

JONAS DA SILVA TEIXEIRA

**VARIABILIDADE E ESPECIFICIDADE DE BACTERIÓFAGOS INTESTINAIS
DE BEZERROS SAUDÁVEIS E DIARREICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

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

T

T266v
2019
Teixeira, Jonas da Silva, 1992-
Variabilidade e especificidade de bacteriófagos intestinais
de bezerros saudáveis e diarreicos / Jonas da Silva Teixeira. –
Viçosa, MG, 2019.
x, 27 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Poliane Alfenas Zerbini.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 25-27.

1. Vírus. 2. Bactérias. 3. Diarréia. 4. Diarréia em bovinos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.2

JONAS DA SILVA TEIXEIRA

**VARIABILIDADE E ESPECIFICIDADE DE BACTERÍOFAGOS INTESTINAIS DE
BEZERROS SAUDÁVEIS E DIARREICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2019.


Fernanda Prieto Bruckner


Maria Cristina Dantas Vanetti


Poliane Affenas Zerbini
(Orientadora)

*Dedico aos meus pais Luiz Miranda Teixeira e Maria Ivone da Silva Teixeira, pois
tudo que sou devo a eles.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida! Pela saúde que me concedeu, por colocar as pessoas certas no meu caminho e me dar forças para enfrentar todos os desafios que a vida me impõe diariamente. Minha luz, quando todas as outras luzes falham.

À senhora Maria Ivone, minha mãe, e ao senhor Luiz, meu pai, que me criaram e me ensinaram ser o melhor que eu possa ser dentro das minhas inúmeras limitações. Me ensinaram a ser um homem de caráter, moral e ética firmes, independentemente da situação, além de batalhar pelas minhas conquistas sempre com humildade e jamais desistir dos meus sonhos. Pessoas que fizeram e fazem por mim o que ninguém jamais faria e que, acima de tudo desejam a minha felicidade. Oxalá um dia eu seja um homem que chegue à metade do ser humano que são meus pais.

Agradeço aos meus irmãos Roberto e Felipe pela experiência de convivência. Tantas diferenças e semelhanças, experiências de vida, conflitos e alegrias. Pelo apoio às minhas escolhas e o desacordo em algumas decisões que me fizeram e fazem refletir em como melhorar como ser humano sempre.

A toda minha família pelo apoio, carinho e compreensão, em especial à vó Maria.

À minha namorada Thaísa pelo apoio em todas as horas, me trazendo conforto e paz nos momentos mais difíceis. Te amo demais!

Um agradecimento especial à Professora Poliane Alfenas Zerbini que me recebeu de braços abertos no laboratório, sempre disposta a me ajudar e orientar, acreditando no meu potencial até quando nem mesmo eu acreditava. Não sei o que seria de mim se tivesse tido outro orientador!

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Vírus, com quem aprendi muito sobre convivência no ambiente no ambiente de trabalho.

Agradeço à Professora Maria Cristina Dantas Vanetti pela co-orientação, se mostrando sempre à disposição em ajudar e contribuir para o sucesso do meu trabalho. Agradeço também a todos os colegas do laboratório de microbiologia de alimentos pelo companheirismo e apoio nos momentos de desespero.

Agradeço à professora Maria Catarina Megumi Kasuya e toda sua equipe do Laboratório de Associações Micorrízicas pelo suporte, em especial à Dra. Marliane de Cássia Soares da Silva, quem muito me ajudou nas etapas finais de meu trabalho.

Agradeço ao professor Murilo Zerbini pelas aulas espetaculares e a toda sua equipe de pesquisadores, em especial à Geisiane, que compartilhou comigo as

desventuras da pós-graduação e me ajudou a superar as adversidades. “*Aiya Eärendil elenion ancalima!*”.

Agradeço ao Núcleo de Microscopia e Microanálises da UFV pelo suporte técnico, em especial ao Gilmar, pela paciência e disposição em me ajudar. As horas a fio procurando partículas virais teriam sido muito mais agonizantes e desesperadoras não fossem as incessantes piadas e brincadeiras dessa ilustre e carismática pessoa.

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro.

Agradeço a todas as pessoas que desejaram meu sucesso e felicidade e que, de alguma forma, contribuíram e/ou contribuem para os mesmos.

BIOGRAFIA

JONAS DA SILVA TEIXEIRA, filho de Luiz Miranda Teixeira e Maria Ivone da Silva Teixeira, agricultores familiares de origem simples e humilde, nascido em Itapecerica da Serra - SP, e criado na zona rural do interior de Minas Gerais. Ingressei na Universidade Federal de Viçosa no ano de 2011, quando já no primeiro ano de graduação experienciei a docência no Cursinho Popular de Paula Cândido, onde descobri minha paixão e vocação como professor. Durante todo o período de graduação lecionei Biologia no cursinho pré-vestibular da minha cidade, onde eu mesmo outrora estudara e aprendera a amar essa maravilhosa área de conhecimento.

No ano de 2014, ingressei no Laboratório de Imunovirologia como bolsista de iniciação científica, onde permaneci por dois anos, conheci e me fascinei pelo universo dos vírus.

Em 2017, ingressei no programa de mestrado em Microbiologia Agrícola, agora no Laboratório de Vírus, onde conheci a Prof^a. Poliane Alfenas Zerbini, que sempre procurou estimular minha autoconfiança como pesquisador e confiou em minha capacidade, mesmo quando até eu mesmo duvidava.

Ao longo do curso pude perceber meu crescimento acadêmico e pessoal, desenvolvendo além do projeto de pesquisa em si, minhas relações interpessoais, trabalho em equipe e novamente aperfeiçoando minha paixão pela docência.

Sei que ainda tenho muito a aprender e crescer nessa instituição, o que me motivou a realizar meu doutorado na UFV.

Jonas da Silva Teixeira

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	<u>vii</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>ix</u>
<u>1. INTRODUÇÃO GERAL</u>	<u>1</u>
<u>2. MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>7</u>
<u>2.1. Coleta de amostras</u>	<u>7</u>
<u>2.2. Cultivo dos isolados de bactérias</u>	<u>7</u>
<u>2.3. Análise do perfil das comunidades bacterianas por DGGE.....</u>	<u>8</u>
<u>2.4. Enriquecimento para vírus líticos ou lisogênicos</u>	<u>9</u>
<u>2.5. Detecção de placas de lise.....</u>	<u>9</u>
<u>2.6. Isolamento e propagação de bacteriófagos a partir de placas de lise</u>	<u>10</u>
<u>2.7. Titulação de bacteriófagos.....</u>	<u>10</u>
<u>2.8. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</u>	<u>10</u>
<u>2.9. Extração de material genético viral</u>	<u>11</u>
<u>2.10. Análise da natureza e tamanho dos genomas virais</u>	<u>11</u>
<u>3. RESULTADOS</u>	<u>13</u>
<u>3.1. Análise do perfil das comunidades bacterianas por DGGE.....</u>	<u>13</u>
<u>3.2. Detecção de vírus líticos e lisogênicos e isolamento viral</u>	<u>13</u>
<u>3.3. Caracterização dos isolados virais.....</u>	<u>16</u>
<u>DISCUSSÃO</u>	<u>22</u>
<u>CONCLUSÕES</u>	<u>24</u>
<u>REFERÊNCIAS.....</u>	<u>25</u>

RESUMO

TEIXEIRA, Jonas da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Variabilidade e especificidade de bacteriófagos intestinais de bezerros saudáveis e diarreicos**. Orientadora: Poliane Alfenas Zerbini.

Apesar dos avanços na disponibilidade de vacinas e na otimização da transferência de imunidade passiva pela colostragem, a diarreia neonatal ainda é, atualmente, a doença de muito impacto na criação bovina no mundo, sendo a doença com maior índice de morbidade e mortalidade em bezerros de até trinta dias de idade. As causas da doença não são facilmente reconhecidas e, portanto, não são eficientemente combatidas, caracterizando-se por uma enfermidade de causa multifatorial. Dentre estas causas incluem fatores nutricionais, fisiológicos, ambientais e de manejo, além de diversos microrganismos como protozoários, bactérias e vírus. O tratamento convencional se baseia no suporte (fluidoterapia intravenosa e oral) e no uso de antibióticos, devido à alta prevalência de diarreias causadas por *Escherichia coli*. Tais infecções geralmente não são tratadas satisfatoriamente devido à resistência bacteriana aos antibióticos ou à distribuição inadequada do mesmo no sítio de ação, sendo que seu uso em diarreias não bacterianas pode ainda piorar o quadro por supressão da microbiota comensal, o que favorece a multiplicação de outros micro-organismos como leveduras e protozoários. Estudos recentes mostraram que os bacteriófagos são os microrganismos mais abundantes e diversos, o que sugere que possam ter um impacto significativo na modelagem da microbiota intestinal. Entretanto, seu papel na modulação da dinâmica microbiana em bovinos neonatos ainda não foi estudado. Na busca de um melhor entendimento das complexas interações entre os diversos microrganismos presentes no ambiente intestinal, bem como a relação da dinâmica da diversidade microbiana e o estado saúde/doença, este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade de bacteriófagos líticos e lisogênicos e sua interação com bactérias normalmente encontradas no ambiente intestinal em bezerros saudáveis e diarreicos. Os resultados mostraram que em animais diarreicos existe maior presença de bacteriófagos em multiplicação lítica, enquanto que em animais sadios, predominam vírus em ciclo lisogênico. Animais doentes apresentam microbiota bacteriana mais diversa, enquanto animais saudáveis

apresentam uma microbiota mais homogênea. Cinco vírus líticos foram isolados, sendo quatro provenientes de amostras de animais doentes e um de animais

sadios. Estes isolados foram caracterizados segundo a natureza de seus genomas, morfologias e gama de hospedeiros. Todos os vírus isolados apresentam gama de hospedeiros distintas, com vírus podendo infectar somente a hospedeira de isolamento, até vírus podendo infectar diferentes espécies bacterianas. A caracterização morfológica e molecular pôde agrupar os isolados na ordem *Caudovirales*.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Jonas da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Variability and specificity of intestinal bacteriophages from healthy and diarrheic calves** Advisor: Poliane Alfenas Zerbini.

Despite the advances in the availability of vaccines and in the optimization of passive immunity by feeding with colostrum, neonatal diarrhea is still the disease with the greatest impact on cattle breeding in the world, being the disease with the highest morbidity and mortality rate in calves up to thirty days of age. The causes of the disease are not easily recognized and, therefore, are not efficiently combated, being characterized by a multifactorial cause disease. These causes include nutritional, physiological, environmental and management factors, as well as several microorganisms such as protozoa, bacteria and viruses. Conventional treatment is based on support (oral and intravenous fluid therapy) and antibiotic use due to the high prevalence of diarrhea caused by *Escherichia coli*; however, such infections are generally not treated satisfactorily due to bacterial resistance or inadequate antibiotic local distribution, and its use in non-bacterial diarrhea can further worsen the situation by suppressing the commensal microbiota, which favors the multiplication of other microorganisms such as yeasts and protozoa. Recent studies have shown that bacteriophages are the most abundant and diverse microorganisms that make up the intestinal microbiota, suggesting that they may have a significant impact on shaping intestinal microbiota. However, its role in the modulation of microbial dynamics in neonates has not been studied. In the search for a better understanding of the complex interactions between the various microorganisms present in the intestinal environment, as well as the relation of the dynamics of microbial diversity and health / disease status, this work aim to study the diversity of lithic and lysogenic bacteriophages and their interaction with bacteria normally found in the intestinal environment in healthy and diarrheic calves. The results showed that in diarrheic animals there is a greater presence of bacteriophages in lytic multiplication, whereas in healthy animals, viruses predominate in the lysogenic cycle. Sick animals have a more diverse bacterial microbiota, while healthy animals have a more homogeneous microbiota. Five lytic viruses were isolated, four from diseased animal samples and one from healthy animals. These isolates were characterized according to the nature of their

genomes, morphologies and host range. All viruses isolated have a range of distinct hosts, with viruses that can infect only the host host, even viruses that can infect different bacterial species. The characterization can group the isolates in the order *Caudovirales*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A diarreia é considerada uma das doenças de maior importância que acometem os bovinos neonatos, sendo considerada a principal causa de morbidade e mortalidade em animais jovens (UETAKE, 2013). Estima-se que 75% das mortes em animais leiteiros jovens até a idade do desmame seja causada por esta enfermidade (YIMER; BIRHANU, 2015), o que resulta em significativas perdas econômicas devido aos custos com profilaxia e tratamento, aumento da susceptibilidade dos animais a patógenos oportunistas, retardo no ganho de peso e óbitos (RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., HINCHCLIFF, K. W., 2007). Os custos relativos à saúde animal representam 3,1% do total de custos para criação de um animal leiteiro até o primeiro parto, sendo este valor atribuído, em grande parte, à diarreia, infecções umbilicais e pneumonias (MOHD NOR et al., 2012).

O sinal clínico para diagnóstico de diarreia é a eliminação de fezes de consistência aquosa ou pastosa que é visualizada no períneo e/ou cauda do animal sujos com fezes (FAGUNDES et al., 2014). A presença de um agente isolado não é comprovante de sua etiologia no surgimento da doença, entretanto, é necessário o envolvimento de algum agente para que ela ocorra. Os animais em sistemas de produção são manejados em rebanhos, ou seja, submetidos à condições de estresse ambiental, nutricional e social semelhantes, e igualmente expostos aos microrganismos que são ubíquos a ambientes de criação bovina, sendo estes os fatores que caracterizam a complexidade da instalação e manutenção da enfermidade nos rebanhos (WINDEYER et al., 2014).

O diagnóstico etiológico desta enfermidade se torna um desafio uma vez que diversos são os fatores envolvidos nas causas da mesma. Portanto, caracteriza-se por uma síndrome de causa multifatorial, destacando-se além da influência ambiental, manejo, fatores fisiológicos e nutricionais, o envolvimento de vários agentes infecciosos (YIMER; BIRHANU, 2015). Dentre estes, os mais comumente encontrados são bactérias (*Escherichia coli* e *Salmonella enterica*), protozoários (*Eimeria* spp e *Cryptosporidium parvum*) e vírus (Rotavírus e Coronavírus), sendo o último, geralmente o agente etiológico primário (CHAGAS, 2015).

S. enterica serovar Typhimurium e Dublin são a causa comum de diarreia em bovinos, principalmente em idade menor do que três semanas. Estes animais

infectados servem como fonte de zoonose por meio da contaminação da alimentação ou contato direto (CHO; YOON, 2014). Apesar de sua relevância, pesquisas apontam carência no estudo dos agentes etiológicos envolvidos, sugerindo a participação de muitos outros agentes na maioria das vezes negligenciados. Dentre estes agentes incluem-se bactérias como *Clostridium perfringens* e vírus dos gêneros *Pestivirus*, *Torovirus*, *Nebovirus* e *Norovirus* (CHO et al., 2013).

Escherichia coli pode ser classificada em seis grupos patogênicos de acordo com diferentes fatores de virulência: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteroagregativa e *E. coli* enterohemorrágica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Entre estas bactérias, a mais comum nas diarreias de bezerros é a ETEC que produz os antígenos de adesão K99 (comumente conhecida como *E. coli* K99 +) e enterotoxina termoestável (NATARO; KAPER, 1998). É importante salientar que quando a triagem para isolamento tem como foco a identificação das cepas K99 +, outras cepas de *E. coli* que geralmente são identificadas pela histopatologia podem ser perdidas. Bezerros neonatos são mais susceptíveis à infecção por ETEC durante os primeiros 4 dias após o nascimento e desenvolvem diarreia aquosa se infectados (FOSTER; SMITH, 2009), (FOSTER; SMITH, 2009).

Após a ingestão, ETEC expressa o antígeno K99 para adesão ao epitélio intestinal, multiplicando-se nos enterócitos das vilosidades intestinais. A porção distal do intestino delgado apresenta o ambiente ideal para colonização por ETEC devido ao baixo pH (menos de 6,5). A atrofia das vilosidades devido à perda de células infectadas e danos à lamina própria são comumente observadas no intestino delgado afetado (FRANCIS; ALLEN; WHITE, 1989). Após a colonização do epitélio intestinal, a produção da toxina termoestável produzida por ETEC eleva a secreção de cloreto no intestino. Isso promove a saída de água por osmose para o lúmen intestinal e leva ao desenvolvimento de diarreia secretora em bezerros. Alguns sinais clínicos podem dar pistas do possível agente etiológico. Infecções causadas por *E. coli*, por exemplo, comumente observa-se animais com temperatura normal ou elevada, anorexia, desidratação, abdômen projetado para o dorso e olhos fundos, diarreia profusa pastosa a líquida, com odor fétido e coloração amarelada a esbranquiçada, podendo haver ainda, presença de muco ou

sangue, com alto índice de letalidade a depender da cepa envolvida (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014).

O tratamento convencional usado nos casos de diarreia baseia-se, além do suporte (fluidoterapia) e mudanças de manejo (melhorias no *status* sanitário do setor de cria, separação precoce do bezerro da mãe e aleitamento por mamadeira), no uso de antibióticos. Entretanto, a falha do tratamento frequentemente ocorre devido à resistência bacteriana ou à distribuição inadequada do antibiótico no sítio de ação, resultando em concentrações terapêuticas insuficientes para matar as bactérias no lúmen intestinal. O uso de antibióticos em diarreias não bacterianas pode piorar o quadro por supressão da microbiota normal, o que pode favorecer o crescimento de outros micro-organismos como as leveduras e protozoários (BLANCHARD, 2012).

Diarreias geralmente não são tratadas satisfatoriamente pela terapia com antibióticos para eliminação da doença já existente ou para prevenir o estabelecimento de infecção crônica. Na América latina, as espécies multi-resistentes mais perigosas são conhecidas como ESKAPE: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (KERRO DEGO; VAN DIJK; NEDERBRAGT, 2002). Dentre as bactérias citadas acima, não há relatos de infecção intestinal causada *Pseudomonas aeruginosa*. A utilização de bacteriófagos como ferramenta real no controle de patógenos tem atraído o interesse de um considerável número de pesquisadores nos últimos anos, devido à emergência das bactérias resistentes a antibióticos (KUTATELADZE; ADAMIA, 2010)(CONNERTON; TIMMS; CONNERTON, 2011).

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias, sendo sua natureza geral similar a outros vírus. Eles consistem de um ácido nucléico envolto por uma capa proteica (capsídeo), podendo ou não estar envolvido por um envelope lipoproteico. Os grupos de bacteriófagos são variados, com vírus com genomas de DNA e RNA, com diferentes morfologias e tamanhos. 96,3% dos bacteriófagos isolados são pertencentes às famílias *Syphoviridae*, *Podoviridae* e *Myoviridae*, todos fagos caudados, incluídos na ordem *Caudovirales* (ACKERMANN; PRANGISHVILI, 2012).

Nos últimos anos a visão que se têm sobre a real diversidade e abundância

da virosfera têm sido modificada e ampliada drasticamente. Isso se deve ao fato de que, enquanto a principal forma de identificação de vírus era seu isolamento e cultivo, atualmente, a forma de detecção é feita por meio de análises de sequências metagenômicas. No que se refere aos bacteriófagos, essa nova abordagem têm mostrado que vírus previamente não detectados, ou que eram considerados raros, são na verdade, importantes componentes do viroma global (YUTIN et al., 2018).

Quanto às estratégias de multiplicação, os bacteriófagos também apresentam mecanismos variados. Após o reconhecimento de algum receptor externo do hospedeiro e entrada na célula, o fago pode integrar em seu cromossomo, se multiplicando quando este se divide, configurando o ciclo lisogênico. Contrariamente, o fago pode usar a maquinaria do hospedeiro para sintetizar suas proteínas e replicar seu genoma, produzindo uma progênie de partículas que culmina com a lise celular, neste caso, trata-se do ciclo lítico. De forma intermediária, no ciclo pseudolisogênico, o fago não replica seu genoma nem se integra, permanecendo de forma instável no citoplasma (Figura 1) (FEINER et al., 2015).

Os bacteriófagos estão presentes em todos os ambientes, podendo ser isolados do solo, da água, do fundo do oceano, assim como do corpo de animais. Sabe-se que os bacteriófagos são os microrganismos mais abundantes no ecossistema gastrointestinal e junto com as bactérias hospedeiras são um importante componente desta microbiota (SORDI; LOURENC, 2019)20]. Eles podem impactar na diversidade bacteriana por lise da célula hospedeira, por meio da integração no genoma e modulação fenotípica da célula, e como agentes de transferência horizontal de genes (pelo mecanismo de transdução) entre células microbianas (STERN; SOREK, 2011).

Estudos sobre a diversidade e dinâmica da microbiota intestinal humana e suas interações neste ecossistema têm associado este tema a funções vitais nos sistemas digestório, imune e nervoso (SORDI; LOURENC, 2019). Na área veterinária, o tema da diversidade e dinâmica microbiana intestinal também tem ganhado interesse, uma vez que diversas são as evidências de que este complexo microbioma desempenha uma função crucial no desenvolvimento imunológico e, conseqüentemente, na saúde dos bezerros neonatos.

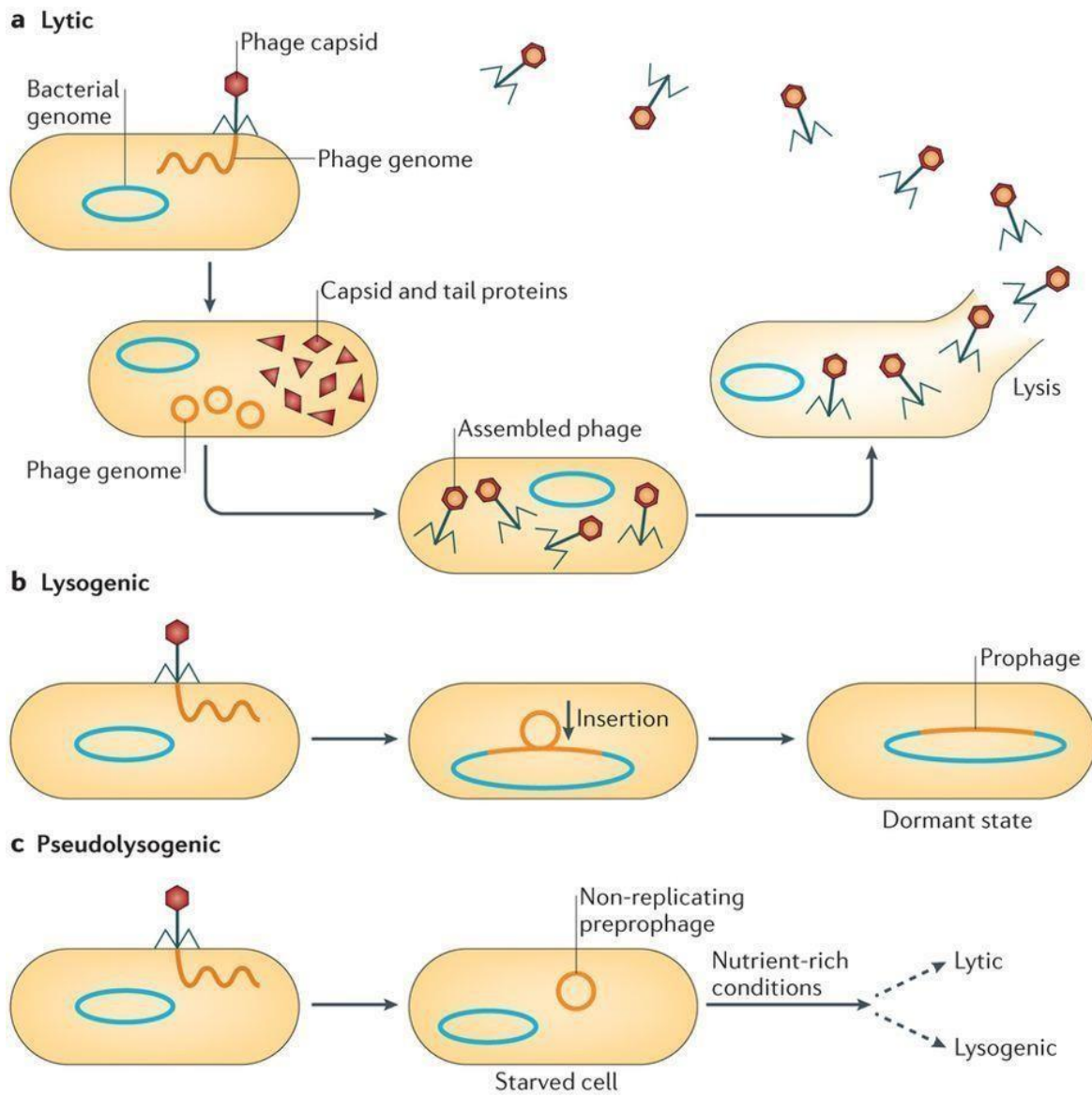


Figura 1. Principais formas de replicação viral. Fonte: (FEINER et al., 2015)

Estes trabalhos estão voltados, em sua grande maioria, para a microbiota bacteriana, com foco em manejo e componentes da dieta (MALMUTHUGE; GRIEBEL; GUAN, 2015; MALMUTHUGE; GUAN, 2017; UYENO; SHIGEMORI; SHIMOSATO, 2015). A influência dos bacteriófagos nas populações microbianas neste ecossistema ainda é pouco estudada.

Além disso, modelos da dinâmica de interação entre os fagos e a microbiota intestinal humana, mostraram que existe uma predominância de vírus em lisogenia em indivíduos saudáveis, o que favorece a diversificação desta microbiota, enquanto que em indivíduos em disbiose, predominam vírus em ciclo lítico, embora neste caso, o mecanismo subjacente ainda seja desconhecido (MIRZAEI; MAURICE, 2017; SHKOPOROV; HILL, 2019). Tomados em conjunto, estes dados nos levaram a questionar se, no caso da patologia veterinária em questão, este padrão também poderia ser observado.

Neste trabalho, foi avaliada a predominância entre ciclo lítico ou lisogênico de bacteriófagos presentes em fezes de animais sadios ou acometidos por diarreia. Foram isolados e caracterizados cinco bacteriófagos líticos, com base na natureza de seus genomas, morfologia e gama de hospedeiros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta de amostras

Foram coletadas amostras fecais diretamente do reto de sete bezerros, três sadios e quatro com diarreia. Os animais foram escolhidos de acordo com a idade, entre 1 e 12 dias, e que não foram tratados com qualquer medicamento (Tabela 1). A amostra foi coletada com uso de luvas descartáveis e, imediatamente transferidas para um tubo falcon esteril de 50 mL, que foi acondicionado em caixa isotérmica com gelo. As amostras coletadas foram mantidas a 4°C.

Tabela 1. Amostras fecais coletadas de animais pertencentes ao setor de Gado de Leite da UFV.

Identificação do animal	Tipo de Criação	Idade (dias)	FC (bpm)	FR (mpm)	Temperatura (°C)	Diagnóstico
8013	Leite	12	120	42	39,1	Sadio*
8014	Leite	12	160	64	38,8	Sadio*
8015	Leite	7	120	40	38,7	Diarreico
8016	Leite	2	120	44	39,8	Diarreico
8018	Leite	3	140	100	39	Diarreico
8019	Leite	3	122	80	39,4	Diarreico
8020	Leite	1	128	100	38,9	Sadio*

*Critério de avaliação usado foi ausência de sinais clínicos característicos de diarreia.

2.2. Cultivo dos isolados de bactérias

Isolados de *E. coli* foram cultivados em caldo Luria Bertani (LB) a 37°C, *Salmonella enterica* em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C, e *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus amylovorus*, *Enterobacter cloacae* e *Lactococcus lactis* foram cultivados em Caldo MRS à mesma temperatura. Todos os isolados foram ativados duas vezes, utilizando-se 10 µL da cultura estoque a -80°C em 1 mL do meio de cultura apropriado, e incubados nas mesmas condições acima, por 24 horas. O isolado de *Escherichia coli* MM 293 (MESELSON; YUAN, 1968) foi obtido a partir da coleção de culturas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os isolados *E. coli* ATCC® 29214™, *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC® 13311™, *S. enterica* ATCC® 14028™, *S. enterica* serovar Choleraesuis, ATCC® 12011™, *S. enterica* subsp. *arizonae* ATCC® 13314™, *S. enterica* serovar Enteriditis ATCC® 13076™, *S. enterica*

serovar Pullorum ATCC® 9120™, *S. enterica* serovar Enteritidis PT4 578, *Salmonella* F12, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. amylovorus*, *E. clocae* e *L. lactis*, foram gentilmente cedidos pela Professora Maria Cristina Dantas Vanetti, do Departamento de Microbiologia, Laboratório de Microbiologia Industrial da UFV.

2.3. Análise do perfil das comunidades bacterianas por DGGE

Para analisar os perfis de comunidades bacterianas foi realizado DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*). Uma amostra de 0,1g de fezes de animal sadio (8013) e doente (8018) foi submetida a extração de DNA pelo kit DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) seguindo recomendação do fabricante. O DNA extraído foi submetido a amplificação por PCR utilizando o par de *primers* (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') específicos para o gene que codifica a região 16S rRNA do Domínio Bacteria. Em seguida, foi realizada uma segunda reação para amplificação de um fragmento de 180 pb utilizando o par de *primers* 968F — 5'-AACGCAAGAACCTTAC-3' com cauda CG na região 5' (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGG GCGGGGGCACGGGGGG-3') e 1392R — 5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3' (NIELSEN et al., 1999), específicos para os genes que codificam a região 16S rRNA do Domínio Bacteria. As reações de PCR foram realizadas como descritas por Rodrigues (2012). Cinco microlitros dos produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5%, para verificação do tamanho dos amplicons, utilizando padrão de peso molecular 1 kb. Os géis foram corados com brometo de etídeo (1 µg mL⁻¹) e visualizados sob luz UV. Confirmada a presença de produtos de PCR pela eletroforese em gel de agarose, estes foram submetidos à técnica de DGGE, conforme descrito por (MUYZER; WAAL; UITIERLINDEN, 1993). Para determinar a similaridade genética entre as amostras, os padrões de bandas foram analisados pelo programa BioNumerics versão 5.1 (AppliedMaths®, Belgium). O dendograma para a análise da similaridade genética entre as cepas foram realizados pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Groupusing Mathematical Average Taxonomy*), utilizando-se o coeficiente de Dice-Sørensen, com otimização e tolerância de 1,5%. O dendograma para análise de diversidade foi gerado utilizando o pacote Vegan do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2006). Foram utilizados os estimadores não-paramétricos de riqueza de espécies Chao 1, equitabilidade de

Pulou e diversidade de Simpsons.

2.4. Enriquecimento para vírus líticos ou lisogênicos

Um *pool* de dois gramas de fezes de animais sadios ou doentes foram ressuspendidas em 10 ml de $MgSO_4$ (20 Mm) e 45 mL de caldo APT (SAMBROOK; W RUSSELL, 2001) sendo incubadas por 6 horas a 37 °C. Após o tempo de incubação, a indução do ciclo lítico foi realizada segundo (SEKULOVIC et al., 2014). 20 mL desta mistura foram pipetados sobre placas de ágar APT e incubadas em atmosfera anaeróbica por 4 h. As bactérias foram então expostas à luz ultravioleta (302 nm) por 10 segundos e cobertas com ágar semissólido fundido e resfriado a 55°C, contendo uma cultura isca previamente incubada por 12 horas. Após incubação por 12 horas sob condições anaeróbicas, uma zona de limpeza no tapete bacteriano foi indicativa de indução de fagos e posterior propagação na estirpe de teste.

Às amostras induzidas e não induzidas, foi adicionado NaCl 1M, seguido de centrifugação a 11.000 *g* por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado de 10% de Polietilenoglicol (PEG) 8.000 (p/v), seguido de incubação a 4 °C por 3 dias. As amostras foram então centrifugadas a 11.000 *g* por 30 minutos a 4 °C e o centrifugado contendo as partículas virais foi ressuspendido em tampão SM (0,1 M de NaCl, 0,01 M de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mL de Tris-HCl 1M, pH 7,5, 5 mL de gelatina 2 % e H_2O q.s.p 1 L) (SAMBROOK; W RUSSELL, 2001).

2.5. Detecção de placas de lise

Para o ensaio de placa de lise foram utilizados como isolados iscas os isolados bacterianos listados no item 2.2.

Uma alíquota de 500 µL da cultura bacteriana fresca incubada por 12 horas, foi misturada com 3 mL de meio semissólido apropriado, fundido e resfriado a 55 °C. Após agitação manual, a mistura foi despejada em placas de cultura contendo meio sólido apropriado onde foram mantidas à temperatura ambiente. Após solidificação do meio, 5 µL de suspensão de bacteriófagos (obtida como descrito no item 2.4) foi pipetada cuidadosamente sobre a superfície. As placas foram então

incubadas por 12 horas em estufa, sob temperatura de 37°C. A observação de placas de lise na superfície do meio serviu como indicativo da presença de vírus em ciclo lítico.

2.6. Isolamento e propagação de bacteriófagos a partir de placas de lise

As culturas bacterianas usadas como hospedeiras para os bacteriófagos foram cultivadas em meio apropriado e, uma alíquota de 500 µL foi retirada após incubação por 12 horas e inoculada em 5 mL de caldo estéril, junto com placas de lise individuais cuidadosamente recortadas (item 2.5). Seguiu-se de incubação a 37°C por 12 horas. Após este período, foram adicionados clorofórmio e NaCl, respectivamente com concentrações finais de 10 % (v/v) e 1 M. As amostras foram incubadas em repouso a 4°C por 1 hora, e após este período, procedeu-se a centrifugação (5.000 *g*, 20 minutos, 4°C), sendo o sobrenadante cuidadosamente recolhido, filtrado em membranas de 0,22 µm e transferido para novos tubos. O processo foi repetido três vezes para garantir a ausência de mistura de vírus.

2.7. Titulação de bacteriófagos

Para a titulação dos bacteriófagos propagados, foram realizadas diluições seriadas decimais (10^{-1} a 10^{-7}) do estoque viral em tampão SM. Uma alíquota de 100 µL de cada uma das diluições foi misturada com o mesmo volume de cultura bacteriana incubada *overnight* a 37°C. A mistura foi então adicionada ao meio semissólido apropriado para cada espécie bacteriana, fundido e resfriado a 55°C e vertido em placas de Petri contendo meio sólido, e incubados em estufa sob temperatura de 37°C. No dia seguinte, o número de placas de lise foi contado e o título de bacteriófagos expressos em unidades formadoras de placas de lise (UFP/mL)

2.8. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Uma alíquota de 5 μL de cada isolado viral, concentrada por ultracentrifugação a 36.000 rpm por 2 horas em colchão de sacarose a 20%, foi aplicada sobre uma tela de microscopia eletrônica (*grid*) de 200 *mesh*, previamente

coberta com Formvar[®]. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, as partículas virais aderidas foram contrastadas com acetato de uranila 2 % (p/v) por 20 segundos. As telas foram submetidas à visualização utilizando o microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109 TEM) no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM).

Para análise da morfologia viral foi utilizado o *software* ImageJ (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), sendo estimado o diâmetro do capsídeo e comprimento da cauda. Após esta análise, os fagos foram classificados em suas respectivas famílias, tendo como referência o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV)(KING et al., 2012). Foram analisadas 2 imagens em diferentes aumentos para cada isolado viral.

2.9. Extração de material genético viral

O purificado viral foi tratado com DNase e RNase previamente à extração de ácidos nucleicos totais, para isso, 1 mL de purificado viral foi misturado com 2 uL e DNase I (Promega) e 10 ug/mL de RNase-A (Sigma-Aldrich), em uma concentração final de 1x. As amostras tratadas foram utilizadas para extração de ácido nucleico total como descrito por Sambrook e Russell (2001), e a qualidade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8%.

2.10. Análise da natureza e tamanho dos genomas virais

A análise da natureza dos genomas virais foi realizada por digestão do material genético extraído conforme item 2.9. O ácido nucleico extraído foi tratado com as enzimas S1 nuclease, DNase I (Promega) e RNase-A (Sigma-Aldrich), em uma concentração final de 1x..

O tamanho dos genomas virais foi estimado por Eletroforese em gel de agarose 1 % com tampão TBE 0,5 X (TBE 1 X: Tris 0,89 M, borato 0,89 M e EDTA 0,02 M) a 14 °C por 15 horas, com uma voltagem de 6 V/cm e tempo de pulsação variando de 1 a 5 segundos. O gel foi analisado após coloração por brometo de

etídio 0,5 µg/mL e visualizado sob luz ultravioleta. Foram utilizados como marcadores de peso molecular, o concatâmero obtido do fago lambda (Lambda

PFG Ladder, 50-1.000 kb, New England Biolabs) e o DNA do fago Lambda cortado com a enzima HindIII (Promega).

3. RESULTADOS

3.1. Análise do perfil das comunidades bacterianas por DGGE

A análise do perfil das comunidades bacterianas por DGGE revelou existirem diferenças entre as comunidades bacterianas de animais sadios e diarreicos. Utilizando o método UPGMA- Sorensen-Dice (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) foi possível observar que existe uma distância de 60% entre as amostras. O agrupamento das triplicatas próximas entre si, 100% de similaridade, reforça a confiabilidade do ensaio (Figura 2A). As análises de diversidade revelaram haver grupos bacterianos exclusivos em cada amostra além de diversos grupos que são compartilhados em diferentes graus de abundância (FIGURA 2B). Além disso, a mostra de animal sadio se mostrou ligeiramente menos diversa em relação à amostra de animal doente.

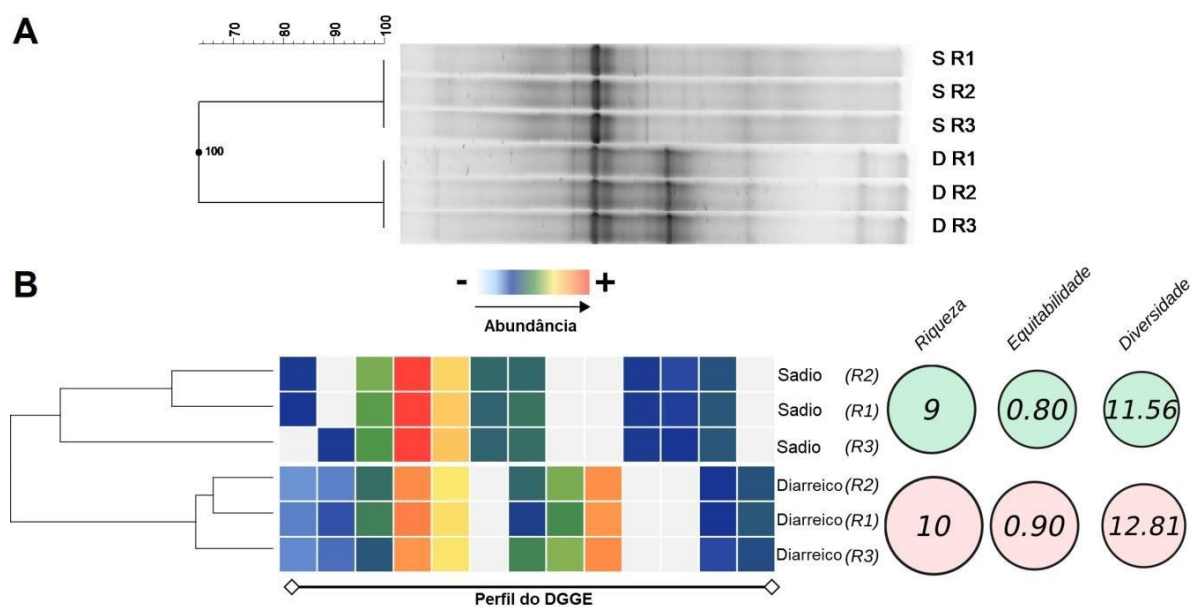


Figura 2. (A) Dendograma de Análise de Agrupamento (UPGMA, Dice-Sørensen) de amostra de animal sadio 8013 (S) e diarreico 8018 (D). (B) Dendograma de análise de índices de diversidade. R1, R2 e R3 se referem às replicatas de uma mesma amostra.

3.2. Detecção de vírus líticos e lisogênicos e isolamento viral

Foram isolados 4 bacteriófagos utilizando-se *Escherichia coli* como isca, enquanto que para *S. enterica* foi isolado um bacteriófago, sendo todos eles provenientes de amostras fecais não induzidas. Três dos bacteriófagos de *E. coli* e

o isolado de *Salmonella*, são oriundos de amostras fecais de animais doentes, enquanto apenas um vírus isolado foi proveniente de animal sadio (Tabela 2). Para as demais espécies bacterianas avaliadas neste estudo, não foram isolados vírus líticos ou lisogênicos.

Tabela 2. Bacteriófagos líticos isolados

Isolado viral	Tipo de amostra	Hospedeiro isca utilizado
EcoVD1	Animal diarreico	<i>Escherichia coli</i> ATCC 29214
EcoVD2	Animal diarreico	<i>Escherichia coli</i> ATCC 29214
EcoVD3	Animal diarreico	<i>Escherichia coli</i> MM 293
EcoVS1	Animal sadio	<i>Escherichia coli</i> MM 293
SenVD1	Animal diarreico	<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i> (CT) ATCC 13314

Nas culturas de *E. coli* ATCC 29214 e *S. enterica* ATCC 13314, poucas placas de lise foram observadas em amostras induzidas provenientes de animais doentes, enquanto naquelas de animais diarreicos, toda a área da gota se apresentava lisada. Nas amostras não induzidas, só foi possível visualizar lise naquelas provenientes de animais doentes (Figura 3).

De forma semelhante, as hospedeiras *E. coli* MM 293 e *S. enterica* ATCC 12011, revelaram um alto grau de indução das amostras tanto de animais doentes quanto sadios, enquanto para amostras não induzidas, foi observado um maior grau de lise naquelas provenientes de animais doentes (Figura 3).

Já nas as iscas *L. casei* e *L. amylovorus*, nenhum sinal de lise foi observado nos tratamentos não induzidos, tanto para amostras de animais diarreicos quanto para animais sadios. Por outro lado, graus semelhantes de indução foram observados tanto para animais sadios quanto diarreicos (Figura 3).

Similarmente, nas iscas *E. clocae* e *S. enterica* ATCC 14028, nenhum sinal de lise foi observado nos tratamentos não induzidos, tanto para amostras de animais diarreicos quanto para animais sadios, entretanto foi observado baixo grau de indução somente nas amostras provenientes de animais doentes (Figura 3).

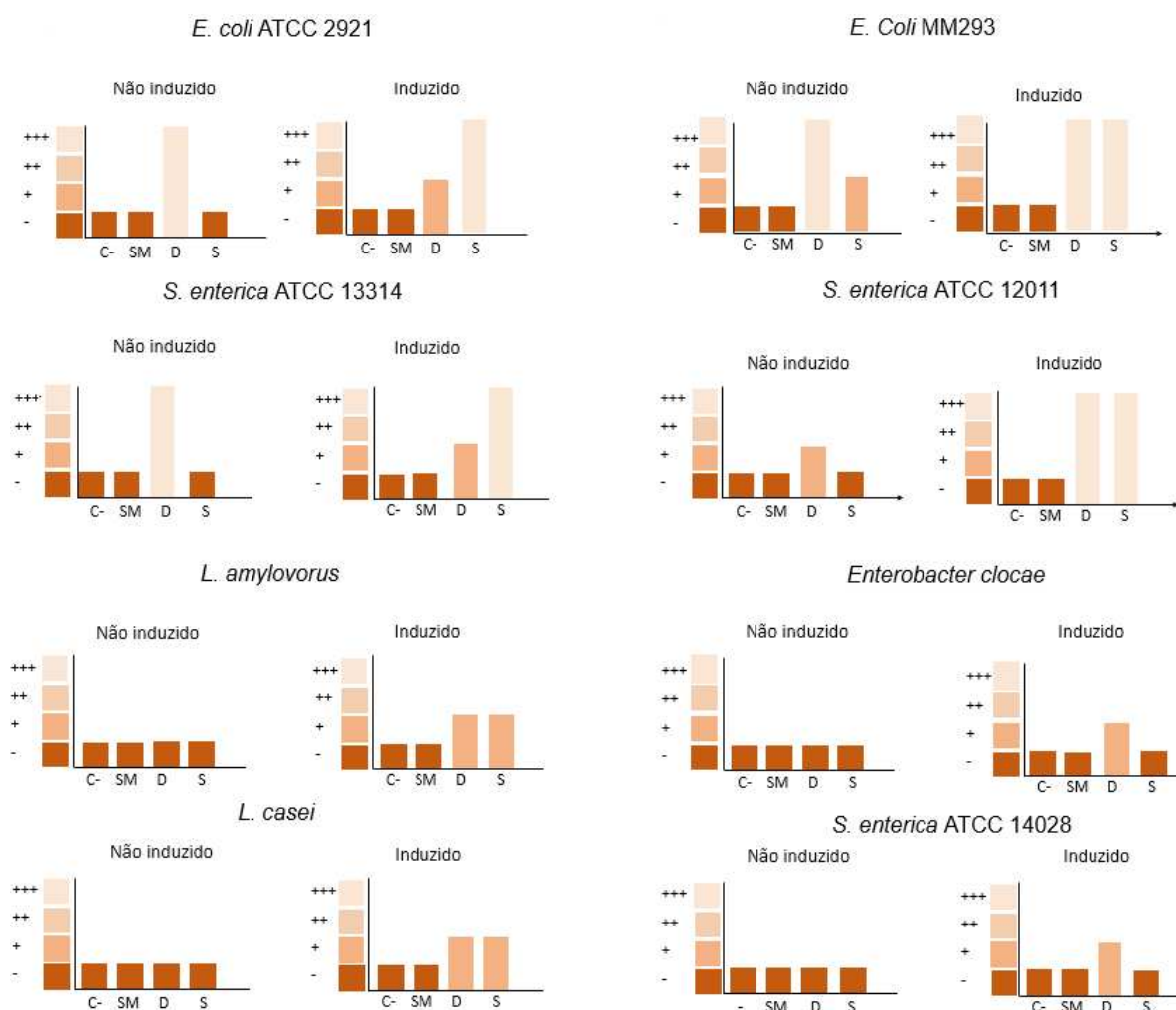


Figura 3. Detecção de vírus líticos e lisogênicos em amostras fecais, induzidas ou não, de animais sadios e diarreicos C- = tapete bacteriano; SM = tampão de armazenamento dos vírus; D = amostra de animal doente; S = amostra de animal sadio. +++ lise completa de toda área da gota; ++ poucas placas de lise, ou placas túrbidas; + local da gota ligeiramente diferente do C-

As titulações brutas de purificados virais, induzidos e não induzidos, a partir de culturas mistas mostraram-se variáveis, a depender da bactéria isca utilizada como hospedeira. Para esta titulação, foram utilizadas as mesmas bactérias para as quais foram detectadas placas de lise individuais para o isolamento, sendo elas *E. coli* ATCC 29214, *E. coli* MM 293 e *S. enterica* ATCC 13314.

O título dos bacteriófagos líticos nas amostras de fezes não submetidas ao tratamento de indução variou de 10^3 a 10^5 UFP/mL, independentemente de o animal ser sadio ou diarreico. Entretanto, títulos mais elevados foram obtidos após a indução do ciclo lítico e os valores de UFP/mL variaram de 10^6 a 10^9 (Tabela 3).

Tabela 3. Quantificações brutas de filtrados virais induzidos e não induzidos a partir de culturas mistas.

Bactéria hospedeira	Induzido*	Não Induzido*
<i>E. coli</i> ATCC 29214		
Diarreico	10 ⁶	10 ³
Sadio	10 ⁶	0
<i>E. coli</i> MM293		
Diarreico	10 ⁹	10 ⁵
Sadio	107	10 ³
<i>S. enterica</i> ATCC 13314		
Diarreico	0	0
Sadio	10 ⁶	0

* Média de três repetições.

Em conjunto os resultados mostram que, em graus variáveis a depender a bactéria hospedeira utilizada, em animais doentes, predominam vírus realizando ciclo lítico, enquanto em animais saudáveis, predominam vírus realizando ciclo lisogênico.

3.3. Caracterização dos isolados virais

Os vírus isolados foram caracterizados quanto a gama de hospedeiros, morfologia de partícula, natureza e tamanho do genoma.

Os cinco isolados apresentaram gamas de hospedeiros diferentes, com vírus que infectam apenas sua isca, até vírus que infectam cinco cepas bacterianas de duas diferentes espécies, dentre as testadas (Tabela 4). EcoVD1 é capaz de lisar, além de sua isca, outra *E. coli* MM 293 e *S. enterica* ATCC 12011, enquanto EcoVD2, apresenta um espectro mais restrito, infectando apenas a segunda. O isolado EcoVD3 é o mais especialista, infectando apenas sua isca, enquanto SenVD1, é o mais generalista, infectando ambas as *E. coli*, além de *S. enterica* ATCC 12011 e *S. enteriditis*. Por fim, o isolado EcoVS1, pôde infectar *E. coli* ATCC 29214, contudo com baixa eficiência, e *S. enterica* ATCC 12011 com alta eficiência.

Tabela 4. Gama de hospedeiros dos cinco bacteriófagos líticos isolados.

Bactérias Hospedeiras	Isolados virais				
	EcoVD1	EcoVD2	EcoVD3	EcoVS1	SenVD1
<i>Escherichia coli</i> MM 293	+++	-	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> ATCC® 29214	+++	+++	-	+	+++
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> ATCC® 13314	-	-	-	-	+++
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis, ATCC® 12011	++	++	-	++	+++
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC® 13311	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> ATCC® 14028	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteriditis ATCC® 13076	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Pullorum ATCC® 9120	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> serovar Enteriditis PT4 578	-	-	-	-	++
<i>Salmonella</i> F12	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i>	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	-	-	-	-	-
<i>L. amylovorus</i>	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i>	-	-	-	-	-
<i>E. clocae</i>	-	-	-	-	-

+++ Lise evidente, placas de lise claras, completamente transparentes; ++ Lise moderada, placas de lise túrbidas; + Sem lise evidente, contudo, local da gota marcadamente diferente do controle negativo; - Ausência completa de lise.

A análise morfológica mostrou que todos os isolados virais morfologia de cabeça isométrica e cauda, característica dos bacteriófagos de DNA fita dupla (*dsDNA*) pertencentes à ordem *Caudovirales*. O isolado EcoVD1 possui cabeça icosaédrica de, aproximadamente, 52 nm e cauda longa, não contrátil de, aproximadamente, 300 nm. O isolado EcoVD2 apresenta cabeça icosaédrica de, aproximadamente, 80 nm e cauda longa, contrátil de, aproximadamente, 95 nm. O isolado EcoVD3 apresenta cabeça icosaédrica de, aproximadamente, 75 nm e cauda longa, contrátil de, aproximadamente, 116 nm. O isolado EcoVS1 apresenta cabeça icosaédrica de, aproximadamente, 78 nm e cauda longa, contrátil de, aproximadamente, 109 nm, e o isolado SenVD1 apresenta cabeça icosaédrica de, aproximadamente, 90 nm e cauda longa, contrátil de, aproximadamente, 61 nm (Figura 4).

A análise da natureza dos genomas revelou que todos os isolados apresentam

material genético composto por DNA de fita dupla (Figura 5). O tamanho dos genomas foi estimado em 100 Kb nos isolados virais EcoVD3 e EcoVS1 (Figura 6). Os isolados EcoVD1 e EcoVD2 apresentam tamanho estimado do genoma em 30 Kb (Figura 7).

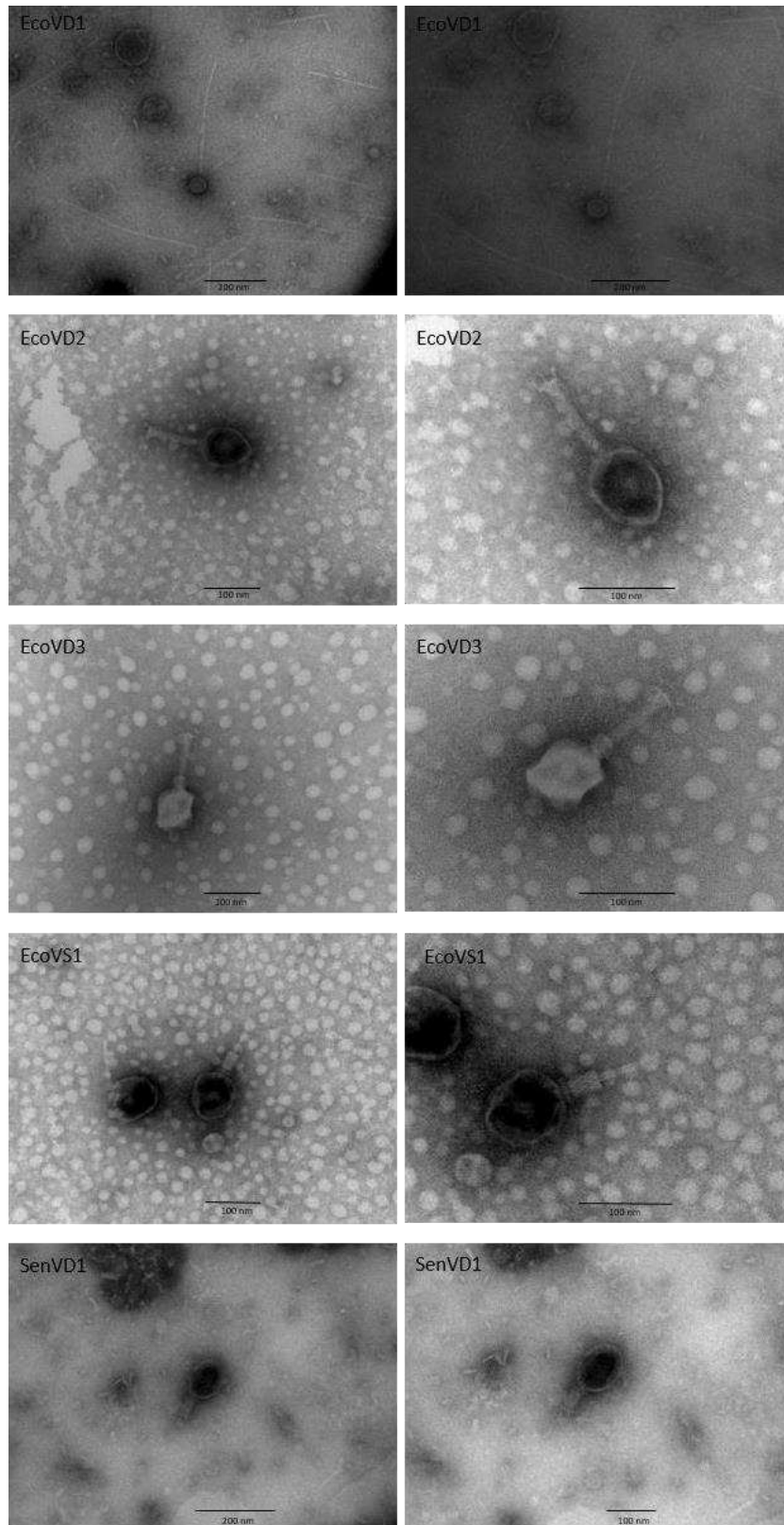


Figura 4. Caracterização morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão dos cinco vírus isolados de fezes provenientes de animais saudáveis ou diarreicos. Aumentos de 140.000x (esquerda) e 250.000x (direita)

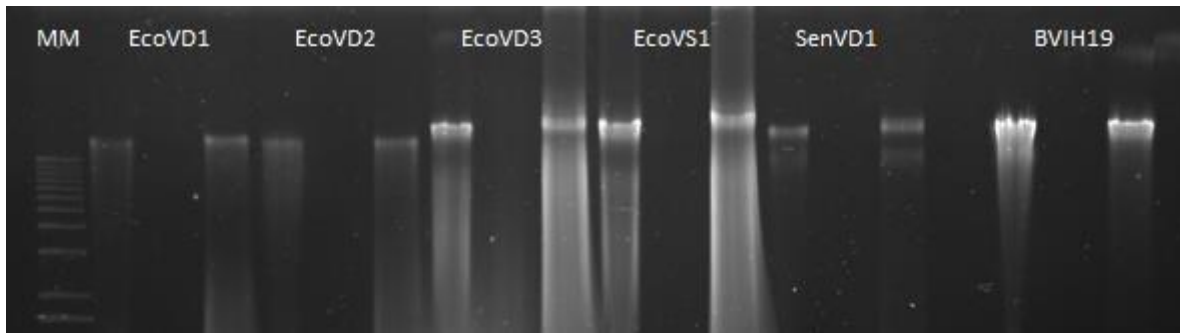


Figura 5. Análise da natureza dos genomas dos isolados virais. MM, 1 kb; EcoVD1; EcoVD2; EcoVD3; EcoVS1; SenVD1. O DNA de *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (BVIH19), foi utilizado como controle da digestão.

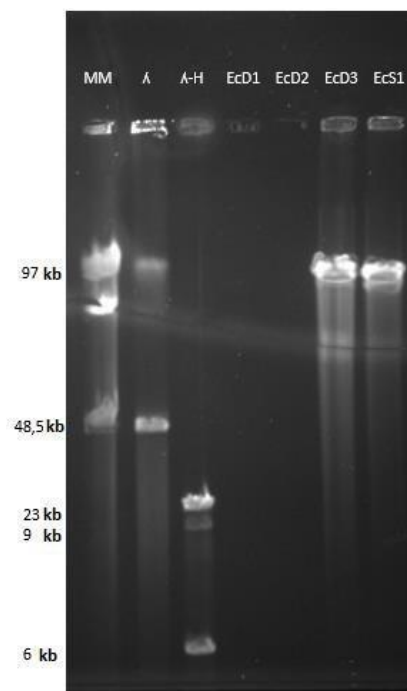


Figura 6. Eletroforese em gel de campo pulsado para medição do tamanho estimado do genoma dos isolados EcoVD3 (EcD3) e EcoVS1 (EcS1). (MM) Concatâmero de Lambda; λ; λ digerido com Hind-III; EcoVD3; EcoVS1.

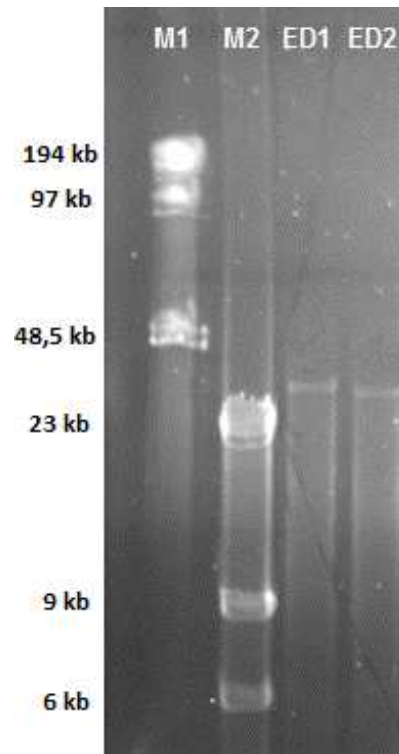


Figura 7. Eletroforese em gel de campo pulsado para medição do tamanho estimado do genoma dos isolados EcoVD1 (ED1) e EcoVD2 (ED2). M1, Concatâmero de Lambda; M2, λ digerido com Hind-III; EcoVD1;EcoVD2.

DISCUSSÃO

A análise do perfil das comunidades bacterianas por DGGE revelou existirem diferenças entre as comunidades bacterianas de animais sadios e diarreicos, com uma distância de 60% entre as amostras. Existem grupos de bactérias exclusivos em ambas as amostras, bem como grupos comuns, embora com diferentes graus de abundância. Foi possível observar ainda que existe maior diversidade bacteriana na amostra proveniente de animal diarreico.

Estudos da microbiota intestinal tem mostrado que este ambiente se apresenta em constante variação de suas comunidades microbianas. A flutuação entre espécies ora dominantes ora escassas é uma característica marcante da dinâmica Lotka-Volterra (BAIGENT, 2010), também conhecida como "*kill the winner*". Este tipo de dinâmica resulta de infecções líticas e causam aumento da diversidade bacteriana. Os autores (MIRZAEI; MAURICE, 2017) a relatam como predominante na fase infantil, quando um determinado hospedeiro bacteriano, ou presa, aumenta em abundância em um sistema porque pode explorá-lo. Essa expansão é seguida por um aumento na população de fagos predadores. A infecção por fagos causa uma diminuição da presa bacteriana inicial, deixando um nicho ecológico aberto que outros táxons bacterianos competitivos podem preencher e o ciclo pode então recomeçar.

Em trabalho recente, como o de (GOMEZ; WEESE, 2017), é possível observar ainda que, embora o fato de que o estado de disbiose, ou seja, quebra do equilíbrio normal da microbiota, já ser relacionado ao estabelecimento da diarreia, a base molecular para tais desordens permanece indefinido, sendo relatado apenas que "grupos de bactérias chave" e o tratamento com antibióticos podem estar envolvidos. Ao que tudo indica, por serem os microrganismos mais abundantes e diversos neste ambiente (STERN; SOREK, 2011), os bacteriófagos certamente merecem lugar de destaque na modelagem e dinâmica microbianas, podendo estar relacionados direta ou indiretamente tanto com o estado de eubiose quanto ao estado de disbiose.

Apesar de variados graus de lise serem observados a depender da isca bacteriana utilizada, foi possível confirmar a hipótese de que ocorre predominância de ciclo lítico em animais doentes e ciclo lisogênico em animais sadios, o que corrobora os resultados de diversidade aqui obtidos. Os altos níveis de indução são coerentes com os dados da literatura que apontam grande contribuição de genomas de

bacteriófagos em genomas de bactérias que compõem a microbiota intestinal (FEINER et al., 2015; MIRZAEI; MAURICE, 2017; SHKOPOROV; HILL, 2019). A facilidade de isolamento de bacteriófagos de *E. coli* e *S. enterica* provavelmente se deveu ao fato de que, além da abundância natural destes fagos neste ambiente (DUEÑAS et al., 2017; MORENO SWITT et al., 2013), as condições de cultivo enriqueceram as amostras para estes microrganismos, que atuaram como fonte de propagação para enriquecimento destes vírus.

A ausência de bacteriófagos líticos que infectam *S. enterica* ATCC 13314 na amostra de material fecal não induzida de animal diarreico foi intrigante, uma vez que, para o ensaio de detecção foi observado alto grau de lise dessa amostra. Entretanto, este resultado pode ser explicado pelo fato de que, do ensaio de detecção, foi isolada uma placa de lise individual, que posteriormente revelou se tratar do fago SenVD1. Como a titulação desta amostra foi posterior a este ensaio, a viabilidade deste vírus pode ter sido comprometida durante o período de estocagem (GOLEC et al., 2011; JÓNCZYK et al., 2011).

O ensaio de gama de hospedeiros sugere haver predominância de bacteriófagos generalistas, uma vez que, dentre os isolados, apenas dois infectavam uma única espécie, sendo que um deles infectava apenas seu hospedeiro isca. A predominância de fagos líticos generalistas, isolados de animais diarreicos, está em acordo com o descrito por MIRZAEI; MAURICE, (2017), já que este padrão é observado em situações de disbiose, onde ocorre diminuição da diversidade bacteriana e aumento no número de partículas virais livres. Ainda segundo GANDON et al., (2008), o surgimento de bacteriófagos especialistas é comum no processo de coevolução entre hospedeiros e bacteriófagos e leva ao aumento na diversidade bacteriana (MIRZAEI; MAURICE, 2017), o que corrobora com o resultado de um dos bacteriófagos especialistas ter sido isolado de animal sadio.

O tamanho e natureza dos genomas (DNA), bem como a morfologia, foram comparáveis com os de outros autores (LITT; JARONI, 2017; WANG et al., 2015), e permitiram agrupar todos os isolados na ordem *Caudovirales*. Sendo que o isolado EcoVD1 pertence à família Syphoviridae e os demais à família Myoviridae (ACKERMANN, 2008).

CONCLUSÕES

- Em animais sadios, foi observada uma predominância de vírus multiplicando em ciclo lisogênico, enquanto em animais doentes, predominam vírus multiplicando em ciclo lítico.
- Foram isolados cinco bacteriófagos líticos, sendo quatro de animais doentes e um proveniente de animal sadio.
- Análises de gama de hospedeiros, morfológicas e a estimativa do tamanho do genoma sugerem que os cinco vírus são diferentes entre si.
- O sequenciamento completo dos genomas virais irá nos permitir realizar a classificação taxonômica precisa dos vírus isolados.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, H.-W. Tailed Bacteriophages: The Order Caudovirales. v. 51, p. 135–201, 2008.
- ACKERMANN, H.-W.; PRANGISHVILI, D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. **Archives of Virology**, v. 157, n. 10, p. 1843–1849, 2012.
- BAIGENT, S. Lotka-Volterra Dynamics - An introduction . 2010.
- BLANCHARD, P. C. **Diagnostics of Dairy and Beef Cattle Diarrhea** *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 2012.
- CHAGAS, A. C. D. S. **Diarréia em bezerros leiteiros lactantes: a doença e o manejo em diferentes unidades da Embrapa. - Portal Embrapa.** Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/137797/1/Documentos120.pdf>>. Acesso em: 21 dez. 2017.
- CHO, Y. IL et al. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3–4, p. 375–385, 2013.
- CHO, Y. IL; YOON, K. J. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. **Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2014.
- CONNERTON, P. L.; TIMMS, A. R.; CONNERTON, I. F. **Campylobacter bacteriophages and bacteriophage therapy** *Journal of Applied Microbiology*, 2011.
- COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de Escherichia coli causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811–818, set. 2014.
- DUEÑAS, F. et al. Characterization of Salmonella phages from dairy calves on farms with history of diarrhea. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 2196–2200, 2017.
- FAGUNDES, T. F. et al. Análise descritiva da diarreia em uma coorte de bezerras criadas em sistema de casinhas até cem dias de idade, Município de Piraí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1895, 27 ago. 2014.
- FEINER, R. et al. A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 641–650, 2015.
- FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. **Pathophysiology of Diarrhea in Calves** *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 2009.
- FRANCIS, D. H.; ALLEN, S. D.; WHITE, R. D. Influence of bovine intestinal fluid on the expression of K99 pili by Escherichia coli. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 6, p. 822–826, 1989.

GANDON, S. et al. Host-parasite coevolution and patterns of adaptation across time and space. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 21, n. 6, p. 1861–1866, 2008.

GOLEC, P. et al. A reliable method for storage of tailed phages. **Journal of**

Microbiological Methods, v. 84, n. 3, p. 486–489, 2011.

GOMEZ, D. E.; WEESE, J. S. Viral enteritis in calves. **Canadian Veterinary Journal**, v. 58, n. 12, p. 1267–1274, 2017.

JOŃCZYK, E. et al. The influence of external factors on bacteriophages-review. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 3, p. 191–200, 2011.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.

KERRO DEGO, O.; VAN DIJK, J. E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. **The Veterinary quarterly**, v. 24, n. 4, p. 181–198, 2002.

KING, A. M. K. et al. **Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses**. Ninth Repo ed. Pirbright, Woking Surrey GU24 0JB UK: Elsevier Ltd, 2012.

KUTATELADZE, M.; ADAMIA, R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 591–595, 2010.

LITT, P. K.; JARONI, D. Isolation and Physiomorphological Characterization of *Escherichia coli* O157:H7-Infecting Bacteriophages Recovered from Beef Cattle Operations . **International Journal of Microbiology**, v. 2017, p. 1–12, 2017.

MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P. J.; GUAN, L. L. The Gut Microbiome and Its Potential Role in the Development and Function of Newborn Calf Gastrointestinal Tract. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, n. May 2016, 2015.

MALMUTHUGE, N.; GUAN, L. L. Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health 1. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5996–6005, 2017.

MESELSON, M.; YUAN, R. DNA Restriction Enzyme from *E. coli*. **Nature**, v. 217, p. 1110–1114, 1968.

MIRZAEI, M. K.; MAURICE, C. F. **Ménage à trois in the human gut: Interactions between host, bacteria and phages****Nature Reviews Microbiology**, 2017.

MOHD NOR, N. et al. Estimating the costs of rearing young dairy cattle in the Netherlands using a simulation model that accounts for uncertainty related to diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 106, n. 3–4, p. 214–224, 2012.

MORENO SWITT, A. I. et al. Salmonella bacteriophage diversity reflects host diversity on dairy farms. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 275–285, 2013.

MUYZER, G.; WAAL, E. C. D. E.; UITIERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical microbiology**

reviews, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.

OIKONOMOU, G. et al. Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA . Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth. v. 8, n. 4, 2013.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., HINCHCLIFF, K. W., & C. **A Textbook of the Disease of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. Veterinary Medicine**, 2007.

SAMBROOK, J.; W RUSSELL, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**, p. 999, 2001.

SEKULOVIC, O. et al. Characterization of temperate phages infecting Clostridium difficile isolates of human and animal origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2555–2563, 2014.

SHKOPOROV, A. N.; HILL, C. Bacteriophages of the Human Gut: The “Known Unknown” of the Microbiome. **Cell Host and Microbe**, v. 25, n. 2, p. 195–209, 2019.

SORDI, L. DE; LOURENC, M. The Battle Within : Interactions of Bacteriophages and Bacteria in the Gastrointestinal Tract. 2019.

STERN, A.; SOREK, R. The phage-host arms race: Shaping the evolution of microbes. **BioEssays**, v. 33, n. 1, p. 43–51, 2011.

UETAKE, K. Newborn calf welfare : A review focusing on mortality rates. n. October 2012, p. 101–105, 2013.

UYENO, Y.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. **Microbes and environments Microbes and Environments**, v. 30, n. 2, p. 126–132, 2015.

WANG, J. et al. Feces of feedlot cattle contain a diversity of bacteriophages that lyse non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli . **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 467–475, 2015.

WINDEYER, M. C. et al. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 2, p. 231–240, 2014.

YIMER, M.; BIRHANU, B. T. A review on major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method. n. February 2016, 2015.

YUTIN, N. et al. Vast diversity of prokaryotic virus genomes encoding double jelly-roll major capsid proteins uncovered by genomic and metagenomic sequence analysis. p. 1–17, 2018.