ISSN 1678-8842

Embrapa Suínos e Aves

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 16

Concórdia, SC / Setembro, 2024

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

2 FOME ZERO E AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

Quantificação de bacteriófagos em amostras biológicas: comparação de métodos com plaqueamento em ágar

Clarissa Silveira Luiz Vaz[1], Daiane Voss-Rech[2], Francisco Noé da Fonseca[3] e Arlei Coldebella [4]

[1] Médica veterinária, doutora em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC. [2] Bióloga, mestre em Medicina Veterinária, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC. [3]Farmacêutico, doutor em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa, Gerência-Geral de Estratégias para o Mercado, Brasília, DF. [4] Médico Veterinário, doutor em Ciência Animal e Pastagens, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

Resumo – O ensaio em placa sobre dupla camada de ágar é um método bem estabelecido para quantificação de bacteriófagos, porém laborioso. Aqui, comparamos a quantificação de bacteriófagos em amostras intestinais de frangos por meio desse método clássico e por um procedimento mais simples e rápido, o ensaio em placa com gota. Após administração de um coquetel com fagos, frangos foram eutanasiados em intervalos regulares e o conteúdo cecal foi removido. As amostras foram serialmente diluídas e simultaneamente quantificadas por ambos os ensaios. Para o ensaio em dupla camada de ágar, sobrecamadas de ágar foram preparadas com cada diluição da amostra previamente homogeneizada com a bactéria hospedeira e adsorvida, e então distribuídas sobre placas de cultivo individuais contendo meio de cultura. No ensaio em gota, alíquotas de todas as diluições foram diretamente dispensadas sobre a superfície de uma mesma placa de cultivo previamente preparada com a sobrecamada da bactéria hospedeira. Após incubação, as UFPs foram contadas e transformadas em escala logarítmica para análise estatística. Houve associação significativa ($p \leq 0,05$) entre as técnicas ($R2 = 0,8921$). Todavia, o ensaio em placa com gota estimou números mais altos de fagos comparado ao ensaio em placa sobre dupla camada de ágar, numa média de 0,42 log. O ensaio em placa com gota foi efetivo para quantificar bacteriófagos, estimando títulos aproximados de fagos em relação ao ensaio em placa sobre dupla camada e possibilitando reduzir o número de placas de cultivo e o tempo necessário para a análise de muitas amostras.

Termos para indexação: bacteriófago, título de fago, enumeração, método em placa.

Bacteriophage quantification in biological samples: comparison of plating methods

Abstract – Double agar overlay plaque assay is a well-stablished technique to enumerate bacteriophages, but also cumbersome to perform. We compared plating methods using the double agar overlay plaque assay and

Embrapa Suínos e Aves
Rodovia BR 153 - KM 110
Caixa Postal 321
89.715-899, Concórdia, SC
Fone: (49) 3441 0400
Fax: (49) 3441 0497
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente
Franco Muller Martins

Secretária-executiva
Tânia Maria Biavatti Celant

Membros
Clarissa Silveira Luiz Vaz
Cátia Silene Klein
Gerson Neudi Scheuermann
Jane de Oliveira Peixoto
Joel Antonio Boff

Revisão de texto
Jean Carlos Porto Vilas Boas Souza

Normalização bibliográfica
Claudia Antunez Arrieche (CRB-14/880)

Projeto gráfico
Leandro Sousa Fazio

Diagramação
Vivian Fracasso

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

a simpler and faster protocol, the small drop plaque assay (spot test), to enumerate bacteriophages in intestinal samples from broilers. After receiving a phage cocktail, broilers were euthanized at regular intervals to obtain cecal content. Samples were serially diluted and phages were concurrently enumerated by both plaque assays. For the double agar overlay, monolayers with each dilution were prepared from samples previously homogenized and adsorbed with the host bacterium and then placed on overlay culture in individual plates. In the small drop plaque assay, all dilutions from a single sample were placed onto a unique plate previously prepared with a monolayer of the host strain. Plates were incubated and PFUs were counted and log-transformed before statistical analysis. Analyses revealed a significant association ($p \leq 0.05$) between the evaluated methods ($R2 = 0.8921$). However, the small drop assay estimated higher phage numbers when compared to the double agar overlay assay at an average of 0.42 log. The small drop plaque assay was useful for determining the bacteriophages number in the analyzed samples, estimating approximate phage titers, thus saving time and reducing the number of plates for analysis of large amount of samples.

Index terms: bacteriophage, phage titer, enumeration, plaque counting.

Introdução

Bacteriófagos (fagos) são vírus que infectam seletivamente bactérias. Os fagos com ciclo de vida lítico introduzem seus ácidos nucleicos na bactéria-alvo, desencadeando a replicação e formação de novas partículas virais, que rompem a membrana da bactéria durante sua liberação. Esse efeito bactericida torna os bacteriófagos líticos atrativos para controle de bactérias patogênicas em animais de produção (Gigante; Atterbury, 2019). Outras formas de aplicação no combate a bactérias incluem descontaminação de alimentos e desinfecção de superfícies e ambientes (Żbikowska; Michalczuk; Dolka, 2020; Abd-El Wahab *et al*., 2023; Jordá *et al*., 2023; Gvaladze; Lehnherr; Hertwig, 2024).

Pelas suas características biológicas (incapacidade de replicar fora da célula hospedeira), a propagação de fagos em laboratório necessita de co-cultivo com a bactéria-alvo em meio líquido ou sólido que, sob condições adequadas, permite a replicação viral. O cultivo em meio sólido ou semissólido, disposto na superfície do ágar, possibilita visualizar a infecção pelo fago. Múltiplos ciclos de infecção a partir de uma única partícula viral levam à formação de zonas circulares na área adjacente, observadas na forma de placas de lise (inibição da multiplicação bacteriana) sobre o cultivo da bactéria-hospedeira (Sanders, 2012; Baer; Kehn-Hall, 2014). O ágar limita a difusão das placas de lise, uma vez que a multiplicação dos fagos acontece na cultura da célula-alvo enquanto houver atividade metabólica e nutrientes disponíveis (Carlson, 2005). O tamanho das placas de lise resultantes dessa interação depende do ciclo de vida do fago, espessura e concentração das camadas do ágar, composição do meio de cultura, densidade celular, entre outros fatores (Carlson, 2005; Baer; Kehn-Hall, 2014). Diferenças no aspecto das placas de lise são também determinadas por características peculiares de cada fago, como o tempo de adsorção e o número de partículas virais produzidas em cada célula bacteriana usada no co-cultivo (Carlson, 2005; Sanders, 2012). De modo geral, a produção de 10 a 15 partículas de fagos por célula-alvo é suficiente para a formação de placas de lise visíveis em meio sólido (Carlson, 2005). Cada placa de lise é entendida como uma unidade formadora de placa (UFP), que é usada para estabelecer o título de bacteriófagos (Sanders, 2012).

A quantificação de fagos em amostras biológicas é uma etapa essencial durante a condução de experimentos em pesquisa e desenvolvimento com bacteriófagos. Os procedimentos laboratoriais de contagem usando cultivo em placa são geralmente preferidos porque possibilitam a visualização e enumeração de UFPs. Dentre esses, o método clássico é o ensaio sobre dupla camada de ágar (Kropinski *et al*., 2009; Sanders, 2012; Waturangi, 2024), facilmente executado em laboratórios que dispõem de infraestrutura básica para microbiologia. Entretanto, esse método demanda tempo de execução e gasto de insumos, dificultando a análise de muitas amostras num curto intervalo. O ensaio em placa com gota é uma variação desse procedimento, que possibilita dispor várias diluições da amostra-teste numa única placa de cultivo, otimizando o uso de insumos e o tempo de execução dos ensaios (Mazzocco *et al*., 2009b). Esse trabalho comparou a quantificação de bacteriófagos líticos para *Salmonella* em conteúdo intestinal de frangos pelo ensaio em placa sobre dupla camada de ágar e pelo ensaio em placa com gota, visando estimar a equivalência entre si. Essa publicação apoia o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas, por meio do fortalecimento da pesquisa científica e melhoria das capacidades tecnológicas de setores industriais nos

países em desenvolvimento (meta 9.5 do ODS 2 - Indústria, inovação e infraestrutura).

Material e métodos

Bacteriófagos

Foram usados três bacteriófagos líticos nativos (Vaz *et al*., 2020), isolados de galinhas, com ação contra sorotipos de *Salmonella* spp., armazenados na Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Suinocultura e Avicultura (CMISEA) da Embrapa Suínos e Aves. A partir de estoques a -80 °C em tampão Sulfato-Magnésio (SM) com 7% de DMSO e 1% de clorofórmio, os fagos foram individualmente amplificados em uma cepa hospedeira de *Salmonella* Enteritidis, proveniente da mesma coleção, usando cultivo sobreposto em placa em caldo nutriente com $MgSO_4$ (10 mM) e 0,65% de agarose, incubado a 37 °C por 18 h. A camada superficial de agarose foi extraída da placa e suspensa em tampão SM acrescido de 5% de clorofórmio e incubada *overnight* a 4 °C. A suspensão foi assepticamente coada, centrifugada a 12.000 x g por 5 min, filtrada em membrana de 0,45 µM e estocada a 4 °C. Cada fago foi submetido à diluição seriada e titulado sobre dupla camada de ágar em placa de cultivo, usando a mesma cepa de *S*. Enteritidis.

Inoculação *in vivo* e colheita de amostras

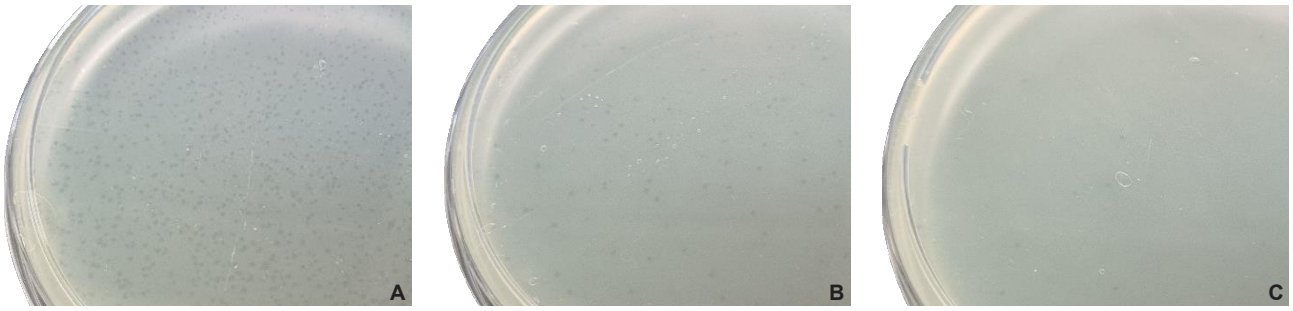
As aves usadas nesse estudo foram tratadas segundo os princípios de ética e bem-estar animal preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os procedimentos de alojamento, métodos experimentais e eutanásia foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Suínos e Aves, certificado n° 21/2018. Pintinhos White Leghorn livres de patógenos específicos (SPF) foram alojados em cabines isoladoras com ar filtrado e receberam ração e água à vontade. Um coquetel com os três fagos (aproximadamente $1,4 \times 10^{11}$ UFP/ave/dia) foi administrado às aves pela água de beber dos 35 aos 39 dias de idade. O conteúdo cecal foi colhido em intervalos regulares (24, 72 e 120 h) após a administração dos fagos, totalizando 61 aves analisadas. O material foi acondicionado em gelo e analisado em até 2 h após a colheita.

Preparação e diluição das amostras

No laboratório, o conteúdo cecal de cada ave (1-2 g) foi individualmente pesado, diluído em 10 volumes de tampão SM, tratado com 2% de clorofórmio e homogeneizado até dissolução completa. De cada amostra, alíquotas de 2 mL foram centrifugadas a 10.000g por 3 min e o sobrenadante foi submetido a diluições decimais seriadas em tampão SM, sendo imediatamente submetido aos dois procedimentos de contagem, de forma simultânea.

Quantificação pelo ensaio em placa sobre dupla camada de ágar

O ensaio foi executado conforme anteriormente descrito (Carlson, 2005), com algumas adaptações. Alíquotas de 0,02 mL de cada diluição foram transferidas para um microtubo contendo 200 µL de uma cultura da cepa hospedeira de *S*. Enteritidis em fase exponencial de crescimento, e incubadas a 37 °C por 10-15 min para promover a adsorção. A seguir, todo o conteúdo do microtubo foi transferido para tubos de ensaio de vidro, contendo 6 mL de caldo nutriente com 0,65% de agarose e $MgSO_4$ (10 mM) (CN-A-$MgSO_4$), previamente liquefeito e mantido em banho de água a 48 °C, e imediatamente vertido sobre placas (90 x 15 mm) com ágar nutriente e $MgSO_4$ (10 mM) (AN-$MgSO_4$). As placas foram mantidas entreabertas na cabine de segurança biológica até solidificação (15-20 min) e incubadas a 37 °C por 18-24 h. Desta forma, cada diluição foi aplicada em placas individuais. Placas contendo entre 30 e 300 UFPs foram selecionadas para a contagem (Figura 1) e o resultado foi corrigido pelo fator de diluição correspondente.



Fotos: Daiane Voss-Rech

Figura 1. Aspecto da contagem de bacteriófagos pelo ensaio em placa (90 x 15 mm) sobre dupla camada de ágar (diluições seriadas de base 10). Cada placa de cultivo contém uma única diluição da amostra-teste: 10^{-5} (A), 10^{-6} (B) e 10^{-7} (C).

Quantificação pelo ensaio em placa com gota

O ensaio foi realizado segundo descrito por Carlson (2005), com algumas adaptações. Para cada amostra, um cultivo em sobrecamada contendo 200 µL da cepa hospedeira de *S*. Enteritidis em fase exponencial de crescimento e 6 mL de CN-A-$MgSO_4$ foi previamente preparado sobre uma placa (90 x 15 mm) com AN-$MgSO_4$. Partindo das mesmas diluições utilizadas no ensaio anterior, 20 µL de cada diluição foram dispensados em forma de gota sobre a placa. As placas foram mantidas entreabertas na cabine de segurança biológica até completa absorção das gotas (15-20 min) e incubadas a 37 °C por 18-24h. Desta forma, todas as diluições da amostra foram aplicadas em uma única placa. Diluições contendo entre 3 e 30 UFPs foram selecionadas para a contagem (Figura 2) e o resultado corrigido pelo fator de diluição correspondente. Uma representação esquemática de ambos os procedimentos é apresentada na Figura 3.

Análise estatística

A contagem de bacteriófagos obtida por ambos os ensaios foi transformada em escala logarítimica (log_{10} UFP/g). A seguir, foi avaliada a associação entre os ensaios por meio da análise de regressão linear, seguida do teste t para dados pareados, de modo a avaliar diferença entre si. Todas as análises foram realizadas pelo SAS (versão 9.4), considerando um nível mínimo de significância de $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

Várias estratégias para titulação de bacteriófagos em amostras biológicas estão disponíveis, como técnicas baseadas na contagem direta de partículas virais infectivas (métodos em placa que permitem a visualização de UFPs) ou indireta, como detecção e quantificação de ácidos nucleicos (ex: PCR quantitativa). Ács, Gambino e Brøndsted (2020) detalham vantagens e limitações de cada uma, cuja adoção depende da capacidade de cada laboratório, do objetivo, da assertividade desejada e do custo que pode ser comportado. Os métodos para quantificação em placa de cultivo exigem, entre outros fatores, disponibilidade de uma cepa bacteriana que suporte a infecção pelo fago e a liberação de sua progênie. Aqui, usamos uma bactéria sabidamente permissiva aos três fagos em estudo. A capacidade infectiva desses fagos, o tempo de adsorção e a média de partículas virais produzidas por célula dessa bactéria hospedeira foram previamente determinados (dados não apresentados), assim como o aspecto morfológico das placas de lise produzidas já era conhecido, facilitando a execução desse estudo.

Pelo ensaio em placa sobre dupla camada de ágar, cada diluição da amostra-teste deve ser misturada à cepa bacteriana permissiva que, após a adsorção (interação entre receptores presentes no fago e na cepa-alvo que culmina com a ligação à bactéria), é disposta como sobrecamada (geralmente de ágar em baixa concentração – *soft agar*) na superfície de uma placa individual contendo ágar microbiológico (Kropinski *et al*., 2009; Waturangi,

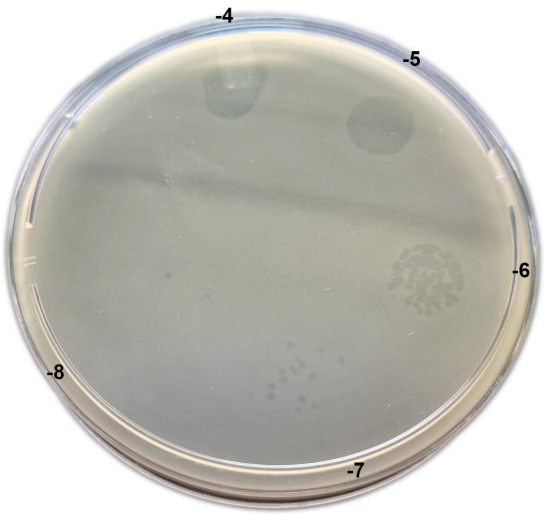


Foto: Daiane Voss-Rech

Figura 2. Aspecto da contagem de bacteriófagos pelo ensaio em placa (90 x 15 mm) com gota (diluições seriadas de base 10). A placa de cultivo contém múltiplas diluições da amostra-teste.

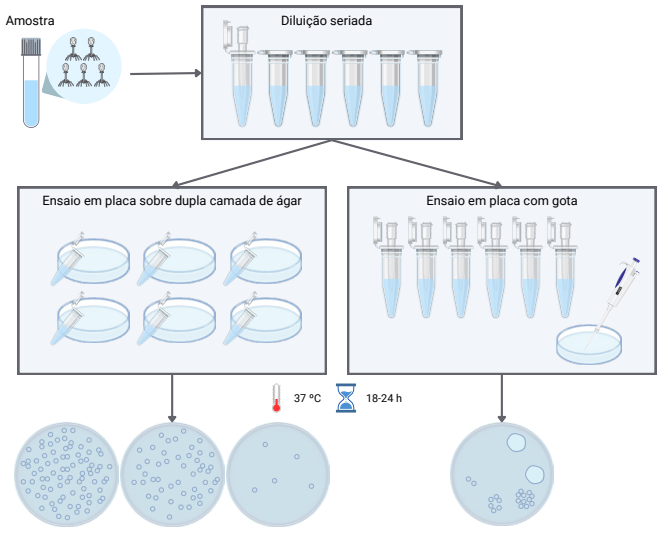


Ilustração: Marina Schmitt

Figura 3. Quantificação de bacteriófagos líticos em conteúdo cecal de frangos por meio do ensaio em placa sobre dupla camada de ágar e do ensaio em placa com gota.

2024). No ensaio com gota, todas as diluições de uma amostra são dispostas numa única placa de cultivo, possibilitando a visualização de UFPs dentro do perímetro de cerca de 10-12 mm, correspondente ao ponto no qual cada gota foi aplicada sobre o ágar (Mazzocco *et al*., 2009b). De acordo com o tamanho da placa de lise produzida pelo bacteriófago em estudo, pode ser necessário ajustar o volume da gota a ser dispensada (Mazzocco *et al*., 2009b).

Há protocolos de quantificação em placa de fagos que suprimem o cultivo em sobrecamada. É o caso da contagem por plaqueamento direto, que usa placas de cultivo individuais para cada diluição (Mazzocco *et al*., 2009a), ou variações do método em gota propriamente dito (Mazzocco *et al*., 2009b; Chhibber; Kaur; Gondil, 2018). Essa estratégia agiliza a execução do ensaio, porém a ausência da sobrecamada de agarose tende a prejudicar a resolução das placas de lise formadas (Mazzocco *et al*., 2009a). Chhibber, Kaur e Gondil (2018) relatam títulos aproximados de fagos para *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* quantificados simultaneamente pelo ensaio em gota sem sobrecamada e pelo ensaio em placa sobre dupla camada de ágar. Contudo, o ensaio em gota sem sobrecamada resultou em contagens com maior desvio padrão entre si, sugerindo que possa ser usado como um método de triagem para um resultado rápido inicial, passível de ser validado posteriormente pelo ensaio clássico.

No presente estudo, a análise de regressão linear aplicada sobre as contagens de bacteriófagos obtidas pelo ensaio em placa sobre dupla camada de ágar e o ensaio em placa com gota revelou associação significativa ($p \leq 0,05$) entre ambos os procedimentos ($R^2 = 0,8921$) (Figura 4). Entretanto, o ensaio em placa com gota estimou números mais altos de fagos quando comparado ao ensaio em placa sobre dupla camada de ágar, numa média de 0,42 log. Notadamente, a execução do ensaio em gota envolve menor manipulação das amostras em comparação ao método clássico, e isso pode ter causado menor grau de danos estruturais aos bacteriófagos e menos interferência na formação das placas de lise. Além disso, o preparo prévio da sobrecamada da bactéria hospedeira dispensa a transferência da diluição de fagos para tubos de ensaio, evitando a perda de fagos pela retenção nas paredes do tubo. Estes fatos corroboram, possivelmente, as diferenças de titulação observadas neste estudo.

Ambas as estratégias analisadas nesse estudo exigem a diluição seriada da amostra-teste. No entanto, o procedimento em gota otimiza a execução do ensaio de um modo geral por usar placas

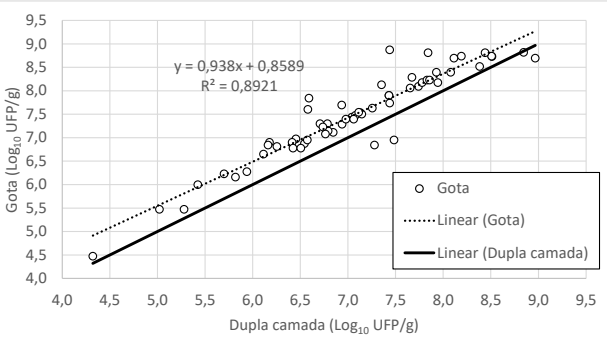


Figura 4. Associação entre a contagem de bacteriófagos pelo ensaio em placa sobre dupla camada de ágar e o ensaio em placa com gota.

previamente preparadas com o cultivo da bactéria hospedeira e dispor todas as diluições numa única placa, o que também economiza insumos. O tempo de leitura também é reduzido, pois a área a ser analisada no ensaio em gota é bem menor que a placa inteira do ensaio clássico. Essas características são desejáveis em estudos que exigem quantificação de bacteriófagos em grande número de amostras num curto intervalo de tempo. Todavia, os métodos baseados em placa podem ter aplicação limitada para detecção e/ou quantificação de bacteriófagos lisogênicos, fagos que produzem lise incompleta ou fagos que formam placas de lise pequenas, de difícil visualização (Kropinski *et al*., 2009; Waturangi, 2024). Placas de lise pequenas ou que apresentam morfologia variável podem ser melhor visualizadas com o uso de corantes comuns, como cristal violeta (Baer; Kehn-Hall, 2014). Bacteriófagos jumbo (caracterizados por partículas grandes - tamanho de cabeça ~100 nm e comprimento de cauda ~200 nm, com genoma maior de 200 Kb) difundem-se pobremente na monocamada de ágar, dificultando sua visualização em placa (Harding; Kyte; Fineran, 2023). A substituição do ágar por agarose em baixa concentração favorece a difusão das placas produzidas por esses fagos, facilitando a sua contagem (Waturangi, 2024).

Cabe considerar eventuais diferenças na precisão e reprodutibilidade dos métodos para quantificação de fagos em placa entre laboratórios e/ou analistas. Outras estratégias para quantificar bacteriófagos em amostras biológicas de forma mais rápida, como PCR quantitativa em tempo real (qPCR), podem ser consideradas, de acordo com a aplicabilidade e exequibilidade em cada situação. A precisão e a reprodutibilidade, todavia, dependerão grandemente da padronização do ensaio. A qPCR usa *primers* e sondas específicos para o fago em estudo, cujo desenho e síntese exigem conhecimento do

genoma completo ou de sequências de genes-alvo conservados. A padronização envolve também correlacionar os resultados da quantificação molecular com o método de plaqueamento em ágar, já que a primeira pode superestimar a contagem ao detectar DNA de partículas viáveis e inviáveis, enquanto o segundo detecta somente fagos viáveis. Além disso, também demandará treinamento de pessoal técnico para execução (Anderson *et al*., 2011; Ács; Gambino; Brøndsted, 2020).

Conclusões

Nas condições avaliadas, o ensaio em placa com gota estimou títulos maiores de bacteriófagos em comparação ao ensaio em placa sobre dupla camada de ágar. Contudo, ambas as estratégias apresentaram associação significativa entre si, indicando que são equivalentes. Assim, o ensaio em placa com gota pode ser considerado em estudos que exigem análise de múltiplas amostras num curto período, otimizando tempo de trabalho e insumos laboratoriais. Os resultados são derivados do uso de bacteriófagos e cepa bacteriana permissiva específicos e servem como base para aplicação dos protocolos avaliados para outros fagos e bactéria hospedeira, desde que apresentem características biológicas semelhantes.

Agradecimentos

Esse trabalho foi financiado pelo Sistema Embrapa de Gestão (SEG, projeto n° 20180300800).

Referências

ABD-EL WAHAB, A.; BASIOUNI, S.; EL-SEEDI, H. R.; AHMED, M. F. E.; BIELKE, L. R.; HARGIS, B.; TELLEZ-ISAIAS, G.; EISENREICH, W.; LEHNHERR, H.; KITTLER, S.; SHEHATA, A. A.; VISSCHER, C. An overview of the use of bacteriophages in the poultry industry: Successes, challenges, and possibilities for overcoming breakdowns. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 1136638, 2023.

ÁCS, N.; GAMBINO, M.; BRØNDSTED, L. Bacteriophage enumeration and detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 594868, 2020.

ANDERSON, B.; RASHID, M. H.; CARTER, C.; PASTERNACK, G.; RAJANNA, C.; REVAZISHVILI, T., DEAN, T.; SENECAL, A.; SULAKVELIDZE, A. Enumeration of bacteriophage particles: comparative analysis of the traditional plaque assay and real-time QPCR- and nanosight-based assays. **Bacteriophage**, v. 1, p. 86-93, 2011.

BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems. **Journal of Visualized Experiments**, v. 93, e52065, 2014.

CARLSON, K. Working with bacteriophages: common techniques and methodological approaches. In: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. (ed.) **Bacteriophages:** biology and applications. New York: CRC Press, 2005. p. 437-494.

CHHIBBER, S.; KAUR, P.; GONDIL, V. S. Simple drop cast method for enumeration of bacteriophages. **Journal of Virological Methods**, v. 262, p. 1–5, 2018.

GIGANTE, A.; ATTERBURY, R. J. Veterinary use of bacteriophage therapy in intensively-reared livestock. **Virology Journal**, v. 16, n. 155, 2019.

GVALADZE T.; LEHNHERR, H.; HERTWIG, S. A bacteriophage cocktail can efficiently reduce five important *Salmonella* serotypes both on chicken skin and stainless steel. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 1354696, 2024.

HARDING, K. R.; KYTE, N.; FINERAN, P. C. Jumbo phages. **Current Biology**, v. 33, p. R743–R759, 2023.

JORDÁ, J.; LORENZO-REBENAQUE, L.; MONTORO-DASI, L.; MARCO-FUERTES, A.; VEGA, S.; MARIN, C. Phage-based biosanitation strategies for minimizing persistent *Salmonella* and *Campylobacter* bacteria in poultry. **Animals**, v. 13, 3826, 2023.

KROPINSKI, A. M.; MAZZOCCO, A.; WADDELL, T. E.; LINGOHR, E.; JOHNSON, R. P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In: CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. (ed.). **Bacteriophages**: methods and protocols: isolation characterization, and interactions. New York: Humana Press, 2009. v. 1.

MAZZOCCO, A.; WADDELL, T. E.; LINGOHR, E.; JOHNSON, R. P. Enumeration of bacteriophages by the direct plating plaque assay. In: CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. (ed.), **Bacteriophages**: methods and protocols: isolation characterization, and interactions. New York: Humana Press, 2009a. v. 1. p. 77-80.

MAZZOCCO, A.; WADDELL, T. E.; LINGOHR, E.; JOHNSON, R. P. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system. In: CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. (ed.). **Bacteriophages**: methods and protocols: isolation characterization, and interactions. New York: Humana Press, 2009b. v. 1. p. 81–85.

SANDERS, E. R. Aseptic laboratory techniques: plating methods. **Journal of Visualized Experiments**, v. 63, e3064, 2012.

VAZ, C. S. L.; RECH, D. V.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; BRENTANO, L.; TREVISOL, I. M. Effect of time of therapy with wild-type lytic bacteriophages on the reduction of *Salmonella* enteritidis in broiler chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 240, 2020.

WATURANGI, D. E. Enumeration of bacteriophages by plaque assay. In: TUMBAN, E. (ed.) **Bacteriophages**: methods in molecular biology. New York: Humana Press, 2024. (MIMB, volume 2738). p. 147-153.

ŻBIKOWSKA, K.; MICHALCZUK, M.; DOLKA, B. The use of bacteriophages in the poultry industry. **Animals**, v.10, p. 872, 2020.

Embrapa

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA