphylococcus aureus* strains recovered from bovine intramammary infections in Colombians dairy

herds. *Comparative Immunology. Microbiology and Infectious Diseases*, v. 93, p. 101940, 2023.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

UKPANA, M. A.; UPLA, P. U. Why is *Staphylococcus aureus* such a successful pathogen. **Microbiology Research Journal International**, v. 19, p. 1-22, 2017.

VERMA, A. K.; BAUER, C.; PALANI, S.; METZGER, D. W.; SUN, K. IFN- γ drives TNF- α hyperproduction and lethal lung inflammation during antibiotic treatment of postinfluenza *Staphylococcus aureus* pneumonia. **The Journal of Immunology**, v. 207, n. 5, p. 1371-1376, 2021.

VIRTO, M.; SANTAMARINA-GARCÍA, G.; AMORES, G.; HERNÁNDEZ, I. Antibiotics in dairy production: where is the Problem? **Dairy**, v. 3, n. 3, p. 541-564, 2022.

WALKER, P. J.; SIDDELL, S. G.; LEFKOWITZ, E. J.; MUSHEGIAN, A. R.; ADRIAENSSENS, E. M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; DEMPSEY, D. M.; DUTILH, B. E.; GARCÍA, M. L.; HENDRICKSON, R. C.; JUNGLEN, S.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J. H.; LAMBERT, A. J.; ŁOBOCKA, M.; OKSANEN, H. M.; ORTON, R. J.; ROBERTSON, D. L.; RUBINO, L.; SABANADZOVIC, S.; SIMMONDS, P.; SMITH, D. B.; SUZUKI, N.; VAN DOORSLAER, K.; VANDAMME, A.-M.; VARSANI, A.; ZERBINI, F. M. Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). **Archives of Virology**, v. 167, n. 11, p. 2429-2440, 2022.

WALKER-YORK-MOORE, L.; MOORE, S. C.; FOX, E. M. Characterization of Enterotoxigenic *Bacillus cereus* sensu lato and *Staphylococcus aureus* Isolates and Associated Enterotoxin Production Dynamics in Milk or Meat-Based Broth. **Toxins**, v. 9, n. 7, p. 225, 2017.

WATTS, J. L.; BODDIE, R. L.; OWENS, W. E.; NICKERSON, S. C. Determination of teat dip germicidal activity using the excised teat model. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 1, p. 261-265, 1988.

WEINBAUER, M. G.; RASSOULZADEGAN, F. Are viruses driving microbial diversification and diversity? **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2004.

WHO. **Estimating The Burden of Foodborne Diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>>. Acessado em: 2 maio 2023.

WILLING, B. P.; PEPIN, D. M.; MARCOLLA, C. S.; FORGIE, A. J.; DIETHER, N. E.; BOURRIE, B. C. Bacterial resistance to antibiotic alternatives: a wolf in sheep's clothing? **Animal Frontiers**, v. 8, n. 2, p. 39-47, 2018.

WILLS, Q. F.; KERRIGAN, C.; SOOTHILL, J. S. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 1220-1221, 2005.

WILLY, C.; BUGERT, J. J.; CLASSEN, A. Y.; DENG, L.; DÜCHTING, A.; GROSS, J.; HAMMERL, J. A.; KORF, I. H. E.; KÜHN, C.; LIEBERKNECHT-JOUY, S.; ROHDE, C.;

RUPP, M.; VEHRESCHILD, M. J. G. T.; VOGELE, K.; WIENECKE, S.; WITZENRATH, M.; WÜRSTLE, S.; ZIEHR, H.; MOELLING, K.; BROECKER, F. Phage Therapy in Germany-Update 2023. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 588, 2023.

WU, Q.; LI, L.; XIANG, P.; ZHANG, T.; PENG, L.; ZOU, L.; LI, Q. Phages in fermented foods: interactions and applications. **Fermentation**, v. 9, n. 3, p. 201, 2023.

YAZDI, M.; BOUZARI, M.; GHAEMI, E. A.; SHAHIN, K. Isolation, characterization and genomic analysis of a novel bacteriophage VB_EcoS-Golestan infecting multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

Apêndice - Publicações no período



ISSN 1678-3921

Journal homepage: www.embrapa.br/pab

For manuscript submission and journal contents, access: www.scielo.br/pab

Microbiology/ Original Article

Lytic bacteriophages as a potential alternative to control *Staphylococcus aureus*

Abstract – The objective of this work was to characterize autochthonous bacteriophages and to determine their lytic activity on *Staphylococcus aureus*. Six phages were isolated from dairy barn flush water through enrichment cultures with three *S. aureus* strains. All phages were characterized by DNA digestion by restriction enzymes and sequencing of the DNA fragment encoding endolysin. Each phage was tested against 100 *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis and from dairy products using the lysis-plate method. The sequences of the endolysin gene were highly conserved, with nucleotide similarity higher than 99% among the isolated phages. Three domains involved in the recognition and lysis of the bacterial cell wall were identified. Two bacteriophages isolated from the dairy barns present high lytic activity on *S. aureus*, on a wide range of host strains, indicating their potential for studies on phage therapy in dairy cattle or as a biological control agent for dairy products.

Index terms: *Staphylococcus aureus*, biological control, endolysin, phage.

Bacteriófagos líticos como alternativa potencial para o controle de *Staphylococcus aureus*

Resumo – O objetivo deste trabalho foi caracterizar bacteriófagos autóctones e determinar sua atividade litica em *Staphylococcus aureus*. Seis fagos foram isolados de água de lavagem de pisos de estábulos por meio do enriquecimento de cultura com três estirpes de *S. aureus*. Todos os fagos foram caracterizados pela digestão do DNA com enzimas de restrição e pelo sequenciamento do fragmento de DNA que codifica a endolisina. Cada fago foi testado contra 100 estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina e de produtos lácteos pelo método de lise em placa. Sequências do gene de endolisina apresentaram alta conservação, com mais de 99% de similaridade a nível do nucleotídeo entre os fagos isolados. Foram identificados três domínios envolvidos no reconhecimento e na lise da parede celular bacteriana. Dois bacteriófagos isolados de estábulos apresentam alta atividade litica em *S. aureus*, em ampla gama de estirpes, o que indica seu potencial para estudos de fagoterapia em gado leiteiro ou como agente de controle biológico para produtos lácteos.

Termos para indexação: *Staphylococcus aureus*, controle biológico, endolisina, fagos.

Introduction

Staphylococcus aureus is a gram-positive pathogen responsible for human and animal infections. It is a frequent etiological agent of mastitis, a disease that affects dairy cattle worldwide and causes

Juliana Almeida Leite⁽¹⁾,
Hyago Passe Pereira⁽²⁾,
Cristiano Amâncio Vieira Borges⁽³⁾,
Bruna Rios Coelho Alves⁽³⁾,
Alessandra Isis Alves Pinheiro Ramos⁽³⁾,
Marta Fonseca Martins⁽³⁾ and
Edna Froeder Arcuri⁽³⁾

⁽¹⁾ Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo, Avenida Brasil, nº 4.365, Mangueiras, CEP 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: juliana.leite@ioc.fiocruz.br

⁽²⁾ Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário, São Pedro, CEP 36036-900 Juiz de Fora, MG, Brazil. E-mail: hyago9295@gmail.com

⁽³⁾ Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, nº 510, Dom Bosco, CEP 36038-330 Juiz de Fora, MG, Brazil. E-mail: cristiano.borges@embrapa.br, bruna.alves@embrapa.br, lizspinhelro@yahoo.com.br, marta.martins@embrapa.br, edna.arcuri@embrapa.br

■ Corresponding author

Received
July 9, 2018

Accepted
August 8, 2019

How to cite
LEITE, J.A.; PEREIRA, H.P.; BORGES, C.A.V.; ALVES, B.R.C.; RAMOS, A.I.A.P.; MARTINS, M.F.; ARCURI, E.F. Lytic bacteriophages as a potential alternative to control *Staphylococcus aureus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.54, e00917, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00917>



This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License

Pesq. agropec. bras., Brasília, v.54, e00917, 2019
DOI: [10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00917](https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00917)

RESEARCH ARTICLE

Lipopolysaccharide triggers different transcriptional signatures in taurine and indicine cattle macrophages: Reactive oxygen species and potential outcomes to the development of immune response to infections



Raquel Moraes de Paiva Daibert^{1*}, Carlos Alberto Oliveira de Blagi Junior^{2†}, Felipe de Oliveira Vieira^{1†}, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva^{3†}, Eugenio Damaceno Hottz^{1†}, Mariana Brandi Mendonça Pinheiro^{1†}, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza^{3†}, Hyago Passe Pereira^{1†}, Marta Fonseca Martins^{3†}, Humberto de Mello Brandão^{3†}, Marco Antônio Machado^{3*}, Wanessa Araújo Carvalho^{3*}

1 Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, **2** Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, **3** Embrapa—Dairy Cattle Research Centre, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

* These authors contributed equally to this work.
† These authors also contributed equally to this work.
* wanessa.carvalho@embrapa.br

OPEN ACCESS

Citation: Daibert RMDP, de Blagi Junior CAO, Vieira FdO, da Silva MVGB, Hottz ED, Mendonça Pinheiro MB, et al. (2020) Lipopolysaccharide triggers different transcriptional signatures in taurine and indicine cattle macrophages: Reactive oxygen species and potential outcomes to the development of immune response to infections. *PLoS ONE* 15(11): e0241861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241861>

Editor: Gordon Langsley, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale - Institut Cochin, FRANCE

Received: April 23, 2020

Accepted: October 22, 2020

Published: November 6, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241861>

Copyright: © 2020 Daibert et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Macrophages are classified upon activation as classical activated M1 and M2 anti-inflammatory regulatory populations. This macrophage polarization is well characterized in humans and mice, but M1/M2 profile in cattle has been far less explored. *Bos primigenius taurus* (taurine) and *Bos primigenius indicus* (indicine) cattle display contrasting levels of resistance to infection and parasitic diseases such as C57BL/6J and Balb/c murine experimental models of parasite infection outcomes based on genetic background. Thus, we investigated the differential gene expression profile of unstimulated and LPS stimulated monocyte-derived macrophages (MDMs) from Holstein (taurine) and Gir (indicine) breeds using RNA sequencing methodology. For unstimulated MDMs, the contrast between Holstein and Gir breeds identified 163 Differentially Expressed Genes (DEGs) highlighting the higher expression of C-C chemokine receptor type five (*CCR5*) and *BOLA-DQ* genes in Gir animals. LPS-stimulated MDMs from Gir and Holstein animals displayed 1,257 DEGs enriched for cell adhesion and inflammatory responses. Gir MDMs cells displayed a higher expression of M1 related genes like Nitric Oxide Synthase 2 (*NOS2*), Toll like receptor 4 (*TLR4*), Nuclear factor NF-kappa-B 2 (*NFKB2*) in addition to higher levels of transcripts for proinflammatory cytokines, chemokines, complement factors and the acute phase protein Serum Amyloid A (SAA). We also showed that gene expression of inflammatory M1 population markers, complement and SAA genes was higher in Gir in buffy coat peripheral cells in addition to nitric oxide concentration in MDMs supernatant and animal serum. Co-expression analyses revealed that Holstein and

Research Article

Cite this article: Passe Pereira H, Lima Verardo L, Morena Del Cambre Amaral Weller M, Paula Sbardella A, Prado Munari D, Moraes de Paiva Daibert R, Araújo Carvalho W, Antonio Machado M and Fonseca Martins M (2021). Going further post-RNA-seq: *In silico* functional analyses revealing candidate genes and regulatory elements related to mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Research* 88, 285–292. <https://doi.org/10.1017/S0022029921000571>

Received: 25 November 2020

Revised: 30 March 2021

Accepted: 31 May 2021

First published online: 10 August 2021

Keywords:

Bovine; extracorporeal udders; mastitis; MicroRNA; transcription factors

Author for correspondence:

Marta Fonseca Martins,
Email: marta.martins@embrapa.br

Going further post-RNA-seq: *In silico* functional analyses revealing candidate genes and regulatory elements related to mastitis in dairy cattle

Hyago Passe Pereira¹, Lucas Lima Verardo²,

Mayara Morena Del Cambre Amaral Weller³, Ana Paula Sbardella⁴,

Danísio Prado Munari⁴, Raquel Moraes de Paiva Daibert⁵,

Wanessa Araújo Carvalho⁵, Marco Antonio Machado⁵

and Marta Fonseca Martins⁵

¹Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil; ²Zootechnics Department, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Brazil; ³Zootechnics Department, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Brazil; ⁴Department of Exact Sciences, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, Brazil and ⁵Molecular Genetics Laboratory, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brazil

Abstract

This study aimed to obtain a better understanding of the regulatory genes and molecules involved in the development of mastitis. For this purpose, the transcription factors (TF) and MicroRNAs (miRNA) related to differentially expressed genes previously found in extracorporeal udders infected with *Streptococcus agalactiae* were investigated. The Gene-TF network highlighted *LOC515333*, *SAA3*, *CD14*, *NFKB1A*, *APOC2* and *LOC100335608* and genes that encode the most representative transcription factors *STAT3*, *PPARG*, *EGR1* and *NFKB1* for infected udders. In addition, it was possible to highlight, through the analysis of the gene-miRNA network, genes that could be post-transcriptionally regulated by miRNAs, such as the relationship between the *CCL5* gene and the miRNA bta-miR-363. Overall, our data demonstrated genes and regulatory elements (TF and miRNA) that can play an important role in mastitis resistance. The results provide new insights into the first functional pathways and the network of genes that orchestrate the innate immune responses to infection by *Streptococcus agalactiae*. Our results will increase the general knowledge about the gene networks, transcription factors and miRNAs involved in fighting intramammary infection and maintaining tissue during infection and thus enable a better understanding of the pathophysiology of mastitis.

Bovine mastitis is an inflammatory response of the mammary gland caused by metabolic and physiological changes, trauma or, more often, environmental or contagious pathogenic microorganisms (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007) that is responsible for significant economic losses in dairy cattle (Contreras and Rodriguez, 2011). There is a wide range of pathogens that cause mastitis, including Gram-negative and Gram-positive bacteria, mycoplasmas and algae (Zadoks *et al.*, 2011). *Streptococcus agalactiae* is an important Gram-positive bacterium that causes contagiously transmitted chronic subclinical infections in cows (Keefe, 1997; Zadoks *et al.*, 2011). The prevalence of this pathogen in dairy herds is quite high, especially in countries with emerging dairy industries (Duarte *et al.*, 2004) and current control strategies involve farm management practices and antibiotic administration promoting the possible emergence of resistant pathogens (Guterbock *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1999). Therefore, it is necessary to develop new methodologies to control *S. agalactiae*, including breeding more resistant cattle through enhanced genomic selection. Genomics and transcriptomic data have elucidated gene networks and physiological cellular processes important in the response to *S. agalactiae* (Sbardella *et al.*, 2019; Weller *et al.*, 2019). In our laboratory, bovine extracorporeal udders have proved to be a successful tool for *ex situ* transcriptomic analysis of the innate response triggered by *S. agalactiae* in mammary tissue and display metabolic pathways associated with the inflammatory response (Pinto *et al.*, 2017; Sbardella *et al.*, 2019; Weller *et al.*, 2019). In order to contribute to a better knowledge of the genes involved in mastitis development, this study aimed to investigate transcription factors and MicroRNAs related to differentially expressed genes (DEGs) previously found in these bovine extracorporeal udders infected with *S. agalactiae*.

© The Author(s), 2021. Published by Cambridge University Press on behalf of Hannah Dairy Research Foundation



CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-12104>



Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.73, n.2, p.534-538, 2021

Communication

[Comunicação]

Development of tetra-primer ARMS-PCR protocol to genotype the prolactin receptor SNP 39136666 and assessment of this SNP in Brazilian locally adapted cattle breeds

[Desenvolvimento de protocolo de tetra-primer ARMS-PCR para genotipagem do SNP 39136666 do receptor da prolactina e avaliação desse SNP em raças bovinas brasileiras localmente adaptadas]

D.R.L.R. Faza¹, H.P. Pereira², A.A. Egito³, R.A.A. Torres Junior³, E.S. Kim⁴,
T.S. Sonstegard⁴, M.F. Martins¹, J.C.C. Panetto¹,
M.V.G.B. Silva¹, M.A. Machado^{1*}

¹Centro de Pesquisa de Pecuária de Leite da Embrapa - Juiz de Fora, MG

²Universidade Federal de Juiz de Fora - Juiz de Fora, MG

³Centro de Pesquisa de Pecuária da Embrapa - Campo Grande, MS

⁴Recombinetics - Saint Paul, United States

Cattle herds are highly influenced by environmental conditions and production and reproduction losses caused by high temperatures and humidity have been reported (Landaeta-Hernandez *et al.*, 2011; Osei-Amponsah *et al.*, 2019). Cattle breeds originated from India (*Bos primigenius indicus*) are less productive when compared to European breeds under favorable conditions. However, indicine breeds are more resilient and remain productive under unfavorable conditions such as parasitosis, disease and heat stress (Guis *et al.*, 2012; Lemos *et al.*, 2018). Most taurine breeds are adapted to temperate weather and commonly have long, thick and curly hair, subcutaneous fat layers and elongated digestive tract in which rumination generates heat (Martinez *et al.*, 2012; Anderson *et al.*, 2015).

In contrast, indicine breeds have short hair, large skin folds, increased heat flow from the body to the skin and reduced metabolic rate (Turner & Schlegel, 1960). Nevertheless, a small number of taurine breeds (e.g. *Senepol*) present high heat tolerance due to their short, straight, smooth and lower follicle density hair which is called "slick hair" phenotype (Olson *et al.*, 2003). Taurine animals showing this phenotype are able to control the body temperature under conditions of

thermal stress and therefore were able to maintain normal productivity.

Olson *et al.* (2003) identified a genomic region of dominant inheritance that was able to provide thermal tolerance in *Senepol* and *Carora* breeds and their crosses. From these findings, scientific investigations were initiated to unravel the molecular mechanisms involved in this trait. Through the use of microsatellite markers, the slick hair locus was located on bovine chromosome 20, positionally located between markers DIK4835 and DIK2930 (Mariasegaram *et al.*, 2007). Additional genomic wide association study (GWAS) identified two sequence polymorphisms at this locus in *Senepol* breed and their crosses. One mutation was located in the prolactin gene (*PRL*) and the other one in its receptor (*PRLR*) and both showed impact on thermoregulation and hair morphology (Huson *et al.*, 2014; Littlejohn *et al.*, 2014).

The mutation located in the *PRLR* gene (p.Leu462*) is a deletion that introduces a premature stop codon in the RNA sequence, resulting in the loss of 120 C-terminal amino acids from the long isoform receptor (ss1067289408; chr20:39136558G>G). Porto-Neto *et al.* (2018) found that p.Leu462* mutation, described by Littlejohn

D.R.L.R. Faza
<https://orcid.org/0000-0002-5155-7716>
H.P. Pereira
<https://orcid.org/0000-0002-0203-4567>
A.A. Egito
<https://orcid.org/0000-0002-1690-4140>
R.A.A. Torres Junior
<https://orcid.org/0000-0001-6609-427X>
E.S. Kim
<https://orcid.org/0000-0002-0017-992X>
T.S. Sonstegard
<https://orcid.org/0000-0002-0400-4276>
M.F. Martins
<https://orcid.org/0000-0002-0260-5124>
J.C.C. Panetto
<https://orcid.org/0000-0002-9195-4728>
M.V.G.B. Silva
<https://orcid.org/0000-0001-5469-0413>
M.A. Machado
<https://orcid.org/0000-0002-5868-851X>

Recebido em 1 de julho de 2020

Aceito em 13 de janeiro de 2021

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: marco.machado@embrapa.br

Article

Population Dynamics of Methanogenic Archaea in Co-Digestion Systems Operating Different Industrial Residues for Biogas Production

Isabela Gomes Barreto da Motta ¹, Larice Aparecida Rezende Santana ², Hyago Passe Pereira ¹ ,
Vanessa Romário de Paula ³, Marta Fonseca Martins ³, Jailton da Costa Carneiro ³
and Marcelo Henrique Otenio ^{3,*} 

¹ Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora Campus, Juiz de Fora 36036-900, Brazil

² Postgraduate Program in Science and Technology of Milk and Dairy Products, Health Sciences Center, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora Campus, Juiz de Fora 36036-900, Brazil

³ Embrapa Dairy Cattle, Brazilian Agricultural Research Corporation, Juiz de Fora 36038-330, Brazil

* Correspondence: marcelo.otenio@embrapa.br; Tel: +55-32-3311-7514



Citation: da Motta, I.G.B.; Santana, L.A.R.; Pereira, H.P.; de Paula, V.R.; Martins, M.F.; da Costa Carneiro, J.; Otenio, M.H. Population Dynamics of Methanogenic Archaea in Co-Digestion Systems Operating Different Industrial Residues for Biogas Production. *Sustainability* 2022, 14, 11536. <https://doi.org/10.3390/su141811536>

Academic Editors: Kyoung S. Ro, Ariel A. Szogi, Matias Vanetti and Ailton Kianz

Received: 18 August 2022

Accepted: 9 September 2022

Published: 14 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: This study aimed to analyze the population dynamics of methanogenic archaea in co-digestion systems operated under different concentrations of industrial waste such as ricotta whey and brewery waste sludge in association with bovine manure. It was believed that the association of these residues from the food industry combined with bovine manure can contribute to improve the production of biogas. To identify the archaea, DNA extractions and the sequencing of the 16S rRNA gene were performed from 38 samples of influents and effluents. The results indicated that *Methanosaeta* and *Methanosarcina* were predominant in the co-digestion of ricotta cheese whey and that *Methanosaeta*, *Methanocorpusculum*, and *Methanobrevibacter* prevailed in the co-digestion of residual brewery sludge. The three ricotta cheese whey bioreactors demonstrated efficiency in methane production; in contrast, residual sludge of brewery bioreactors only showed efficiency in the system operated with 20% co-substrate.

Keywords: biogas; methane; microbial ecology; ricotta cheese whey; residual brewery sludge brewery

1. Introduction

Anaerobic biodegradation (AB) is an important tool for the treatment of organic waste used to generate byproducts (biogas and biofertilizer) from substrate stabilization, contributing to the production of renewable energy [1–4]. AB is a metabolic process with multiple syntrophic relationships that occur between microorganisms in the steps of hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis under specific environmental conditions [5,6].

Methanogenesis is a crucial step to methane (CH₄) production [7], and methanogenic archaea are the key microorganisms of this step. These species are divided into three groups, according to the substrate used for their growth. Hydrogenotrophic methanogens use hydrogen (H₂) and carbon dioxide (CO₂) as substrates; acetoclastic methanogens use acetate structures; and the methylotrophic methanogens use methyl groups [8].

The identification of these microorganisms in samples of bioreactors is possible through metagenomics analysis [9]. As a technique that is independent of cultivation, metagenomics allows the identification of the microbiological diversity from a complex environmental sample [10,11]. This is possible by the investigation of the hypervariable regions (V1 to V9) of the 16S rRNA of prokaryotes.

An increase in the number of studies involving methods for improving the AB was seen in recent years [12], with emphasis on anaerobic co-digestion (AcoD) [13]. AcoD is a

ISSN 1678-3921

Journal homepage: www.embrapa.br/pab

For manuscript submission and journal contents,
access: www.scielo.br/pab

Veterinary Science/ Original Article

Separation and quantification of milk proteins with the addition of cheese whey by lab-on-a-chip

Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos⁽¹⁾,
Hyago Passe Perelra⁽²⁾,
Glisele Nogueira Fogaça⁽³⁾,
Vanelda Maria Meurer⁽⁴⁾,
Marco Antônio Moreira Furtado⁽⁵⁾,
Cristiano Amâncio Vieira Borges⁽⁶⁾,
Mayara Moreira Del Cambre Amaral
Weller⁽⁶⁾ and
Marta Fonseca Martins⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal de Juiz de Fora,
Faculdade de Farmácia, Rua José Lourenço
Kelmer, s/n, Campus Universitário, São
Pedro, CEP 36036-900 Juiz de Fora, MG,
Brazil. E-mail: alessasiqueira@gmail.com,
glisele_fogaça@hotmail.com,
vanelda.meurer@gmail.com,
marcoantoniofurtado@yahoo.com.br

⁽²⁾ Universidade Federal de Juiz de Fora,
Instituto de Ciências Biológicas, Rua
José Lourenço Kelmer, s/n, Campus
Universitário, São Pedro, CEP 36036-900
Juiz de Fora, MG, Brazil.
E-mail: hyago_passe@hotmail.com

⁽³⁾ Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do
Nascimento, nº 610, Dom Bosco,
CEP 36038-330 Juiz de Fora, MG, Brazil.
E-mail: cristiano.borges@embrapa.br,
marta.martins@embrapa.br

⁽⁴⁾ Universidade Federal do Espírito Santo,
Departamento de Zootecnia, Alto
Universitário, s/n, Guararema,
CEP 29500-000 Alegre, ES, Brazil.
E-mail: mayara.weller@ufes.br

⁽⁵⁾ Corresponding author

Received
August 23, 2022

Accepted
November 09, 2022

How to cite
SANTOS, A.S. de O. dos; PEREIRA, H.P.;
FOGAÇA, G.N.; MEURER, V.M.; FURTADO,
M.A.M.; BORGES, C.A.V.; WELLER,
M.M.D.C.A.; MARTINS, M.F. Separation and
quantification of milk proteins with the addition
of cheese whey by lab-on-a-chip. *Pesquisa
Agropecuária Brasileira*, v.58, e03099, 2023.
DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2023.v58.03099>.

Abstract – The objective of this work was to evaluate microfluidic chip electrophoresis, known as lab-on-a-chip technique, for the detection of milk adulteration using cheese whey in comparison with SDS-PAGE. Raw, pasteurized, processed at an ultra-high temperature (UHT), and powdered milk samples received increasing concentrations of cheese whey (0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 50, and 100% v/v), and were subjected to lab-on-a-chip electrophoresis and SDS-PAGE to detect their mixtures. The lab-on-a-chip methodology was able to separate and quantify milk proteins. In addition, the tested technique is easy, rapid, sensitive, and can detect the addition of cheese whey in milk from the lowest level tested (1%) for milk proteins α -casein and β -casein.

Index terms: electrophoresis, microfluidic electrophoresis, milk fraud, milk quality.

Separação e quantificação de proteínas do leite com adição de soro de queijo por lab-on-a-chip

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a eletroforese com dispositivo de microfluidos, conhecida como técnica *lab-on-a-chip*, para detecção de adulteração de leite com soro de queijo, em comparação ao SDS-PAGE. Amostras de leite cru, pasteurizado, processado em temperatura ultra-alta (UHT) e em pó receberam adição de soro de queijo em concentrações crescentes (0, 1, 2,5, 5, 10, 20, 30, 50 e 100% v/v) e foram submetidas a eletroforese *lab-on-a-chip* e SDS-PAGE para detectar suas misturas. A metodologia *lab-on-a-chip* foi capaz de separar e quantificar as proteínas do leite. Além disso, a técnica *lab-on-a-chip* é fácil, rápida, sensível e pode detectar adição de soro de queijo no leite do nível mais baixo testado (1%) para as proteínas do leite α -caseína e β -caseína.

Termos para indexação: eletroforese, eletroforese microfluidica, fraude do leite, qualidade do leite.

Introduction

Milk proteins are elements of high importance from an economic point of view and to human health, due to their physico-chemical properties and nutritional value. There are two classes of proteins: caseins – α -casein (α -CN), β -casein (β -CN) and kappa-casein (κ -CN) – and whey proteins represented by the albumin of the whey, lactoferrin, immunoglobulins, glycomacropeptides, beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin (Beloti & Tamanini, 2015; Sharma et al., 2021).



This is an open-access article distributed under the
Creative Commons Attribution 4.0 International License

Pesq. agropec. bras., Brasília, v.58, e03099, 2023
DOI: [10.1590/S1678-3921.pab2023.v58.03099](https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2023.v58.03099)