

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA- FAMEV UFU**  
**PEDRO LUCAS FIGUEIREDO NUNES**

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A ANTÍGENOS DE *Salmonella* Enteritidis**  
**ATRAVÉS DA TECNOLOGIA DE *PHAGE DISPLAY***

UBERLÂNDIA - MG

2021

**PEDRO LUCAS FIGUEIREDO NUNES**

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A ANTÍGENOS DE *Salmonella* Enteritidis  
ATRAVÉS DA TECNOLOGIA DE *PHAGE DISPLAY***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

UBERLÂNDIA - MG

2021

**PEDRO LUCAS FIGUEIREDO NUNES**

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A ANTÍGENOS DE *Salmonella* Enteritidis  
ATRAVÉS DA TECNOLOGIA DE *PHAGE DISPLAY***

Monografia aprovada como requisito parcial a  
obtenção do título de Médico Veterinário no  
curso de graduação em Medicina Veterinária da  
Universidade Federal de Uberlândia.

**APROVADA EM \_\_/\_\_/\_\_\_\_**

Prof<sup>ª</sup> Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca  
FAMEV – UFU

---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Eliane Pereira Mendonça  
FAMEV – UFU

---

Pós Doutorando Tafarel Andrade de Souza  
UFU

---

UBERLÂNDIA - MG  
2021

**“Tenho pressa de amar aqueles que estão ao meu lado, pois a vida é rápida demais para as pessoas de bom coração”**

*Pedro Lucas F. Nunes*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que provém saúde e força para eu conseguir alcançar meus sonhos.

Aos meus pais, Gilberto Ferreira Nunes e Leonice Figueiredo Nunes, que sempre me deram amor, estabilidade e incentivo para correr atrás dos meus estudos, tentaram, pelo menos, me ensinar tudo que achavam que era certo e bom.

A Hanna, por ser um serzinho que tanto amo.

Aos meus familiares por sempre me acolherem e me tratarem com amor, especialmente minhas avós e avôs, meus tios, tias e primos.

A Laura por ter sido uma grande amiga em tempos que parecia tudo perdido.

Aos meus amigos Wesley, Vanessa, Helena, Leandro, Priscila, Bruna, Baner, João Pedro, Jeronimo, Rafael, Fábio, Cristian e todos os outros. Parte de quem eu sou também devo a vocês. Baner, me ajudou muito no laboratório, agradeço por ter me acolhido e me ensinado tanto de vida e técnica. Bruna, obrigado por ter sido uma boa pessoa na condução desse trabalho, tornou leve e agradável. Wesley e Vanessa, estiveram comigo durante a graduação ao meu lado, foram verdadeiros amigos. Leandro e Helena, sempre me ajudaram quando precisei, foram mãos amigas. Priscila, me ajudou como irmã no início e até hoje tenta abrir as portas da vida para mim.

Aos meus inimigos, que me fizeram mais forte, sem vocês eu não conseguiria amadurecer com a vida.

Agradeço também a Fabiana por ser uma pessoa tão bondosa comigo e ter me ensinado tanto.

Finalmente devo essa obra a Bia, minha orientadora, que sempre me tratou bem e com igualdade, me acolheu como um filho e me incentiva a ser melhor sempre.

Obrigado gente, tamo junto!

## RESUMO

Salmonelose é a doença causada por bactérias do gênero *Salmonella* spp., sendo considerada como a principal causa de infecções alimentares em humanos e resulta anualmente em cerca de 155 mil mortes em todo o mundo. A metodologia *phage display* consiste em uma biblioteca combinatória de peptídeos expressos na superfície de um bacteriófago. O uso de bacteriófagos selecionados contra diferentes alvos tem inúmeras aplicações, sendo aqui objetivada a seleção de ligantes de *Salmonella* Enteritidis (SE), para futuro uso em diagnóstico, prevenção ou terapia. A avaliação dos melhores clones ligantes de SE foi realizada por meio de um *phage-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), sendo um total de 24 clones testados. Apenas seis fagos demonstraram alta afinidade pela SE, sendo eles: H1, B4, H1-2, A1-2, E6 e G1. Em contrapartida foi visualizada baixa interação com a microbiota de aves SPF (*Specific Pathogen Free*) dos clones selecionados. Portanto, futuramente, esses clones podem ser potenciais alternativas para diagnóstico e controle de SE.

**Palavras-chave:** fagos, phage display, peptídeos.

## ABSTRACT

Salmonellosis is the disease caused by bacteria of the genus *Salmonella* spp., being considered as the main cause of food infections in humans and results annually in about 155,000 deaths worldwide. The phage display methodology consists of a combinatorial library of peptides expressed on the surface of a bacteriophage. The use of bacteriophages selected against different targets has numerous applications, aiming to select *Salmonella* enteritidis (SE) ligands for future use in diagnosis, prevention or therapy. The evaluation of the best SE ligand clones was performed through a phage- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), with a total of 24 clones tested. Only six phages showed high affinity for SE: H1, B4, H1-2, A1-2, E6 and G1. On the other hand, low interaction was observed with the microbiota of SPF (Specific Pathogen Free) birds of the selected clones. Therefore, in the future, these clones may be potential alternatives for the diagnosis and control of SE.

**Keywords:** phages, phage display, peptides.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Geral.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Específicos.....</b>	<b>10</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 <i>Salmonella</i> spp.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 <i>Salmonella</i> na avicultura .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....</b>	<b>14</b>
<b>3.4 <i>Phage display</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Seleção de peptídeos – <i>Biopanning</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 Amplificação de fagos.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3 Preparação da <i>Salmonella</i> para sensibilização das placas.....</b>	<b>19</b>

<b>4.4</b>	<b>Preparação da microbiota para sensibilização de placas.....</b>	<b>20</b>
<b>4.5</b>	<b>Validação por <i>Phage</i>-ELISA clones para seleção de clones com maior afinidade .....</b>	<b>20</b>
<b>5.</b>	<b>BIOSSEGURANÇA.....</b>	<b>22</b>
<b>6.</b>	<b>ANÁLISE ESTADÍSTICA.....</b>	<b>22</b>
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>28</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias gram-negativas e anaeróbicas facultativas do gênero *Salmonella* spp. são causadoras da salmonelose, principal tipo de infecção alimentar em todo o mundo. As mais relevantes fontes contaminadas por essa bactéria são alimentos de origem animal, incluindo carnes de frango e vermelha, ovos, leite e frutos do mar (FOLEY et al., 2008). Apesar de mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella* serem descritos, *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) (SE) é o mais frequente sorotipo causador de salmonelose em seres humanos de vários países (LEE et al., 2015).

A capacidade de aderência a superfícies da *Salmonella*, aumenta o risco de contaminação e disseminação desse patógeno para alimentos. As superfícies que possuem resíduos orgânicos ou são refrigeradas podem criar condições para o desenvolvimento e persistência de comunidades denominadas de biofilmes, as quais possuem bactérias patogênicas e agem como fonte de contaminação cruzada (SREY et al., 2013; BRIDIER et al., 2014). A utilização de estratégias como uso de sanitizantes em equipamentos industriais é eficaz, mas tem como possível consequência a seleção de fenótipos resistentes.

Vários mecanismos de resistência à antibióticos incluindo bombas de efluxo, alteração de antibióticos e degradação de antimicrobianos por enzimas têm sido descritos para *Salmonella* (CAMPIONI et al., 2014; REIS et al., 2018; HOLGUÍN et al., 2019). Uma das estratégias para o controle de *Salmonella* seria o uso da tecnologia do *phage display*, ainda pouco explorada para esse micro-organismo. Essa tecnologia tem sido utilizada na identificação, caracterização e produção de peptídeos destinados a diferentes aplicações (PORTEFAIX et al., 2002).

A metodologia *phage display* consiste numa biblioteca combinatória de peptídeos expressos na superfície de bacteriófago M13. Nessa biblioteca há todas possíveis variações existentes em peptídeos ou proteínas de interesse. Essa metodologia tem provado ser muito eficiente na obtenção de bibliotecas contendo até bilhões de produtos diferentes (RUSSEL, 1991).

Portanto, este trabalho objetiva validar clones de fagos altamente ligantes a SE, selecionados pela metodologia de *phage display*, por meio do *phage*- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivos gerais**

Validar clones de fagos altamente ligantes a SE, por meio do *phage*- ELISA.

### **2.2- Objetivos específicos**

Avaliar a eficiência da seleção de peptídeos por testes de ELISA.

Obter fagos e peptídeos que poderão ser usados como controle de SE em futuros trabalhos.

Avaliar a interação de fagos que expressam peptídeos ligantes a SE, com a microbiota de aves SPF por testes de ELISA.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Salmonella* spp.

As bactérias que pertencem ao gênero *Salmonella*, fazem parte da família *Enterobacteriaceae*, com uma abrangência de mais de 2800 sorotipos diferentes, que possuem predominância variada dependendo da localização geográfica, época e abundância da espécie (DOMINGOS et al., 2014). São gram-negativas, em forma de bastonetes medindo (0,7 – 1,5 x 2,0 - 5µm), anaeróbicas facultativas, não fermentadoras de lactose e com flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares: *Salmonella Pullorum* e *Gallinarum* que não possuem motilidade ou pouca. (AZEVEDO, 2009).

A *Salmonella* é conhecida mundialmente como agente causador de toxinfecções em humanos, com mais de 80 milhões de casos anuais da doença (MAJOWICZ et al., 2010). Estima-se que nos Estados Unidos, os custos decorrentes de salmoneloses variam de 1,3 a 4,0 bilhões de dólares por ano, em decorrência do tratamento, e impacto no setor de trabalho (TAITT et a., 2004). A *S. Enteritidis*, tem sido considerada o sorovar mais usual em casos de infecções em humanos (CARDOSO; TESSARI, 2013).

O gênero *Salmonella* é dividido em 2 grandes espécies: *Salmonella entérica* e *Salmonella bongori*. Sendo a primeira, subdividida em 6 subespécies: *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*, *salamae* e *entérica*, sendo que os sorovares que pertencem à *S. enterica* subs. *enterica*, possuem maior prevalência e importância para a saúde pública (SANTOS et al., 2009). A classificação dessa subespécie é feita com base na composição antigênica dos flagelos (antígeno H), da parede celular (antígeno O), e dos antígenos capsulares (antígenos Vi) (AZEVEDO, 2009).

Os sorovares mais encontrados em aves no Brasil são: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg*, *S. Agona* e *S. Mbandaka*. A *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (BACK, 2010; CARDOSO; TESSARI, 2013). Dentre as *Salmonellas* paratíficas, a *S. Enteritidis* é uma das mais patogênicas para o homem, que pode se infectar principalmente com o consumo de carne e ovos contaminados (CARDOSO; TESSARI, 2013).

Alguns sorovares são adaptados a hospedeiros específicos, como a *S. Typhi* ao ser humano, *S. Choleraesuis* aos suínos, *S. Abortus-equi* aos equinos, *S. Dublin* aos bovinos, *S. Abortus-ovis* (ovinos) e *S. Gallinarum* às aves (POPOFF et al., 2004). Por outro lado, os que não possuem nenhum tipo de especificidade, podem afetar diferentes hospedeiros e levarem a um quadro sintomático ou assintomático. Nesse grupo possuem maior ocorrência os sorovares: Enteritidis, Typhimurium, Anatum, Derby e Panama (ZERO; RODRIGUES, 2017).

Segundo Forsythe (2013), existem alguns fatores de virulência que são comuns a pertencentes deste gênero, como a presença de fímbrias e atuação do lipopolissacarídeo que auxilia na fixação de superfícies, como a mucosa intestinal, e colonização. O sistema de secreção tipo III atua na transferência de um vasto número de sinalizadores para a célula hospedeira que resultam em eventos celulares que colaboram para a infecção da bactéria.

### **3.2 *Salmonella* na avicultura**

Devido ao grande crescimento do setor avícola nos últimos anos, o sistema de criação adquiriu uma estrutura voltada para populações maiores, com galpões de alta densidade de aves, o que reflete do ponto de vista sanitário, uma predisposição maior para disseminação de patógenos. Portanto, quanto maior a escala de produção, é necessário o desenvolvimento e uso de técnicas para controle de desafios sanitários (SANTOS et al., 2009).

As doenças bacterianas e virais, de forma geral, representam um dos maiores problemas na produção de aves (ALBINO et al., 2017). Na avicultura, o termo salmonelose aviária é usado para nomear um conjunto de enfermidades relacionados a qualquer membro do gênero *Salmonella* (CARDOSO; TESSARI, 2015). Em aves comerciais, essa bactéria traz grandes impactos econômicos com alta taxa de mortalidade e disseminação. Do ponto de vista da saúde pública, também é responsável por toxinfecções em humanos pela contaminação de produtos de origem avícola (BERCHIERI, et al., 2009).

As aves podem desenvolver a forma clínica da doença, ou apresentarem uma manifestação subclínica, que consiste na disseminação do agente infeccioso mesmo em aves que parecem saudáveis (BACK, 2004). Essa característica do curso da doença, reforça a importância do ponto de vista da saúde pública, pois abrange além dos animais, o ser humano (FERREIRA et al., 2013).

As principais espécies de *Salmonellas* aviárias são: *Salmonella* Gallinarum (Tifo aviário), *Salmonella* Pullorum (Pulorose), *Salmonella* Typhimurium e SE (Paratifo Aviário). Essas bactérias podem desencadear doença de curso crônico ou agudo, e também podem oferecer restrições comerciais para aves positivas (SANTOS et al., 2008).

O Tifo aviário, causado pela *Salmonella* Gallinarum, é uma doença que causa em aves adultas, sinais clínicos como inapetência, apatia, diarreia amarelo-esverdeada, anemia grave, dispneia, queda na postura e pode levar a morte dos animais (ANDREATTI, 2006). É uma enfermidade que é comum em aves de postura comercial, mas também pode atingir matrizes de corte. A transmissão ocorre tanto de maneira vertical, como horizontal, medidas higiênicas sanitárias são importantes para o controle dessa doença. A doença é agressiva em aves, com morbidade e mortalidade altas, com um curso de cinco a sete dias (ZANINELLI et al., 2019).

A Pulorose, cujo agente é a *Salmonella* Pullorum, acomete aves por volta da terceira semana de vida e apresenta alta mortalidade. As galinhas são os principais hospedeiros, mas pode ocorrer a doença em perus, papagaios, codornas e pardais (CARDOSO; TESSARI, 2015). Matrizes pesadas possuem menos resistência a doença do que as matrizes leves. As aves que sobrevivem podem passar para um estado de portadoras, no qual é possível a bactéria persistir por longos períodos. Nesse estado, o agente coloniza o sistema reprodutor do animal que resulta na transmissão vertical da doença (ZANINELLI et al., 2019). Os sintomas mais comuns são em aves jovens, em adultas não são facilmente visualizados. Dentre eles, a depressão, fraqueza, sonolência, asa caída, retardo no crescimento, asa caída, dificuldade respiratória, fezes de coloração branca e posteriormente a morte (ALBINO et al., 2017; ANDREATTI, 2006).

O Paratifo aviário pode ser causado por diferentes sorotipos de *Salmonella*, é um termo usado para salmoneloses ocasionadas por sorovares não específicos de aves, sendo de interesse para saúde aviária e pública. A *Salmonella* Typhimurium e SE são os agentes mais isolados nessa enfermidade (CARDOSO; TESSARI, 2015). É uma doença que acomete aves jovens primariamente, mas pode causar sintomas em aves adultas, caso estejam em situações estressantes. A transmissão ocorre de forma horizontal e vertical e leva a apatia, amontoamento, diarreia, penas arrepiadas e asas caídas, em animais jovens. Em animais adultos ocorre claudicação, cegueira, queda na postura e inapetência. Em aves, a mortalidade não é alta, porém em humanos pode levar a quadros severos de gastroenterites (ALBINO et al., 2017).

O diagnóstico de forma geral, é feito por isolamento em meios de cultura, sendo os principais o meio verde brilhante e MacConkey (ANDREATTI, 2006; SANTOS; MOREIRA;

DIAS, 2008). Provas bioquímicas e sorológicas também podem ajudar na identificação, como testes de aglutinação, microaglutinação e ensaios imunoenzimáticos são capazes de identificar anticorpos por vários meses após a infecção. Exames moleculares podem servir como uma complementação ao diagnóstico laboratorial e importante ferramenta no controle na cadeia de produção alimentícia (CARDOSO; TESSARI, 2015).

O controle de salmoneloses em aves comerciais, pode ser feito com o uso de antimicrobianos, quando apresentam mortalidades expressivas. Porém, o animal possui alta chance de ainda ser portador da doença, e colaborar para formação de resistência antimicrobiana (PANDINI, 2015). Com isso, as medidas para controle e prevenção baseiam em biossegurança. O uso de vacinas para controle, pode causar confusão na interpretação de resultados, pela dificuldade de distinguir sorologia vacinal e da enfermidade (OIE, 2012; WIBISONO et al., 2020).

### **3.3 *Salmonella* Enteritidis**

A *Salmonella* Enteritidis é frequentemente isolada em casos de salmonelose no mundo todo. São aproximadamente 3.7 milhões de casos da doença no Reino Unido, que gera por caso doença em humanos, cerca de 4.6 a 40 milhões de dólares dependendo da gravidade apresentada. A gastroenterite em humanos, geralmente é leve, com febre, dor abdominal e diarreia, que perdura por 4 a 7 dias sem a necessidade de hospitalizações. Porém, em pessoas no grupo de risco, como criança, idosos e imunocomprometidos, podem precisar de hospitalização e uso de antibióticos (WHO, 2018; BRYAN; DOYLE, 1995).

A interação da *Salmonella* com o hospedeiro depende de inúmeros fatores, tanto inerentes ao próprio ser infectado, como o ambiente e a bactéria. Pode haver divergências na colonização intestinal em distintas linhagens de galinhas. Em aves jovens os sintomas mais comuns incluem diarreia, desidratação, inapetência e alta mortalidade. Em poedeiras adultas, podem produzir ovos contaminados com *Salmonella* sem a manifestação clínica da doença. Não existem manifestações clínicas específicas para *S. Enteritidis* (OMWANDHO; KUBOTA, 2010).

A bactéria pode infectar o ovo de diferentes maneiras. Uma delas é através da casca do ovo devido a contaminação externa, como por fezes ou do sistema reprodutor. Outra forma é

no oviduto da ave que esteja infectada com a *Salmonella*, mesmo com vários mecanismos antibacterianos, é capaz de sobreviver no albúmen e migrar e penetrar na membrana vitelina até atingir a gema. (GANTOIS et al., 2009).

As vacinas disponíveis para *Salmonellas* na produção avícola, impedem a aderência das bactérias na mucosa intestinal, colonização em outros órgãos e excreção para o meio ambiente. É importante a adoção de medidas que somem tanto a prevenção e biossegurança com o plano vacinal, para que tenha uma eficiência maior no controle do agente (BARBOSA, 2014).

O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), criado em 1994 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), possui como objetivo o controle e erradicação das mais relevantes doenças aviárias e de seres humanos. Esse programa é fundamental para diminuir a presença de diversos micro-organismos na carne de frango e na produção, visando o fornecimento de matéria prima de boa qualidade nos mercados nacionais e internacionais. A Instrução Normativa N. 78, associada a esse programa, é a responsável pela aprovação das Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum* e livres ou controlados para SE e para *Salmonella Typhimurium* (BRASIL, 2003).

### **3.4 Phage display**

É uma técnica usada para seleção e identificação de peptídeos, proteínas e anticorpos com elevada afinidade e especificidade a um alvo, essa técnica foi introduzida primeiramente em 1985 por Geroge Smith (SMITH, 1985). A técnica propiciou descobertas em várias áreas do conhecimento, pela capacidade de estudo de interações moleculares de uma única molécula ou célula, sem conhecimento prévio sobre a natureza da mesma (HUANG et al., 2012; ALMEIDA et al., 2015).

Com bacteriófagos geneticamente modificados, é possível, por meio de algumas ferramentas, a expressão de sequências de peptídeos na sua superfície, o que permite aplicar em células, tecidos ou órgãos em busca de pares receptores-ligantes (BENHAR, 2001; ARAP, 2005). Os ligantes são os peptídeos que possuem maior afinidade para se ligarem a receptores presentes no alvo em estudo. A informação codificadora da sequência do peptídeo fica contida no genoma do bacteriófago, uma única partícula viral ligada a superfície de uma célula ou tecido

é capaz de ser recuperada por infecção bacteriana, e o peptídeo ligante identificado (PANDE et al., 2010).

A técnica consiste na inserção de genes que codificam milhões de proteínas em genomas de bacteriófagos, gerando uma biblioteca de fagos. Esse processo induz aos fagos a expressarem peptídeos em sua superfície viral, fusionados a uma proteína do capsídeo viral (ARAP, 2005). Quanto maior a variedade de peptídeos da biblioteca, maiores são as chances de expor fagos a uma proteína que possam ter a afinidade de ligação. Esse processo de apresentação de antígenos presentes na biblioteca, é denominado *biopanning* (VODNIK et al., 2011).

Métodos mais detalhados sobre o uso do *Phage display* podem ser encontrados em livros como Barbas et al., (2001). Os materiais necessários são de baixo custo e usualmente encontrados em laboratórios. A construção de uma biblioteca de fagos com uma variedade de peptídeos, pode ser mais complexo e exige a colaboração de laboratórios mais experientes (ARAP, 2005).

A biblioteca é apresentada a molécula-alvo de interesse, que geralmente se encontram imobilizadas, podendo ser em placas de imunoensaio. As interações fracas entre os fagos e a molécula-alvo, são rompidas facilmente com lavagens sucessivas, enquanto aqueles fagos que apresentam afinidade de intensidade maior, são recuperados por eluição (PANDE et al., 2010). A eluição é feita com tampões ácidos ou de elevada força iônica, com o objetivo de romper ligações peptídicas (VODNIK et al., 2011).

A próxima etapa consiste da amplificação desses fagos ligantes. Essa amplificação é feita em cultivo bacteriano, geralmente em *Escherichia coli*. O processo é monitorado por meio de titulações de fagos no início do ciclo e no final do mesmo. O ciclo é composto pela repetição do processo de exposição, ligação, eluição e amplificação. Cerca de três a cinco ciclos são suficientes para selecionar fagos com elevada força de ligação e especificidade. Os peptídeos de clones isolados, podem ser sequenciados e analisados em testes posteriores, de maneira isolada para estudo de sua capacidade de interação, que podem ser direcionados para diversos estudos (VODNIK et al., 2011).

Os bacteriófagos são vírus pertencentes à família *Inoviridae*, gênero *Inovirus* (ICTV, 2014). Os fagos utilizados no *phage display*, infectam enterobactérias como a *Escherichia coli*, não possuem ação lítica e são filamentosos (ARAP, 2005). A utilização de fagos filamentosos como vetores de clonagem, possui algumas vantagens como uma melhor estabilidade em amplas faixas de pH, temperatura e ainda podem estar presentes em células em



concentrações elevadas sem causar lise nas mesmas (HEMMINGA et al., 2010; PANDE et al., 2010).

O fago que é mais utilizado na técnica é o M13. É constituído de estrutura em forma de haste flexível com um genoma circular de DNA-fita simples de cerca de 6400 bases, envolta em um capsídeo composto pelas proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. As cinco proteínas podem ser usadas para apresentação de moléculas, sendo a pVIII e pIII são as mais usualmente empregadas para esta finalidade (ARAP, 2005; RUSSEL 1991).

O fago M13 possui uma multiplicação rápida, com conseqüente propagação, que dispensa o uso de seleção por antibiótico ou uso de fago auxiliar helper. Além disso, possui o gene lacZ, facilita a diferenciação de bactérias infectadas, por exibirem uma colônia azul. O gene lacZ faz com que as bactérias infectadas expressem a enzima  $\beta$ -galactosidase que ocasiona a hidrólise do substrato X-Gal presente no meio de cultivo. O fago M13 permite, sem muitas dificuldades, a construção e propagação de bibliotecas do *phage display* (NEB, 2011).

É possível a expressão de peptídeos fusionados à qualquer proteína do fago M13, preferencialmente nas pIII e pVIII, sendo que, os peptídeos devem ser limitados no máximo a 30 aminoácidos. A pIII apresenta massa molecular a de 42 KDa aproximadamente, e três domínios separados por resíduos de glicina. Esta proteína é sintetizada sob a forma de um precursor contendo peptídeo sinalizador que é clivado durante a passagem através da membrana. Sua porção N-terminal participa na infectividade viral e sua porção C-terminal atua na morfogênese das partículas virais (CRISSMAN; SMITH, 1984). A proteína pIII, fusionada a bibliotecas de peptídeos recombinantes é mais indicada para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas com as bibliotecas de peptídeos recombinantes fusionados na pVIII (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

As mais frequentemente usadas são as bibliotecas de peptídeos randômicos. Os peptídeos podem ser expressos de duas formas: linear ou conformacional, e são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítomos contínuos ou descontínuos. No entanto, já se sabe que as imunoglobulinas possuem interação mais preferivelmente com epítomos não lineares, dessa forma a introdução de cisteínas nas extremidades da sequência randômica impõe ao peptídeo uma conformação circular pela formação de uma ponte dissulfeto (SMITH; PETRENKO, 1997).

As bibliotecas de peptídeos comerciais são constituídas de monômeros (-mer) compostos por sete ou doze resíduos de aminoácidos, que possuem de dois bilhões de clones

independentes. Além das bibliotecas de peptídeos, existem atualmente vários tipos de bibliotecas utilizadas com diferentes finalidades (ALMEIDA et al., 2015).

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Seleção de peptídeos – *Biopanning*

A técnica de *biopanning* foi utilizada para a seleção de peptídeos expressos por fagos M13 que se liguem à antígenos de SE, em trabalhos anteriores, no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Ao final do processo 24 fagos foram selecionados usando a SE como alvo, sendo nove fagos a partir da bactéria íntegra e quinze da lisada. Os clones também passaram anteriormente por um processo de titulação, extração de DNA e sequenciamento de peptídeos expressos na superfície. A tabela 1 mostra os clones utilizados nesse trabalho.

### 4.2 Amplificação de fagos

Os vinte e quatro fagos selecionados anteriormente, foram amplificados em meio Luria Bertani (LB- Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), contendo tetraciclina, com uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação a 37°C até a fase *early-log* (densidade óptica- DO 600 ~ 0,3). Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com o eluato dos fagos selecionados e incubado a 37°C *overnight*, agitação de 220 rpm. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4°C a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado contendo uma solução de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril), na quantidade de 1/6 do volume do sobrenadante. A solução foi incubada por 12- 16 horas para a precipitação do fago e posteriormente, centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos para descartar o sobrenadante. O precipitado foi, então, suspenso em PBS (*Phosphate-buffered saline*) e precipitado novamente com PEG/NaCl, por 1 hora no gelo. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em 250 µl de PBS, a fim de se obter o fago amplificado e purificado, que foi posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

### 4.3 Preparação da *Salmonella* para sensibilização das placas

A cepa de SE ATCC 13076, estava armazenada em ágar nutriente (AN), e foi reativada em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) onde permaneceu incubada a 37°C por 24 horas. Após esse período a cepa foi semeada em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (OXOID®), sendo

incubada por mais 24 horas a 37° C. A colônia típica foi diluída em tampão carbonato bicarbonato (pH 8,6) e ajustada para OD 0,5 em 600nm. Após isso 50ul foram usados para sensibilização de cada poço da placa de ELISA.

#### **4.4 Preparação da microbiota para sensibilização de placas**

Foram usadas 100 gramas de fezes de aves SPF (Specific Pathogen Free), que passaram por um processo de diluição em água destilada na proporção de 1:5 e posteriormente filtradas em papel filtro de até 12 micrometro. Após a filtração foi distribuído 40 ml em tubos de 50 ml, para centrifugação de 7000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante, e o pellet foi ressuspendido em tampão carbonato bicarbonato (pH 8,6) e ajustado para OD 0,5 em 600nm. Após isso 50ul foram usados para sensibilização de cada poço da placa de ELISA.

#### **4.5 Validação por *Phage-ELISA* para seleção de clones com maior afinidade**

Os vinte e quatro clones selecionados foram amplificados conforme descrito no item 4.2, e em seguida, submetidos ao ensaio de ELISA com o intuito de realizar um rastreamento quanto a sua reatividade contra antígenos de SE e microbiota de aves SPF. Para validação dos fagos, placas de microtitulação foram sensibilizadas com 50ul de SE na DO 0.5 (Densidade ótica no comprimento de 600nm), aproximadamente  $10^8$  UFC. As placas também foram sensibilizadas com microbiota das aves SPF, igualmente ajustadas na mesma concentração da SE em tampão carbonato bicarbonato (pH 8,6) e posteriormente foram incubadas as placas por 18h a 4°C. Após lavagem e bloqueio da placa com PBS-BSA 5%, foram adicionados  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de placa (PFU) /poço de cada clone, utilizando como controle o fago selvagem, diluídos em tampão PBS Tween 0.1%. Após 1 hora de incubação a 37°C, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e, posteriormente, foi adicionado anticorpo anti-M13 pIII (que se liga à proteína pIII expressa pelo fago M13) conjugado com peroxidase, diluído 1:1000 em tampão PBS-T. A placa foi lavada novamente após 1 hora de incubação com PBS- T a 0,01% e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada utilizando-se o substrato cromogênico OPD (*O-Phenylenediamine dihydrochloroide* – Sigma), em solução contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, interrompida em seguida pela adição de 25µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. A leitura da absorbância foi feita em leitor de placas (*Ip Reader, Thermoplate*) a 492 nm.

**Tabela 1.** Identificação dos fagos selecionados, sequência de aminoácidos dos peptídeos, apresentação do antígeno de *Salmonella* e capacidade de distinção entre SE e microbiota intestinal de frangos.

Identificação do clone	Sequência de Aminoácido	Antígeno usado para seleção	Distinção entre SE e Microbiota
G1	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
H1	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
D2	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
F2	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
G2	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
H2	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
H3	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
A4	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
B4	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
D4	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
E4	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
G4	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
C6	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
E6	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
H6	xxxxxxx	Salmonella lisada	Sim
A1-2	xxxxxxx	Salmonella íntegra	Sim
C1-2 <sup>a</sup>	xxxxxxx	Salmonella íntegra	Sim
G1-2 <sup>a</sup>	xxxxxxx	Salmonella íntegra	Sim
H1-2	xxxxxxx	Salmonella íntegra	Sim
A2-2	xxxxxxx	Salmonella íntegra	Não
E2-2	xxxxxxx	Salmonella íntegra	Sim
F2-2	xxxxxxx	Salmonella íntegra	Sim
D3-2	xxxxxxx	Salmonella íntegra	Sim
H3-2	xxxxxxx	Salmonella íntegra	Sim

<sup>a</sup>Clones com a mesma sequência de aminoácidos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5 BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos que foram realizados neste estudo, bem como a utilização de equipamentos, seguiram as normas de biossegurança descritas por Mineo et al. (2005). Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Nanobiotecnologia (Instituto de Biotecnologia), o qual dispõe de todos os equipamentos para execução do projeto e é referência para seleção e amplificação dos bacteriófagos por *phage display*. Este laboratório é certificado como biossegurança nível 2 do CTNBio (CQB 163/02 - Processo 012000.008091/2002-60).

## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Prism Software Inc., EUA). Os testes *phage*-ELISA tiveram como controle os fagos selvagens utilizados na reação. Para cada clone as avaliações foram realizadas em triplicata. Após avaliação da normalidade foi realizada o teste da ANOVA seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de vinte e quatro clones foram testados. Todos os clones foram avaliados por *phage*-ELISA a capacidade de ligação de fagos com a SE somente em sua forma íntegra. A microbiota de aves SPF, foi usada para analisar possíveis interações cruzadas de fagos, sendo não desejável a interação com a mesma.

Um total de seis fagos demonstraram alta afinidade pela SE, demonstrado na figura 1. Sendo eles: H1, B4, H1-2, A1-2, E6 e G1. Os clones H1, G1 e B4 tiveram as absorvâncias mais elevadas ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos outros clones. Apesar disso, não apresentam nenhuma diferença quanto a ligação de SE, entre si. Em todos os clones testados, a ligação da microbiota apresentou reduzida quando comparada a SE e idêntica ao fago selvagem. Todos os clones, com exceção do A2-2 apresentaram diferença estatística no ELISA entre a microbiota e SE, disponível na figura 2.

Para um o desenvolvimento de um diagnóstico preciso de SE, é necessária uma comparação entre diferentes sorovares de *Salmonella*, e outras bactérias de diferentes grupos. Isso só é possível se os clones selecionados se ligam apenas a SE. Estudos com seleção de peptídeos realizados por Morton et al. (2013) e Agrawal et al. (2016), demonstraram que a determinação de uma concentração mínima de detecção da bactéria de interesse, acrescenta maior confiabilidade para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico.

Os melhores clones selecionados demonstraram alta afinidade pela SE, quando a mesma foi sensibilizada na placa de ELISA. Apesar da diversidade de bactérias que são presentes na microbiota intestinal das aves, os fagos demonstraram baixa afinidade de ligação quando expostos a esses antígenos. Com isso, foi possível identificar clones altamente específicos para SE.

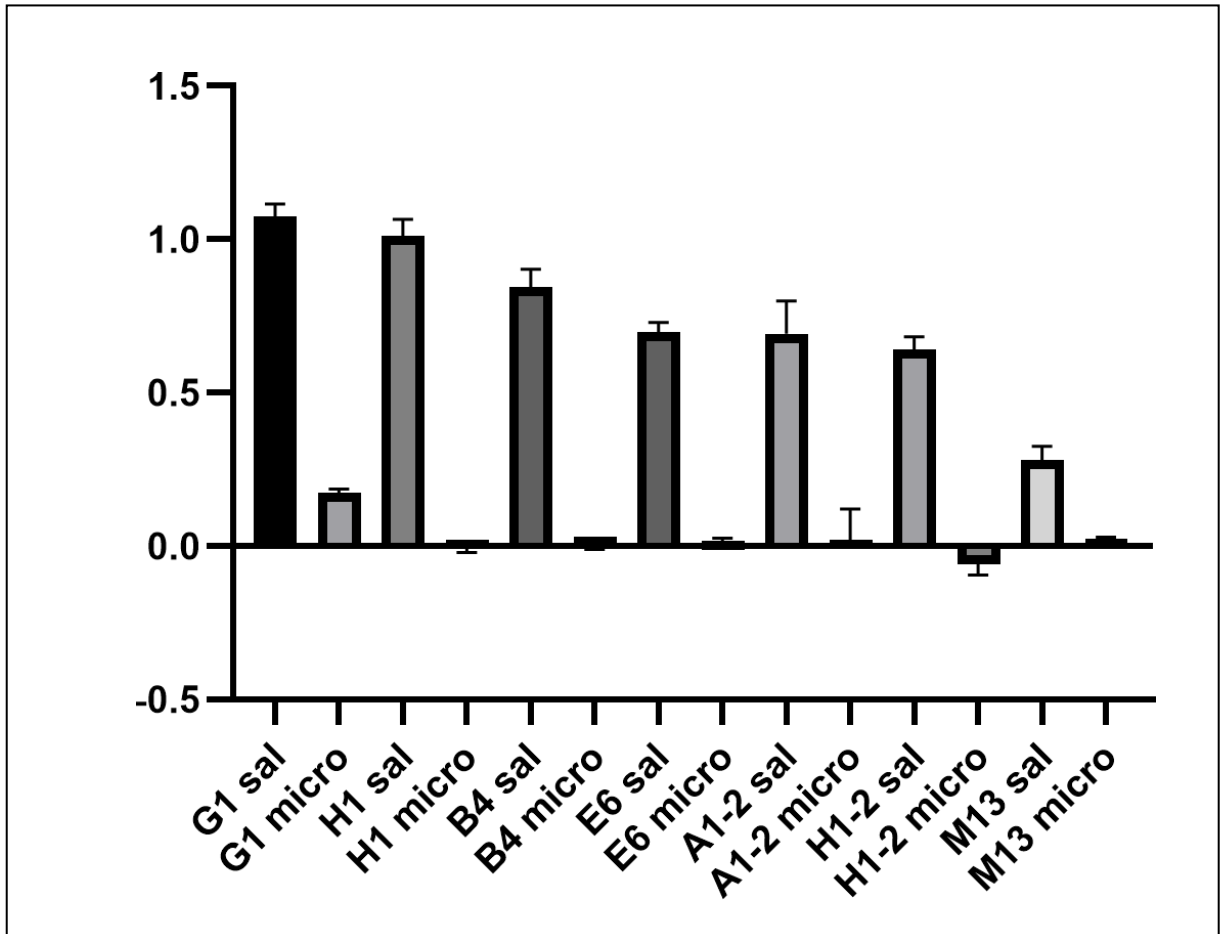
Os métodos de detecção e isolamento atuais de *Salmonella* spp., consistem em crescimento microbiológico seguido por provas bioquímicas, que além de demandar tempo, possui certa dificuldade (DWIVEDI et al., 2011). Algumas técnicas como ELISA (KUMAR et al., 2008), imunodifusão em ágar (D'AOUST; SEWELL, 1988; FLOWERS; KLATT, 1989), ensaios imunocromatográficos (TORLAK et al., 2012; SINGH et al., 2015) e *microarray* de anticorpos (KAROONUTHAISIRI et al., 2009; CHARLERMROJ et al., 2011), são comumente usados para detecção de patógenos de origem alimentar, que engloba a *Salmonella*. Porém,

essas técnicas exigem anticorpos monoclonais, que apresentam excelente especificidade, mas são sensíveis a variações ambientais, e de imunoglobulinas policlonais, que são observadas frequentemente reatividade cruzada a antígenos. Ademais, são métodos trabalhosos, e exige uma imunização prévia dos animais (MORTON et al., 2013; PADMANABAN et al., 2014).

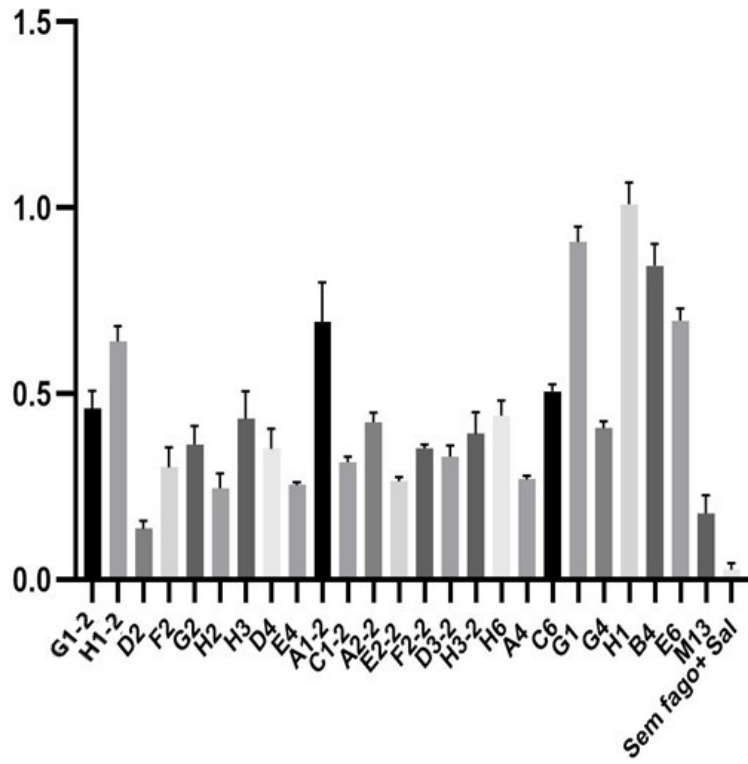
O *phage display* possibilita a seleção de peptídeos alta afinidade e especificidade ao antígeno de interesse, também é possível aplicações em diferentes áreas de pesquisa, sendo de suma importância para inovação em diagnóstico e no tratamento de diversas doenças (HENRY et al., 2015). Essas características demonstram vantagem em relação ao uso de anticorpos.

Trabalhos anteriores demonstraram que a metodologia do *phage display* pode ser usada para detecção de toxinas (WANG et al., 2013; SOYKUT al., 2008), esporos de *Bacillus anthracis* (BRIGATI et al., 2004), *Mycoplasma* (DE et al., 2005), *Listeria monocytogenes* (MORTON et al., 2013) e *Pseudomonas aeruginosa* (CARNAZZA et al., 2008) e *Salmonella Typhimurium* (AGRAWAL et al., 2016). Os fagos selecionados para *Salmonella* em técnicas alternativas ao *phage display*, geralmente são usados para controle da bactéria na indústria avícola, já que as aves podem ser portadoras assintomáticas e serem responsáveis pela permanência ambiental do agente (MARTINS; MARTINS., 2014). No entanto, com a técnica de seleção usada nesse trabalho, é possível a criação de um teste de diagnóstico rápido e preciso para identificação de SE, já que a resistência a antibióticos é frequentemente detectada nessa classe de bactéria (PANDINI et al., 2014).





**Figura 1:** Absorbância dos melhores clones e M13 selvagem selecionados após o ELISA com SE e microbiota. Os fagos G1, H1 e B4 apresentaram-se com os melhores resultados de ligação a SE em relação aos demais clones ( $p < 0,05$ ). G1, H1, B4 não apresentaram diferença entre si quanto a ligação a SE. Os resultados de absorbância da ligação a SE ficou maior que para ligação da microbiota em todos os clones. Todos os resultados de ligação a SE ficaram maiores que a ligação dos fagos selvagens. No caso da microbiota todos os resultados ficaram iguais a do fago selvagem.



**Figura 2:** Absorbância de todos os vinte e quatro clones e M13 selvagem selecionados após o ELISA com SE.

## **8 CONCLUSÃO**

Os melhores clones de fagos selecionados demonstraram alta afinidade de ligação a SE, mesmo quando expostos a antígenos das fezes de aves SPF. Com isso, devido à alta afinidade apresentada, os fagos testados nesse trabalho, possuem potencial para estudos futuros para diagnóstico de SE.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S., Morarka, A., Bodas, D., and Paknikar, K. M. (2012). **Multiplexed detection of waterborne pathogens in circular microfluidics**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(6), 1668-1677.
- ALBINO, Luiz Fernando Teixeira et al. **Produção e nutrição de frangos de corte**. Viçosa: Ed. UFV, 2017.
- ALMEIDA, Greyciele Rodrigues de; JAPOLLA, Greice; CAMPOS, Ivan Torres Nicolau de; BATAUS, Luiz Artur Mendes; SOUZA, Guilherme Rocha Lino de. **PHAGE DISPLAY E SUA APLICAÇÃO EM MEDICINA VETERINARIA**. *Enciclopédia Biosfera*, Goiânia, v. 22, n. 11, p. 2366-2382, 01 dez. 2015. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015c/agrarias/phage%20display%20e%20sua%20aplicacao.pdf>. Acesso em: 18maio2021.
- ANDREATTI, R.L. **Saúde Aviária e Doenças**. São Paulo: Roca, 2006.
- ARAP, Marco Antonio. **Phage display technology: applications and innovations**. *Genet. Mol. Biol.*, São Paulo, v. 28, n. 1, Mar. 2005.
- AZEVEDO, Angela Palamin. **Prevalência e características de Salmonella spp em carne bovina brasileira para exportação: contribuição para uma avaliação de riscos**. 2009. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Ciência de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. DOI: 10.11606/D.9.2016.tde-04052016-172852. Acesso em: 01ago2021.
- BACK, A. **Doenças Bacterianas**. In: BACK, A. *Manual de Doenças de Aves*. Cascavel: Coluna do Saber, 2004.
- BARBAS, Carlos F et al. **Phage Display: A Laboratory Manual**. 1. ed. [S.I]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.s., 2001.
- BARBOSA, João Paulo. **VACINAÇÃO NA CADEIA DE FRANGO DE CORTE NO DISTRITO FEDERAL – REVISÃO DE LITERATURA, METODOLOGIA E IMPORTÂNCIA**. 2014. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Universidade de Brasília, Brasília, 2014. Disponível em: [https://bdm.unb.br/bitstream/10483/8741/1/2014\\_JoaoPauloBarbosa.pdf](https://bdm.unb.br/bitstream/10483/8741/1/2014_JoaoPauloBarbosa.pdf). Acesso em: 22maio2021
- BENHAR, I. **Biotechnological applications of phage and cell display**. *Biotechnology Advances*. v.19, n.1, 2001.
- BERCHIERI, A et al. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologias Avícolas, 2009.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de Salmonella gallinarum e de Salmonella pullorum**

**e livres ou controlados para Salmonella enteritidis e para Salmonella typhimurium.** Instrução normativa nº 78, Diário Oficial da União de 3 de novembro de 2003. Brasília, 2003. Disponível em:

<http://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3864>. Acesso em: 09out2021.

BRIDIER, A., P. SANCHEZ-VIZUETE, M. GUILBAUD, J. C. PIARD, M. NA"ITALI, AND R. BRIANDET. **Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens.** Food Microbiol.v 45, 2014.

BRIGATI, J., WILLIAMS, D. D., SOROKULOVA, I. B., NANDURI, V., HSUAN CHEN, I., TUMBOUGH, C. L., & PETRENKO, V. A. (2004). **Dianostic probes for Bacillus anthracis spores selected from a landscape phage library.** Clinical Chemistry, 50(10), 1899–1906.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. **Bibliotecas apresentadas em fagos.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. v.26, 2002.

BROWN, K. C. (2005). **Isolation of a Mycoplasma-specific binding peptide from an unbiased phage-displayed peptide library.** Molecular Biosystems, 1(2), 149-157.

BRYAN, Frank L.; DOYLE, Michael P.. **Health Risks and Consequences of Salmonella and Campylobacter jejuni in Raw Poultry.** Journal Of Food Protection, v. 58, n. 3, 1 mar. 1995.

CAMPIONI, F.; ZOLDAN, M.; & FALCÃO, J. **Characterization of Salmonella Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil.** Epidemiology and Infection.v. 142(7), 2014.

CARDOSO, A. L. S. P.; Tessari, E. N. C. **Salmonella enteritidis em aves e na saúde pública: revisão de literatura.** Revista Eletrônica de Medicina Veterinária, 2013.

CARDOSO, Ana L. S. P.; TESSARI, Eliana N. C. **Salmoneloses Aviárias: Revisão.** Revista Eletrônica Nutritime. V. 12, n. 3, p. 4049-4069. Mai.-Jun. 2015.

CARNAZZA, S., FOTI, C., GIOFFRE, G., FELICI, F., and GUGLIELMINO, S. (2008). **Specific and selective probes for Pseudomonas aeruginosa from phage-displayed random peptide libraries.** Biosensors and Bioelectronics, 23(7), 1137-1144.

CHARLERMROJ, R., GAJANANDANA, O., BARNETT, C., KIRTIKARA, K., and KAROONUTHAISIRI, N. (2011). **A chemiluminescent antibody array system for detection of foodborne pathogens in milk.** Analytical Letters, 44(6), 1085-1099.

CRISSMAN, J. W.; SMITH, G. P. **Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis.** Virology, v.132, n.2, 1984.

D'AOUST, J. Y., and SEWELL, A. M. (1988). **Reliability of the immunodiffusion 1-2 Test™ system for detection of Salmonella in foods.** Journal of Food Protection, 51,(11),853-856.

DOMINGOS, Isabelle et al. **Salmonella spp. – uma revisão.** 2014. Revista científica eletrônica de ciências aplicadas da FAIT. Disponível em: [http://www.fait.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/q399yynEtu5Lpbn\\_2015-2-3-15-43-4.pdf](http://www.fait.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/q399yynEtu5Lpbn_2015-2-3-15-43-4.pdf). Acesso em: 01ago2021.

DWIVEDI, H. P., and JAYKUS, L. A. (2011). **Detection of pathogens in foods: the current**

**state-of-the-art and future directions.** Crit. Rev. Microbiol. 37, 40–63.

DE, J., C, et al. **Isolation of a Mycoplasma-specific binding peptide from an unbiased phage-displayed peptide library.** *Molecular Biosystems*, 1(2), 149-157, 2005.

FERREIRA, L.L et al. **Salmonelose em sanidade avícola e saúde pública.** Revista Eletrônica Nutritime,[s.l.], Artigo 213 – v. 10, n. 5, 2013.

FLOWERS, R. S., and KLATT, M. J. . **Immunodiffusion screening method for detection of motile Salmonella in foods: collaborative study.** *Journal of AOAC International*. 72(2), 303-311, 1989.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. **Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates.** *Journal of Animal Science*. v. 86, Suppl. 14, 2008.

FORSYTHE, S. J. **Ferramentas de gestão da segurança de alimentos.** In: FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos*. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GANTOIS, Inne et al. **Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis.** *Fems Microbiology Reviews*, Merelbeke, v. 33, n. 4, jul. 2009.

GREINER, M.; SÖHR, D.; GÖBEL, P. **A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests.** *Journal of Immunological Methods*, v. 185, 1995.

GULIG, PAUL & MARTIN, JULIO & MESSER, HARALD & DEFFENSE, BEVERLY & HARPLEY, Crystal. (2008). **Phage Display Methods for Detection of Bacterial Pathogens.** 10.1007/978-0-387-75113-9\_28.

HANLEY, J. A.; McNEIL, B. J. **A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases.** *Radiology*, v. 148, 1983.

HEMMINGA, M. A.; VOS, W. L.; NAZAROV, P. V.; KOEHORST, R. B.; WOLFS, C. J.; SPRUIJT, R. B.; STOPAR, D. **Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages.** *European Biophysics Journal*, v.39, n.4, 2010.

HENRY, KEVIN & ARBABI GHARROUDI, MEHDI & SCOTT, JAMIE. (2015). **Beyond phage display: Non-traditional applications of the filamentous bacteriophage as a vaccine carrier, therapeutic biologic, and bioconjugation scaffold.** *Frontiers in microbiology*. 6. 755. 10.3389/fmicb.2015.00755.

HOLGUÍN, A.V.; CÁRDENAS, P.; PRADA-PENARANDA, C.; RABELO LEITE, L.; BUITRAGO, C.; CLAVIJO, V.; OLIVEIRA, G.; LEEKITCHAROENPHON, P.; MØLLER AARESTRUP, F.; VIVES MJ. **Host Resistance, Genomics and Population Dynamics in a Salmonella Enteritidis and Phage System.** *Viruses*. v. 22 (11): 2, 2019.

HUANG, J. X; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPERA, M. A. **Development of AntiInfectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.56, n.9, 2012.

ICTV, 2014. **International Committee on Taxonomy of Viruses.** Taxonomy. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 13jun2015.

KAROONUTHAISIRI, N., CHARLERMROJ, R., UAWISETWATHANA, U., LUXANANIL, P., KIRTIKARA, K., and GAJANANDANA, O. (2009). **Development of antibody array for simultaneous detection of foodborne pathogens.** *Biosensors and Bioelectronics*, 24(6), 1641-1648.

KUMAR, S., BALAKRISHNA, K., and BATRA, H. V. (2008). **Enrichment-ELISA for detection of Salmonella typhi from food and water samples.** *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(2), 137-143.

LEE, K.; RUNYON, M.; HERRMAN, T.; PHILLIPS, R.V.; HSIEH, J.Y. **Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety.** *Food Control*. v. 47, 2015.

MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S. J.; JONES, T. F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R. M. **The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis.** *Clin Infect Dis.*, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010. doi: 10.1086/650733.

MARTINS, S. C.; MARTINS, C. . **BACTERIÓFAGOS: FERRAMENTA PARA CONTROLE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS.** *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, [S. l.], v. 10, n. 18, 2014. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/2918>. Acesso em: 16out2021.

MINEO, J. R.; SLIVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação.** Uberlândia; EDUFU, 2005.

MORTON, J., KAROONUTHAISIRI, N., STEWART, L. D., OPLATOWSKA, M., ELLIOTT, C. T., and GRANT, I. R. (2013). **Production and evaluation of the utility of novel phage display-derived peptide ligands to Salmonella spp. for magnetic separation.** *Journal of Applied Microbiology*, 115(1), 271-281.

NEW ENGLAND BIOLABS (NEB). **Protein Tools: Ph.D. Phage Display Libraries Instruction Manual.** Ipswich: New England Biolabs, 2011.

OIE. **Fowl typhoid and Pullorum disease.** *Terrestrial Manual*, cap.2.3.11. 2012. Disponível em:

<[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.11\\_FOWL\\_TYPHOID.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.11_FOWL_TYPHOID.pdf)>. Acesso em: 07set2021.

OMWANDHO, Charles O. A.; KUBOTA, Takayuki. **Salmonella enterica serovar Enteritidis: a mini-review of contamination routes and limitations to effective control.** *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, Tsukuba, v. 44, n. 1, 2010.

PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. **Phage display: concept, innovations, applications and future.** *Biotechnology Advances*. v.28, n.6, 2010.

PANDINI, Jessica Angela et al. **Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de Salmonella spp.** isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arquivo Institucional de Biologia*, São Paulo, v. 82, 2015.

PADMANABAN, GURUPRASATH, HYEKYUNG PARK, JI SUK CHOI, YONG-WOO CHO, WOONG CHOL KANG, CHAN-IL MOON, IN-SAN KIM, AND BYUNG-HEON LEE. (2014). **Identification of peptides that selectively bind to myoglobin by biopanning of phage displayed-peptide library.** Journal of Biotechnology, 187, 43-50. LEE. (2014). **Identification of peptides that selectively bind to myoglobin by biopanning of phage displayed-peptide library.** Journal of Biotechnology, 187, 43-50.

PORTEFAIX, J.M.; FANUTTI, C.; GRANIER, C.; CRAPEZ, E.; PERHAM, R.; GRENIER, J.; PAU, B.; DEL RIO, M. **Detection of anti-p53 antibodies by ELISA using p53 synthetic or phage-displayed peptides.** Journal of Immunological Methods. v. 259, 2002.

POPOFF, Michael Y et al. **Supplement 2002 (nº. 46) to the Kauffmann-White scheme.** Res Microbiol. 2004; 155:568-70.

REIS, RAFAEL OLIVEIRA DOS.; SOUZA, MARGARIDA NEVES.; CECCONI, MARIA CRISTINA PICCOLI.; TIMM, LOECI.; IKUTA, NILO.; SIMON, DANIEL et al. **Increasing prevalence and dissemination of invasive nontyphoidal Salmonella serotype Typhimurium with multidrug resistance in hospitalized patients from southern Brazil.** Braz J Infect Dis. v. 22 ( 5 ), 2018.

RUSSEL, M. **Filamentous phage assembly.** Molecular Microbiology. v. 5, 1991

SANTOS, Bernadete Miranda et al. **Guia de Diagnóstico de Doenças Avícolas.** 22. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008.

SANTOS, Bernadete Miranda et al. **Manual de Doenças Avícolas.** Viçosa: Editora Ufv, 2009.

SÉVERINE, Duvaud; CHIARA, Gabella; FRÉDÉRIQUE, Lisacek; HEINZ, Stockinger; VASSILIOS, Ioannidis; CHRISTINE, Durinx. **Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal.** Nucleic Acids Research, 2021.

SINGH, J., SHARMA, S., and NARA, S. (2015). **Nanogold based lateral flow assay for the detection of Salmonella typhi in environmental water samples.** Analytical Methods, 7(21),9281-9288.

SOYKUT, E. A., DUDAK, F. C., and BOYACI, İ. H. (2008). **Selection of staphylococcal enterotoxin B (SEB)-binding peptide using phage display technology.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 370(1), 104-108.

SMITH, G. P. **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.** Science, v.228, 1985.

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. **Phage Display.** Chemical Reviews. v.97, n.2, 1997.

SREY, S.; JAHID, IK.; HÁ, SD. **Biofilm formation in food industries: A food safety concern.** Food Control. V. 31, 2013.

TORLAK, E., AKAN, İ. M., and İNAL, M. (2012). **Evaluation of RapidChek Select for the screening of Salmonella in meat and meat products.** Journal of Microbiological Methods, 90(3), 217-219.



TAITT, C. R.; SHUBIN, Y. S.; ANGEL, R. **Detection of Salmonella enterica Serovar Typhimurium by using a Rapid, Array-Based Immunosensor.** Applied and Environmental Microbiology. v. 70, n. 1, p. 152-158, 2004.

VODNIK, M.; ZAGER, U.; STRUKELJ, B.; LUNDER M. **Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack.** Molecules. v.16, n.1, 2011.

WANG, Y., WANG, H., Li, P., ZHANG, Q., KIM, H. J., GEE, S. J., and HAMMOCK, B. D. (2013). **Phage-displayed peptide that mimics aflatoxins and its application in immunoassay.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(10), 2426-2433.

WIBISONO, Freshindy et al. **A Review of Salmonellosis on Poultry Farms: Public Health Importance.** Systematic Reviews in Pharmacy, Indonesia, v. 11, n. 9, 2020.

WHO. **Salmonella (non-typhoidal).** 2018. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 08set2021.

ZANINELLI, Rafael Lopes et al. **Salmoneloses na produção avícola – revisão bibliográfica.** Ciência Veterinária UniFil, [S.l.], v. 1, n. 3, p. 154-163, mar. 2019. ISSN 2595-7791. Disponível em: <http://periodicos.unifil.br/index.php/revista-vet/article/view/992>. Acesso em: 15ago2021.

ZERO, Raphael Chiarelo; RODRIGUES, Jéssica De Oliveira. **Salmonella: riscos, transmissão e controle na cadeia de produção suína - revisão da literatura.** Nucleus Animalium, Ituverava, v. 9, n. 1, p. 129-141, nov. 2017. ISSN 2175-1463. Disponível em: <http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/animalium/article/view/2692>. Acesso em: 01ago2021.