

ANÁLISE DE CRITÉRIOS PARA UTILIZAÇÃO NA SELEÇÃO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COM POTENCIAL PARA UTILIZAÇÃO MÉDICA: DADOS PRELIMINARES

Guilherme Augusto Marietto Gonçalves¹
Bianca Yuri Borges Suehiro²
Luis Felipe Zuccolo Paschoal Costa²
José Carlos de Figueiredo Pantoja³
Raphael Lucio Andreatti Filho⁴

RESUMO

A fagoterapia é um método de controle de infecções conhecido há mais de cem anos, porém deixou-se de ser utilizada devido à praticidade do uso de antibióticos. No entanto, com o aumento mundial da resistência bacteriana, a fagoterapia ressurge como opção terapêutica, porém os padrões de seleção de amostras utilizados são empíricos. O presente artigo descreve o comportamento *in vitro* de 62 amostras de bacteriófagos líticos isolados de esgoto hospitalar humano usando uma amostra de *Salmonella* Enteritidis de origem avícola. No estudo, foram testados quatro perfis distintos comumente utilizados nas pesquisas com bacteriófagos e observou-se que há uma variância comportamental considerável em que o espectro de atividade lítica, tamanho de halo em gel difusão e índice de proliferação são fatores independentes de virulência, porém amostras prolíferas apresentam maior espectro de atividade lítica.

Palavras-chave: bacteriófagos, *Salmonella*, controle biológico, biotecnologia.

CRITERIA FOR SELECTION OF LYTIC BACTERIOPHAGE FOR USE IN MEDICAL FIELD (SETTING): PRELIMINARY DATA

ABSTRACT

This article analyzed, *in vitro*, the behavior of 62 bacteriophages samples lytic for *Salmonella* Enteritidis. The lytic potential was assessed by analyzing following parameters: proliferation, halo size in gel diffusion, superficial halo size and virulence degree. Proliferation degree of samples was determined by quantifying the amount of plaque forming unit (PFU) using gel diffusion technique. To determine UFP, minor dilution with measurable halos was considered. Lytic spectrum in the gel column was measured with an acrylic precision ruler. For to superficial halo size and virulence degree, the “spot-on-lawn” technique was employed. We observed that lytic activity spectrum, halo size in gel diffusion and proliferation are factors independent of virulence, but prolific samples shown higher spectrum of lytic activity. Prolific samples that present a high degree of virulence demonstrate *in vitro* a good potential for medical application.

Keywords: bacteriophages, *Salmonella*, biologic control, biotechnology.

¹ Médico Veterinário. Docente da Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC/Xanxerê-SC. Contato principal para correspondência.

² Graduando em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/UNESP/Botucatu

³ Docente do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP/Botucatu

⁴ Docente do Departamento de Clínica Veterinária – Patologia Aviária da FMVZ-UNESP/Botucatu.

ANÁLISIS DE LOS CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE BACTERIOFAGOS LÍTICOS CON POTENCIAL PARA USO MÉDICO: DATOS PRELIMINARES

RESUMEN

La fagoterapia es un método de control de la infección conocido por más de cien años, sin embargo, su uso se dejó de aplicar debido a la practicidad de los antibióticos. Con el aumento mundial de la resistencia bacteriana, la fagoterapia resurge como una opción terapéutica, pero los patrones de selección de muestras utilizadas son empíricas. En este trabajo, se describe el comportamiento in vitro de 62 muestras de los bacteriófagos líticos aislados de aguas residuales del hospital humano utilizando una muestra de *Salmonella* Enteritidis original de productos avícolas. En el estudio, se probaron cuatro diferentes perfiles comúnmente utilizados en la investigación en bacteriófagos y se observó que existe una variación considerable en donde el espectro de comportamiento de actividad lítica, tamaño de halo en gel difusión y el índice de proliferación fueron factores independientes de la virulencia, pero las muestras prolíficas tienen un mayor espectro de acción.

Palabras clave: bacteriófagos, *Salmonella*, control biológico, biotecnología.

INTRODUÇÃO

A bacteriofagia é um processo biológico conhecido há quase um século, tendo sido descrito inicialmente por Frederick W. Twort em 1915 e em paralelo por Félix d'Herelle em 1917, sendo melhor compreendido por André Gratia em 1921 (1,2). Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que predam bactérias e no processo final de sua replicação podem até matar seu hospedeiro. São parasitas espécie-específicos, ou seja, não infectam outras bactérias que não seja o seu hospedeiro habitual (3,4).

A utilização terapêutica de bacteriófagos (também chamada de fagoterapia) foi proposta e efetuada inicialmente com sucesso por d'Herelle, mas com a descoberta dos antibióticos acabou sendo esquecida (1,3). No entanto, com o avanço da resistência bacteriana aos antibióticos a fagoterapia foi lembrada, ressurgindo recentemente como uma alternativa ao uso de antibióticos no combate as bactérias patogênicas (5,6,7).

Em geral, a fagoterapia apresenta muitas vantagens sobre a antibioticoterapia: é eficiente contra bactérias patogênicas resistentes a antibióticos devido à indução da bacteriólise diferir completamente da ação destes; por ser hospedeiro-específico não há infecção de outras bactérias, não afetando assim a integridade de microbiota desejada; apresenta a capacidade de responder rapidamente a formação de fago-resistência do hospedeiro pelo fato dos bacteriófagos também apresentarem a capacidade de sofrer mutação; o custo de desenvolvimento de uma fagoterapia é mais barato que o de desenvolvimento de novos antimicrobianos; e porque os bacteriófagos não interagem com células eucarióticas, onde efeitos colaterais do seu uso são incomuns (8). Além disso, os bacteriófagos são onipresentes na natureza, sendo facilmente isolados na água e solo, como também em matéria orgânica quando presentes (4,9). Outro fator interessante é que seu cultivo laboratorial é fácil, pois sua cultura é baseada na manutenção da bactéria hospedeira por métodos microbiológicos tradicionais (8).

Na medicina veterinária, mas especificamente na área da avicultura, a fagoterapia se tornou uma opção para o controle de *Salmonella* (10) sendo que vários estudos foram recentemente realizados em aves. A fagoterapia contra *Salmonella* já foi testada em aves vivas por via oral (9,11,12), por aspersão e em água de bebida (13,14), em conjunto com

produtos de exclusão competitiva (15) e também com probióticos (16). Em subprodutos de origem avícola já foi testada *in vitro* para desinfecção de pele (17) e também carcaça (18,19).

Nestes estudos, a maioria obteve resultados expressivos na redução da carga de *Salmonella*, porém apenas poucos atingiram a eliminação completa do agente. Especula-se informalmente que diversos fatores biológicos, químicos e físicos possam contribuir para o sucesso parcial dos estudos da fagoterapia contra *Salmonella*, mas o que chama a atenção em comum nestes estudos é a falta de informação e padronização geral sobre os critérios de escolha das cepas virais utilizadas. Partindo do princípio que o padrão ouro para escolha de amostras líticas para uso terapêutico é a capacidade de “limpar” placas (característica de virulência) com uma determinada cultura bacteriana específica, o presente artigo analisou a relação da virulência com outros três padrões de seleção de atividade fágica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas sessenta e duas (62) amostras de bacteriófagos líticos oriundas de água de esgoto coletado da Estação de Tratamento de Esgoto de Rubião Júnior, município de Botucatu-SP, pertencente à Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. Os bacteriófagos foram isolados utilizando-se uma cepa de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (SE) isolada de vísceras de aves matrizes e arquivada no Laboratório de Ornitopatologia, pertencente ao Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” *campus* Botucatu-SP, e sorotipada pelo Instituto Adolf Lutz, São Paulo-SP. A avaliação do potencial lítico foi realizada analisando-se os seguintes parâmetros: índice de proliferação (IP), tamanho de halo em gel difusão (HGD), espectro de halo em superfície (EHS) e escala de virulência (EV).

Proliferação e tamanho de halo em gel difusão

Para determinar o IP e o HGD utilizou-se a técnica de difusão em gel. O IP foi avaliado pela quantificação do valor da unidade formadora de placa (UFP). Primeiramente realizou-se diluição seriada de 100 µL das amostras de bacteriófagos em microtubos de polipropileno contendo 900 µL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) de 1^{-1} a 1^{-15} , desprezando 100 µL do último microtubo. Paralelamente, em um tubo de ensaio diluiu-se 1 mL de um pré-cultivo de SE em TSB2x em 9 mL de PBS, obtendo-se uma solução de SE 1:9. Após as diluições adicionou-se o conteúdo de cada microtubo e 100 µL da solução SE 1:9 a tubos de ensaio contendo 3.5 mL de triptona de soja *soft* ágar (caldo triptona de soja acrescido com 0.6% de ágar) e, após rápida homogeneização do conteúdo, distribuiu-se em placa de Petri estéril mantido em repouso sob temperatura ambiente para solidificação. As placas de Petri foram incubadas a 40°C por 24 horas para realização da leitura. Para determinação da UFP considerou-se a menor diluição com números de halos contáveis. Com o auxílio de uma régua de precisão acrílica (Trident Indústria de Precisão Ltda, Itapuí, SP, Brasil) mensurou-se o espectro lítico formado na coluna do gel. Classificou-se para o estudo uma escala de três tamanhos distintos conforme o padrão de mensuração: pequeno (P) – amostras com menos de 1 mm de diâmetro; médio (M) – amostra com diâmetro entre 1-2 mm; e grande (G) – amostras com mais de 2 mm de diâmetro.

Espectro de halo em superfície e determinação de grau de virulência

Para ambas as avaliações empregaram-se a técnica *spot-on-lawn*. Com o auxílio de uma alça de Drigalski semeou-se 100 µL de uma solução turva de SE por toda superfície de uma

placa de Petri contendo ágar triptona de soja. Após 10 minutos de repouso pingou-se 10 μ L de solução de bacteriófago. Após um novo repouso incubou-se a 40°C por 24 horas para a leitura do teste. Com um paquímetro (Mitutoyo Sul Americana, Santo Amaro, SP, Brasil) fez-se a mensuração do espectro lítico das amostras de bacteriófagos para determinar o EHS. Para graduar a virulência propusemos uma escala com três padrões conforme a transparência dos halos líticos: 1 – formação de halo lítico com crescimento massivo de SE; 2 – formação de halo com crescimento moderado de SE; e 3 – formação de halo sem crescimento de SE (Figura 1).

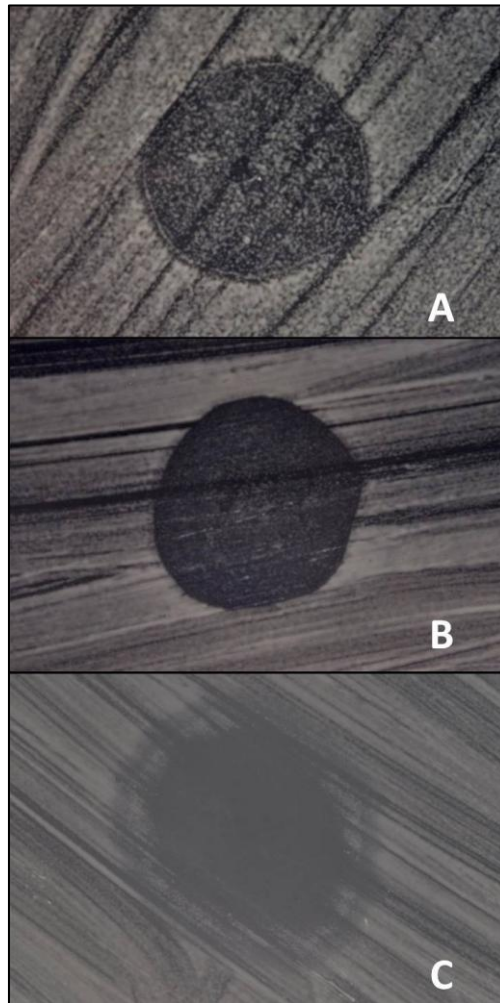


Figura 1. Graduação de virulência conforme a transparência dos halos líticos: A: Grau 1 – formação de halo lítico com crescimento massivo de SE; B: Grau 2 – formação de halo com crescimento moderado de SE; C: Grau 3 – formação de halo sem crescimento de SE.

Análise Estatística

Um modelo de Análise de Variância (PROC GLM, SAS Institute, 2009) foi construído para comparar o EHS entre as categorias de virulência. Devido a um desvio de normalidade, o teste de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY, SAS Institute, 2009) foi usado para comparar a IP mediana entre as categorias de virulência. O teste de Fisher (PROC FREQ, SAS Institute, 2009) foi usado para testar a associação entre o tamanho (P, M, ou G) e as categorias de virulência (1, 2, ou 3). Um modelo de regressão linear (PROC GLM, SAS Institute, 2009) foi usado para avaliar o efeito do IP e virulência no EHS.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nas avaliações realizadas estão expressos na Tabela 1. Do total de amostras isoladas não houve predominância de tamanho no teste HGD, sendo que 32,25% das amostras eram do tipo S (20/62), 32,25% do tipo M (20/62) e 35,5% do tipo L (22/62). Quando se relacionou os tipos de tamanho de placas no HGD com o grau de virulência, observou-se que 55,5% das amostras (35/62) tinham virulência tipo 1, 21% (13/62) tipo 2 e 14% tipo 3 (Figura 2). Não houve associação significativa entre HGD e grau de virulência ($P=0.12$), porém observou-se que há uma tendência biológica crescente na escala de virulência das amostras tipo M, decrescente nas amostras tipo P e que amostras tipo G tenham predominância de virulência grau 1 ou 3 (Figura 3).

Tabela 1. Resultados dos testes aplicados em 62 amostras de bacteriófagos isolados de esgoto hospitalar humano. UFP: unidade formadora de placa, EV: escala de virulência, HGD: tamanho de halo em gel difusão, EHS: espectro de halo em superfície, S: small, M: moderate, L: large

Amostras	HGD	UFP	EV	EHS	Amostras	HGD	UFP	EV	EHS
1	M	$2,1 \times 10^{-7}$	1	9	32	S	$2,6 \times 10^{-13}$	3	13
2	M	4×10^{-7}	3	8	33	L	$5,7 \times 10^{-11}$	1	12
3	M	$9,9 \times 10^{-7}$	3	8	34	S	$2,3 \times 10^{-10}$	1	8
4	M	$1,2 \times 10^{-8}$	3	9	35	M	1×10^{-12}	3	9
5	M	$6,7 \times 10^{-7}$	2	9	36	M	$1,5 \times 10^{-11}$	2	12
6	M	$3,1 \times 10^{-7}$	2	8	37	M	$3,7 \times 10^{-10}$	3	12
7	M	$1,7 \times 10^{-8}$	2	9	38	M	$1,7 \times 10^{-10}$	3	11
8	M	$4,2 \times 10^{-7}$	3	8	39	L	$1,2 \times 10^{-9}$	3	13
9	M	$1,8 \times 10^{-8}$	1	7	40	S	7×10^{-10}	2	11
10	S	$1,4 \times 10^{-7}$	1	9	41	S	$2,6 \times 10^{-12}$	3	11
11	S	$1,9 \times 10^{-8}$	2	8	42	S	$8,2 \times 10^{-12}$	2	9
12	S	$1,6 \times 10^{-8}$	2	8	43	S	$2,3 \times 10^{-12}$	2	14
13	S	$5,2 \times 10^{-7}$	1	8	44	L	$3,3 \times 10^{-10}$	3	11
14	S	$1,9 \times 10^{-8}$	3	9	45	L	$3,7 \times 10^{-11}$	2	14
15	S	$1,7 \times 10^{-7}$	3	9	46	L	$5,1 \times 10^{-11}$	1	12
16	S	$3,3 \times 10^{-7}$	2	8	47	S	$4,1 \times 10^{-10}$	3	9
17	S	$3,1 \times 10^{-12}$	2	8	48	L	$2,2 \times 10^{-12}$	1	12
18	S	$4,2 \times 10^{-11}$	3	8	49	S	$2,8 \times 10^{-11}$	1	8
19	S	$3,6 \times 10^{-10}$	3	9	50	S	$1,2 \times 10^{-10}$	1	8
20	S	$1,1 \times 10^{-10}$	1	9	51	S	$2,4 \times 10^{-11}$	2	9
21	S	$5,2 \times 10^{-7}$	2	8	52	S	5×10^{-10}	1	8
22	S	7×10^{-11}	2	8	53	S	$2,3 \times 10^{-11}$	1	8
23	S	$1,4 \times 10^{-12}$	2	7	54	S	8×10^{-10}	1	8
24	S	$1,3 \times 10^{-13}$	1	8	55	L	$2,5 \times 10^{-11}$	3	10
25	S	$4,8 \times 10^{-11}$	1	9	56	L	1×10^{-9}	3	7
26	S	$3,3 \times 10^{-13}$	2	12	57	L	$2,3 \times 10^{-10}$	1	7
27	S	$1,6 \times 10^{-12}$	2	12	58	L	$1,2 \times 10^{-10}$	1	7
28	S	$4,8 \times 10^{-12}$	3	10	59	L	$1,4 \times 10^{-10}$	2	7
29	S	$3,2 \times 10^{-12}$	1	9	60	L	$2,1 \times 10^{-11}$	3	6
30	S	$3,6 \times 10^{-12}$	1	9	61	L	$1,9 \times 10^{-10}$	3	9
31	S	$3,7 \times 10^{-11}$	2	9	62	L	$4,6 \times 10^{-9}$	3	10

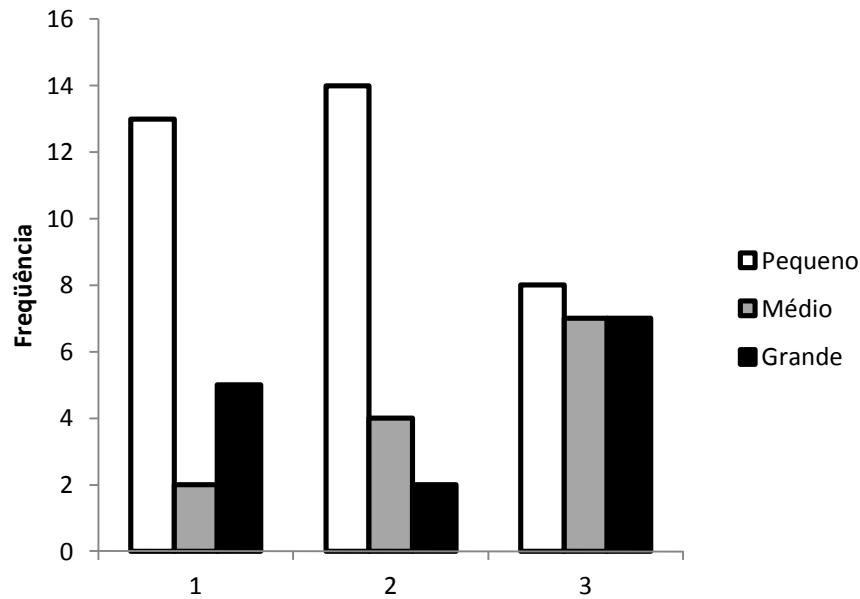


Figura 2. Distribuição da escala de virulência por categoria de tamanho; Fisher's test ($P=0.12$).

Ao relacionar virulência com índice de proliferação houve uma distribuição uniforme, não havendo diferença estatística entre as médias de UFP quando agrupados por grau de virulência ($P=0.61$) (Figura 4), como também não houve relação de EHS com a virulência ($P=0.34$) (Figure 5). No entanto encontrou-se uma relação entre IP e EHS ($P=0.003$), na qual independente de virulência e tamanho em HGD ($P=0.19$), quanto maior for a UFP, maior o EHS (Figure 6).

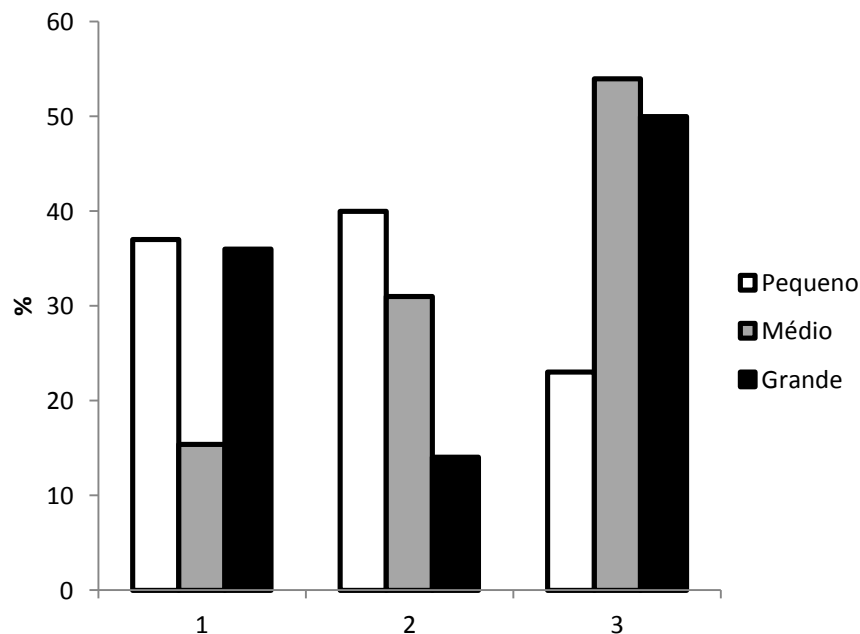


Figura 3. Distribuição percentual da escala de virulência com as categorias de tamanho dos bacteriófagos estudados;

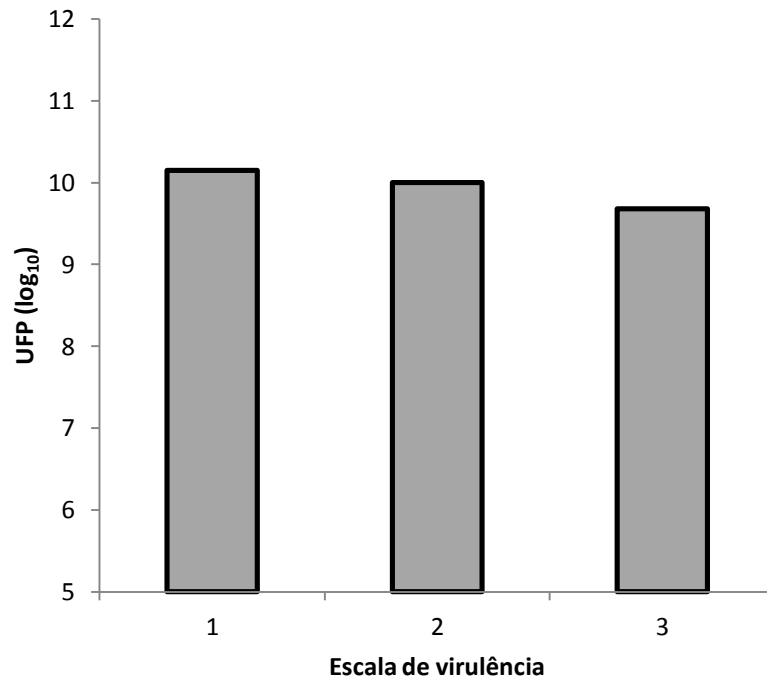


Figure 4. Relação entre índice de proliferação vs escala de virulência; Kruskal-Wallis test (P=0.61).

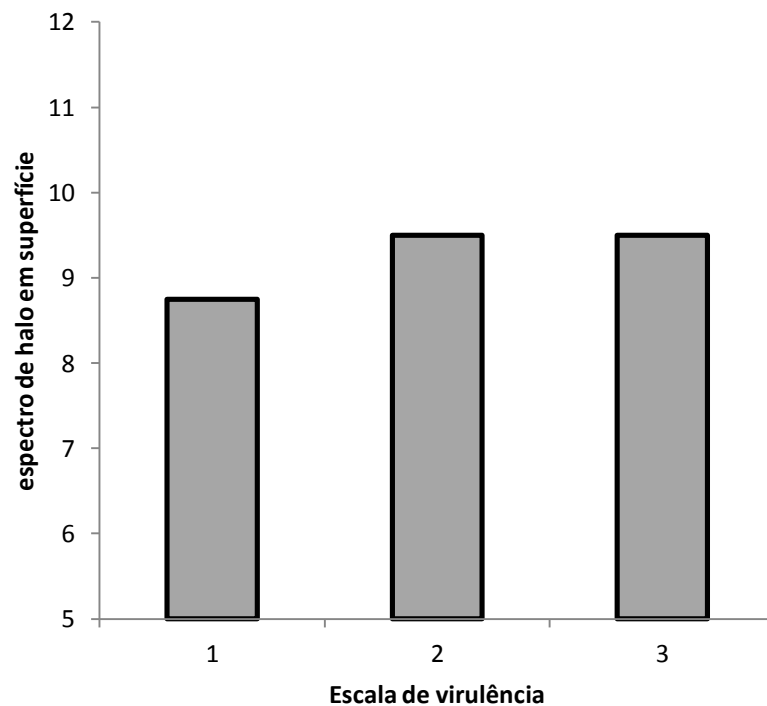


Figura 5. Relação entre espectro de halo em superfície vs escala de virulência; Análise de variância (P=0.34).

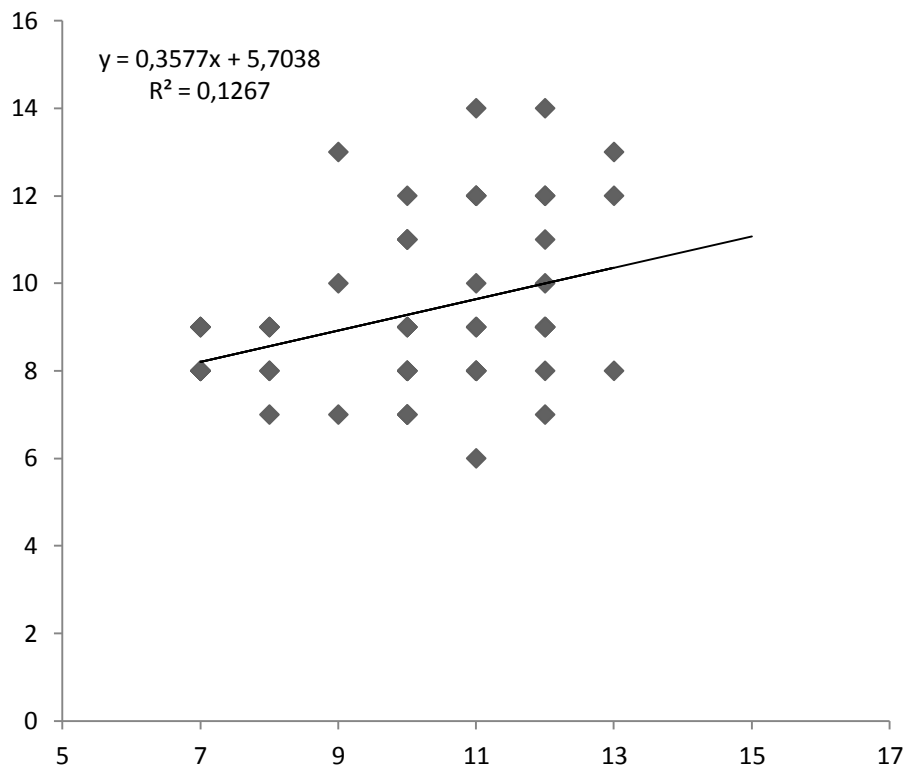


Figure 6. Gráfico de dispersão relacionando espectro de halo em superfície (EHS) vs índice de proliferação. Eixo Y: EHS (mm), Axis X: Log10. Linha sólida indica a linha de tendência simples quando comparada aos pontos dispersos.

DISCUSSÃO

Conforme Bull et al. (20), o ciclo lítico dos bacteriófagos é dividido em três fases. A primeira fase é a de dispersão, que é relativa à liberação de fagos no ambiente por um hospedeiro no intuito da infecção de novos hospedeiros, onde a dispersão é afetada diretamente pelos índices de adsorção dos fagos e hospedeiros no ambiente. A segunda fase é a juvenil, que inicia com o momento da infecção e termina quando as primeiras partículas fágicas infectantes são criadas no interior do hospedeiro. O período deste intervalo é dependente do índice de expressão do genoma fágico, que é determinado pela combinação do estado fisiológico da célula hospedeira e o genoma do fago. A terceira fase é a adulta, que inicia com o surgimento das primeiras partículas fágicas infectantes e termina com o rompimento da célula hospedeira (lise). Durante este período o número de partículas fágicas infectantes dentro da célula aumenta gradativamente. O acúmulo de partículas fágicas é linear até o término deste período, sendo suprimido após a lise (21). Além disso, o declive de aumento linear das partículas fágicas variam entre as espécies de fagos, como também conforme o estado fisiológico da célula hospedeira (22).

Mediante tais informações e conforme nossa observação compreendeu-se que a virulência demonstrada *in vitro* por amostras líticas é relativa à capacidade de adsorção e ao tempo curto de replicação (ou como os autores denominaram: expressão de genoma fágico). Logo, supomos que a classificação proposta de virulência nível 3 possivelmente refere-se a amostras de alta capacidade de adsorção e com um tempo curto de replicação; a virulência nível 2 seja relativa a uma baixa capacidade de adsorção ou a um tempo de replicação longo;

e a virulência nível 1 sejam amostras de baixa capacidade de adsorção com um tempo longo de replicação. Isso fica claro ao observarmos que existem amostras com UFP alta e virulência 1 (ex. amostra 33; ver Tabela 1) e também amostras de UFP baixa com virulência 3 (ex. amostra 8).

Os exemplos citados também representam que a quantidade de replicação e escala em HGD não influencia na virulência, onde inclusive observou-se uma distribuição homogênea entre os tamanhos (P, M, G) e os níveis de virulência, sendo que as amostras de tamanho P tenderam a apresentar numericamente uma virulência nível 1, mas presumimos que isso seja relativo a população por nós avaliada, podendo variar em outros estudos populacionais.

Apesar da virulência não estar relacionada com os fatores estudados verificou-se que os índices de proliferação influenciam no espectro de ação lítica, onde quanto maior o UFC maior o diâmetro de abrangência lítica.

Os testes utilizados neste estudo são relativamente simples e apresentam um custo relativamente baixo, o que facilita a sua utilização em qualquer laboratório de microbiologia (do mais simples ao mais avançado), podem ser utilizados como testes de triagem inicial em estudos com bacteriófagos nas áreas médicas e agrárias.

Por fim concluímos que espectro de atividade lítica, tamanho de halo em gel difusão e proliferação são fatores independentes de virulência, porém amostras prolíferas apresentam maior espectro de atividade lítica, logo, amostras com essas características associadas com alta virulência apresentam um potencial desejado para um possível uso terapêutico.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Projeto FAPESP nº 2010/50.385-0).

REFERÊNCIAS

1. Bier O. Microbiologia e Imunologia. 23a ed. São Paulo: Melhoramentos; 1984.
2. Dublanchet A, Fruciano E. Brève histoire de la phagothérapie. *Med Mal Infect.* 2008;38:415-20.
3. Mayr A, Guerreiro MG. *Virologia Veterinária*. 2a ed. Porto Alegre: Sulina; 1981.
4. Rohwer F, Edwards R. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol.* 2002;184:4529-35.
5. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol.* 1997;5:268-71.
6. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol.* 2006;296:5-14.
7. Matthey M, Spencer J. Bacteriophage therapy - cooked goose or Phoenix rising? *Curr Opin Biotechnol.* 2008;9:608-12.
8. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother.* 2005;11:211-19.

9. Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G, et al. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar enteritidis in vitro and in vivo. *Poult Sci.* 2007;86:1904-09.
10. Marietto-Gonçalves GA, Lima ET, Donato TC, Rocha TS, Cisneros Álvarez LE, Sequeira JL, et al. Eradication of *Salmonella typhimurium* in broiler chicks by combined use of P22 bacteriophage and probiotic. *Microbiol Res.* 2011;3:4-9.
11. Fiorentin L, Vieira ND, Barioni Júnior W. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol.* 2005;34:258-63.
12. Atterbury RJ, Van Bergen MAP, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, et al. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:4543-49.
13. Borie C, Albala I, Sánchez P, Sánchez ML, Ramírez S, Navarro C, et al. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Dis.* 2008;52:64-7.
14. Borie C, Sánchez ML, Navarro C, Ramírez S, Morales MA, Retamales AJ, et al. Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Avian Dis.* 2009;53:250-4.
15. Toro H, Price SB, McKee AS, Hoerr FJ, Krehling J, Perdue M, et al. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Dis.* 2005;49:118-24.
16. Marietto Gonçalves GA, Andreatti Filho RL. Fagoterapia: uma opção de controle biológico para a salmonelose aviária. *Rev Educ Contin Med Vet Zootec. CRMV-SP.* 2012;10:6-13.
17. Goode D, Allen VM, Barrow PA. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:5032-6.
18. Higgins JP, Higgins SE, Guenther KL, Huff W, Donoghue AM, Donoghue DJ, et al. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poult Sci.* 2005;84:1141-5.
19. Bielke LR, Higgins SE, Donoghue AM, Donoghue DJ, Hargis BM, Tellez G. Use of wide-host-range bacteriophages to reduce *Salmonella* on poultry products. *Int J Poult Sci.* 2007;6:754-7.
20. Bull JJ, Pfennig DW, Wang I-N. Genetic detail, optimization and phage life histories. *Int J Poult Sci.* 2004;19:76-82.
21. Wang IN, Dykhuizen DE, Slobodkin LB. The evolution of phage lysis timing. *Evol Ecol.* 1996;10:545-58.

22. Abedon ST, Herschler TD, Stopar D. Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:4233-41.

Recebido em: 03/03/2013

Aceito em: 09/02/2015