

YENNY ISABEL FONSECA RAMÍREZ

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E USO DE BACTERIÓFAGOS PARA O
BIOCONTROLE DE *Yersinia enterocolitica* EM CARNE SUÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F676i
2016
Fonseca Ramírez, Yenny Isabel, 1988-
Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos para o
biocontrole de *Yersinia enterocolítica* em carne suína / Yenny
Isabel Fonseca Ramírez. – Viçosa, MG, 2016.
xv, 55f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Regina Célia Santos Mendonça.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.48-55.

1. Suíno. 2. Suíno - Doenças. 3. Carne de porco. 4. *Yersinia enterocolítica*. 5. Bacteriófagos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 636.4

YENNY ISABEL FONSECA RAMÍREZ

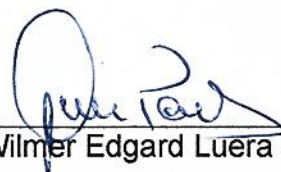
**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E USO DE BACTERÍÓFAGOS PARA O
BIOCONTROLE DE *Yersinia enterocolitica* EM CARNE SUÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de dezembro de 2016.



Márcia Maria de Carvalho



Wilmer Edgard Luera Peña



Monique Renon Eller
(Coorientadora)



Regina Célia Santos Mendonça
(Orientadora)

Dios es el creador, conocedor y promotor absoluto de todas las ciencias y de la verdad. Por eso, si buscas sabiduría, en Él encontrarás la respuesta de por qué no desistir en la ruta del conocimiento.

Isabel Fonseca Ramírez

*À Deus,
A minha família: avó Martha, pais e irmãs,
Ao meu amigo Alejandro,*

DEDICO COM AMOR.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor e compaixão infinita.

À minha família: minha avó Martha, meus pais Hernando e Julia, e minhas irmãs Marcela, Johanna, Mariluz e Xiomara, por seu apoio, carinho, entrega e por estar sempre ao meu lado. Eu amo vocês!

Aos meus amigos que também são minha família: Sr. Jaime, Sra. Elena e Moisés, agradeço por terem me dado a oportunidade de ser um pedacinho de vocês, e por seu apoio incondicional.

A minha Orientadora, professora Regina Célia Santos Mendonça, muito obrigada pela amizade, orientação, oportunidade e confiança.

Ao meu amigo Alejandro Ayala, por sua sabedoria e paciência. Sem você eu não teria alcançado este sonho!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade, excelente qualidade de ensino dada no mestrado, e pelas extraordinárias pessoas que sempre estão dispostas a ajudar.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pelo fornecimento dos micro-organismo utilizados nesta pesquisa.

Aos professores: Monique Eller, Humberto Húngaro, Márcia Carvalho, Wilmer Luera P. e Sebastião Martins Filho, pelas sugestões e esclarecimentos dados no transcurso da pesquisa.

Ao Dr. Stephen T. Abedon, pelas dúvidas que foram esclarecidas.

Ao professor Eber Medeiros, pelo apoio e grande amizade oferecida.

Ao pessoal do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa, por ajudar-me na realização de parte desta pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH): Arthur Sodré, Nélcio Souza, Rodrigo Cardoso,

Luiz Albino, Angélica Batalha, Luana Souza e Isabela T. Bicalho, pelos momentos alegres e apoio teórico e/ou prático oferecidos durante a pesquisa.

Aos meus amigos: Germán Ramírez, Johana Andrade, Michele Caroline, Camila Saraiva, Mauricio Miguel e Leonardo Tellez, por me oferecerem momentos de felicidade e paz. Vocês fizeram minha experiência no Brasil ainda mais agradável!

À Família Sánchez Galvis: Ivan, Paula, Maria José, Bianca e Esteban, pela generosidade e enorme carinho. Vocês sempre me receberam de braços abertos!

Finalmente, quero agradecer do fundo do meu coração aos meus amigos, as testemunhas de Jeová: Sr. Valter Barbosa, Sra. Salomé P. Barbosa e Gabriel Pereira, pela confiança, amizade e a orientação espiritual.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Produção de carne suína.....	4
3.2. Contaminação microbiológica da carne suína.....	4
3.3. <i>Yersinia enterocolitica</i>	5
3.3.1. Mecanismos de patogenicidade de <i>Y. enterocolitica</i>	8
3.3.2. Patogênese e infecção de <i>Y. enterocolitica</i>	10
3.3.3. Contaminação de alimentos, epidemiologia e ocorrência.....	11
3.3.4. Resistência a antibióticos.....	13
3.4. Bacteriófagos.....	14
3.4.1. Ciclos de multiplicação s bacteriófagos.....	15
3.4.2. Usos e aplicações de bacteriófagos na produção de alimentos.....	16
3.4.3. Biocontrole de patógenos veiculados por alimentos por meio de bacteriófagos.....	18

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Obtenção e propagação dos bacteriófagos.....	19
4.1.1. Coleta de amostras.....	19
4.1.2. Propagação dos bacteriófagos.....	20
4.1.3. Titulação e estoque dos bacteriófagos.....	21
4.2. Avaliações da especificidade de hospedeiro.....	21
4.3. Análise morfológica dos bacteriófagos.....	22
4.4. Avaliação da estabilidade dos bacteriófagos	23
4.4.1. Viabilidade dos bacteriófagos em pH da carne suína <i>in natura</i>	23
4.4.2. Viabilidade dos bacteriófagos em diferentes temperaturas....	23
4.4.3. Viabilidade dos bacteriófagos quando expostos à luz branca.	24
4.4.4. Viabilidade dos bacteriófagos em diferentes concentrações de cloreto de sódio.....	24
4.4.5. Viabilidade dos bacteriófagos em solução de sacarose a 0,8 %.....	24
4.4.6. Viabilidade dos bacteriófagos em diferentes valores de nitrato de potássio.....	25
4.5. Determinação de parâmetros cinéticos de um bacteriófago.....	25
4.5.1. Determinação da cinética de adsorção do bacteriófago.....	25
4.5.2. Determinação da curva de <i>one-step growth</i> do bacteriófago..	26
4.6. Avaliação do coquetel de bacteriófagos no biocontrole para <i>Y. enterocolitica</i> em carne suína.....	27
4.6.1. Procedimentos experimentais.....	28
4.6.2. Contagem de bacteriófagos.....	29
4.6.3. Contagem de <i>Y. enterocolitica</i>	30

4.7. Análises estatísticas.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. Isolamento e propagação de bacteriófagos.....	31
5.2. Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados.....	32
5.3. Análise da morfologia dos bacteriófagos.....	33
5.4. Viabilidade dos bacteriófagos.....	35
5.4.1. Viabilidade dos bacteriófagos em pH da carne suína.....	35
5.4.2. Viabilidade dos bacteriófagos em diferentes temperaturas....	35
5.4.3. Viabilidade dos bacteriófagos frente à exposição da luz branca.....	38
5.4.4. Viabilidade dos bacteriófagos a sacarose e cloreto de sódio..	38
5.4.5. Viabilidade dos bacteriófagos em diferentes valores de nitrato de potássio.....	40
5.5. Determinação de parâmetros cinéticos do bacteriófago BFYe6.....	41
5.6. Avaliação do coquetel contendo os bacteriófagos no biocontrole para <i>Y. enterocolitica</i> em carne suína.....	43
5.6.1. Avaliação do biocontrole de bacteriófagos a 4 °C.....	43
5.6.2. Avaliação do biocontrole a 15 °C.....	45
6. CONCLUSÕES.....	47
7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Infecção da <i>Y. enterocolitica</i> nas placas de Peyer.....	11
Figura 2.	Ciclo de multiplicação dos bacteriófagos dentro da célula bacteriana.....	16
Figura 3.	Descontaminação do lombo suíno (<i>Longissimus dorsi</i>).....	28
Figura 4.	Corte e aplicação dos tratamentos nas amostras.....	28
Figura 5.	Placas de lises dos bacteriófagos isolados, formadas mediante a técnica de plaqueamento em sobrecamada de ágar.....	31
Figura 6.	Fotomicrografias eletrônicas dos bacteriófagos para <i>Y. enterocolitica</i>	33
Figura 7.	Representação gráfica dos parâmetros cinéticos do bacteriófago BFYe6 a 30 °C, sobre <i>Y. enterocolitica</i> (ATCC 9610).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Tratamentos aplicados no lombo suíno (<i>Longissimus dorsi</i>)	29
Tabela 2.	Título dos bacteriófagos isolados, após as propagações.....	32
Tabela 3.	Medidas das estruturas dos bacteriófagos (nm).....	34
Tabela 4.	Estabilidade dos bacteriófagos após exposição a pH 5,8 por 180 min.....	35
Tabela 5.	Estabilidade dos bacteriófagos após estocagem a 4 °C por 30 dias.....	36
Tabela 6.	Estabilidade dos bacteriófagos após exposição à 63 °C por 10 min.....	37
Tabela 7.	Estabilidade dos bacteriófagos após exposição à luz branca por 30 dias.....	38
Tabela 8.	Estabilidade dos bacteriófagos após exposição as soluções salinas por 180 min.....	39
Tabela 9.	Estabilidade dos bacteriófagos após exposição à solução de sacarose (0,8 %).....	39
Tabela 10	Contagem dos bacteriófagos após exposição das concentrações de nitrato de potássio.....	40
Tabela 11.	Contagem de <i>Y. enterocolitica</i> (ATCC 9610) em carne suína <i>in natura</i> , após estocagem a 4 °C por até 10 dias...	44
Tabela 12.	Contagem de <i>Y. enterocolitica</i> (ATCC 9610) em carne suína <i>in natura</i> , após estocagem a 15 °C por até 10 dias....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Classificação dos biótipos de <i>Y. enterocolitica</i> segundo testes bioquímicos.....	6
Quadro 2.	Relação entre biótipo, sorotipo O e o plasmídeo pYV em <i>Y. enterocolitica</i>	7
Quadro 3.	Morfologia e famílias de bacteriófagos.....	15
Quadro 4.	Produtos à base de bacteriófagos disponíveis comercialmente para ser usados em alimentos.....	18

RESUMO

FONSECA RAMÍREZ, Yenny Isabel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2016. **Isolamento, caracterização e uso de bacteriófagos para o biocontrole de *Yersinia enterocolitica* em carne suína.** Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Coorientadores: Monique Renon Eller e Humberto Moreira Húngaro.

A carne suína é a carne mais consumida no mundo. Como o suíno é o principal reservatório das estirpes patogênicas de *Yersinia enterocolitica* para o homem e como este micro-organismo possui a capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, com isso, há necessidade de estudar diferentes mecanismos que possam controlar este patógeno. Uma alternativa para seu controle é mediante o uso de bacteriófagos. O objetivo desta pesquisa foi isolar, caracterizar e avaliar bacteriófagos para biocontrole de *Y. enterocolitica* em carne suína. Foram isolados seis bacteriófagos de fezes de aves, dos quais três foram selecionados para a realização dos experimentos: BFYe1, BFYe2 e BFYe6. Posteriormente, procederam-se à caracterização e avaliação dos bacteriófagos mediante a realização de testes de especificidade, morfologia e estabilidade. Também foram determinados os parâmetros cinéticos de adsorção e curva *one step growth* do bacteriófago BFYe6. Finalmente, foi realizada a avaliação do biocontrole do coquetel contendo os bacteriófagos em carne suína *in natura*. Os bacteriófagos em carne suína *in natura*. Os bacteriófagos foram específicos para *Y. enterocolitica* ATCC 9610 e foram classificados como pertencentes à ordem *Caudovirales*, família *Myoviridae*. O bacteriófago BFYe6 apresentou maior estabilidade na maioria das condições avaliadas, mas nenhum dos bacteriófagos manteve viabilidade nas condições de cozimento. O bacteriófago BFYe6 mostrou uma adsorção de 94,5 % no primeiro minuto, com período de latência de 55 min e a média do *burts size* de 10 a 11 UFP por célula infectada. A adição de coquetel de bacteriófagos na carne estocados a 4 °C, reduziram 0,60 e 0,81 ciclos logarítmicos nos T3 e T4 respectivamente até o dia 2, quando comparado com o controle (T2) no dia 0. Nos dias 5, 7 e 10, o T3 controlou a população de *Y. enterocolitica*, contrario ao T4 que controlou a bactéria até o dia 10. A 15 °C, até o dia 10 os bacteriófagos

foram capazes de inibir significativamente o crescimento da bactéria. O controle na diminuição da bactéria no T3 foi de até 0,76 ciclos logarítmicos e no T4 de 1,05 ciclos logarítmicos no dia 10. O MOI não influenciou na efetividade da inibição. Conclui-se que os bacteriófagos apresentaram características favoráveis tais como infectividade, especificidade, estabilidade e potencial de biocontrole de *Y. enterocolitica* sob as condições de refrigeração da carne.

ABSTRACT

FONSECA RAMÍREZ, Yenny Isabel, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. December, 2016. **Isolation, characterization and use of bacteriophages for the biocontrol of *Yersinia enterocolitica* in pork meat.** Adviser: Regina Célia Santos Mendonça. Co-Advisers: Monique Renon Eller and Humberto Moreira Húngaro.

Pork is the most consumed meat in the world. As swine is the main reservoir of the pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* for humans, and as this microorganism has the capacity to multiply in temperatures if of refrigeration, with this there is a need to study different mechanisms that can control this pathogen. An alternative for its control is the using bacteriophages. The objective of this research was isolate, characterize and evaluate bacteriophage for biocontrol of *Y. enterocolitica* in pork meat. Were isolated six bacteriophages from chicken feces, of which three were selected for the experiments: BFYe1, BFYe2 and BFYe6. Subsequently, the characterization and evaluation of the bacteriophages were carried out by means of tests of specificity, morphology, and stability. It was also determined the kinetic parameters of adsorption and one-step growth curve of BFYe bacteriophage 6. Finally, we performed the evaluation of the biocontrol cocktail containing bacteriophages in fresh pork meat. The bacteriophages were specific to *Y. enterocolitica* (ATCC 9610) and were classified as belonging to the *Caudovirales* order, of *Myoviridae* family. The BFYe6 bacteriophage showed higher stability in most conditions evaluated, but none of the bacteriophages maintained viability under cooking conditions. The bacteriophage BFYe6 showed an adsorption of 94.5% in one minute, with a 55 min lag and the average bursts size 10 to 11 PFU per cell infected. The addition of a cocktail of bacteriophages, in the meat stored at 4 °C, reduced 0.60 and 0.81 log₁₀ units in T3 and T4 respectively until day 2, when compared with the T2 control at day 0. On days 5, 7 and 10 T3 controlled the *Y. enterocolitica* population more than T4 and significant differences in bacterial counts were observed in these treatments when compared to treatment without bacteriophage. On days 5, 7 and 10, T3 controlled the population of *Y. enterocolitica*, contrary to T4 that controlled the bacterium until

day 10. At 15 ° C, until day 10 the bacteriophages were able to significantly inhibit the growth of the bacterium. At 15 °C, until day 10 bacteriophages were able to significantly inhibit bacterial growth. The control in the decrease of the bacterium in the T3 was of up to 0.76 log₁₀ units and in the T4 of 1,05 log₁₀ units in day 10. MOI did not influence the effectiveness of inhibition. It concludes that the bacteriophages presented favorable characteristics such as infectivity, specificity, stability and potential of biocontrol of *Y. enterocolitica* under cooling conditions of the meat.

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é um dos mais completos e importantes alimentos na dieta humana, devido ao seu alto teor de proteínas de elevado valor biológico, lipídios e minerais. Tendo em conta as propriedades nutricionais e as mudanças no padrão alimentar global, a carne de porco tornou-se a mais consumida, acima da carne bovina e de frango.

Na produção de carnes, são empregados diferentes processos pelos quais a matéria prima é transformada em produtos próprios para o consumo humano. Durante esta transformação, são executadas atividades de monitoramento, prevenção e correção para garantir a qualidade e inocuidade do produto durante toda a cadeia produtiva. Entretanto, casos de doenças veiculadas por esses alimentos, estão sendo continuamente reportados, geralmente associados a contaminação por bactérias. Segundo a EFSA 2015, em 2013 foram registrados 6.471 casos de yersiniose na União Europeia, sendo a *Y. enterocolitica* a espécie mais notificada (98,66 %) e a terceira doença entérica mais comum na União Europeia.

O suíno é o principal reservatório das estirpes patogênicas *Y. enterocolitica* para o homem. Esta bactéria pode ser isolada nas amígdalas, na língua, nos intestinos e nas fezes de animais infectados. Devido à ausência de sinais nos animais infectados, no momento do abate pode haver contaminação da carne durante a evisceração, ou ainda a contaminação cruzada de uma carcaça infectada para outra não infectada no abatedouro.

Métodos tradicionais de descontaminação de carcaças incluem os métodos físicos (tais como a lavagem com água potável, aplicação de vapor de água sob pressão) e os químicos como aplicação de sanitizantes. Não obstante, fatores como a variabilidade na temperatura de estocagem, baixa penetração no alimento, pH da água, dureza e tempo de contato, diminuem a ação desses métodos contra micro-organismos. Também existem fatores que limitam seu uso como no caso da presença de resíduos no alimento, os quais podem ser tóxicos para o consumidor, ocorrência de odor e irritabilidade aos

manipuladores, preços elevados dos métodos de descontaminação, entre outros.

Alguns desses agentes não são suficientes para a eliminação completa dos contaminantes. Nesses casos, o crescimento de *Y. enterocolitica* pode ser favorecido durante o armazenamento da carne, já que este micro-organismo é psicotrófico e pode continuar sua multiplicação sob condição de refrigeração, o que implica na procura por alternativas de controle de patógenos na produção de carne.

Uma das alternativas atualmente considerada consiste na utilização de bacteriófagos líticos com o objetivo de controlar *Y. enterocolitica*. Esses bacteriófagos apresentam a vantagem de não afetarem o ambiente, serem inofensivos para os seres humanos, de baixo custo e simplicidade na manipulação e aplicação. Além disso, esses agentes mantêm sua capacidade de biocontrole e bioconservação em condições de estocagem sob refrigeração.

Estudos *in vitro*, mostram alguma informação acerca da atividade de bacteriófagos líticos no controle de *Y. enterocolitica*. Entretanto, trabalhos com matrizes alimentares ainda são escassos, o que torna o estudo da aplicação em carne suína um trabalho inovador e com possível aplicabilidade para a indústria de alimentos. Com isso, este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e avaliar a atividade *in vivo* de bacteriófagos contra *Y. enterocolitica* em carne suína *in natura*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar, caracterizar e avaliar a atividade de bacteriófagos para o biocontrole de *Yersinia enterocolitica* em carne suína.

2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar, purificar e selecionar bacteriófagos para *Y. enterocolitica*.
- b) Avaliar a especificidade dos bacteriófagos selecionados.
- c) Avaliar a morfologia dos bacteriófagos selecionados.
- d) Avaliar a estabilidade dos bacteriófagos a pH da carne fresca, diferentes temperaturas, exposição à luz branca, diferentes concentrações de cloreto de sódio, sacarose e nitrato de potássio.
- e) Determinar os parâmetros cinéticos de um dos bacteriófagos.
- f) Avaliar o biocontrole de *Y. enterocolitica* em carne suína *in natura* utilizando o coquetel de bacteriófagos, a 4 e 15 ° C, em até 10 dias de armazenamento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção de carne suína

A carne suína é a carne de maior consumo em todo o mundo (FAO, 2015). Atualmente o rebanho suíno duplicou se comparado ao total de suínos que havia há três décadas. Em 2016, foram produzidos 108.201 milhões de toneladas (equivalente em peso de carcaça) de carne suína em todo mundo, sendo a China o maior produtor com 51.850 milhões de toneladas (47,92 %) e a União Europeia ocupando o segundo lugar com 23.350 milhões de toneladas (21,58 %) (USDA, 2016). O Brasil ocupa o terceiro lugar em produção e exportação de carne suína, com 3.710 milhões de toneladas e 900 milhões de toneladas, respectivamente.

3.2 Contaminação microbiológica da carne suína

Anualmente são reportados números elevados de casos de infecções veiculadas pela carne. Isso se deve à exposição da matéria prima em toda cadeia produtiva. Desde o abate dos animais até o armazenamento da carne em câmaras frias, há possibilidade de crescimento de micro-organismos que se adaptam a estas condições, tais como a *Y. enterocolitica*.

Segundo Gomide et al. (2013), no animal vivo saudável, o sistema muscular é isento de micro-organismos devido à presença de barreiras físicas como a pele, a seletividade das membranas celulares, o sistema linfático e os glóbulos brancos. Após o abate do animal e durante a conversão do músculo em carne há perda destas barreiras de proteção, além da abertura e manipulação da carcaça, o que pode aumentar o risco de contaminação microbiana da carne. Nessa fase pode ocorrer a contaminação da carne por bactérias patogênicas como *Y. enterocolitica*. Esse micro-organismo é comum na cavidade oral, amígdalas, língua, intestino e fezes dos suínos e pode ser disseminado para a carcaça durante o abate (PINTO, 2014; ATOBLA et al. 2012).

No abate dos suínos, alguns animais podem ser portadores potenciais de *Y. enterocolitica* e contaminar outros animais ou outros locais a partir das fezes

(VANANTWERPEN et al. 2015). Porém, é importante controlar a contaminação e buscar mecanismos de descontaminação dos estabelecimentos para diminuir o risco de disseminação e contaminação cruzada.

Em estudo realizado por Bonardi et al. (2014), *Y. enterocolitica* foi encontrada em 15,3 % (23/150) das amídalas dos suínos abatidos dos quais 14,7 % foram positivos para *Y. enterocolitica* biótipo 4 sorotipos O:3, o qual é patogênico para humanos. Os autores concluíram que a contaminação da bactéria nas amídalas foi coincidente com o aparecimento do micro-organismo nas fezes.

3.3 *Yersinia enterocolitica*

O interesse em *Y. enterocolitica* iniciou-se em 1958 devido a uma série de infecções de chinchilas, lebres e posterior correlação causal com linfadenite em humanos. Em 1963 foi encontrada uma similaridade entre isolados de *Y. enterocolitica* de animais e humanos e em 1964 o nome da espécie foi formalmente proposto por Frederiksen (FREDERIKSEN, 1964 apud RIEMANN e CLIVER, 2006).

Yersinia enterocolitica pertence à família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Yersinia*. É uma bactéria caracterizada como gram negativa de forma bacilar, anaeróbia facultativa, oxidase negativa, catalase positiva e não possui capacidade de fermentar a lactose. A temperatura de crescimento pode variar de (-2 a 42) °C, sendo a temperatura ótima de (28 a 30) °C (BARI et al., 2011). Apresentam maior atividade bioquímica a 28 °C do que a 37 °C. A temperatura de crescimento influencia nas características bioquímicas e de motilidade. O pH mínimo de crescimento está entre (4,2 e 4,8), o máximo entre (9,9 e 10), sendo o ótimo de 7,2. A faixa mínima da atividade de água (*A_w*) para seu desenvolvimento é de 0,96 com 5 % (m/v) de NaCl (NZFSA, 2010).

Yersinia enterocolitica está amplamente distribuída na natureza, sendo mais comum encontrá-la na água e no trato digestivo dos animais, especialmente nos suínos (AROCENA et al., 2012). A infecção causada por bactérias do gênero *Yersinia* é conhecida como yersiniose. *Y. enterocolitica* é

um agente patogênico zoonótico e psicotrófico que pode causar a yersiniose em humanos. Ela é transmitida via alimentos e água contaminados ou por contato com pessoas ou animais infectados (ONTARIO, 2015; SKURNIK e TOIVANEN, 1993; CVE, 2003).

No gênero *Yersinia* são descritas 17 espécies, dentre as quais são patogênicas para humanos: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* e *Y. enterocolitica*, sendo esta última a mais frequente em infecções (AROCENA et al., 2012; DRUMMOND et al., 2012). *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* são divididos em vários sorotipos sendo alguns patogênicos (SKURNIK e TOIVANEN, 1993). Porém, nem todas as estirpes de *Y. enterocolitica* causam doença em humanos, pois essa é uma espécie heterogênea subdividida em biotipos, sorotipos e expressão de virulência (FALCÃO e FALCÃO, 2006) (Quadros 1 e 2).

Quadro 1. Classificação dos biotipos de *Y. enterocolitica* segundo testes bioquímicos.

CARACTERÍSTICA ^a	BIOTÍPO					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipase	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	-	-	-	-	-
Esculina (24 h)	+/-	-	-	-	-	-
Xilose	+	+	+	+	-	v
Trealose	+	+	+	+	+	-
Indol	+	+	v	-	-	-
Ornitina descarboxilase	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer (VP)	+	+	+	+	+	+
Sorbose	+	+	+	+	+	-
Pirazinamidase	+	-	-	-	-	-
Redução do nitrato	+	+	+	+	+	-
Inositol	+	+	+	+	+	+
β-Glicosidase ^b	+	-	-	-	-	-

^a símbolos: + = positivo, - = negativo, (+) = lento, v= variável. ^b Dados do *Bacteriological Analytical Manual* (Weagant et al., 2001). Fonte: (BARI et al., 2011).

Quadro 2. Relação entre biotipo, sorotipo O e o plasmídeo pYV em *Y. enterocolitica*.

BIOTÍPO	SOROTIPO(S)
1A	O:4; O:5; O:6,30; O6,31; O:7,8; O:7,13; O:10; O:14; O:16; O:21; O:22; O:25; O:37; O:41,42; O:46; O:47; O:57; NT ^a
1B	O:4,32 ^b ; O:8 ^b ; O:13 ^a ,13 ^b ; O:16; O:18 ^b ; O:20 ^b ; O:21 ^b ; O:25; O:41,42; NT
2	O:5,27 ^b ; O:9 ^b ; O:27
3	O:1,2,3 ^b ; O:3 ^b ; O:5,27 ^b
4	O:3 ^b
5	O:2,3 ^b

^a NT: não tipada. ^b Sorotipos que incluem cepas que transportam o plasmídeo **pYV** que codifica vários genes de virulência. Fonte: (BARI et al., 2011).

A espécie *Y. enterocolitica* possui cerca de 44 antígenos flagelares e 76 sorotipos, sendo esse último comumente utilizado para tipificação das estirpes em laboratório de rotina (FALCÃO e FALCÃO, 2006). Os sorotipos são determinados principalmente pela variabilidade do polissacarídeo O (antígeno O), presente na membrana externa da parede celular da bactéria. A fagotipagem é outro esquema para subtipagem de *Y. enterocolitica* que é avaliada a sensibilidade por diferentes bacteriófagos. Mediante fagotipagem pode-se rastrear a origem de uma epidemia e determinar o modo de transmissão da doença (NICOLLE et al., 1976; KASATIYA e ACKERMANN, 1986).

A maioria das estirpes patogênicas em humanos e animais domésticos pertencem aos biotipos 1B, 2, 3, 4 e 5. (WAUTERS et al., 1987). As estirpes patogênicas detectadas na Europa, Canadá, Japão e África do Sul pertencem aos sorotipos O:3 e O:9 e nos Estados Unidos ao biotipo 1B, sorotipo O:8 (SKURNIK e TOIVANEN, 1993). Entre os animais, o suíno é o único animal onde é encontrado *Y. enterocolitica* biotipo 4, sorotipo O:3, que é uma variedade relacionada com doenças em humanos (TIRZIU et al. 2011). Estudos das sequências de RNAr 16S e de genomas da *Y. enterocolitica* dividiram a espécie em duas subespécies, sendo *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* e *Y. enterocolitica* subsp. *paleoartica* (NEUBAUER et al. 2000).

A bactéria pode ser cultivada com sucesso em meios como ágar de Novobiocina-Irgasan-Cefsulodina (CIN) e ágar MacConkey, formando colônias arredondadas, de (1 – 2) mm de diâmetro. No ágar MacConkey, as colônias são incolores ou rosa pálida e no ágar CIN são vermelhas com bordas incolores (FDA, 2007).

3.3.1 Mecanismos de patogenicidade de *Y. enterocolitica*

As cepas de *Y. enterocolitica* patogênicas têm um plasmídeo de 70 kb denominado pYV (plasmídeo de virulência yersiniana) e genes cromossomais que codificam fatores de virulência e se expressam dependendo da temperatura do ambiente. Os genes plasmidiais são normalmente expressos a 37 °C e os cromossomais a 25 °C (ROHDE et al. 1999).

O plasmídeo pYV transporta produtos que codificam fatores de virulência e inclui a proteína de adesão (YadA – aderência da *Yersinia*) e proteínas efetoras (Yops) nas células alvo. Estes fatores de virulência permitem a sobrevivência e multiplicação de *Y. enterocolitica* nos tecidos linfóides de seus hospedeiros (RIEMANN e CLIVER, 2006).

As proteínas Yops são injetadas diretamente no citosol da célula hospedeira, mediante o sistema de secreção tipo III da bactéria, (inyectosoma - Ysc), alterando o citoesqueleto, inibindo a fagocitose em macrófagos e granulócitos polimorfonucleares (PMNs) e bloqueando a produção de citosinas pro-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão. As Yops são produzidas “*in vitro*” à temperatura de 37 °C e em baixas concentrações do íon cálcio (GRASSL et al., 2003).

A adesina YadA, é a principal proteína da membrana externa que promove a transcitose na célula do hospedeiro através da interação com os receptores $\beta 1$ integrina, união aos fagócitos e as moléculas da matriz extracelular como por exemplo, laminina, colágeno e fibronectina. Também protege a bactéria de defensinas e confere resistência à atividade bactericida (EI TAHIR e SKURNIK, 2001).

Com relação aos genes cromossomais os mais estudados são os genes relacionados à adesão e invasão de células eucariotas, síntese de lipopolissacarídeos (LPS), captura de ferro, produção de enterotoxinas, sínteses de fímbrias, entre outros. (CARNIEL, 1995).

Na adesão e invasão da célula eucariota, as bactérias produzem proteínas que estão nas membranas externas denominadas invasina e Ail, codificadas pelos genes *Inv* e *Ail*, respectivamente. A invasina é a proteína responsável pela invasão das bactérias através das células M e por estabelecer a colonização extracelular de tecidos linfáticos. A proteína Ail, também é responsável por conferir resistência bacteriana em situações adversas do ambiente e às respostas imunológicas do hospedeiro (DOYLE e BUCHANAN, 2013).

Yersinia enterocolitica pode ter dois tipos de LPS, dependendo da quantidade do polissacarídeo da cadeia O-lateral que está ligado ao núcleo interno da parede celular, sendo regulado pela temperatura de incubação, pois se o crescimento da bactéria é abaixo 30 °C o LPS é liso, e se a temperatura é a 37 °C, a célula é rugosa, devido a repressão da síntese do LPS. O LPS pode ser necessário para a expressão ou função normal de outras moléculas de superfície ou sistemas secretores, tais como Ail e YadA. Além disso, a região externa do LPS desempenha um papel na manutenção da integridade da membrana externa e pode contribuir para a resistência de *Y. enterocolitica* aos peptídeos bactericidas em tecidos e macrófagos (FALCÃO e FALCÃO, 2006).

O ferro é um micronutriente essencial de quase todas as bactérias, como cofator de várias enzimas, além de outras funções em processos biológicos essenciais. Bactérias patogênicas produzem quelantes de ferro conhecidos como sideróforos, que são liberados ao meio para capturar o ferro, formando um complexo (sideróforo-ferro). O complexo liga-se aos receptores específicos na superfície bacteriana para logo ser absorvidos (TORTORA et al. 2007). Cepas de *Y. enterocolitica* altamente patogênicas (1B/O:8) apresentam uma ilha cromossômica de alta patogenicidade (HPI) que codifica a biossíntese de um sideróforo conhecido como yersiniobactina (ybt), uma proteína que permite que o patógeno adquira ferro de fontes normalmente inacessíveis. O HPI de

Yersinia está também presente numa variedade de outras enterobactérias, tais como *E. coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Salmonella* spp. Embora os biotipos de *Y. enterocolitica* diferentes de 1B não produzam yersiniabactina, eles são capazes de adquirir ferro a partir de sideróforos exógenos (não sintetizados pela *Yersinia*), como a desferrioxamina B, que é sintetizado por outros micro-organismos (ROBINS-BROWNE et al. 1986).

A espécie de *Y. enterocolitica* sintetiza e secreta uma enzima termooestável que prejudica o trato digestivo dos seus hospedeiros causando uma produção excessiva de monofosfato cíclico de guanosina cíclico (GMPc) dentro das células epiteliais intestinais; isto, por sua vez, provoca perturbação do transporte de fluidos e eletrólitos nas células absorptivas intestinais, o que pode resultar em diarreia. O grupo carboxila terminal do GMPc tem semelhança significativa com as enterotoxinas termooestáveis de *E. coli* enterotoxigênica, *Citrobacter freundii* e *Vibrio cholerae* O1 (CARNIEL e HINNEBUSCH, 2004).

3.3.2 Patogênese e infecção de *Y. enterocolitica*

Y. enterocolitica é um patógeno entérico invasivo, que induz uma resposta inflamatória dos tecidos infectados. Após a inoculação oral, as bactérias passam ao lúmen intestinal, considerando que um pequeno número de bactérias se aderem à mucosa do epitélio através da ligação de receptores (integrinas β_1) das células M, por meio da proteína YadA da proteína de invasão Inv da membrana externa da bactéria. *Y. enterocolitica* atravessa a membrana basal e entra em contato com o tecido linfóide associado ao intestino, onde é desencadeada e produzida a secreção de quimiocinas inflamatórias (IL-8). Essa resposta leva ao estabelecimento do processo inflamatório e destruição de placas de Peyer devido à transmigração de PMNs e apoptoses celular, levando a destruição dos tecidos localizados, causando a formação de microabcessos (GARCÍA et al., 2004). A migração de PMNs através da barreira epitelial conduz a destruição do tecido, o que pode aumentar a translocação de *Yersinia* para as placas de Peyer. As proteínas Yops são translocadas para o citosol da célula hospedeira e podem induzir a

apoptose e a supressão da resposta imunitária (GRASSL et al. 2003) (Figura 1).

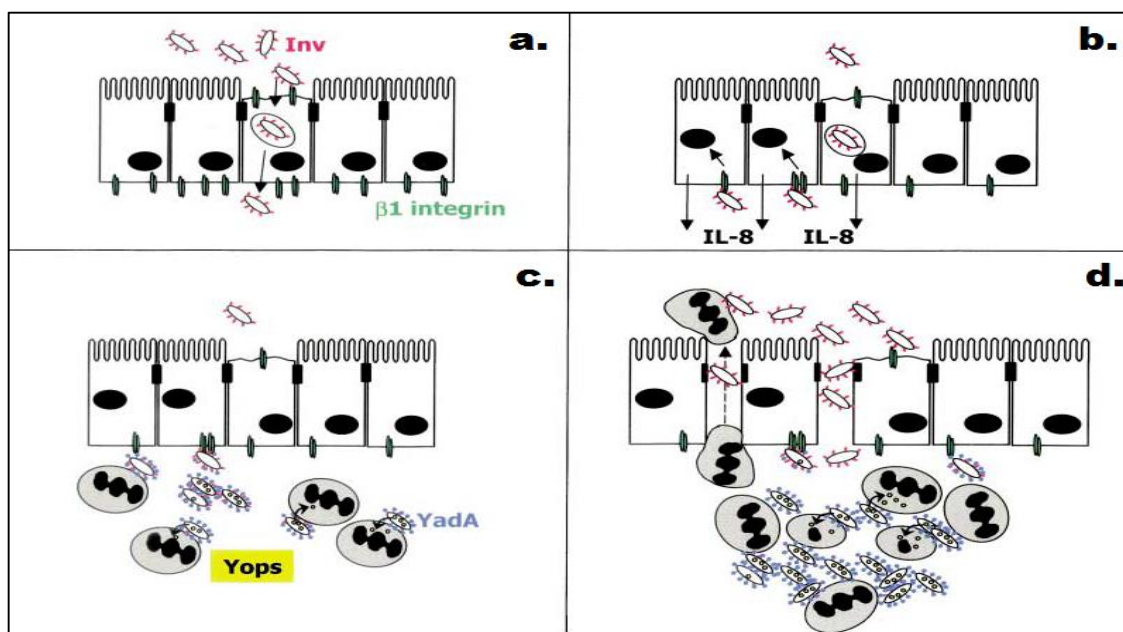


Figura 1. Infecção da *Y. enterocolitica* nas placas de Peyer. **a.** Transcitose, transporte da bactéria em vacúolos e liberada na superfície basal das células M, **b.** união da bactéria às integrinas β1 dos enterócitos e desencadeamento da produção e secreção de quimiocinas inflamatórias (IL-8), **c.** As quimiocinas atraem e ativam PMNs. As bactérias replicam-se nos remendos de Peyer e expressam as Proteínas anti-fagocíticas YadA e Yops, **d.** Destruição do tecido e formação de abscessos. Fonte: (Grassl et al., 2003).

A bactéria se difunde muitas vezes através da linfa para os linfonodos mesentéricos, onde também pode formar microabscessos. Se as bactérias contornarem os nódulos linfáticos para entrar na corrente sanguínea, podem se disseminar para qualquer órgão, mas continuam com a afinidade de infectar o tecido linfoide, preferencialmente nos tecidos tais como o retículo endoteliais do fígado e baço. *Y. enterocolitica* é considerado como um patógeno intracelular facultativo devido a sua resistência por macrófagos. Assim, os macrófagos podem proporcionar um nicho para replicação bacteriana durante as fases iniciais da infecção e servir como um veículo para difusão no hospedeiro (DOYLE e BUCHANAN, 2013).

3.3.3 Contaminação de alimentos, epidemiologia e ocorrência

Os alimentos são os principais veículos de infecção por *Y. enterocolitica*. Mas, no momento do isolamento a partir de alimentos, raramente o patógeno pode ser recuperado, o que se deve, provavelmente, à sensibilidade limitada

dos meios ou dos métodos de cultura empregados, sendo pouco frequentes notificações de surtos (BARI et al., 2011). Além disso, o número exato de casos de yersinose é difícil de determinar, principalmente pelo fato de que muitas pessoas atribuem esta doença a um vírus ou gripe.

A espécie de *Y. enterocolitica* é geralmente associada com alimentos de origem animal tais como carnes, leite não pasteurizado e frutos do mar, bem com solo e águas não tratadas. Pode haver também contaminação cruzada de vegetais e outros alimentos a partir de alimentos crus contaminados e refrigerados (TIRZIU et al., 2011). De acordo com resultados de pesquisas realizadas com alimentos contaminados, *Y. enterocolitica* pode sobreviver em temperatura ambiente e de refrigeração. A bactéria também resiste ao congelamento e pode sobreviver em alimentos congelados e descongelados durante longos períodos (ZADERNOWSKA et al., 2014).

Estima-se que a dose infecciosa necessária para *Y. enterocolitica* esteja entre 10^4 e 10^6 células (FDA, 2012). Após ingestão, o período de incubação do micro-organismo é de aproximadamente sete dias. O quadro clínico se manifesta geralmente com uma diarreia autolimitada, associada com febre leve e dor abdominal por dois ou três dias. Também pode ocorrer náuseas e vômitos, porém, com menor frequência. A duração dos sintomas pode estender-se por até três semanas e por vários meses, caso o quadro clínico se desenvolva para uma enterocolite crônica (RIEMANN e CLIVER, 2006; NZFSA, 2010).

Infecções causadas por estirpes de *Y. enterocolitica* sorotipos O:3 ou O: 9 são, em alguns pacientes, seguidas por artrite reativa. Sintomas extra intestinais observadas com a infecção por *Y. enterocolitica* são reações cutâneas reativas, sendo o eritema nodoso o mais comum (DORINA, B.; KODA, 1996; RIEMANN e CLIVER, 2006).

A maioria dos casos de yersinose ocorre em crianças menores de cinco anos de idade e idosos com idade superior a 60. Esses representam os grupos de risco em que os casos da doença são de maior gravidade, levando a hospitalizações e óbitos (MEDEIROS et al., 2011). No entanto, podem ocorrer

complicações dos sintomas em demais idades, caso o seu estado imunológico esteja comprometido. Em crianças superiores aos 5 anos de idade, a yersiniose aguda apresenta-se geralmente como pseudo-apendicite, pela inflamação do íleo ou gânglios linfáticos mesentéricos. As características comuns são dor abdominal e sensibilidade localizada no quadrante inferior direito. Esses sintomas são geralmente acompanhados de febre, com pouca ou nenhuma diarreia. A importância desta forma da doença encontra-se na sua semelhança com a apendicite (DOYLE e BUCHANAN, 2013).

Entre 2009 e 2013, na União Europeia, foram registrados 6.471 casos de yersiniose, com a confirmação de 6.395 casos (98,8 %), *Y. enterocolitica* foi a espécie mais notificada (98,66 %), sendo a terceira doença entérica mais comum na União Europeia depois de campilobacteriose e salmonelose (EFSA, 2015) e a terceira doença zoonótica mais comum na União Europeia e Alemanha (ROSNER et al., 2010).

3.3.4 Resistência a antibióticos

A disseminação de genes de resistência entre estirpes bacterianas tornou-se um problema crescente em doenças infecciosas. Isso se deve ao aumento de bactérias patogênicas adaptadas aos medicamentos comumente empregados em animais destinados ao consumo humano. Essas bactérias por respostas adaptativas podem desenvolver resistência cruzada a vários medicamentos aprovados na medicina clínica, tornando-se um problema na saúde humana (CARNIEL e HINNEBUSCH, 2004).

Resultados em pesquisas têm demonstrado a resistência de estirpes de *Y. enterocolitica* a antibióticos. Por exemplo, Terentjeva e Bērziņš (2010), estudaram a resistência a antibióticos de estirpes *Y. enterocolitica* isoladas de carcaças de suínos. Os autores encontraram que todas as estirpes apresentaram resistência à ampicilina, cefalotina, eritromicina, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina. Do mesmo modo, Bolton et al. (2013), pesquisaram a resistência de estirpes *Y. enterocolitica* que foram isoladas em diferentes etapas da cadeia de produção de suínos (desmame, terminação e no matadouro) a antibióticos. Os autores encontraram que as estirpes de *Y.*

enterocolitica classificadas no Biótipo 2 sorotipos O:9, apresentaram alta resistência a cefalotina, ampicilina e amoxicilina com ácido clavulânico e media resistência à neomicina e estreptomicina. Anju et al. (2014), avaliaram a taxa de resistência bacteriana de *Y. enterocolitica* e *Yersinia intermedia* obtidos de amostras de suínos e concluíram que as cepas de *Y. enterocolitica* foram altamente resistentes a três antibióticos (ampicilina, ácido nalidixico e tetraciclina), e pouco resistentes a dois antibióticos (cefotaxima e Ceftriaxona) entre 13 antibióticos avaliados.

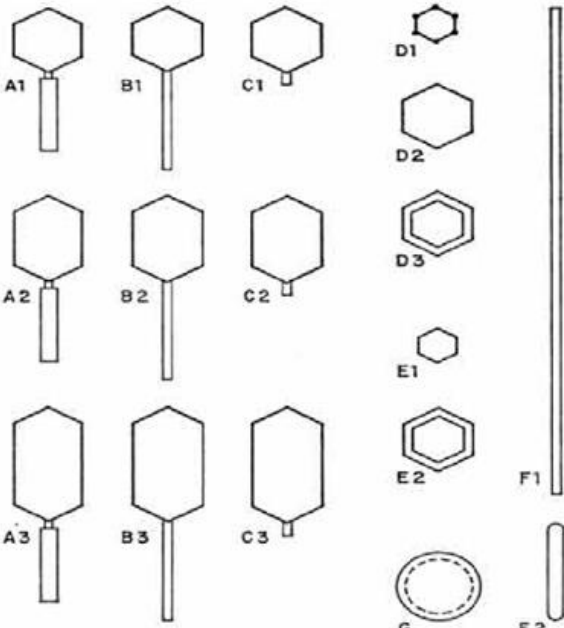
A resistência a antibióticos por *Y. enterocolitica* é dada em sorogrupos específicos (O:3 e O:9) e é conduzida em parte pela produção de duas lactamases produzidas por genes cromossomais (β -lactamases A e B), sendo responsáveis pela resistência à penicilina, ampicilina, cefalotina e carbenicilina. *Y. enterocolitica* O:8 produz β -lactamases tipo A com resistência variável à carbenicilina e cefalotina (FALCÃO e FALCÃO, 2006).

3.4 Bacteriófagos

Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias e estão presentes em diversos ambientes, são ubíquos, apresentam grande diversidade genética e exercem influência sobre o balanço dos ecossistemas (SALEM et al., 2014). Os bacteriófagos, segundo Ackermann (2005), são divididos em 13 famílias, classificados de acordo com seu genoma e características morfológicas.

Aproximadamente o 96 % dos bacteriófagos têm cauda e pertencem à ordem *Caudovirales*. Os bacteriófagos poliédricos, filamentosos e pleomórficos têm um menor numero hospedeiros (Quadro 3). O vírus da ordem *Caudovirales* têm DNA de cadeia dupla ou simples e um capsídeo icosaédrico que se une à cauda helicoidal, por meio de um conector e a maioria das caudas têm umas estruturas de fixação. A ordem compreende as famílias *Myoviridae*, (cauda contráctil, separada da capsídeo por um pescoço), *Siphoviridae* (cauda longa, não contráctil) e *Podoviridae* (cauda curta) (ACKERMAN, 2012).

Quadro 3. Morfologia e famílias de bacteriófagos.

Morfotipo	Família	Forma	Morfologia
A1 – A3 B1 – B3 C1 – C3	<i>Myoviridae</i> <i>Siphoviridae</i> <i>Podoviridae</i>	Com cauda	
D1 D2 D3	<i>Microviridae</i> <i>Corticoviridae</i> <i>Tectiviridae</i>	Poliédricos	
E1 E2	<i>Leviviridae</i> <i>Cystoviridae</i>		
F1 F2	<i>Inoviridae</i>	Filamentosos	
G	<i>Plasmaviridae</i> <i>Fuselloviridae</i>	Pleomórficos	

Fonte: adaptada de Ackermann (2005).

Cada família da ordem *Caudovirales* apresenta um morfotipo baseado na forma do capsídeo de acordo com seu comprimento/largura. Assim, o morfotipo A1, A2 e A3 são da *Myoviridae* (A2: 1.2 - 1.4, A3: 2.4); o B1, B2 e B3 (B2: 1.2 - 1.8, B3: 3 - 3.4) da *Siphoviridae* e o C1, C2 e C3 da *Podoviridae* (B2: 1.1-1.4-1.8, B3: 3.5) (ACKERMANN e EISENSTARK,1974).

3.4.1 Ciclos de multiplicação dos bacteriófagos

Todas as estruturas bacterianas externas constituem potenciais receptores de bacteriófagos (SKURNIK e STRAUCH, 2006). O processo de infecção do bacteriófago inicia a partir do reconhecimento e a adsorção do vírus na superfície da bactéria hospedeira (SHAO e WANG, 2008). Normalmente, o bacteriófago adsorve a uma célula hospedeira pelas fibras da cauda e injeta seu ácido nucleico no interior do citoplasma. Uma vez que o hospedeiro é infectado, a replicação dos bacteriófagos pode apresentar os ciclos lítico ou lisogênico (Figura 2) (KURTBÖKE, 2012):

No ciclo lítico, após injeção do material genético, os bacteriófagos utilizam o metabolismo do hospedeiro para sintetizar ácidos nucleicos e diversas

proteínas virais. Posteriormente, a estrutura dos capsídeos é montada e o genoma viral é empacotado, caracterizando a etapa de maturação. Finalmente, os bacteriófagos induzem a lise celular e são liberados ao meio externo (MADIGAN et al., 2010).

Em alguns bacteriófagos, a liberação da progênie é ocasionada pela degradação da parede celular bacteriana induzida pelo efeito da holina (proteína que atua formando poros na membrana celular) e a endolisina (enzima de degradação de peptidoglicanos). Este ao caso de bacteriófagos para *Y. enterocolitica*. (LEON-VELARDE et al., 2016).

No ciclo lisogênico, os bacteriófagos injetam seu ácido nucleico e este é integrado ao cromossomo bacteriano (profago). O profago também pode permanecer localizados no citoplasma na forma de plasmídeo e replicar-se em sincronia com a célula hospedeira. Os bacteriófagos lisogênicos ou temperados podem se manter durante vários períodos sem causar lise celular, podendo interromper o estado lisogênico a qualquer momento revertendo-se à via lítica por condições ambientais.

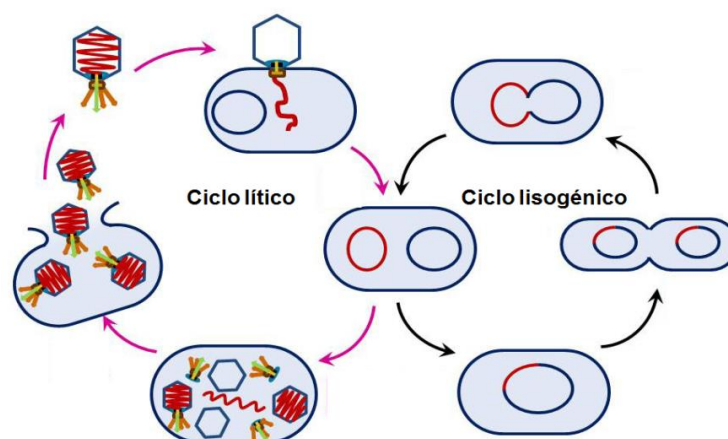


Figura 2. Ciclo de multiplicação dos bacteriófagos.
Fonte: Kurtböke, (2012).

3.4.2 Usos e aplicações de bacteriófagos na produção de alimentos

Bacteriófagos líticos desde sua descoberta têm sido usados como agentes de terapia para prevenir ou reduzir o número de bactérias patogênicas em pessoas e animais. O uso de bacteriófagos para tratar problemas infecciosos causados por bactérias foi empregado pela primeira vez por Félix

d'Herelle em 1917, no controle de *Shigella dysenteriae* para o tratamento de doentes com difteria. No entanto, a partir da década de 40, os países de ocidente iniciaram a produção e o uso massivo de antibióticos e levou a uma redução considerável no uso da fagoterapia (D'HERELLE 1917, apud KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005; KURTBÖKE 2012).

O uso excessivo de antibióticos levou ao desenvolvimento de bactérias resistentes. Desta forma, recentemente a fagoterapia foi retomada e estudos vêm sendo realizados para o controle de bactérias na medicina humana e veterinária. Bacteriófagos também são aplicados em outras áreas, como na indústria de alimentos como biossanitizantes, biocontroladores e biopreservantes (MORA et al., 2005).

Entre as vantagens do o uso de bacteriófagos tem-se:

- Especificidade dos bacteriófagos para um determinado micro-organismo hospedeiro;
- O mecanismo de ação difere dos antibióticos, o que faz com que sejam eficientes mesmo frente a bactérias resistentes aos antibióticos;
- A dose inicial dos bacteriófagos incrementa-se exponencialmente, pois se multiplicam enquanto o hospedeiro ainda exista;
- Adaptam-se continuamente aos mecanismos de defesa das bactérias;
- Baixa toxicidade, pelo fato de não produzir moléculas que sejam tóxicas ao consumidor nem se replicar em células eucariotas.
- Baixo custo e simplicidade de manipulação;
- Tolerância a condições adversas nos alimentos.

Bacteriófagos lisogênicos não são recomendáveis como agentes terapêuticos ou para biocontrole em alimentos, pois podem possuir genes que codificam para fatores de virulência ou de resistência a antibióticos. Assim, na seleção de bacteriófagos para uso na cadeia produtiva de alimentos ou para aplicações antibacterianas, devem ser escolhidos e empregados somente aqueles bacteriófagos que tenham ciclos exclusivamente líticos (LY-CHATAIN 2014; JORQUERA et al., 2015).

3.4.3 Biocontrole de patógenos veiculados por alimentos por meio de bacteriófagos.

Em 2006, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso de uma preparação de *pool* de bacteriófagos como aditivo alimentar geralmente reconhecido como seguro (GRAS) denominado P100 (ListexTMP100) para o controle de *Listeria monocytogenes* em carne e queijos (ROSSI e ALMEIDA, 2010). Outros produtos também foram aprovados e atualmente são comercializados para uso em alimento (Quadro 4).

Quadro 4. Produtos à base de bacteriófagos disponíveis comercialmente para serem usados em alimentos

PRODUTO	EMPRESA	BACTERIÓFAGOS	BACTÉRIA ALVO	ALIMENTOS
EcoShieldTM	Intralytix	Combinação de 3 bacteriófagos	<i>E. coli</i> O157:H7	Alimentos em geral, principalmente carne bovina.
ListshieldTM	Intralytix	Combinação de 6 bacteriófagos	<i>L. monocytogenes</i>	Alimentos em geral, principalmente salmão defumado, produtos cárneos e avícolas prontos para o consumo.
ListexTMP100	Micreos	Bacteriófago P100	<i>L. monocytogenes</i>	Alimentos em geral, principalmente queijos, pescado e carnes.
SalmofreshTM	Intralytix	Combinação de 6 bacteriófagos	<i>Salmonella entérica</i>	Carnes, pescados, frutas e hortaliças.
AgriphageTM	Omnylytics	Um bacteriófago	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> e <i>P. syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	Plantas de tomate e pimentão
SalmonalexTM	Micreos	Combinação de 2 bacteriófagos (Fola e S16)	<i>Salmonella entérica</i>	Alimentos em geral.

Fonte: JORQUERA et al. 2015.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa - Minas Gerais.

O micro-organismo hospedeiro utilizado para o isolamento e propagação de bacteriófagos e na contaminação de pedaços de carne suína *in natura* foi *Y. enterocolitica* subespécie *enterocolitica* INCQS 00098 (ATCC 9610), biótipo 1B, sorotipo O:8, isolada de abscesso facial humano, fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS-FIOCRUZ). Um estoque da cultura foi produzido em caldo tripton de soja (TSB Difco™) contendo 20 % (v/v) de glicerol (Vetec®) como crioprotetor e mantido em congelamento a -20 °C.

4.1 Obtenção e propagação dos bacteriófagos

4.1.1 Coleta de amostras

Para o isolamento dos bacteriófagos, foram coletadas 5 amostras de águas residuárias provenientes de produções animais do Departamento de Zootecnia (DZO) da UFV, 5 amostras de águas de lagoas da UFV e 8 amostras de mistura de fezes de aves caipiras (frangos, galinhas, papagaios, perus, pavões e patos) de uma propriedade do Município de Viçosa, Minas Gerais, totalizando 18 amostras. As amostras foram armazenadas em sacolas plásticas esterilizadas e transportadas ao LAMPOAH.

O isolamento dos bacteriófagos, foi feito segundo metodologia adaptada de Carvalho et al. (2010). Pesou-se 1 g ou mL da amostra e adicionou-se a 5 mL de TSB (Difco™) suplementado com 50 µL de CaCl₂ (1 mMol·L⁻¹) e 50 µL de MgSO₄ (10 mMol·L⁻¹) e 500 µL de *Y. enterocolitica* em fase logarítmica (10⁸ UFC·mL⁻¹). Em seguida, as amostras foram incubadas em agitador (Shaker Solab, SL 221) por 24 h a 30 °C com rotação de 100 rpm. Após este tempo, as amostras foram tratadas com clorofórmio (Vetec®) 1:4 (v/v clorofórmio:amostra), homogeneizadas e mantidas por 15 min a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas (Sigma, 3K30, ROTOR

12111H) a 8.600·g por 10 min a 4 °C e posteriormente filtradas em membrana hidrofílica PVDF com poro de 0,22 µm (Millex®).

Para avaliar a presença de bacteriófagos nas suspensões obtidas, usou-se a técnica de plaqueamento em sobrecamada de ágar. Um volume de 100 µL do hospedeiro em fase logarítmica e 100 µL da suspensão de bacteriófagos foram misturados com 5 mL de meio TSA semi-sólido (TSB adicionado de 0,7 % (m/v) de ágar-ágar–Difco™) fundido aproximadamente a 45 °C e vertidos em Placa de Petri contendo ágar base TSA (TSB adicionado de 1,2 % de ágar-ágar–Difco™) sólido. As placas de Petri foram incubadas a 30 °C por 24 h para a verificação da formação de placa de lise.

Para a purificação dos bacteriófagos, placas de lise foram retiradas com auxílio de pipeta Pasteur e adicionadas a 5 mL de TSB juntamente com 500 µL do hospedeiro em fase logarítmica. Os tubos foram incubados a 30 °C por 24 h. As suspensões foram centrifugadas a 8.600·g por 10 min e filtradas em membrana hidrofílica PVDF com poro de 0,22 µm. Alíquotas de 100 µL do filtrado foram misturados com 100 µL do hospedeiro e adicionados a 5 mL de TSA 0,7 % semi-sólido usando a técnica de plaqueamento em sobrecamada de ágar, repetindo o ciclo de incubação, centrifugação e filtração três vezes, para garantir a pureza dos bacteriófagos isolados.

4.1.2 Propagação dos bacteriófagos

Para propagação dos bacteriófagos purificados, 1 mL do hospedeiro foi misturado com 1 mL da suspensão do bacteriófago e essa mistura foi deixada por 10 min a 30 °C, a fim de permitir a adsorção do bacteriófago à bactéria. Em seguida, foi realizada a técnica de plaqueamento em sobrecamada de ágar e as placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. Após esse período, as placas foram examinadas para visualização de placas de lise. Adicionou-se então, 3 mL de solução tampão SM [50 mM Tris-HCl [pH 7,5], (SIGMA®); 0,1 M NaCl (Vetec®); 8 mM MgSO₄ (Alphatec) e 0,01 % gelatina (Difco™)] à placa e incubou-se a 17 °C, sob agitação a 100 rpm em agitador por 24 h. O líquido foi coletado, centrifugado a 8.600·g por 10 min a 4 °C e filtrado em membrana hidrofílica PVDF com poro de 0,22 µm.

4.1.3 Titulação e estoque dos bacteriófagos

Para determinar a concentração dos bacteriófagos em suspensão, foram feitas diluições seriadas com 900 µL de tampão SM e 100 µL do filtrado da suspensão de bacteriófagos. Em seguida, foi realizado o plaqueamento utilizando a técnica de plaqueamento em sobrecamada de ágar, usando 100 µL do hospedeiro e 100 µL do da suspensão do bacteriófago. Após incubação, determinou-se o título dos bacteriófagos, mediante a contagem de placas de lises entre 10 e 100, expressos em Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP·mL⁻¹), de acordo com a equação 1:

$$\text{UFP.mL}^{-1} = \frac{\text{Número de placas de lise} * \text{fator de diluição}}{\text{Volume da alíquota (mL)}} \quad (\text{Equação 1})$$

Após a titulação, os bacteriófagos foram estocados em solução tampão SM, embalados em tubos de vidro esterilizados, envolvidos em papel alumínio e armazenados a 4 ± 1 °C, sendo periodicamente reativos dos estoques para utilização em estudos posteriores.

4.2 Avaliações da especificidade de hospedeiro

Para avaliar a especificidade dos bacteriófagos a diferentes micro-organismos foram utilizadas culturas fornecidas pela FIOCRUZ: *Yersinia kristensenii* INCQS 00560 (ATCC 33639), *Listeria monocytogenes* INCQS 00353 (ATCC 15313), *Pseudomonas fluorescens* INCQS 00077 (NCTC 10038), *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00026 (ATCC 25619), *Salmonella Typhimurium* INCQS 00150 (ATCC 14028), *Salmonella Enteritidis* INCQS 00258 (ATCC 13076), *Escherichia coli* INCQS 00180 (CDC0111ab), *E. coli* O157:H7 INCQS 00171 (ATCC 43895), *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* INCQS 00249 (ATCC 25904), *Campylobacter jejuni* INCQS 00262 (IOC/ATCC 33560), *Campylobacter coli* INCQS 00263 (ATCC 33559), e pelo LAMPOAH: *Campylobacter jejuni* (B12013).

A atividade lítica dos bacteriófagos isolados foi avaliada usando a técnica de microgota em superfície, conforme descrito por Hungaro et al., (2013). Um volume de 500 µL da bactéria em fase logarítmica foi misturado com 5 mL de

meio TSA semi-sólido, fundido aproximadamente a 45 °C e a mistura foi vertida em Placa de Petri contendo ágar base TSA sólido. Após solidificação do meio, pipetou-se 10 µL do bacteriófago com título de 10^8 UFP·mL⁻¹ sobre a superfície da placa contendo a bactérias. Após secagem das microgotas, as placas foram incubadas por 24 h, de acordo com a temperatura ótima de crescimento de cada micro-organismo. Indicou-se a especificidade do bacteriófago para a bactéria hospedeira mediante observação da formação de placas de lises. Foram feitas três repetições por cada micro-organismo alvo.

4.3 Análise morfológica dos bacteriófagos

Previamente à análise morfológica, foi realizada uma etapa de concentração dos bacteriófagos para aumentar a eficiência de visualização, segundo a técnica descrito por Sambrook e Russell (2001), com modificações. Em um tubo de polycarbonato (50 mL) foi adicionada uma camada de 3 mL de glicerol 40 %, sobre ela uma segunda camada de 4 mL de glicerol 5 % diluído em tampão SM; logo, foi adicionada uma terceira camada de 5 mL da suspensão de bacteriófago com título 10^8 UFP·mL⁻¹. Finalmente uma quarta camada de 1 mL de tampão SM foi adicionada. Os tubos foram centrifugados a 19.500·g (BECKMAN J2-MC, Brea – CA, EUA, rotor JA-20) por 2 h a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de tampão SM.

Uma alíquota de 10 µL da suspensão de cada bacteriófago concentrado foi depositada em superfícies de *grids* revestidos com Formvar carbono. Em cada *grid*, foi colocada uma gota do contraste acetato de uranila a 2 % (m/v) e depois do contato de 30 s com o bacteriófago, o excesso foi retirado com papel filtro. As *grids* contendo bacteriófagos foram secos a temperatura ambiente por 24 h e posteriormente visualizadas em Microscópio Eletrônica de Transmissão (MET) (Zeiss, EM 109 – trifásico) no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

4.4 Avaliação da estabilidade dos bacteriófagos

Com o propósito de determinar a estabilidade dos bacteriófagos em diferentes condições existentes na indústria de carnes, eles foram submetidos

a diferentes condições de pH, temperaturas, exposição à luz, sal, nitrato de potássio e sacarose. Após exposição, as soluções eram diluídas e tituladas para a determinação da concentração residual dos bacteriófagos. Foram feitas três repetições para cada experimento.

4.4.1 Viabilidade dos bacteriófagos em pH da carne suína *in natura*

Foi utilizado neste experimento um pH de 5,8 devido ao fato de este ser o pH final da carne após processo de transformação músculo-carne.

O teste foi realizado conforme metodologia adaptada de Albino et al. (2014). Uma alíquota de 100 µL de cada bacteriófago foi suspendida em 900 µL tampão SM acidificado com ácido láctico (1 %) até pH 5,8. A viabilidade dos bacteriófagos foi avaliada a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) após 60, 120 e 180 min até completar 180 min. Após cada intervalo de exposição, as amostras foram diluídas em tampão SM e foi feita a contagem de bacteriófagos mediante o plaqueamento pela técnica de plaqueamento em sobrecamada de ágar

4.4.2 Viabilidade dos bacteriófagos em diferentes temperaturas

A temperatura e o tempo utilizados neste ensaio foram baseados nas recomendações preconizadas por USDA (2013), nas quais se indica que um lombo suíno, para ser considerado cozido, deve atingir a temperatura interna de (62,8 °C) por um tempo de cozimento de (20 a 30) min por cada 500 g.

A avaliação da viabilidade dos bacteriófagos foi feita expondo três diferentes tubos (um para cada intervalo de tempo) contendo 10 mL de suspensão de bacteriófago, em banho maria (Solab, SL 150/22), mantido a (63 ± 1 °C) e fazendo-se a contagem de bacteriófagos, mediante o plaqueamento pela técnica de sobrecamada em ágar. A cada 10 min até 30 min retirou-se um tubo para o plaqueamento.

A viabilidade dos bacteriófagos quando estocados em temperatura de refrigeração (4 °C) foi avaliada por um período de 30 d. Esse tempo foi determinado baseado em pré-testes.

4.4.3 Viabilidade dos bacteriófagos quando expostos à luz branca

Avaliou-se a viabilidade dos bacteriófagos frente à exposição da luz branca (Lâmpada tubular, Megaforth®, 6.400 k 40 w), expondo tubos de vidro contendo 5 mL de solução com cada bacteriófago em dois pontos distantes 60 e 120 cm de uma fonte de luz, durante 720 h (30 dias) de luz, à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após esse período, foram feitas diluições seriadas das amostras em tampão SM e posteriores plaqueamentos pela técnica de plaqueamento em sobrecamada de ágar.

4.4.4 Viabilidade dos bacteriófagos em diferentes concentrações de cloreto de sódio

O teste de viabilidade de bacteriófagos em NaCl foi baseado em valores usados em formulações de diferentes produtos cárneos (RANKEN, 2000).

Uma alíquota de 100 µL de solução contendo cada bacteriófago foi suspendida em 900 µL tampão SM adicionada com cloreto de sódio (Vetec®) a $22 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (2,2 %) e $27 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (2,7 %). A viabilidade dos bacteriófagos foi avaliada em intervalos de 60 min até completar 180 min, a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após cada intervalo, as amostras foram diluídas em tampão SM e foi feita a contagem de bacteriófagos mediante o plaqueamento pela técnica de plaqueamento em sobrecamada de ágar.

4.4.5 Viabilidade dos bacteriófagos em solução de sacarose a 0,8 %

Avaliou-se a viabilidade dos bacteriófagos em solução de sacarose, baseados nas concentrações de açúcar de 0,5 a 1 % (LAWRIE, 2005; FAO, 2014). Para isto, 100 µL da suspensão de cada bacteriófago foi suspendida em 900 µL de uma solução tampão SM adicionado com sacarose (ISOFAR®) a $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (0,8 %). Foi determinado o título dos bacteriófagos em intervalos de 60 min até completar 180 mi, a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

4.4.6 Viabilidade dos bacteriófagos em diferentes valores de nitrato de potássio

Segundo a legislação brasileira, o limite máximo para uso do conservante nitrato de potássio em produtos cárneos é de 300 ppm (BRASIL, 1998), sendo que em alguns países recomendam sua diminuição de 300 para 150 ppm

(EFSA, 2003; FDA, 2014). Com base nessas informações, experimentou-se a viabilidade dos bacteriófagos nas concentrações de 150 e 300 ppm.

Adicionou-se uma alíquota de 100 µL de cada bacteriófago em 900 µL tampão SM em duas diferentes concentrações de nitrato de potássio (Reagen®): 0,15 mg·mL⁻¹ (150 partes por milhão, ppm) e 0,3 mg·mL⁻¹ (300 ppm). As suspensões foram avaliadas em intervalos de 60 min até completar 180 min, à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após cada intervalo de exposição, as amostras foram diluídas em tampão SM e foi feita a contagem de bacteriófagos mediante o plaqueamento pela técnica de sobrecamada em ágar.

4.5 Determinação de parâmetros cinéticos de um bacteriófago

Dentro dos bacteriófagos isolados, um foi selecionado para a determinação dos parâmetros cinéticos, mediante a realização da cinética de adsorção e a curva de crescimento em um só passo ou *One-step growth*, baseadas na metodologia de Popova et al. (2012), com modificações.

4.5.1 Determinação da cinética de adsorção do bacteriófago

Para determinar a cinética de adsorção, primeiro usou-se o cultivo de *Y. enterocolitica*, em fase exponencial de crescimento, com uma concentração suficiente para atingir a absorbância de 0,46 no comprimento de onda DO₆₀₀, ou seja, 10⁸ UFC·mL⁻¹. Em seguida, uma alíquota de 100 µL da bactéria foi diluída em 900 µL de tampão fosfato salino (PBS) (NaCl (Vetec®) 7,65 g·L⁻¹, Na₂HPO₄ anidro (NEON) 0,724 g·L⁻¹, KH₂PO₄ (Vetec ®) 0,210 g·L⁻¹, [pH 7,4]), até 10⁷ UFC·mL⁻¹.

Adicionou-se à suspensão da bactéria (10⁷ UFC·mL⁻¹) 1 mL da suspensão do bacteriófago (10⁴ UFC·mL⁻¹), caracterizando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,001. A mistura foi mantida em contato por 1, 2, 3, 4, 5 e 10 min a 30 °C. Após cada intervalo, alíquota de 100 µL foi transferida para um microtubo contendo 850 µL de tampão SM adicionado de 50 µL de clorofórmio (diluição 10⁻¹). Imediatamente, a suspensão foi centrifugada a 8.600·g por 10 min a 4 °C e recuperou-se o sobrenadante para fazer diluições seriadas em tampão SM e determinar o título dos bacteriófagos não adsorvidos (livres), usando a técnica de sobrecama em ágar.

Construiu-se o gráfico de porcentagem (%) de bacteriófagos livres em função do tempo de adsorção (min) para cada intervalo de tempo, utilizando a equação 2:

$$\% \text{ bacteriófagos livres} = \frac{Tf \cdot 100}{Ti} \quad (\text{Equação 2});$$

onde: Tf é final do bacteriófago (UFP·mL⁻¹), por cada intervalo de tempo; Ti , o título inicial do bacteriófago em contato com a bactéria.

A constante de adsorção foi calculada a partir da equação de regressão linear da relação entre o Ln de UFP·mL⁻¹ de bacteriófagos livres em função do tempo e expressa em mL·min⁻¹. A constante de adsorção é igual ao oposto da inclinação resultante (slope) dividida pela concentração de bactérias (N).

4.5.2 Determinação da curva de *One-step growth* do bacteriófago

Usou-se o cultivo de *Y. enterocolitica*, em fase exponencial de crescimento, com uma concentração suficiente para atingir a absorvância de 0,46 no comprimento de onda DO₆₀₀, ou seja, 10⁸ UFC·mL⁻¹.

Em microtubo, foi adicionado 1 mL de *Y. enterocolitica* (10⁸ UFC·mL⁻¹) e centrifugou-se a 13.000·g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso e homogeneizado em 500 µL de TSB complementado com 500 µL do bacteriófago (10⁶ UFP·mL⁻¹, MOI 0,01). Após um intervalo de 4 min a 30 °C, a mistura foi centrifugada a 13.000·g por 1 min a 4 °C. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e realizou-se diluições seriadas em tampão SM para determinar o número de bacteriófagos não adsorvidos usando a técnica de plaqueamento de sobrecama em ágar. Simultaneamente, o precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de TSB e deixado a 30 °C sob agitação (100 rpm). A partir do tempo 0 e em intervalos de 5 min até completar 90 min, foram retiradas alíquotas de 100 µL e feitas diluições seriadas em tampão SM, para fazer a titulação dos bacteriófagos usando a técnica de sobrecama em ágar.

Construiu-se o gráfico da curva de crescimento *One-step growth*, a partir das unidades formadoras de placa liberadas por célula infectada (UFP/célula

infectada) produzidas em cada intervalo de tempo (0 a 90 min), conforme descrito nas as equações 4 e 5.

$$\text{Bacteriófagos adsorvidos} = \frac{T_i - T_f}{\text{Vol (mL)}} \quad (\text{Equação 4});$$

onde: T_i , é o título inicial do bacteriófago ($\text{UFP} \cdot \text{mL}^{-1}$), colocado em contato com a bactéria. T_f , é o título dos bacteriófagos não adsorvidos ($\text{UFP} \cdot \text{mL}^{-1}$) e o Vol (mL), é o volume da ressuspensão de bactérias infectadas (5 mL).

$$\text{UFP/Célula infectada} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de bacteriófagos livres}) - (\text{n}^\circ \text{ de bacteriófagos livres no Tempo "0"})}{\text{n}^\circ \text{ de bacteriófagos adsorvidos}} \quad (\text{Equação 5})$$

O período de latência e o *burst size* foram definidos a partir do gráfico da curva de crescimento One-step growth do bacteriófago.

4.6 Ação do coquetel de bacteriófagos no biocontrole para *Y. enterocolitica* em carne suína

Na avaliação dos bacteriófagos no biocontrole de *Y. enterocolitica*, foi utilizado um coquetel contendo os bacteriófagos isolados, em quantidades equimolares para cada tratamento. A carne utilizada foi o lombo suíno (*Longissimus dorsi*), adquirida do estabelecimento comercial denominado “Funarbinha”, da UFV.

A fim de garantir que a contaminação do alimento seja apenas por *Y. enterocolitica*, a descontaminação da carne foi feita segundo a metodologia adaptada de Silva et al. (2016). Peças de lombo suíno (*Longissimus dorsi*) foram primeiramente expostas à radiação ultravioleta por 30 min para a descontaminação das superfícies. Após 15 min iniciais, as peças foram viradas para que a incidência de radiação fosse uniforme. Em seguida, as superfícies foram cortadas com ajuda de um bisturi estéril e descartadas, utilizando para o experimento a carne com a superfície descontaminada (Figura 3).



Figura 3. Descontaminação do lombo suíno (*Longissimus dorsi*). **a.** Exposição à radiação UV. **b.** corte da superfície.

Foram coletados pedaços de carne antes da realização dos procedimentos experimentais, para avaliar o processo de descontaminação.

4.6.1 Procedimentos experimentais

Pedaços de carne de 10 g com dimensões aproximadas de 5 cm de comprimento, 3 cm de largura e 1 cm de profundidade (Figura 4a) foram cortadas e distribuídas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto por quatro tratamentos, com três repetições por tratamento, segundo Tabela 1.

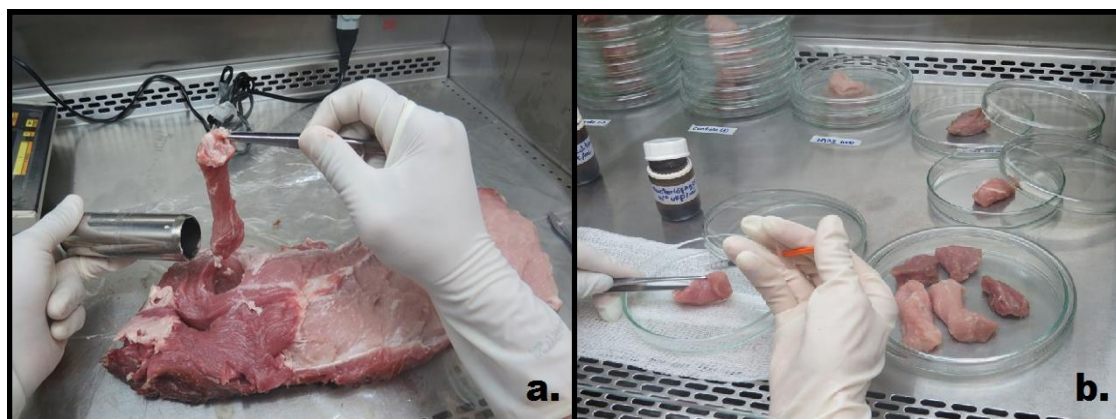


Figura 4. Corte e aplicação dos tratamentos nas amostras. **a.** Corte dos pedaços de lombo suíno com ajuda de um vazador de aço inox. **b.** aplicação dos tratamentos.

Tabela 1. Tratamentos aplicados no lombo suíno (*Longissimus dorsi*).

Tratamento	<i>Y. enterocolitica</i> (UFC·g ⁻¹)	Bacteriófagos (UFP·g ⁻¹)	MOI
T1 (C-)	Sem inóculo	Sem inóculo	-----
T2 (C+)	10 ⁵	Sem inóculo	-----
T3	10 ⁵	10 ⁸	1000
T4	10 ⁵	10 ¹⁰	100000

(C+) controle negativo, (C-) controle positivo.

As amostras foram inoculadas de forma homogênea com 1 mL de suspensão bacteriana (10⁵ UFC·mL⁻¹) e mantidos por 20 min em local asséptico, garantindo a difusão bacteriana por toda superfície. Para os ensaios de biocontrole, as amostras do tratamento 3 (T3) e tratamento 4 (T4) foram inoculadas também com 1 mL da suspensão do coquetel contendo os bacteriófagos distribuído pelas faces da carne, procurando homogeneizar sua distribuição, e logo foram mantidas por 20 min em local asséptico (Figura 4b). Retirou-se uma amostra de cada tratamento para controle microbiológico (contagem inicial) da bactéria e do coquetel de bacteriófagos.

Depois de feitas as inoculações dos tratamentos, as amostras foram embaladas em sacos plásticos esterilizados e armazenados por 10 d, nas temperaturas de 4 °C e 15 °C. As análises microbiológicas foram feitas nos tempos 2, 5, 7 e 10 d.

4.6.2 Contagem de bacteriófagos

Foram coletadas amostras dos tratamentos 3 e 4 para contagem inicial de bacteriófagos. Para análise microbiológica, 10 g da amostra foram homogeneizadas com 90 mL de tampão SM durante 6 min. Retirou-se uma alíquota de 1 mL para centrifugação a 8.600·g por 10 min a 4 °C e posteriormente filtrou-se em membrana hidrofílica PVDF com poro de 0,22 µm. A partir da diluição 10⁻¹, foram feitas diluições seriadas com 900 µL de tampão SM e 100 µL do filtrado. Fez-se o plaqueamento usando a técnica de plaqueamento em sobrecamada de ágar. As placas foram incubadas a 30 °C

por 24 h. Após o período foi determinado o título dos bacteriófagos nos tratamentos.

4.6.3 Contagem de *Y. enterocolitica*

A metodologia utilizada para contagem de *Y. enterocolitica* foi a espalhamento em superfície. Em homogeneizador, 10 g de carne com 90 mL tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) foram homogeneizadas por 6 min e feitas diluições decimais da amostra. Posteriormente, foram feitos plaqueamentos em duplicata, utilizando uma alíquota de 100 µL da diluição espalhada em Placa de Petri contendo ágar MacConkey (HIMEDIA®). As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. Após esse período, procedeu-se a contagem das colônias (1-2 mm de diâmetro, planas, incolores, ou levemente rosadas). O resultado foi expresso em UFC·g⁻¹ e convertido em escala logarítmica (log₁₀ UFC·g⁻¹) para as análises estatísticas.

4.7 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados utilizando o software R, versão 3.3.1, pacote de dados ExpDes, (The R Fundation, Vienna, Austria).

As comparações das medias dos tratamentos feitos na avaliação da estabilidade dos bacteriófagos, foram avaliadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

As comparações das medias dos tratamentos feitos no biocontrole dos bacteriófagos em carne suína, foram avaliadas pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e propagação de bacteriófagos

Das 18 amostras analisadas, seis (33,3 %) apresentaram bacteriófagos específicos para *Y. enterocolitica* (ATCC® 9610™), sendo todas de origem de fezes de aves. O resultado é relativamente alto se comparado com os resultados obtidos por Salem et al. (2014), que encontraram bacteriófagos para *Y. enterocolitica* em apenas 11,35 % de 793 amostras de fezes de suínos coletadas na Finlândia.

Das oito amostras de fezes de aves, 75 % foram positivas na presença de bacteriófagos para a bactéria, determinada mediante a visualização de formação de placa de lise sobre a superfície de placas de ágar TSA contendo o hospedeiro *Y. enterocolitica* ATCC® 9610™ (Figura 5). Observou-se que as placas de lises eram pequenas, translúcidas e com ausência de colônias isoladas no seu interior, com forma circular e bordas regulares, sem formação de halo.

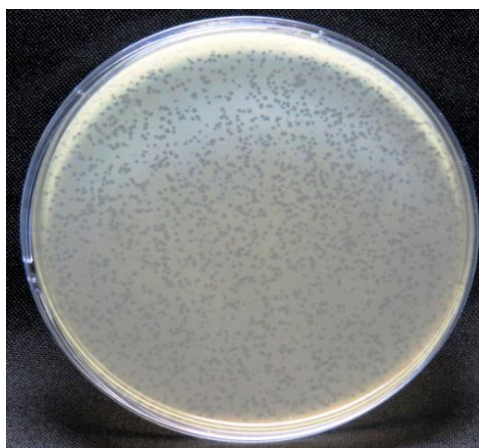


Figura 5. Placas de lises dos bacteriófagos isolados, formadas mediante a técnica de plaqueamento em sobrecamada de ágar.

Na propagação dos seis bacteriófagos observou-se em várias ocasiões que em três deles havia formação de colônias bacterianas sobre o ágar. Tais bacteriófagos foram descartados, pois poderiam ser lisogênicos ou gerar resistência pelo hospedeiro.

Durante a pesquisa foi necessário fazer propagações sucessivas de cada bacteriófago isolado a fim de alcançar o título de 10^{12} UFP.mL⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 2. Título dos bacteriófagos isolados, após as propagações.

Bacteriófago	Titulação (UFP·mL ⁻¹)
BFYe1	4,8 x 10 ¹²
BFYe2	2,3 x 10 ¹²
BFYe6	7,6 x 10 ¹¹

5.2 Avaliação de especificidade dos bacteriófagos selecionados

Nenhuma lise foi observada quando se avaliou o comportamento lítico dos bacteriófagos frente aos micro-organismos avaliados, mostrando especificidade para a estirpe *Y. enterocolitica* testada. Resultados semelhantes foram encontradas por Kasatiya e Ackermann (1986), que demonstraram a alta especificidade dos bacteriófagos para *Yersinia*.

Uma alta especificidade dos bacteriófagos para *Yersinia* foi demonstrada pelo estudo de Popp et al. (2000), na qual avaliaram oito bacteriófagos frente a 132 cepas de gênero *Yersinia*. Nenhum dos bacteriófagos infectou mais de uma espécie do gênero *Yersinia* e alguns bacteriófagos foram soro específicas. Os autores relatam que a especificidade entre a mesma espécie pode ser devido à variedade dos antígenos O da superfície bacteriana, que podem servir como receptores para os bacteriófagos. Hertwig et al. (1999), também relataram que os bacteriófagos possivelmente podem usar os antígenos O da superfície da membrana celular de *Y. enterocolitica* como receptores. Eles avaliaram a atividade lítica de 14 bacteriófagos (isolados a partir de *Y. enterocolitica* O: 3 e O: 5,27) em 62 outras cepas do gênero *Yersinia* patogênicas e não patogênicas. Destes, apenas 11 bacteriófagos não foram ativos para *Y. enterocolitica* não patogênica, do biogrupo 1A, isso talvez por não ter o mesmo antígeno O da *Y. enterocolitica* da qual foram isolados.

Resultados encontrados por Pajunem et al. (2000) demonstraram que a especificidade do bacteriófago ϕ YeO3-12 para *Yersinia* se deve às características do antígeno da bactéria. Inicialmente, a bactéria hospedeira deste bacteriófago foi *Y. enterocolitica* O:3 e seu antígeno O é um

homopolímero de 6-deoxi-L-altropiranoze. Ao testar a especificidade com aproximadamente 300 estirpes do gênero *Yersinia*, os resultados mostraram que o bacteriófago ϕ YeO3-12 era específico em *Y. enterocolitica* O:1, O:2 e O:3; ou seja, os sorotipos com antígeno O que contêm o 6-deoxi-L-altropiranoze, sendo também sensíveis *Yersinia frederiksenii* sorotipo O: 3 e *Yersinia mollaretii* sorotipo O: 3.

Leon-Velarde et al. (2016) descreveram que os bacteriófagos estudados empregavam os LPS e as proteínas da membrana externa da porina OmpF (proteínas que permitem a difusão passiva de pequenas moléculas através da membrana externa da bactéria) como receptores para a união com a bactéria, características determinadas como fator limitante na especificidade dos bacteriófagos para *Y. enterocolitica*.

5.3 Análise da morfologia dos bacteriófagos

Foi observada a morfologia dos bacteriófagos selecionados por meio de MET. Os bacteriófagos isolados possuem capsídeo de simetria icosaédrica com contorno hexagonal, pescoço e cauda longa, contrátil, com estrias transversais (Figura 6).

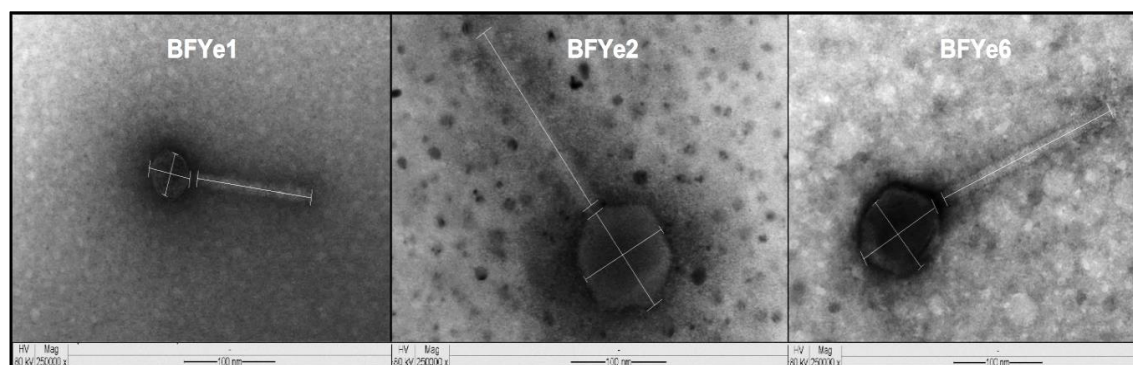


Figura 6. Fotomicrografias eletrônicas dos bacteriófagos para *Y. enterocolitica*. As linhas determinam os pontos das medidas em nm.

Segundo as características visualizadas, os bacteriófagos podem ser classificados como pertencente à ordem *Caudovirales* e família *Myoviridae*.

Dentro das características da família *Myoviridae*, existem morfotipos A1 (com C/L < de 1,2), A2 (1,2 – 1,4) e A3 (2,4), que são determinados baseados na relação do comprimento/largura dos bacteriófagos. O bacteriófago BFYe1

foi classificado no morfotipo A1 e os bacteriófagos BFYe2 e BFYe6 foram classificados no morfotipo A2 (Tabela 3).

Tabela 3. Medidas das estruturas dos bacteriófagos (nm).

Bacteriófagos	Cabeça (nm)			Cauda (nm)		Pescoço (nm)
	C	L	Relação C/L	C	L	C
BFYe1	43,50	39,92	1,1	120,52	14,32	7,43
BFYe2	106,70	92,37	1,2	198,28	17,44	9,76
BFYe6	89,80	76,94	1,2	192,87	13,73	11,13

C: comprimento, L: largura.

Estudos realizados por Hertwig et al. (1999) e Kasatiya e Ackermann (1986), também encontraram isolados de bacteriófagos de águas residuárias, pertencentes a família *Myoviridae*, classificados nos morfotipos A1 e A2. Na literatura pesquisada, não foram encontrados estudos com classificação no morfotipo A3, para bacteriófagos de *Yersinia*.

Dentro da ordem *Caudovirales*, além da classificação dos bacteriófagos em famílias, existem outros níveis taxonômicos tais como subfamílias, gêneros e espécies (ICTV, 2015). A família *Myoviridae* é composta de 3 subfamílias e 29 gêneros que não estão classificados em subfamílias. Até hoje, 5 espécies de bacteriófagos para o gênero *Yersinia* estão classificados no ICTV, todos eles dentro da família *Myoviridae*. Apenas dois bacteriófagos *Yersinia vírus R1RT* e *Yersinia vírus TG1* para *Y. enterocolitica* foram caracterizados (Leonvelarde et al. 2016) e classificados pelo ICTV dentro da família *Myoviridae* e no gênero *Tg1*.

Assim, estudos complementares como análise de sequencia, são necessários para categorizar mais amplamente os bacteriófagos desta pesquisa.

5.4 Viabilidade dos bacteriófagos

5.4.1 Viabilidade dos bacteriófagos em pH da carne suína.

O bacteriófago que apresentou maior sensibilidade ao pH testado foi o BFYe1, com redução de 1,48 ciclos logarítmicos, seguido por BFYe2. A maior redução da viabilidade destes bacteriófagos se deu nos primeiros 60 min de exposição, e não houve diferenças significativas na concentração dos bacteriófagos após este período. (Tabela 4).

Tabela 4. Estabilidade dos bacteriófagos após exposição a pH 5,8 por 180 min.

Bacteriófago	Médias $\log_{10}$ PFU·mL ⁻¹					
	Tempo (min)					
	0	60	R1	120	180	RT
BFYe1	8,72 ^a ± 0,15	7,38 ^b ± 0,26	1,34	7,31 ^b ± 0,30	7,24 ^b ± 0,32	1,48
BFYe2	8,67 ^a ± 0,11	7,73 ^b ± 0,23	0,94	7,66 ^b ± 0,22	7,27 ^b ± 0,23	1,40
BFYe6	8,08 ^a ± 0,09	7,99 ^a ± 0,06	0,09	7,87 ^{ab} ± 0,03	7,37 ^b ± 0,27	0,71

Valores médios de $\log_{10}$ PFU·mL⁻¹ seguidos pelo desvio padrão (±). Os dados acompanhados pela mesma letra entre linhas não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de significância de 5 %. R1, redução ciclos logarítmicos entre o tempo 0 e 60 min; RT, redução final de ciclos logarítmicos desde o tempo 0 até o 180 min.

O pH da carne *in natura* afetou a viabilidade dos bacteriófagos nas condições avaliadas (protegidos da luz e estocados em tampão SM), mas isso não limita seu uso. Todavia estudos conduzidos por JUN et al. (2013) e Albino (2014), avaliaram bacteriófagos para *Shigella* e *Salmonella* quando expostos em condições de pH 2, 3 e 4, mostrando perda da viabilidade dos bacteriófagos em pH baixos. Esses resultados podem ser similares para os bacteriófagos de *Y. enterocolitica*, provavelmente, dada a característica proteica do capsídeo.

5.4.2 Viabilidade dos bacteriófagos em diferentes temperaturas

A viabilidade dos bacteriófagos foi avaliada quando estocados à temperatura de refrigeração por 30 d e na temperatura de cozimento da carne por 30 min. O bacteriófago que apresentou maior estabilidade quando estocado a 4 °C foi o BFYe6, seguido por BFYe1 0,47 e BFYe2 (Tabela 5).

Tabela 5. Estabilidade dos bacteriófagos após estocagem a 4 °C por 30 dias.

Bacteriófago	Médias log ₁₀ PFU·mL ⁻¹		Redução (Ciclos log)
	Tempo (d)		
	0	30	
BFYe1	8,72 ^a ± 0,15	8,25 ^b ± 0,35	0,47
BFYe2	8,69 ^a ± 0,11	8,17 ^b ± 0,12	0,52
BFYe6	8,08 ^a ± 0,09	7,73 ^b ± 0,10	0,35

Valores médios de $\log_{10}$ PFU·mL⁻¹ seguidos pelo desvio padrão (±). Os dados acompanhados pela mesma letra entre linhas não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de significância de 5 %.

A diminuição da viabilidade dos bacteriófagos nessa temperatura provavelmente tenha ocorrido devido a alterações nas estruturas morfológicas das unidades virais. Thorne e Holt (1974), observaram que um bacteriófago para *Bacillus* diminuía sua atividade lítica após 144 h de armazenamento em condições de refrigeração. Eles avaliaram por MET as estruturas morfológicas das partículas virais antes e depois do período de estocagem e observaram que antes da estocagem, as caudas estavam relaxadas e após o armazenamento, os vírus tinham as caudas contraídas. Essa característica, juntamente com a perda de infectividade do bacteriófago, aumentava à medida que se prolongava o período de estocagem.

Normalmente, a cauda do bacteriófago se mantém relaxada antes da adsorção com o hospedeiro e contraída no momento da interação com a parede celular. Alguns autores sugerem que isso se deve ao fato de que o bacteriófago pode apresentar em sua estrutura proteínas de composição similar à actimiosina, que é responsável pela contração muscular (KOZLOFF e LUTE, 1959; ARISAKA, F. e KANAMARU, 2013). Uma possível justificativa para a contração da cauda do bacteriófago em condições de refrigeração seria a presença de proteínas semelhantes à actimiosina que, em baixas temperaturas, se contraem, realizando uma possível injeção do material genético no meio, o que poderia explicar a perda de viabilidade do bacteriófago. Sendo assim, mais estudos relacionados à proteômica de bacteriófagos devem ser realizados a fim de se comprovar esses mecanismos.

Na temperatura de cozimento (63 °C) foi possível determinar a viabilidade dos três bacteriófagos até 10 min. A partir 20 min não foram observadas placa de lises, (Tabela 6).

Tabela 6. Estabilidade dos bacteriófagos após exposição a 63 °C por 10 min.

Bacteriófago	Médias log ₁₀ PFU·mL ⁻¹		Redução (Ciclos log)
	Tempo (min)		
	0	10	
BFYe1	8,72 ^a ± 0,15	1,83 ^b ± 0,07	6,89
BFYe2	8,69 ^a ± 0,11	1,62 ^b ± 0,11	7,07
BFYe6	8,08 ^a ± 0,09	1,16 ^b ± 0,31	6,92

Valores médios de log₁₀ PFU·mL⁻¹ seguidos pelo desvio padrão (±). Os dados acompanhados pela mesma letra entre linhas não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de significância de 5 %.

Resultados semelhantes foram encontrados por Tovkach et al. (2012). Esses autores observaram a diminuição de 99,4 % na viabilidade do bacteriófago de nos primeiros 5 min a temperatura constante de 53 °C. Os pesquisadores comprovaram por micrografias que os bacteriófagos apresentavam cabeças vazias, bem como foi observado que algumas cabeças estavam totalmente destruídas.

O motivo da perda de viabilidade dos bacteriófagos em altas temperaturas pode ser devido à liberação do genoma viral causada por alguma lesão dos capsômeros da cápside ou rompimento da mesma, pois o aumento de energia cinética das moléculas desestabiliza as interações intra e extramoleculares, desorganizam o envoltório de proteínas, levando à desnaturação (DUDA et al. 2009; QIU, 2012; BAUER et al. 2015).

A temperatura foi um fator importante na inviabilidade dos bacteriófagos isolados, sendo totalmente inativados a 63 °C por um tempo inferior a 20 minutos de exposição. Isto pode ser um fator favorável para o uso de bacteriófagos no biocontrole de *Y. enterocolitica* em carne suína *in natura*, pois poderia reduzir a rejeição dos consumidores a adição dos vírus no alimento. Assim, a inativação dos bacteriófagos pela temperatura de cozimento da carne levaria a uma maior aceitação do consumidor no seu uso em alimentos.

5.4.3 Viabilidade dos bacteriófagos frente à exposição da luz branca

Os bacteriófagos que apresentaram de maior a menor estabilidade na distância de 60 cm da luz branca foram o BFYe6 (Tabela 7).

Tabela 7. Estabilidade dos bacteriófagos após exposição à luz branca por 30 d.

Bacteriófago	Luz branca (cm)	Médias log ₁₀ PFU·mL ⁻¹		Redução (Ciclos log)
		Tempo (d)		
		0	30	
BFYe1	60	8,72 ^a ± 0,15	5,90 ^b ± 0,23	2,82
	120	8,72 ^a ± 0,15	8,04 ^b ± 0,17	0,68
BFYe2	60	8,69 ^a ± 0,11	5,83 ^b ± 0,09	2,86
	120	8,69 ^a ± 0,11	8,11 ^b ± 0,07	0,58
BFYe6	60	8,08 ^a ± 0,09	7,0 ^b ± 0,19	1,08
	120	8,08 ^a ± 0,09	7,70 ^b ± 0,18	0,38

Valores médios de $\log_{10}$ PFU·mL⁻¹ seguidos pelo desvio padrão (±). Os dados acompanhados pela mesma letra entre linhas não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de significância de 5 %.

A sensibilidade dos bacteriófagos à luz branca foi estudada por Iriarte et al. (2007), que testaram a influência da luz fluorescente sobre o bacteriófago ϕ Xacm 2004-16, mostrando que a luz afetava a viabilidade do bacteriófago, dependendo ou não de algum tipo de proteção.

Os resultados encontrados nessa pesquisa demonstraram que os bacteriófagos são sensíveis à luz branca e existe uma correlação significativa entre a distância da luz e a estabilidade dos bacteriófagos. A concentração dos bacteriófagos diminuía a medida que estavam mais próximos da luz branca. Assim, se os bacteriófagos forem utilizados para o biocontrole de *Y. enterocolitica* em carne *in natura*, quanto mais afastados da fonte de luz, maior será o período de eficiência.

5.4.4 Viabilidade dos bacteriófagos a sacarose e cloreto de sódio

Observou-se a viabilidade dos bacteriófagos quando expostos a cloreto de sódio nas concentrações de 2,0 e 2,7 % (Tabela 8) e sacarose 0,8 % (Tabela 9).

Tabela 8. Estabilidade dos bacteriófagos após exposição a soluções salinas, por 180 min.

Bacteriófago	NaCl (%)	Médias log ₁₀ PFU·mL ⁻¹				Redução (Ciclos log)
		Tempo (min)				
		0	60	120	180	
BFYe1	2	8,72 ^a ± 0,15	7,66 ^b ± 0,15	7,61 ^b ± 0,12	7,35 ^b ± 0,21	1,37
	2.7	8,72 ^a ± 0,15	7,68 ^b ± 0,19	7,38 ^b ± 0,21	7,19 ^b ± 0,16	1,53
BFYe2	2	8,69 ^a ± 0,11	7,69 ^b ± 0,14	7,64 ^b ± 0,11	7,56 ^b ± 0,15	1,13
	2.7	8,69 ^a ± 0,11	7,71 ^b ± 0,05	7,67 ^b ± 0,05	7,47 ^b ± 0,11	1,22
BFYe6	2	8,08 ^a ± 0,09	7,82 ^a ± 0,14	7,70 ^b ± 0,25	7,71 ^b ± 0,11	0,37
	2.7	8,08 ^a ± 0,09	7,86 ^a ± 0,11	7,71 ^{ab} ± 0,14	7,21 ^b ± 0,24	0,87

Valores médios de $\log_{10}$ PFU·mL⁻¹ seguidos pelo desvio padrão (±). Os dados acompanhados pela mesma letra entre linhas não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de significância de 5 %.

Nos bacteriófagos BFYe1 e BFYe2 houve maior redução nos primeiros 60 min de exposição as soluções contendo NaCl. Após esse período, não se observou diferenças significativas. Na exposição ao cloreto de sódio a 2 % (0,8 M) e 2,7 % (1,1 M), o bacteriófago BFYe1 apresentou maior redução da viabilidade. O bacteriófago que mostrou maior estabilidade de exposição ao NaCl foi o BFYe6, quando expostos a 2 % e 2,7 % de NaCl.

Com relação a exposição à sacarose, o bacteriófago que apresentou maior estabilidade foi o BFYe6, seguido por BFYe1 e finalmente o BFYe2 (Tabela 9).

Tabela 9. Estabilidade dos bacteriófagos após exposição à solução de sacarose (0,8 %).

Bacteriófago	Médias log ₁₀ PFU·mL ⁻¹				Redução (Ciclos log)
	Tempo (Min)				
	0	60	120	180	
BFYe1	8,72 ^a ± 0,15	7,69 ^b ± 0,16	7,48 ^b ± 0,23	7,38 ^b ± 0,12	1,34
BFYe2	8,69 ^a ± 0,11	7,61 ^b ± 0,16	7,18 ^b ± 0,36	7,08 ^b ± 0,34	1,61
BFYe6	8,08 ^a ± 0,09	7,78 ^{ab} ± 0,11	7,73 ^{ab} ± 0,12	7,62 ^b ± 0,14	0,46

Valores médios de $\log_{10}$ PFU·mL⁻¹ seguidos pelo desvio padrão (±). Os dados acompanhados pela mesma letra entre linhas não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de significância de 5 %.

Whitman e Marshall (1971) estudaram a influência de sacarose (2 M) e cloreto de sódio (4 M) na redução da viabilidade em dois bacteriófagos para *Pseudomonas*. Eles encontraram nestas concentrações perda de viabilidade dos bacteriófagos.

As quantidades de sal e açúcar utilizadas neste estudo apresentaram reduções significativas dos bacteriófagos, mas não limita seu uso. Portanto, esses aditivos comumente empregados em produtos cárneos, podem ser adicionados juntamente com bacteriófagos.

5.4.5 Viabilidade dos bacteriófagos em diferentes valores de nitrato de potássio

Observou-se a viabilidade dos bacteriófagos em duas concentrações de nitrato de potássio durante 3 h de exposição (Tabela 10).

O bacteriófago BFYe1 apresentou maior redução de ciclos logarítmicos, para 150 e 300 ppm de KNO₃. O bacteriófago que mostrou maior estabilidade quando exposto a KNO₃ nas concentrações de 150 e 300 ppm, foi o BFYe6.

Tabela 10. Estabilidade dos bacteriófagos após exposição das concentrações de nitrato de potássio.

Bacteriófago	KNO ₃ (ppm)	Médias log ₁₀ PFU·mL ⁻¹				Redução (Ciclos log)
		Tempo (min)				
		0	60	120	180	
BFYe1	150	8,72 ^a ± 0,15	7,18 ^b ± 0,13	7,04 ^b ± 0,18	6,84 ^b ± 0,05	1,88
	300	8,72 ^a ± 0,15	6,87 ^b ± 0,18	6,70 ^b ± 0,32	6,64 ^b ± 0,16	2,08
BFYe2	150	8,69 ^a ± 0,11	7,48 ^b ± 0,24	7,25 ^b ± 0,16	7,14 ^b ± 0,17	1,55
	300	8,69 ^a ± 0,11	7,08 ^b ± 0,19	6,97 ^b ± 0,11	6,75 ^b ± 0,15	1,94
BFYe6	150	8,08 ^a ± 0,09	7,71 ^b ± 0,15	7,56 ^{bc} ± 0,05	7,33 ^c ± 0,01	0,75
	300	8,08 ^a ± 0,09	7,24 ^b ± 0,16	7,12 ^b ± 0,20	7,03 ^b ± 0,08	1,05

Valores médios de log₁₀ PFU·mL⁻¹ seguidos pelo desvio padrão (±). Os dados acompanhados pela mesma letra entre linhas não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ao nível de significância de 5 %.

O nitrato de potássio nestas concentrações causou uma significativa redução na concentração dos bacteriófagos. Se os bacteriófagos são usados em produtos cárneos onde é adicionado o nitrato de potássio, este composto

poderia ser um fator importante na diminuição da viabilidade dos bacteriófagos, sendo mais evidente a redução quando se emprega a maior concentração do composto.

As reduções da viabilidade dos bacteriófagos nos diferentes testes de estabilidade, não seriam um fator limitante no seu uso na indústria de alimentos, pois esse efeito pode ser revertido com adição de maiores concentrações de bacteriófagos no alimento, para compensar as perdas.

5.5 Determinação de parâmetros cinéticos do bacteriófago BFYe6

Foi estudado o ciclo de infecção do bacteriófago BFYe6 sobre *Y. enterocolitica* (ATCC 9610), a partir da curva de cinética de adsorção e curva de crescimento em um passo ou *One-step growth* (Figura 7).

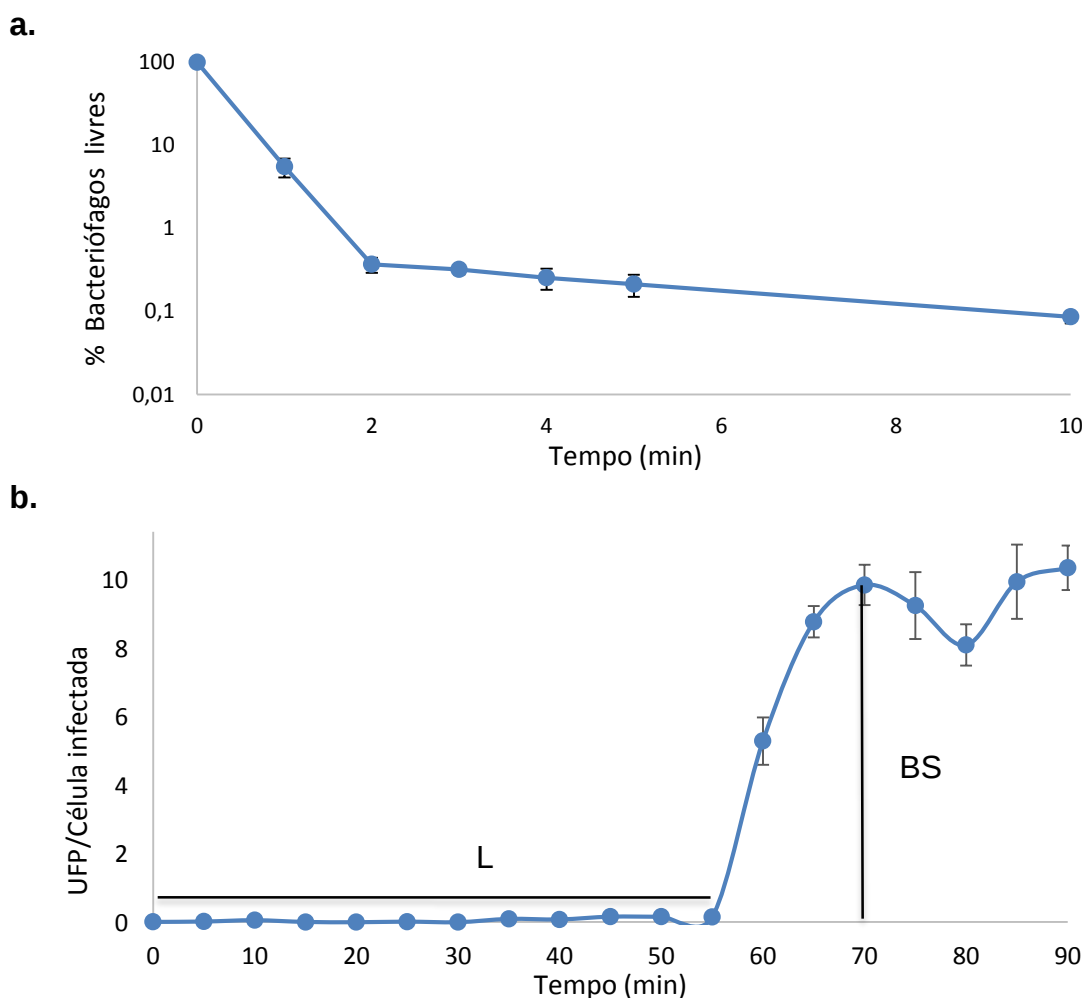


Figura 7. Representação gráfica dos parâmetros cinéticos do bacteriófago BFYe6 a 30 °C, sobre *Y. enterocolitica* (ATCC 9610). **a.** Curva de cinética de adsorção. **b.** Curva de *One-step growth*, com indicação de estimativa de *burst size* (BS) e período de latência (L).

No primeiro minuto de contato entre o bacteriófago e a bactéria o 94,5 % dos bacteriófagos livres adsorveram, enquanto que no 10º minuto o 99,9 % dos bacteriófagos estavam adsorvidos (Figura 7a). Segundo os resultados, a constante de adsorção (k) do bacteriófago BFYe6 à *Y. enterocolitica* foi de $2,972 \cdot 10^{-9} \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Valores de constante de adsorção para bacteriófagos normalmente variam de 10^{-8} - $10^{-9} \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (HYMAN e ABEDON, 2009).

Foi determinado o período de latência e o *bust size*, a partir da curva *one-step growth*, (Figura 7b). O período de latência do bacteriófago BFYe6 foi de 55 min, seguido pelo período do aumento da concentração de partículas de bacteriófagos no meio extracelular, até chegar numa constância de concentração dos bacteriófagos. A média do tamanho da explosão ou *bursts size* foi de 10 a 11 UFP por célula infectada.

Em estudos realizados com bacteriófagos para *Y. enterocolitica*, Kiljunen et al. (2005), trabalharam com o bacteriófago Φ R1-37, da família *Myioviridae* e a estirpe YeO3-R, encontraram que o período de latência foi de 50 min. No entanto, os autores encontraram um *burst size* de aproximadamente 80 UFP por célula infectada, sendo um valor dez vezes maior ao comparado com o *burst size* do bacteriófago BFYe6. Em um estudo conduzido por Pajunen et al. (2000) com a bactéria 6471/76 (YeO3) e o bacteriófago Φ YeO3-12 da família *Podoviridae*, foi encontrado um *burst size* de 100 a 140 UFP por célula infectada, com o período de latência de 25 min. Na realização da curva *One-step growth*, os autores deixaram adsorverem os bacteriófagos na bactéria em um período de 5 min, utilizando MOI de 0,0005.

Resultados similares no *burst size* de bacteriófagos pertencentes à família *Myioviridae* foram encontrados por Garbe et al. (2010), os quais trabalharam com o bacteriófago JG004, para *P. aeruginosa*. Os autores encontraram resultados de 13 UFP por célula infectada com um período de latência de 40 min. Carvalho et al. (2010), relataram que o bacteriófago ϕ CcolBB37 para *Campylobacter* apresenta um *burt size* de 9 UFP por célula infectada.

A atividade dos bacteriófagos nas bactérias hospedeiras depende tanto do vírus, como do estado fisiológico e funções celulares do micro-organismo

hospedeiro (YOU et al. 2002). A quantidade de bacteriófagos liberados no *bust size* pode ser influenciada pelo tamanho do micro-organismo hospedeiro, podendo ser menor a liberação da progênie em bactérias de menor tamanho (WEINBAUER e PEDUZZI, 1994; YOU et al. 2002).

Storms et al. (2014), pesquisaram a Influência do crescimento das bactérias hospedeiras no bacteriófago T4 e concluíram que organelas intracelulares devem estar disponíveis em quantidades maiores para formação das partículas virais no hospedeiro e assim poder aumentar a produtividade dos bacteriófagos.

5.6 Avaliação do coquetel contendo os bacteriófagos no biocontrole para *Y. enterocolitica* em carne suína

Uma quantidade inicial de *Y. enterocolitica* de $4,48 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ foi inoculada em cada pedaço de carne suína, assim como um coquetel contendo os bacteriófagos BFYe1, BFYe2 e BFYe6 em quantidades equimolares de $7,40 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ para o tratamento 3 (T3) e $9,72 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ para o tratamento 4 (T4).

5.6.1 Avaliação do biocontrole de bacteriófagos a 4 °C

A carne inoculada com *Y. enterocolitica*, após 10 dias de estocagem a 4 °C, alcançou contagens de $8,08 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ dessa bactéria (Tabela 11).

A adição de coquetel de bacteriófagos nos MOIs 1000 (T3) e 100000 (T4) a 4 °C inicialmente (até o dia 2) reduziu o número de *Y. enterocolitica* em 0,60 e 0,81 ciclos logarítmicos nos T3 e T4, respectivamente. No T3, apesar de ter ocorrido crescimento bacteriano contendo o coquetel de bacteriófagos, houve uma redução significativa da contagem do micro-organismo, nos tempos 5, 7 e 10 d. O T4 somente até o dia 10 foi capaz de controlar o crescimento da bactéria de forma estatisticamente significativa.

Em relação ao T3, houve diminuição nos valores de 1,18, 0,76 e 0,94 ciclos logarítmicos nos dias 5, 7 e 10, respectivamente. No T4, houve diminuição de 0,83 ciclos logarítmicos no dia 10. Assim, a partir do dia 5 de estocagem da carne, o tratamento contendo bacteriófagos em menor

concentração (T3) controlou mais a população de *Y. enterocolitica* do que o tratamento contendo maior quantidade desses agentes (T4).

Tabela 11. Contagem de *Y. enterocolitica* (ATCC 9610) em carne suína *in natura*, após estocagem a 4 °C por até 10 dias.

MOI	Médias $\log_{10}$ CFU·g ⁻¹				
	Tempo (dias)				
	0	2	5	7	10
Controle (T2)	4,46 ^a ± 0,08	4,61 ^a ± 0,19	5,90 ^a ± 0,26	6,97 ^a ± 0,06	8,08 ^a ± 0,39
1000 (T3)	4,47 ^a ± 0,03	3,87 ^b ± 0,23	4,72 ^b ± 0,20	6,21 ^b ± 0,21	7,14 ^b ± 0,21
100000 (T4)	4,51 ^a ± 0,06	3,70 ^b ± 0,13	5,33 ^a ± 0,17	6,59 ^{ab} ± 0,14	7,25 ^b ± 0,23

Valores médios de $\log_{10}$ CFU·g⁻¹ seguidos pelo desvio padrão (±). Os dados acompanhados pela mesma letra entre colunas não diferem entre si, pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5 %.

Orquera et al. (2012) também mostraram a capacidade lítica de bacteriófagos no biocontrole de *Y. enterocolitica* em carne suína, estocada a 4 °C durante 7 dias, usando MOI de 10000. Os autores encontraram redução de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos após 24 h de incubação, mantendo uma constante na redução de ciclos logarítmicos no transcorrer dos dias. Um dado interessante do bacteriófago usado pelos pesquisadores foi que o número de partículas virais liberadas no *burst size* foi estimado em aproximadamente 120 bacteriófagos (SCHWUDKE et al. 2008), um valor onze vezes maior que o do bacteriófago BFYe6. Provavelmente, esse fato influenciou na atividade reduzida do bacteriófago BFYe6 no coquetel, uma vez que o número de partículas virais por célula infectada foi apenas de 10 a 11 UFP.

Estudos publicados por diversos autores relatam que o controle de bactérias por bacteriófagos é maior se são utilizados maiores valores de MOIs (SUKUMARAN et al. 2015; ALBINO et al. 2014). Entretanto, nesta pesquisa foi mostrado que a utilização de MOIs mais altos nem sempre irá garantir maior redução na contagem da bactéria. Este resultado pode ser fruto de um efeito conhecido como *Lysis from without*, pelo qual a adsorção simultânea de um alto número de bacteriófagos na célula hospedeira supera o máximo de

adsorção dos vírus na bactéria e induz a lise precoce do micro-organismo mediante a degradação da parede celular. O efeito gera morte celular sem geração de bacteriófagos (DELBRÜCK, 1940; KUTTER e SULAKVELIDZE, 2005; ABEDON, 2011).

5.6.2 Avaliação do biocontrole a 15 °C

Na temperatura de 15 °C, até o dia 10 os bacteriófagos foram capazes de controlar significativamente o crescimento da bactéria (Tabela 12). O MOI não influenciou na efetividade da inibição. O controle na diminuição da bactéria no T3 foi de até 0,76 ciclos logarítmicos e no T4 de 1,05 ciclos logarítmicos no dia 10.

Tabela 12. Contagem de *Y. enterocolitica* (ATCC 9610) em carne suína *in natura*, após estocagem a 15 °C por até 10 dias.

MOI	Médias log ₁₀ CFU·g ⁻¹				
	Tempo (dias)				
	0	2	5	7	10
Controle (T2)	4,48 ^a ± 0,82	7,27 ^a ± 0,22	8,97 ^a ± 0,21	9,25 ^a ± 0,33	9,23 ^a ± 0,34
1000 (T3)	4,49 ^a ± 0,07	7,08 ^a ± 0,32	8,54 ^a ± 0,22	8,74 ^a ± 0,15	8,48 ^b ± 0,11
100000 (T4)	4,48 ^a ± 0,06	6,99 ^a ± 0,35	8,51 ^a ± 0,26	8,80 ^a ± 0,18	8,19 ^b ± 0,18

Valores médios de log₁₀ CFU·g⁻¹ seguidos pelo desvio padrão (±). Os dados acompanhados pela mesma letra entre colunas não diferem entre si, pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5 %.

A temperatura de incubação influencia no tempo de geração ou duplicação de um micro-organismo (YOTIS e TEODORO, 1957). O tempo médio de duplicação de *Y. enterocolitica* a 30 °C é de 34 min, a 22 °C é de 1 h e a 7 °C de 5 h (FDA, 2012). A taxa de crescimento do patógeno foi maior quando incubado na temperatura de 15 °C, alcançando a fase estacionária no quinto dia; já em tempo de 4 °C a taxa de crescimento foi menor, apenas iniciando a fase estacionária no décimo dia.

Considerando que foram necessárias realizar várias propagações para aumentar a concentração dos três bacteriófagos e que estes podem apresentar características cinéticas e morfológicas similares, propõe-se que o *burst size* do

BFYe6 é representativo para os outros bacteriófagos; porém, a 15 °C o baixo número de bacteriófagos liberados no *burst size* não foi suficiente para controlar o crescimento acelerado da bactéria.

6. CONCLUSÕES

Estudos como a especificidade, estabilidade e parâmetros cinéticos são essenciais para o biocontrole de micro-organismos por bacteriófagos na indústria de alimentos. Os bacteriófagos isolados neste trabalho foram específicos para a cepa de *Y. enterocolitica* testada e estáveis na maioria das condições a que foram expostos, o que reforça seu potencial uso na indústria de alimentos. O *burst size* do bacteriófago BFYe6 foi menor se comparado ao de outros bacteriófagos já isolados para *Yersinia*, e isso teve uma relação direta com as repetidas propagações necessárias para obtenção do título desejado. Isto pode ser um fator limitante, mas não decisivo para o uso desses bacteriófagos em alimentos pois, apesar disso, eles apresentaram características favoráveis tais como infectividade, especificidade, estabilidade e potencial de biocontrole de *Y. enterocolitica* sob as condições nas quais o alimento é estocado.

7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDON, S.T. **Lysis from without.** Bacteriophage, 1(1): 46-49, 2011.

ACKERMANN, H.W. Bacteriophage classification. In: KUTTER, E; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: biology and applications.** Boca Raton, FL: CRC Press, p. 67-90, 2005.

ACKERMANN, H.W. **Bacteriophage electron microscopy.** Advances in Virus Research, 82: 1-32, 2012.

ACKERMANN, H.W.; EISENSTARK, A. **The present state of phage taxonomy.** Intervirology, 3(4): 201-219, 1974.

ALBINO, L.A.A; ROSTAGNO, M.H.; HÚNGARO, H.M.; MENDONÇA, R.C.S. **Isolation, characterization, and application of bacteriophages for *Salmonella* spp. biocontrol in pigs.** Foodborne pathogens and disease, 11(8): 602-609, 2014.

ANJU, P.; LATHA, C.; SUNIL, B.; SETHULEKSHMI, C. **Antimicrobial resistance profile of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia intermedia* isolates from retail pork.** International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(8): 231–234, 2014.

ARISAKA, F.; KANAMARU, S. **Protein interactions in the assembly of the tail of bacteriophage T4.** Biophysical Reviews, 5(2): 79-84, 2013.

AROCENA, C.; GALAZKA, J.; PICÓN, T.; GUIACHETTO, G. **Apendicitis aguda, bacteriemia y artritis: manifestaciones de infección por *Yersinia enterocolitica* en un adolescente.** Sociedad Uruguaya de Pediatría, 83 (3): 185–188, 2012.

ATOBLA, K.; KAROU, T.G.; DADIE, A.T.; NIAMKE, L.S.; DJE, K.M. **Isolation and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pigs in Abidjan, Côte d'Ivoire.** Journal of Applied Biosciences, 50: 3540–3548, 2012.

BARI, L.; HOSSAIN, M.A.; ISSHIKI, K.; UKUKU, D. **Behavior Of *Yersinia enterocolitica* In Foods.** Journal Of Pathogens, 1-13, 2011.

BAUER, D.W.; LI, D.; HUFFMAN, J.; HOMA, F.L.; WILSON, K.; LEAVITT, J.C.; S.R. CASJENS.; J. BAINES.; EVILEVITCH, A. **Exploring the balance between DNA pressure and capsid stability in herpesviruses and phages.** Journal of virology, 89(18): 9288-9298, 2015.

BOLTON, D.J.; IVORY, C.; MCDOWELL, D. **A small study of *Yersinia enterocolitica* in pigs from birth to carcass and characterisation of porcine and human strains.** Food control, 33(2): 521-524, 2013.

BONARDI, S.; ALPIGIANI, I.; PONGOLINI, S.; MORGANTI, M.; TAGLIABUE, S.; BACCI, C.; BRINDANI, F. **Detection , enumeration and characterization**

of *Yersinia enterocolitica* 4/O: 3 in pig tonsils at slaughter in Northern Italy. International Journal of Food Microbiology, 177: 9–15, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998. **Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos e seus limites máximos em carnes e produtos cárneos.** Diário Oficial da União. 1998.

CARNIEL, E. **Chromosomal virulence factors of *Yersinia*: an update.** Contributions to microbiology and immunology, 13: 218-224, 1995.

CARNIEL, E.; HINNEBUSCH, B.J. ***Yersinia*: molecular and cellular biology.** Wymondham, UK: Horizon Bioscience, 2004.

CARVALHO, C.; SUSANO, M.; FERNANDES, E.; SANTOS, S.; GANNON, B.; NICOLAU, A.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J. **Method for bacteriophage isolation against target *Campylobacter* strains.** Letters in applied microbiology, 50(2): 192-197, 2010.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Manual das doenças transmitidas por alimentos. ***Yersinia enterocolitica* / *Yersinia pseudotuberculosis*.** 2003. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acessado em 31 de Oct de 2015.

DELBRÜCK, M. **The growth of bacteriophage and lysis of the host.** The journal of general physiology, 23(5): 643-660, 1940.

DORINA, B.; KODA, Y.K.L. **Doenças Gastroenterológicas em Pediatria.** São Paulo: Editora Atheneu, 425p, 1996.

DOYLE, M.P.; BUCHANAN, R.L. **Food microbiology: fundamentals and frontiers.** American Society for Microbiology Press. 2013.

DRUMMOND, N.; MURPHY, B.P.; RINGWOOD, T.; PRENTICE, M.B.; BUCKLEY, J.F.; FANNING, S. ***Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain.** Foodborne pathogens and disease, 9(3): 179-189, 2012.

DUDA, R.L.; ROSS, P.D.; CHENG, N.; FIREK, B.A.; HENDRIX, R.W.; CONWAY, J.F.; STEVEN, A.C. **Structure and energetics of encapsidated DNA in bacteriophage HK97 studied by scanning calorimetry and cryo-electron microscopy.** Journal of molecular biology, 391(2): 471-483, 2009.

EFSA. European Food Safety Authority. **Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products.** The EFSA Journal, 14: 1–31, 2003.

EFSA. **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013.** The EFSA

Journal, v 13(1):3991. 2015. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2013.pdf>. Acessado em 18 de Maio de 2016.

EI TAHIR, Y.; SKURNIK, M. **YadA, the multifaceted *Yersinia adhesin***. International journal of medical microbiology, 291(3): 209-218, 2001.

FALCÃO, J.P.; FALCÃO, D.P. **Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 27(1): 9-19, 2006.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Procesados de carnes. Fichas técnicas, 2014**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acessado em 2 de Jun de 2016.

FAO. **Cerdos y la producción animal, 2015** Disponível em: <http://www.fao.org>. Acessado em 01 de Fev de 2016.

FDA. Food and Drug Administration. **Bad bug book: handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins**. Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acessado em 30 de Jul. de 2016.

FDA. **BAM: *Yersinia enterocolitica*, 2007**. Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acessado em 03 de Dec. de 2015.

FDA. **Food Additive Status List, 2014**. Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acessado em 03 de Jul. de 2016.

GARBE, J.; WESCHE, A.; BUNK, B.; KAZMIERCZAK, M.; SELEZSKA, K.; ROHDE, C.; SCHOBERT, M. **Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions**. BMC microbiology, 10(1): 1, 2010.

GRACÍA, R.D.C.R.; ZARAIN, P.L.; LAGUNA, Y.M. **Mecanismos de Patogenicidad e Interacción: Parásito-Hospedero**. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: BUAP, 2004.

GRASSL, G. A.; BOHN, E.; MÜLLER, Y.; BÜHLER, O.T.; AUTENRIETH, I.B. **Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion**. International journal of medical microbiology, 293(1): 41-54, 2003.

GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M.; FONTES, P.R. **Ciência e qualidade da carne, Fundamentos**. Viçosa: Editora UFV, p. 155-185, 2013.

HERTWIG, S.; POPP, A.; FREYTAG, B.; LURZ, R.; APPEL, B. **Generalized transduction of small *Yersinia enterocolitica* plasmids**. Applied and environmental microbiology, 65(9): 3862-3866, 1999.

HUNGARO, H.M.; MENDONÇA, R.C.S.; GOUVÊA, D.M.; VANETTI, C.D.; PINTO, C.L.O. **Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin**

in comparison with chemical agents. Food Research International, 52: 75-81, 2013.

HYMAN, P., ABEDON, S.T. **Practical methods for determining phage growth parameters.** Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, 175-202, 2009.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Vírus. **Virus Taxonomy: 2015 Release.** Disponível em: <http://ictvonline.org/index.asp>. Acessado em 22 de Oct de 2016.

IRIARTE, F.B.; BALOGH, B.; MOMOL, M.T.; SMITH, L.M.; WILSON, M.; JONES, J.B. **Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces.** Applied and environmental microbiology, 73(6): 1704-1711, 2007.

JORQUERA, D.; GALARCE, N.; BORIE, C. **El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica.** Revista Chilena Infectología. 32(6): 678-688, 2015.

JUN, J.W.; KIM, J.H.; SHIN, S.P.; HAN, J. E.; CHAI, J. Y.; PARK, S.C. **Characterization and complete genome sequence of the *Shigella* bacteriophage pSf-1.** Research in microbiology, 164(10): 979-986, 2013.

KASATIYA, S.; ACKERMANN, H.W. **Morphology of Yersinia enterocolitica Phages.** Annales de l'Institut Pasteur/Virologie, 137: 59–69, 1986.

KILJUNEN, S.; HAKALA, K.; PINTA, E.; HUTTUNEN, S.; PLUTA, P.; GADOR, A.; SKURNIK, M. **Yersiniophage ϕ R1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine.** Microbiology, 151(12): 4093-4102, 2005.

KOZLOFF, L.M.; LUTE, M. **A contractile protein in the tail of bacteriophage T2.** Journal of Biological Chemistry, 234(3): 539-546, 1959.

KURTBÖKE, D.I. **Bacteriophages.** Rijeka: InTech, 267 p, 2012.

KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: biology and applications.** United States of America: CRC Press, 510p, 2005.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne.** Porto Alegre: Artmed, 6ªedição, 2005.

LEON-VELARDE, C.G.; HAPPONEN, L.; PAJUNEN, M.; LESKINEN, K.; KROPINSKI, A.M.; MATTINEN, L.; RAJTOR, M.; ZUR, J.; SMITH, D.; CHEN, S.; NAWAZ, A.; JOHNSON, R.P.; ODUMERU, J.A.; GRIFFITHS, M.S.; SKURNIK, M. **Yersinia enterocolitica-Specific Infection by Bacteriophages TG1 and ϕ R1-RT Is dependent on temperature-regulated expression of the phage host receptor OmpF.** Applied and Environmental Microbiology, 82(17): 5340-5353, 2016.

LY-CHATAIN, M.H. **The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy.** *Frontiers in microbiology*, 5(51): 1-7, 2014.

MADIGAN, M.H; MARTINKO J.H; DUNLAP, P.V; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock.** Porto Alegre: Artmed, p. 258-268, 2010.

MEDEIROS, L.; LEJEUNE, J.; WILLIAMS; M. ***Yersinia enterocolitica*. A rare but important food safety concern for young children and immune-compromised individuals.** Ohio: The Ohio State University Family and Consumer Sciences, HYG-5574-11, 1-2, 2011. Disponível em: <<http://ohioline.osu.edu>. Acessado em: 31 Oct, 2015.

MORA, A.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; BLANCO, J. **Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain.** *Research in Microbiology*, 156(7): 793-806, 2005.

NEUBAUER, H.; ALEKSIC, S.; HENSEL, A.; FINKE, E.J.; MEYER, H. ***Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups.** *International journal of medical microbiology*, 290(1): 61-64, 2000.

NICOLLE, P.; MOLLARET, H.H.; BRAULT, J. **New results on the phage typing of *Yersinia enterocolitica*, concerning more of 4 000 strains of various origins.** *Revue d'epidemiologie et de sante publique*, 24(6): 479-496, 1976.

NZFSA. New Zealand Food Safety Authority. Microbial pathogen data sheet. ***Yersinia enterocolitica*, 2010.** Disponível em: <http://repositorio.insa.pt>. Acessado em 08 de Nov de 2015.

ONTARIO. Ministry health and long term care. ***Yersiniosis*, 2015.** Disponível em: <http://www.health.gov.on.ca>. Acessado em 08 de Maio de 2016.

ORQUERA, S.; GÖLZ, G.; HERTWIG, S.; HAMMERL, J.; SPARBORTH, D.; JOLDIC, A., ALTER, T. **Control of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* by virulent bacteriophages.** *J Mol Genet Med*, 6: 373-278, 2012.

PAJUNEM, M; KILJUNEN S; SKURNIK M. **Bacteriophage ϕ YeO3-12, Specific for *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3, is Related to Coliphages T3 and T7 .** *Journal of Bacteriology*, 182 (18): 5114 – 5120, 2000.

PINTO, P.S.A. **Inspeção e Higiene de Carnes.** Vicoso: Editora Vicoso, p. 258, 2014.

POPOVA, A.V.; ZHILENKOV, E.L.; MYAKININA, V.P.; KRASILNIKOVA, V.M., VOLOZHANTSEV, N.V. **Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*.** *FEMS microbiology letters*, 332(1): 40-46, 2012.

POPP, A.; HERTWIG, S.; LURZ, R.; APPEL, B. **Comparative study of temperate bacteriophages isolated from *Yersinia***. Systematic and applied microbiology, 23(4): 469-478, 2000.

QIU, X. **Heat Induced Capsid Disassembly and DNA Release of Bacteriophage λ** . PloS one, 7(7): e39793, 2012.

RANKEN, M.D. **Handbook of meat product technology**. Oxford: Blackwell Science, 2000.

RIEMANN, H.P.; CLIVER, D.O. **Foodborne infections and intoxications**. San Diego: Academic Press, 3 ed, 922 p, 2006.

ROBINS-BROWNE, R.M.; PRPIC, J.K.; STUART, S.J. ***Yersinia* and iron. A study in host-parasite relationships**. Contributions to microbiology and immunology, 9: 254-258, 1986.

ROHDE, J.R.; LUAN, X.S.; ROHDE, H.; FOX, J.M.; MINNICH, S.A. **The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 °C**. Journal of bacteriology, 181(14): 4198-4204, 1999.

ROSNER, B.M.; STARK, K.; WERBER, D. **Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008**. BMC public health, 10 (1): 1, 2010.

ROSSI, L.P.R., ALMEIDA, R.C.D.C. **Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 69(2): 151-156, 2010.

SALEM, M.; VIRTANEN, S.; KORKEALA, H.; SKURNIK M. **Isolation and characterization of *Yersinia*-specific bacteriophages from pig in Finland**. Journal of Applied Microbiology, 118: 599-608, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Purification of bacteriophage λ particles by centrifugation through a glycerol step gradient**. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Spring Harbor Laboratory Press, 3ªedição, p. 2.52-2.53, 2001.

SCHWUDKE, D.; ERGIN, A.; MICHAEL, K.; VOLKMAR, S.; APPEL, B.; KNABNER, D.; STRAUCH, E. **Broad-host-range *Yersinia* phage PY100: genome sequence, proteome analysis of virions, and DNA packaging strategy**. Journal of bacteriology, 190(1): 332-342, 2008.

SHAO, Y.; WANG, I.N. **Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time**. Genetics. 180(1): 471-482, 2008.

SILVA, S.Q.; SANTOS, M.T.D.; PAES, S.A.; VANETTI, M.C.D. **Acid and low temperature treatments on *Salmonella Enteritidis* inoculated in pork and its subsequent survival in simulated gastric fluid**. Ciência Rural, 46(3): 530-535, 2016.

SKURNIK, M.; TOIVANEN P. ***Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide: genetics and virulence.** Elsevier Science Publishers, 1(4): 148–152, 1993.

SKURNIK, M.; STRAUCH, E. **Phage therapy: Facts and Fiction.** International Journal of Medical Microbiology, 296: 5-14, 2006.

STORMS, Z.J.; BROWN, T.; COOPER, D.G.; SAUVAGEAU, D.; LEASK, R.L. **Impact of the cell life-cycle on bacteriophage T4 infection.** FEMS microbiology letters, 353(1): 63-68, 2014.

SUKUMARAN, A.T.; NANNAPANENI, R.; KIESS, A.; SHARMA, C.S. **Reduction of *Salmonella* on chicken meat and chicken skin by combined or sequential application of lytic bacteriophage with chemical antimicrobials.** International Journal of Food Microbiology, 207:8–15, 2015.

TERENTJEVA, M.; BĒRZIŅŠ, A. **Prevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in slaughter pigs in Latvia.** Journal of Food Protection, 73(7): 1335-1338, 2010.

THORNE, C.B.; HOLT, S.C. **Cold lability of *Bacillus cereus* bacteriophage CP-51.** Journal of virology, 14(4): 1008-1012, 1974.

TIRZIU, E.; CUMPANASOIU, C.; VALENTIN, R.G.; SERES, M. ***Yersinia enterocolitica* Monographic Study.** Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 44(2): 144–149, 2011.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Introducción a la microbiología.** Ed. Médica. Buenos Aires: Editora Médica Panamericana, 9 ed, 988 p, 2007.

TOVKACH, F.I., ZHUMINSKA, G.I.; KUSHKINA, A.I. **Long-term preservation of unstable bacteriophages of enterobacteria,** Mikrobiol Z, 2012.

USDA. United States Department of Agriculture. **Fresh Pork from Farm to Table, 2013.** Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov>. Acessado em 01 de Jun. de 2016.

USDA. **Livestock and poultry: World markets and trade. 2016.** Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov>. Acessado em 1 de Dez. de 2016.

VANANTWERPEN, G.; BERKVEN, D.; ZUTTER, L.; HOUF, K. **Association between microbiological and serological prevalence of human pathogenic *Yersinia* spp. in pigs and pig batches.** Veterinary Microbiology, 178: 114–118, 2015.

WAUTERS, G.; KANDOLO, K.; JANSSENS, M. **Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*.** Contributions to microbiology and immunology, 9: 14-21, 1987.

WEINBAUER, M.G.; PEDUZZI, P. **Frequency, size and distribution of bacteriophages in different marine bacterial morphotypes.** Marine Ecology Progress Series, 108(1): 11-20, 1994.

WHITMAN, P.A.; MARSHALL, R.T. **Characterization of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef.** Applied microbiology, 22(3): 463-468, 1971.

YOTIS, W.; TEODORO, R. **650. The influence of temperature on the generation time of bacteria commonly found in milk: II. Examination of partial contributions over the full lactation period of two cows.** Journal of Dairy Research, 24(01): 27-32, 1957.

YOU, L.; SUTHERS, P.F.; YIN, J. **Effects of *Escherichia coli* physiology on growth of phage T7 in vivo and in silico.** Journal of Bacteriology, 184(7): 1888-1894, 2002.

ZADERNOWSKA, A.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. ***Yersinia enterocolitica*: a dangerous, but often ignored, foodborne pathogen.** Food Reviews International, 30(1): 53-70, 2014.