

ANGELO LIPARINI PEREIRA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍÓFAGOS LÍTICOS DE BACTÉRIAS  
PATOGÊNICAS ASSOCIADAS COM MASTITE BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

ANGELO LIPARINI PEREIRA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍÓFAGOS LÍTICOS DE BACTÉRIAS  
PATOGÊNICAS ASSOCIADAS COM MASTITE BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADO: 25 de agosto de 2010

---

Elza Fernandes de Araújo

---

Leandro Licursi de Oliveira  
(Coorientador)

---

Hilário Cuquetto Mantovani  
(Coorientador)

---

Bolivar Nobrega de Faria

---

Sérgio Oliveira de Paula  
(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico minha tese aos meus pais, que sempre me apoiaram em tudo que fiz. Incentivaram-me nos estudos, sempre deixando bem claro que a educação seria a maior herança que eles poderiam me deixar.

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor, carinho e compreensão.

Ao meu orientador Sérgio Oliveira de Paula pelos ensinamentos, paciência, dedicação, conselhos científicos e pessoais e pela amizade.

Aos professores Leandro Licursi de Oliveira, Elza Fernandes de Araújo, Hilário Cuquetto Mantovani, Marisa Vieira de Queiroz, Francisco Murilo Zerbini Júnior pelas valiosas sugestões.

À minha noiva Karina, por estar sempre ao meu lado, incentivando-me nos momentos mais difíceis.

Aos amigos do laboratório pelo convívio muito agradável, principalmente à turma dos fagos: Roberto, Víctor, Pâmela, Tácio, Monique, Lucas, Vinícius, que tanto me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos da turma dos Porecas pelos momentos de diversão.

Aos funcionários João e Jorge pela amizade e disponibilidade.

Às secretarias do departamento de Biologia Geral: Beth e Diana que sempre me atenderam com muita boa vontade.

A todos os Viçosenses que me acolheram com muito carinho nessa cidade maravilhosa.

Ao departamento de Biologia Geral pela oportunidade.

À Universidade Federal de Viçosa pelo ensino de qualidade.

## SUMÁRIO

	Página
<a href="#">_Toc257735801</a>	
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Mastite Bovina.....	6
3.2 Bacteriófagos .....	10
3.2.1 Visão geral .....	10
3.2.2 Ciclo biológico .....	13
3.2.3 Ecologia .....	16
3.2.4 Bacteriófagos como terapia .....	18
3.2.5 Fago $\lambda$ (lambda).....	20
3.2.5.1 Ciclo lítico .....	20
3.2.5.2 Regulação da transcrição – ciclo lítico ou lisogênico?.....	22

3.2.5.3	Manutenção do estado lisogênico .....	24
3.2.5.4	Indução do profago - sistema de regulação SOS .....	25
3.2.6	Fagos de <i>Staphylococcus sp</i> .....	26
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
4.1	Caneca de fundo escuro e California Mastitis Test (CMT) .....	27
4.2	Isolamento e identificação das bactérias .....	27
4.3	Estirpe bacteriana .....	28
4.4	Antibiograma .....	29
4.5	Isolamento de bacteriófagos .....	29
4.6	Preparo da solução de bactéria estoque .....	30
4.7	Plaqueamento dos bacteriófagos .....	30
4.8	Propagação de bacteriófagos .....	31
4.9	Titulação de bacteriófagos .....	31
4.10	Teste do potencial lítico dos fagos .....	32
4.11	Avaliação da especificidade de hospedeiro .....	32
4.12	Teste de termoestabilidade .....	34
4.13	Extração do genoma viral e ensaio com DNase e RNase .....	34
4.14	Eletroforese em campo pulsado .....	35
4.15	Perfil protéico dos bacteriófagos .....	35
4.16	Eletroforese SDS-PAGE .....	35
4.17	Microscopia eletrônica .....	36
5.	RESULTADOS .....	37
5.1	Caneca de fundo escuro, CMT, isolamento e identificação das bactérias causadoras de mastite .....	37
5.2	Antibiograma .....	37
5.3	Isolamento e propagação de bacteriófagos .....	42
5.4	Teste para o potencial lítico dos bacteriófagos .....	42
5.5	Avaliação da especificidade de hospedeiro .....	44
5.6	Teste de termoestabilidade .....	46
5.7	Extração de genoma viral, ensaio com DNase e RNase .....	48
5.8	Perfil protéico .....	49
5.9	Microscopia eletrônica .....	49
6.	DISCUSSÃO .....	51

6.1 Caneca de fundo escuro, CMT, isolamento e identificação das bactérias causadoras de mastite .....	51
6.2 Antibiograma .....	51
6.3 Isolamento e propagação de bacteriófagos .....	54
6.4 Teste para o potencial lítico dos bacteriófagos .....	55
6.5 Avaliação da especificidade de hospedeiro.....	58
6.6 Teste de termoestabilidade.....	59
6.7 Extração de genoma viral, ensaio com DNase e RNase, Perfil protéico e Microscopia eletrônica.....	60
7. CONCLUSÃO .....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## RESUMO

PEREIRA, Angelo Liparini, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2010.  
**Isolamento e caracterização de bacteriófagos líticos de bactérias patogênicas associadas com mastite bovina.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.  
Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Leandro Licursi de Oliveira.

A mastite bovina é a principal doença que acomete os rebanhos de gado de leite no Brasil e no mundo, sendo responsável por imensos prejuízos. Diversos microrganismos são causadores da doença, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus epidermidis*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium pyogenes* e *Candida albicans*. De todos esses microrganismos *S. aureus* é o mais prevalente. Apesar da antibioticoterapia ainda ser o procedimento mais utilizado no tratamento da mastite bovina, buscam-se meios alternativos para o tratamento devido à crescente preocupação com a presença de resíduos de antibióticos no leite e com a seleção de cepas bacterianas resistentes. Os resíduos de antibiótico, além de interferirem na produção dos derivados, inviabilizando muitas vezes a produção destes, representam também riscos à saúde pública, existindo relatos de reações de hipersensibilidade após o consumo de leite com presença de

penicilina. A utilização de bacteriófagos como ferramenta real no controle de patógenos é uma alternativa ao tratamento. Para tanto, esse trabalho averiguou a prevalência da mastite bovina na região da zona da mata mineira, que apresentou uma porcentagem de 19,19%. Foi realizado o isolamento e a identificação das bactérias a partir do leite mastístico. Pôde-se perceber que as bactérias do gênero *Staphylococcus* foram as mais prevalentes, representando 77,22% dos isolados. Algumas cepas isoladas foram submetidas ao teste de antibiograma, para a averiguação da susceptibilidade dessas bactérias a determinados antibióticos. Verificou-se que 65% e 60% das cepas de *Staphylococcus aureus* testadas eram resistentes à penicilina e à ampicilina, respectivamente. Foram isolados 10 bacteriófagos capazes de infectar *S.aureus*. Esses fagos foram avaliados quanto ao seu potencial lítico, sua especificidade e sua termoestabilidade. Além disso, foi feita a caracterização desses fagos quanto ao tipo de material genético, ao tamanho desse genoma e ao perfil protéico que eles apresentam. Todos os fagos isolados apresentaram o mesmo perfil protéico e com um genoma de DNA de aproximadamente 175 kb. Por meio da microscopia eletrônica, verificou-se que os fagos eram caudados, sendo classificados na família *Myoviridae*.

## ABSTRACT

PEREIRA, Angelo Liparini, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2010.  
**Isolation and characterization of lytic bacteriophages for pathogenic bacteria associated with bovine mastitis.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani and Leandro Licursi de Oliveira.

Bovine mastitis is the main disease affecting the herds of dairy cattle in Brazil and the world, accounting for huge losses. Several microorganisms are causing the disease, such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus epidermidis*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium pyogenes* and *Candida albicans*. Of all these microorganisms *S. aureus* is the most prevalent. Despite antibiotic therapy is still the most widely used procedure in the treatment of bovine mastitis, we have sought alternative means of treatment due to the growing concern about the presence of antibiotic residues in milk and selection of resistant bacterial strains. The residues of antibiotics also interfere with the production of derivatives, often making it impossible to produce them. They cause public health risks and there are reports of hypersensitivity reactions after drinking milk with the presence of penicillin. The use of bacteriophages as a tool in actual control of pathogens is an alternative treatment. Therefore, this work

examined the prevalence of bovine mastitis in the region of Zona da Mata Mineira, which showed a percentage of 19.19%. We performed the isolation and identification of bacteria from mastitis' milk. It can be noticed that the bacteria of the genus *Staphylococcus* were the most prevalent, accounting for 77.22% of isolates. Some strains were tested with antibiotic, to investigate the susceptibility of these bacteria to certain antibiotics. It was found that 65% and 60% of *Staphylococcus aureus* strains tested were resistant to penicilina and ampicillin, respectively. Were isolated 10 bacteriophages able to infect *S. aureus*. These phages were evaluated for their lytic potential, its specificity and its thermostability. Furthermore, we described the characteristics of these phages on the type of genetic material, the size of genome and protein profile they present. All phage isolates showed very similar protein profile with a DNA genome of approximately 175 kb. By electron microscopy, it was found that phages were caudate, belonging to the *Myoviridae* family.

## 1. INTRODUÇÃO

Os bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias e são amplamente distribuídos tanto em meio líquido quanto em meio sólido. Esses vírus foram descobertos independentemente por Twort (1915) e D' Herelle (1917), embora as primeiras observações destes vírus tenham sido datadas em 1896, por Hankin. Este relatou que a água dos rios Jumna e Ganges na Índia poderia matar várias espécies de bactéria, especialmente a *Vibrio cholera* (KUTTER, 2005).

Com a descoberta dos fagos, além dos estudos da natureza biológica, pensou-se também na utilização deles no tratamento e prevenção de doenças infecciosas. D' Herelle foi o primeiro a perceber o potencial dos fagos para tratar infecções bacterianas. Em 1919, ele realizou a fagoterapia com sucesso em um menino de 12 anos de idade que sofria de disenteria bacteriana (SULAKVELIDZE et al., 2001). D' Herelle repetiu este procedimento com sucesso em outros três pacientes com disenteria e todos melhoraram sensivelmente no prazo de 24 horas (SUMMERS, 2001). Na mesma época, Bruynoghe e Maisin (1921) utilizaram fagos no tratamento de infecções estafilocócicas da pele, fato que se tornou o primeiro relato publicado da fagoterapia. Eles reportaram uma redução no inchaço e na dor, assim como uma redução na febre. (SULAKVELIDZE et al., 2001; KUTTER, 2005).

D' Herelle rapidamente expandiu o leque de doenças bacterianas que poderiam ser tratadas com fagos. Ele tratou com sucesso quatro pacientes de

peste bubônica no Egito. Na Índia reduziu drasticamente as taxas de mortalidade por cólera em pacientes internados em hospitais, passando de 30% para 0% (SULAKVELIDZE et al., 2001; KUTTER, 2005).

No entanto, nem todos os ensaios de fagoterapia nessa época foram bem sucedidos. Apesar da grande expectativa que se tinha na utilização de bacteriófagos como agente terapêutico, a fagoterapia entrou em declínio na década de 1930 no mundo ocidental, mesmo antes do uso difundido de antibióticos. A escassez de estudos rigorosamente controlados e padronizados frustrou as primeiras tentativas de se utilizar objetivamente a fagoterapia (SUMMERS, 2001; KUTTER, 2005).

Esses fatores, juntamente com a descoberta dos antibióticos e logo em seguida a segunda guerra mundial, resultaram em um declínio da investigação da fagoterapia no Ocidente. Pesquisas e aplicações práticas continuaram apenas em institutos do leste Europeu e da ex-União Soviética (ALISKY et al.1998).

No entanto, as preocupações modernas com o aumento da prevalência de bactérias resistentes aos antibióticos fizeram com que se aumentasse o interesse no estudo de terapias alternativas, renovando o estudo da fagoterapia no ocidente.

Um importante passo para o ressurgimento da pesquisa com fagos no Ocidente foi uma série de experiências veterinárias efetuadas por Smith e Huggins em 1980. Seus primeiros trabalhos foram focados na septicemia induzida experimentalmente em camundongos usando uma cepa de *Escherichia coli* (O18: K1: H7) de uma criança com meningite. Uma única injeção intramuscular de um fago foi mais eficaz do que múltiplas injeções de diferentes antibióticos (tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfafurazole) em proteger camundongos contra uma infecção potencialmente letal (SMITH e HUGGINS, 1982).

O uso da fagoterapia nas vacas com mastite bovina seria bastante interessante, já que o agente etiológico na maior parte das vezes é bacteriano. A mastite bovina é a principal doença que acomete o rebanho leiteiro em todo o mundo, ocasionando imensos prejuízos. As perdas para o produtor são devido à desvalorização do leite mastítico pelo laticínio, gastos com medicamentos e veterinário, descarte de animais com mastite crônica, queda na produção de

leite e descarte do leite dos animais tratados (devido à presença de resíduos de antibióticos).

O uso de antibióticos representa prejuízos para o produtor, devido à necessidade de descarte do leite, desincentivando o tratamento das mastites subclínicas. Em alguns casos, de maneira inconseqüente, alguns produtores não descartam o leite com antibiótico, disponibilizando-o para o consumo. Essa atitude representa riscos à saúde pública, além do antibiótico interferir na produção de produtos derivados do leite. Além disso, diversos estudos têm demonstrado um aumento crescente na prevalência de bactérias causadoras de mastite resistentes a diversos antibióticos. Nesse cenário, os bacteriófagos aparecem como uma boa alternativa de tratamento para essa doença.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

- 1) Isolamento de bactérias causadoras de mastite e estabelecimento de um banco bacteriano local;
- 2) Isolamento e caracterização de bacteriófagos específicos para as bactérias *Staphylococcus aureus*;
- 3) Estabelecimento de um banco de bacteriófagos local, selecionando bacteriófagos com maior potencial terapêutico;

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Avaliar a prevalência de mastite bovina na região de Viçosa-MG;
- 2) Identificar as principais bactérias causadoras de mastite na região de Viçosa-MG;
- 3) Identificar a sensibilidade das bactérias causadoras de mastite a antibióticos usualmente utilizados;
- 4) Avaliar o potencial lítico, a especificidade e a termoestabilidade dos bacteriófagos isolados;
- 5) Caracterizar os bacteriófagos isolados, quanto ao tipo e tamanho do material genético, padrão de proteínas e morfologia.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Mastite Bovina**

A mastite, também conhecida como mamite, caracteriza-se por um processo de inflamação da glândula mamária. Apesar de o estresse e os ferimentos físicos também causarem inflamação da glândula, a infecção por bactérias representa 90% dos casos (PHILPOT e NICKERSON, 1991). O quadro se inicia quando os microrganismos invadem a glândula mamária, atravessam o canal do teto e multiplicam-se no interior dos tecidos (SANTOS e FONSECA, 2007), causando assim um aumento da contagem de células somáticas (CCS). Células somáticas são células de defesa que migram do sangue para os alvéolos quando há uma infecção, além das células de descamação do epitélio glandular secretor. A contagem dessas células é utilizada para avaliar a qualidade do leite (BRITO, 2001).

A invasão microbiana pode ocorrer por diversas formas, como por exemplo, a colonização da pele e do canal do teto entre as ordenhas ou através da introdução de cânulas contaminadas no momento do tratamento intramamário. O risco de adquirir a doença talvez seja aumentado por fatores químicos, físicos ou traumáticos. Por esta razão, a mastite pode ser considerada como uma doença multifatorial, incluindo: 1) o bovino, o

hospedeiro; 2) o microrganismo, o agente causador, e 3) o ambiente (SCHROEDER, 1997; DEGO et al., 2002; SANTOS e FONSECA, 2007).

Em rebanhos leiteiros é possível encontrar animais sadios, animais com uma glândula mamária infectada e animais com as quatro glândulas mamárias infectadas. Esta variabilidade sugere que a incidência e prevalência da mastite dependam de diferenças na susceptibilidade da glândula mamária a infecções intramamárias (BARKEMA et al., 1997).

Entre os fatores que influenciam a susceptibilidade a infecções intramamária em bovinos estão: número de partos, nutrição, estágio de lactação, produção de leite e raça (SMITH et al., 1997; BARKEMA et al., 1999; ZADOKS et al., 2001). Um dos mais significativos fatores conhecidos que influenciam na capacidade de defesa da glândula mamária é o estágio de lactação (KEHRLI Jr et al., 1989; SHAFER-WEAVER et al., 1996; MALLARD et al., 1998). Vacas próximas à lactação são mais sensíveis a infecções por patógenos ambientais (WAGTER et al., 2000; BURVENICH et al., 2003). É possível que durante o período próximo ao parto, as vacas apresentem certas alterações em mecanismos de defesa, associados tanto com mudanças hormonais e metabólicas quanto ao estresse fisiológico (MALLARD et al., 1998).

A mastite causa perda da qualidade do leite, além de sérios prejuízos econômicos, tanto ao produtor quanto à indústria de laticínios (BRAMLEY et al., 1996). Seus prejuízos são devido a diversos fatores como:

- Desvalorização do leite mastítico pelo laticínio;
- Descarte do leite em função do tratamento (devido à presença de resíduos de antibióticos);
- Custo com medicamentos;
- Descarte prematuro de animais em casos crônicos;
- Queda da produção leiteira a curto e a longo prazo.

A mastite tem sido apontada como a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo (FEßLER et al., 2010a). O prejuízo mundial causado pela mastite é estimado em 35 bilhões de dólares por ano (BRAMLEY et al., 1996; WELLENBERG et al., 2002).

A mastite bovina pode ser classificada como clínica ou subclínica. Na mastite clínica ocorre a apresentação de sinais evidentes, tais como:

- Edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor na glândula mamária, grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite (FONSECA e SANTOS, 2000). Na forma subclínica não se observam alterações macroscópicas, mas ocorre redução na produção de leite e mudanças na composição do leite, tais como:

- Aumento da CCS, dos teores de cloro, sódio e proteínas séricas;
- Diminuição dos teores de caseína, lactose e gordura do leite (CULLOR et al., 1994).

Na mastite subclínica, como não existem sinais evidentes da doença, não é possível diagnosticá-la sem a utilização de testes auxiliares, tais como o Califórnia Mastitis Test (CMT), o Wisconsin Mastitis Test (WMT), a condutividade elétrica do leite e a contagem de células somáticas.

No caso das formas clínicas, o diagnóstico é realizado pelo uso da caneca de fundo preto ou telada, onde visualizam-se as alterações macroscópicas do leite.

A mastite subclínica apresenta prevalência maior do que a sua forma clínica. Considerando-se que a mastite subclínica seja responsável por 90 a 95% dos casos da doença nos rebanhos leiteiros, ela configura-se como a forma mais importante. Na maioria das vezes, a prevalência de mastite é subestimada, uma vez que muitos consideram para efeito de análise, apenas os casos de mastite clínica, pois esses casos se apresentam de forma evidente e de diagnóstico fácil. (SANTOS e FONSECA, 2007).

Nas suas principais formas de apresentação, clínica e subclínica, a doença é causada por um grande número de microrganismos. Dentre os agentes da mastite, *Staphylococcus aureus* é o mais freqüentemente isolado em diversos países (BRAMLEY et al., 1996; FEßLER et al., 2010a). No Brasil, relatos de isolamento de *S. aureus* de mastite subclínica são conhecidos desde o início da década de 50 (LACERDA Jr. et al., 1954). Desde então, trabalhos realizados nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do País demonstram a predominância de *S. aureus* como agente etiológico da doença (BRITO e BRITO, 1996).

Langenegger et al. (1970) examinou o perfil microbiológico de 429 vacas que apresentavam exame microbiológico positivo e encontraram 53,1% de *S. aureus*, 24,7% de *Streptococcus agalactiae*, 17,2% de *Streptococcus*

*dysgalactiae* e 4,6% de *Streptococcus uberis*. Nader Filho et al. (1983) encontraram dentre as amostras positivas obtidas 52,08% de *S. aureus*, 14,58% de *S. dysgalactiae*, 10,42% de *S. agalactiae*, 8,33% de *S. uberis* e 6,25% de *S. epidermidis*. Langoni et al. (1990) examinando 702 amostras de leite com mastite subclínica encontraram a seguinte ocorrência de agentes: *S. aureus* 36,9%, *S. epidermidis* 22,2%, *Corynebacterium bovis* 4,8%, *Corynebacterium pyogenes* 4,4%, *S. uberis* 4,3%, *E. coli* 4,0%, *S. dysgalactiae* 3,8%, *S. agalactiae* 3,7% e *Candida albicans* 3,8%.

A mastite causada por *Staphylococcus* sp. em particular pode ser manifestada por uma infecção clínica ou subclínica, que pode persistir através do período de lactação e lactações subseqüentes. Algumas estirpes possuem fatores de virulência que facilitam a colonização e a infecção da glândula mamária. Por exemplo, *S. aureus* produz uma enzima chamada coagulase, que promove a coagulação do fibrinogênio no sangue, convertendo-o em fibrina. O coágulo de fibrina pode proteger a bactéria da fagocitose e isolá-la das outras defesas do hospedeiro. Outra forma de escape do sistema imune por essas bactérias é a infecção intracelular. Nessa infecção as células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) não têm acesso a essas bactérias tão facilmente (DEGO et al., 2002; OVIEDO-BOYSO et al., 2007; MIDDLETON et al., 2009).

A antibioticoterapia ainda é o procedimento mais utilizado no tratamento da mastite bovina. Porém várias pesquisas têm buscado métodos alternativos para o tratamento, pois além do problema do aumento da prevalência de bactérias resistentes a antibiótico, devemos ressaltar que o resíduo no leite de consumo representa riscos à saúde pública e interfere na produção dos derivados, inviabilizando muitas vezes a produção destes (PINTO et al., 2001; BEDI, et al., 2009; MIDDLETON, et al., 2009).

Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas são usualmente usados no tratamento de mastite bovina, sendo muitas vezes ineficazes devido a uma grande prevalência de cepas de *Staphylococcus* sp. produtoras de  $\beta$ -lactamases do tipo BlaZ ou da proteína PLP2a, que se liga à penicilina, impedindo a ação da mesma (FEßLER et al., 2010b).

Diversos estudos que tratam da susceptibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina mostram aumento crescente no padrão de

resistência, principalmente para *S. aureus*, o agente mais freqüentemente isolado (BRITO e BRITO, 1996; LOWY, 2003).

## **3.2. Bacteriófagos**

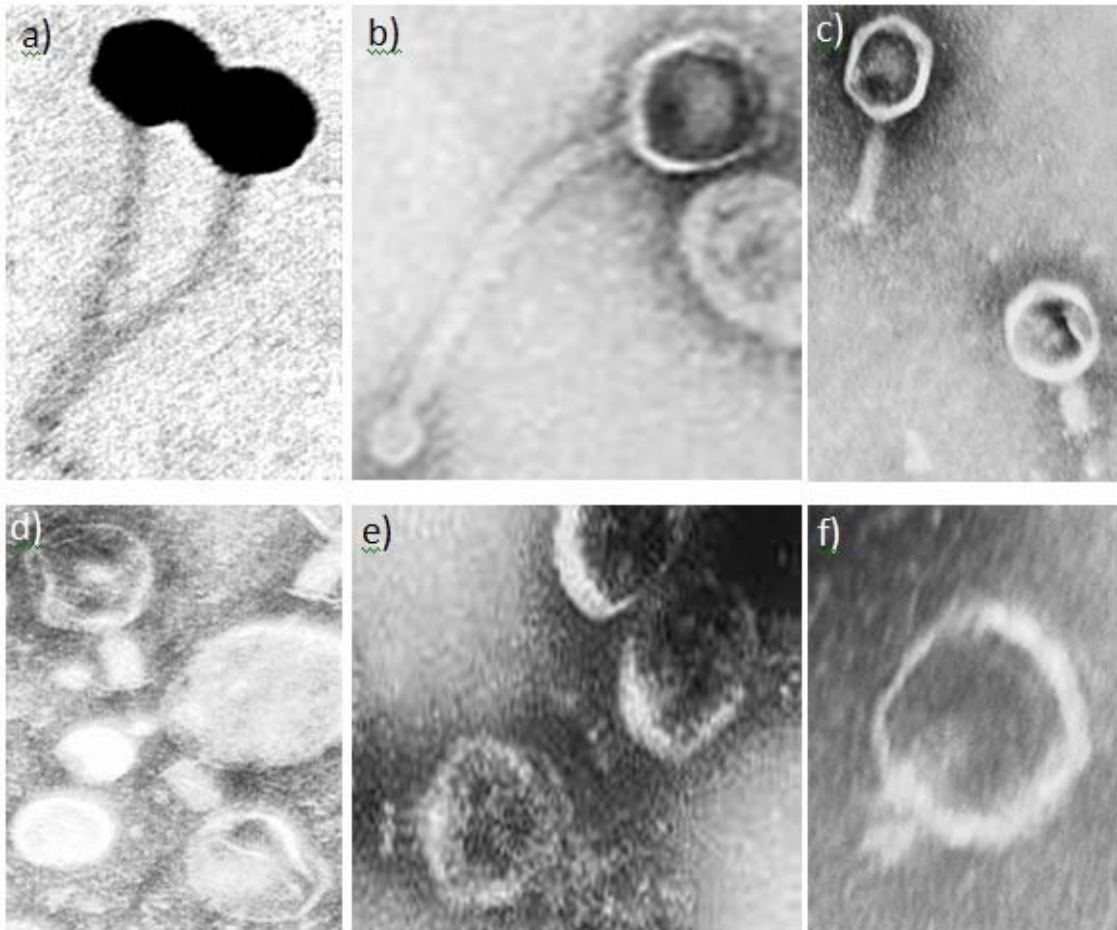
### **3.2.1 Visão geral**

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam hospedeiros pertencentes aos domínios Archaea e Bacteria, sendo sua natureza geral similar a de outros vírus (ACKERMANN, 2003; GREGORACCI et al., 2006a). Eles consistem de um ácido nucléico envolto por uma capa protéica (capsídeo), podendo ou não estar envolvido por um envelope lipoprotéico. Eles requerem uma bactéria com um receptor específico para que possam entrar e se multiplicar. Mais de 5300 fagos já foram descritos, porém apenas aproximadamente 300 fagos foram extensivamente caracterizados, dos quais deriva-se a maior parte do conhecimento atual (ACKERMANN, 2003; GREGORACCI et al., 2006a; VERMA et al., 2009).

Os grupos de bacteriófagos são variados, e apresentam diferentes morfologias, tamanho, etc. Fagos podem possuir genomas constituídos de RNA ou DNA, fita simples ou dupla, linear ou circular e segmentado ou único, sendo que nem todas as combinações possíveis estão presentes (ACKERMANN, 2003; CASJENS, 2005; GREGORACCI et al., 2006a; SKURNIK e STRAUCH, 2006).

Apesar de toda essa diversidade, cerca de 96% dos fagos são caudados e constituem a ordem *Caudovirales*. A ordem *Caudovirales* congrega vírus icosaédricos, que apresentam DNA fita-dupla como material genético e que possuem como estrutura diferencial a cauda, que é responsável pelo reconhecimento dos hospedeiros e injeção do material genético (ACKERMANN, 2003; CASJENS, 2005; GREGORACCI et al., 2006a). Essa ordem possui três famílias: *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae* (figura 1). As três famílias se diferem em relação à morfologia da cauda, sendo que os fagos da família *Siphoviridae* possuem uma cauda longa e não-contrátil; os fagos da família *Myoviridae* possuem uma cauda contrátil; e os fagos da família

*Podoviridae* possuem uma cauda bem curta (ACKERMANN, 2003; CHIBANI-CHENNOUFI, 2004; SUTTLE, 2005; GREGORACCI et al., 2006a).



Fonte: Gregoracci, 2006b

Figura 1: Imagens digitalizadas dos negativos de microscopia eletrônica de transmissão. a) e b) Família *Siphoviridae*, com cauda longa e não-contrátil; c) e d) Família *Myoviridae* com cauda contrátil ; e) e f) Família *Podoviridae*, com cauda bem curta

Fagos poliédricos, filamentosos e pleomórficos, compreendem menos de 4% dos vírus bacterianos (ACKERMANN e GERSHMAN, 1992; TOPLEY et al., 1990; DOSKAR et al., 2000; ACKERMANN, 2001, 2003).

Os vírus representam os organismos mais abundantes na Terra, estando presente em todos os ambientes em que existe vida, em escala superior aos procariontos, reconhecidos ocupantes de todos esses nichos (BAMFORD, 2003; CHIBANI-CHENNOUFI, 2004; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; BREITBART e ROHWER, 2005; DABROWSKA et al., 2005; HAMBLY e SUTTLE, 2005; SKURNIK e STRAUCH, 2005; SUTTLE, 2005). Dos vírus, os

fagos são os que estão mais diversamente distribuídos, simplesmente por seus hospedeiros serem os únicos com distribuição e abundância suficientes para sustentar esta enorme quantidade de vírus no planeta (FUHRMAN, 1999, BREITBART et al., 2002; BREITBART e ROHWER, 2005, HAMBLY e SUTTLE, 2005).

Os bacteriófagos podem ser achados praticamente em qualquer lugar, podendo ser isolados do solo, da água, do fundo do oceano assim como do corpo de animais. Os fagos se propagam em bactérias que são simbióticas ou patogênicas aos organismos mais evoluídos. Sabe-se que os bacteriófagos são muito comuns no trato gastro-intestinal e junto com as bactérias hospedeiras são um importante componente da microbiota intestinal. Estima-se que em 1g de solo ou água, cerca de  $10^8$  partículas de fagos podem ser isoladas (MERRIL, 1974; ASHELFORD et al., 2000; GORSKI et al., 2003; SONI et al., 2010).

Estimativas do total de procariotos no planeta giram em torno de  $10^{30}$  organismos (CHIBANI-CHENNOUFI, 2004; SUTTLE, 2005). Observações diretas e indiretas de microrganismos em diversos ambientes distintos reportam cerca de dez partículas virais para cada célula (BREITBART et al., 2004; CHIBANI-CHENNOUFI, 2004; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; BREITBART e ROHWER, 2005; SKURNIK e STRAUCH, 2006). Sendo assim, as estimativas do total de vírus no globo atingem cerca de  $10^{31}$  partículas (SUTTLE, 2007; VERMA et al., 2009).

Os estudos de diversidade de fagos são dificultados pela incapacidade de se cultivar a maioria dos procariotos do ambiente, pois menos de 1% dos procariotos podem ser cultivados em placas (BREITBART et al., 2002; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; BREITBART e ROHWER, 2005; GREGORACCI et al., 2006). Muitos desses estudos são feitos com técnicas que independem do cultivo bacteriano, como os estudos de metagenômica viral, em que se faz a análise funcional baseada em seqüências de genomas virais contidos em amostras ambientais. Nesses estudos perceberam que aproximadamente 75% de seqüências ficavam sem alinhamento nos bancos de dados existentes (BREITBART e ROHWER, 2005; HAMBLY e SUTTLE, 2005).

Mesmo de ambientes mais extremos como águas profundas, salternas solares (salinidade dez vezes superior aos oceanos), fontes quentes ácidas

(>80°C com pH=3,0), lagos alcalinos (pH=10), lagos polares (>30m de profundidade) e ambientes subterrâneos terrestres (>2km de profundidade), já foram isolados genomas virais (BREITBART e ROHWER, 2005).

### **3.2.2 Ciclo biológico**

Os fagos se assemelham em vários passos com os demais vírus, mas com algumas particularidades próprias. O passo de adsorção é inicial a toda infecção viral (WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; COMEAU e KRISCH, 2005; SKURNIK e STRAUCH, 2005; GREGORACCI et al., 2006). Essa adsorção, os fagos geralmente o fazem em dois passos distintos, o primeiro reversível e o segundo irreversível (LINDBERG, 1973; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; COMEAU e KRISCH, 2005; GREGORACCI et al., 2006a).

A atração eletrostática influi bastante na primeira etapa. Na segunda, as ligações se tornam mais estáveis e enzimas hidrolíticas atuam para facilitar a passagem de material genético através da parede bacteriana (LINDBERG, 1973; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; GREGORACCI et al., 2006a). Praticamente todas as estruturas bacterianas expostas na parede, assim como estruturas acessórias, como o pili, o flagelo e a cápsula, podem ser utilizadas pelos bacteriófagos para a adsorção destes, tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas (LINDBERG, 1973; SKURNIK e STRAUCH, 2005; GREGORACCI et al., 2006a).

A próxima etapa do ciclo é a penetração/descapsidação. No caso dos fagos, eles utilizam enzimas que fazem verdadeiros buracos na parede celular bacteriana, facilitando a entrada do material genético. Nesse processo o capsídeo não penetra na célula hospedeira, ficando aderido à parede exterior da célula, enquanto o material genético é injetado. Poucos são os casos em que há entrada do capsídeo viral na célula (WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; SKURNIK e STRAUCH, 2005; GREGORACCI et al., 2006a).

Alguns fagos são altamente virulentos, produzindo muitos vírions, fazendo com que as vias metabólicas do hospedeiro sejam toda ou quase toda

direcionada para replicação viral. Assim que o material genético do bacteriófago alcança o citoplasma da célula hospedeira, inicia-se a biossíntese do ácido nucléico e das proteínas virais. Nos primeiros minutos, após a infecção, não são encontrados fagos completos na célula hospedeira. Somente podem ser detectados componentes isolados – material genético e proteínas virais. Durante a multiplicação viral, chama-se período de eclipse, aquela fase em que ainda não estão formados os vírions completos e infectivos. Nesse ciclo, denominado lítico, ocorre morte da bactéria durante a liberação das partículas virais por rompimento da membrana plasmática após um grande acúmulo dessas no citoplasma bacteriano. Esse rompimento é facilitado por ação enzimática, que enfraquece a parede celular e a membrana plasmática da célula, além do grande número de partículas virais que são formadas, fornecendo uma pressão sobre essas estruturas (FUHRMAN, 1999; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; SKURNIK e STRAUCH, 2005; GREGORACCI et al., 2006a).

O ciclo lítico está relacionado com o processo de transdução generalizada. Durante o passo de empacotamento do material genético viral no capsídeo, pode haver inclusão de material genético do hospedeiro. Assim esse fago numa próxima infecção, injeta seu material genético que contém partes de genoma bacteriano. Esse genoma poderá ser inserido nesse novo hospedeiro por recombinação, ocorrendo um processo de transferência genética horizontal (CANCHAYA et al., 2003; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; GREGORACCI et al., 2006a).

Outros fagos promovem infecção crônica nas bactérias, estabelecendo uma relação de verdadeiro parasitismo (WEINBAUER e RASSOULZADEGAN; 2004). Estes fagos geralmente produzem continuamente uma baixa quantidade de vírus. Esses fagos não matam as células e são liberados por brotamento (FUHRMAN, 1999; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; GREGORACCI et al., 2006a).

Existem também aqueles fagos que integram seu material genético ao genoma da bactéria após a infecção. Estes fagos, chamados lisogênicos, produzem proteínas que silenciam a expressão da maior parte dos genes virais (FUHRMAN, 1999; ALMEIDA et al., 2004; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; SKURNIK e STRAUCH, 2005). Os fagos

lisogênicos inserem seu material genético no hospedeiro e nesse estado são chamados de profagos. As proteínas produzidas por esses vírus mantêm esse estado, além de conferirem imunidade ao hospedeiro bacteriano a outros bacteriófagos relacionados. Porém, esse estado não é permanente. Agressões no DNA, como luz ultravioleta e agentes químicos, podem desencadear alterações fisiológicas que culminam com a indução do profago, que passa para um ciclo lítico, produz progênie e lisa o hospedeiro (FUHRMAN, 1999; CHIBANI-CHENNOUFI, 2004; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; SKURNIK e STRAUCH, 2005; GREGORACCI et al., 2006a).

O profago pode ser danificado por meio de inserções de elementos móveis e pela ocorrência de deleções. Com o passar do tempo, acredita-se que apenas genes que confirmam alguma vantagem funcional para os hospedeiros é que se mantêm, enquanto os outros são eliminados por deleção e/ou recombinação (BRÜSSOW et al., 2004; ALMEIDA et al., 2004; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004, BREITBART e ROHWER, 2005, COMEAU e KRISCH, 2005).

O ciclo lisogênico está associado ao processo de transdução especializada. Por meio da transdução, fagos lisogênicos podem também transferir informações genéticas, que irão alterar características metabólicas, morfológicas e/ou fisiológicas das bactérias, conferindo vantagens ou desvantagens competitivas, permitindo a adaptação delas a novos nichos ecológicos (BRÜSSOW et al., 2004; CHIBANI-CHENNOUFI, 2004; DAUBIN e OCHMAN, 2004; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; CASJENS, 2005; FARUQUE et al., 2005).

Quando o material genético inserido através do processo de transdução modifica propriedades do procaríoto infectado, designa-se conversão lisogênica (CANCHAYA et al., 2003; CHIBANI-CHENNOUFI, 2004; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; GREGORACCI et al., 2006a).

O evento seguinte é a maturação. Nesse processo, vírions completos são formados a partir do material genético e dos capsídeos. Os componentes virais se organizam espontaneamente formando as partículas virais. No caso dos fagos caudados, as cabeças e as caudas são montadas separadamente a partir de subunidades protéicas: a cabeça é preenchida com DNA viral e se une à cauda (TORTORA, 2005; GREGORACCI et al., 2006a).

O estágio final da multiplicação viral consiste na liberação dos vírions da célula hospedeira. O termo lise é geralmente usado para esse estágio da multiplicação dos fagos, pois a membrana plasmática da bactéria se rompe (lisa). A lisozima, que é codificada pelo genoma do fago, é sintetizada dentro da célula e destrói a parede celular, liberando os bacteriófagos recém-produzidos. Os fagos liberados infectam novas células nas proximidades, e o ciclo de multiplicação se repete (TORTORA, 2005; GREGORACCI et al., 2006a).

O estágio de transmissão, em que a partícula infecciosa busca outra célula permissível, normalmente é o que demanda mais tempo no ambiente e o mais propenso a não se concluir (FUHRMAN, 1999; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004). No entanto, apenas uma pequena parcela de vírus precisa atingir seu objetivo para que a população viral seja mantida (WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; GREGORACCI et al., 2006a).

### **3.2.3 Ecologia**

Anteriormente, acreditava-se que os fagos, mesmo em abundância no planeta Terra, não representavam organismos que pudessem interferir de maneira significativa nas cadeias ecológicas. Esse conceito vem sofrendo mudanças, devido à importância dos fagos principalmente na transferência de genes, controle de certos procaríotos, transferência de matéria e energia, fazendo com que os fagos ocupem posições de mais destaque (SUTTLE, 2007; WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; HAMBLY e SUTTLE, 2005; ABEDON, 2009a).

Em certos nichos observou-se que a predação por fagos líticos representa a principal causa da mortalidade de bactérias (FUHRMAN, 1999; SUTTLE, 2005; GREGORACCI et al., 2006a). Em outros nichos a mortalidade das bactérias pelos fagos só é superada por alguns protistas, principalmente nanoflagelados heterotróficos. Sustenta-se que os fagos sejam responsáveis pela mortalidade diária de um terço dos procaríotos do globo (SUTTLE, 2005).

A predação das bactérias ora por protistas ora por bacteriófagos influencia de maneira drástica a cadeia alimentar microscópica, pois a predação por protistas seqüestra e transfere os nutrientes para níveis tróficos superiores. A lise viral, por sua vez, libera esses nutrientes para a reserva de matéria orgânica dissolvida, disponibilizando-os para os demais procariotos. Isso faz com que os procariotos utilizem boa parte da biomassa bacteriana, criando um ciclo semifechado de nutrientes (WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; GREGORACCI et al., 2006a; THINGSTAD et al., 2008).

Acredita-se que os fagos sejam responsáveis por conter espécies de bactérias mais favorecidas competitivamente, permitindo a manutenção de linhagens menos favorecidas, propiciando uma maior diversidade bacteriana. Esse modelo foi postulado com base na maior probabilidade de fagos encontrarem de maneira aleatória os hospedeiros que estejam mais abundantes no meio. Os hospedeiros mais abundantes fazem com que a população de fagos específicos cresça e com isso consiga frear o crescimento da população bacteriana, fazendo uma espécie de controle biológico natural (WEINBAUER e RASSOULZADEGAN, 2004; BREITBART e ROHWER, 2005; GREGORACCI et al., 2006a).

Esse controle biológico provavelmente explica a queda das epidemias periódicas de cólera na Índia. A natureza autolimitante dessas epidemias seria atribuída à amplificação dos fagos líticos específicos para *Vibrio cholerae* no ambiente e principalmente nos intestinos humanos, aumentando a carga viral e reduzindo a carga bacteriana ambiental (FARUQUE et al., 2005).

#### **3.2.4 Bacteriófagos como terapia**

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 (SULAKVELIDZE, et al., 2001; MERRIL, et al., 2003). O aumento da população de bactérias resistentes a tratamentos comuns com antibióticos é uma preocupação crescente, e as oportunidades para o

desenvolvimento no futuro de novos químiointibióticos eficazes podem ser limitadas (BELLO e VILA, 2007).

Os bacteriófagos constituem uma ferramenta natural, não tóxica, viável para o controle de diversos patógenos. De fato, no início do século XX, as terapias fágicas foram utilizadas no tratamento de infecções bacterianas antes do advento dos antibióticos (ALISKY et al., 1998; SCHOOLNIK et al., 2004). Mas em grande parte essas terapias eram confinadas a regiões da antiga União Soviética (SILVER et al., 1993; CHANISHVILI et al., 2001).

Atualmente, alguns bacteriófagos já estão sendo usados no tratamento de infecções por *Staphylococcus* em humanos e animais pelo ocidente. Vários estudos recentes têm mostrado o uso de bacteriófagos como uma promessa terapêutica no controle de infecções bacterianas (O'FLAHERTY et al., 2005; WILLS et al, 2005; BRUTTIN e BRUSSOW, 2005; VINODKUMAR et al., 2005; SKURNIK e STRAUCH, 2006; CHHIBBER et al. 2008; PARISIEN et al., 2008; KUMARI et al., 2009; KUMARI, et al., 2010). Em adição, componentes dos fagos, como as endolisinas, têm também sido testadas por suas atividades anti-*S. aureus* (O'FLAHERTY, et al., 2005)

Muitos resultados de pesquisas reportadas no passado mostraram eficiência variada na aplicação dessa terapia. Isso provavelmente ocorreu devido a uma série de fatores, que inclui um pequeno entendimento da patogenicidade das bactérias, falta de conhecimento da interação fago-hospedeiro e o possível uso de fagos impuros na preparação de alguns estudos (BARROW, 2001).

No entanto estudos mais recentes e rigorosos têm demonstrado a efetividade da terapia fágica. Um exemplo seria o efeito de cura dos bacteriófagos em camundongos com uma bacteriemia por *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (BISWAS, et al., 2002). Outros estudos demonstraram o mesmo efeito em ratos infectados experimentalmente por *Staphylococcus aureus* (MATSUZAKI et al., 2003), e agindo como agente profilático contra infecção a *S. aureus*, especificamente após cirurgia (WILLS et al., 2005).

Com o presente conhecimento a respeito dos fagos e da genética bacteriana é possível driblar os problemas encontrados em tentativas

anteriores de se usar os fagos como agente antimicrobiano natural (BARROW et al., 1997; ALISKY et al., 1998).

Os bacteriófagos, assim como os antibióticos, possuem atividade antibacteriana. No entanto, terapias com fagos apresentam pelo menos algumas vantagens teóricas sobre os antibióticos como, por exemplo:

- Os bacteriófagos são muito específicos, isto é, normalmente afetam apenas a espécie de bactéria-alvo, enquanto que antibióticos atacam tanto o microrganismo patogênico quanto o da microbiota normal. Isso afeta o balanço microbiológico do paciente, podendo levar a sérias infecções secundárias (CHERNOMORDIK, 1989; KARL, 2004);

- Os fagos replicam no local da infecção, sendo disponíveis no local onde eles são mais requisitados. Já os antibióticos são metabolizados e eliminados do corpo e não necessariamente são concentrados no local da infecção (SMITH et al., 1982);

- Nenhum efeito colateral sério foi descrito por se ter utilizado terapia fágica. Os bacteriófagos são inofensivos para as células de mamíferos. No entanto muitos efeitos colaterais através da utilização de antibióticos foram descritos, tais como, desordem intestinal, alergias e infecções secundárias (YAO et al., 1995; KARL, 2004);

- Os fagos possuem a capacidade de aumentar exponencialmente em número ao longo do tempo, desde que haja células hospedeiras suficientes para eles se multiplicarem (DIXON, 2004).

- Bactérias resistentes ao bacteriófago permanecem susceptíveis a outros fagos que possuem superfície de contato similar, enquanto que a resistência a antibióticos não é limitada às bactérias atingidas. Além disso, a frequência de mutação do fago é significativamente superior à frequência de mutações de bactérias, permitindo uma pronta resposta dos fagos às bactérias resistentes (PARISIEN et al., 2008)

- Seleção de novos fagos (contra bactérias fago-resistentes) é um processo relativamente rápido que pode levar dias ou semanas. Já o desenvolvimento de um novo antibiótico (contra bactérias antibiótico-resistentes) é um processo que consome muito tempo, que pode levar anos para ser realizado, o que encarece o custo do medicamento (CHOPRA et al., 1997; LALEH et al., 2008).

Os bacteriófagos utilizados como agentes terapêuticos ou biocontrole só são recomendados quando lisam rapidamente as células bacterianas sem integração do seu material genético no genoma bacteriano (GREER, 2005, HUDSON et al., 2005; SAKAGUCHI et al., 2005).

### **3.2.5 Fago $\lambda$ (Lambda)**

#### **3.2.5.1 Ciclo Lítico**

A infecção por  $\lambda$  pode levar a dois ciclos: - lítico ou lisogênico. No ciclo lisogênico, em que seu DNA fica inserido no DNA do hospedeiro, uma série limitada de genes é expressa, levando à criação de um estado profago. Na resposta lítica, uma série de genes é expressa em uma ordem definida, levando à lise celular e liberando a progene do fago. Fagos como o  $\lambda$  são chamados temperados porque eles nem sempre matam o hospedeiro (LWOFF, 1953). Em contraste, fagos que sempre matam o hospedeiro são chamados de virulentos.

O fago  $\lambda$  possui 6 longas fibras da cauda que faz o contato inicial com a parede celular do hospedeiro. Uma fibra da cauda única e central, produto do gene J, se liga a uma proteína ligante de maltose chamada LamB, e o DNA do fago é injetado para a célula.

O DNA do  $\lambda$  é dupla-fita linear com aproximadamente 50 kb. Em cada um dos finais do DNA dupla-fita está um segmento de fita única de 12 nucleotídeos, chamado cos. Essas fitas simples finais são complementares, permitindo ao DNA do  $\lambda$  se circularizar.

Na resposta lítica, a RNA polimerase dependente de DNA da *Escherichia coli* começa a transcrever os promotores da esquerda e da direita do genoma do fago, chamados PL e PR. Na ausência do produto do gene N, a transcrição dos promotores PL e PR termina com um produto de poucas centenas de nucleotídeos. Termina na primeira região terminadora de cada lado. O pequeno transcrito da região PL contém o gene N, e seu produto permite que a transcrição continue além desses terminadores. Essa transcrição estendida possibilita a expressão dos genes *exo*, *bet*, e *Gam* na direção da

esquerda, assim como dois genes de replicação (O e P) e um gene de regulação positiva (Q) nos transcritos da direção da direita. Uma das seqüências do pequeno transcrito da direção da direita é *nutR*. Quando a RNA polimerase transcreve a sequencia *nutR*, o produto do gene N consegue se ligar a essa seqüência de RNA e a RNA polimerase. Com isso a RNA polimerase não reconhece tR1 ou qualquer outro terminador de transcrição. O produto do gene N de  $\lambda$  não atua sozinho, mas em conjunto com proteínas do hospedeiro chamadas proteínas Nus (N utilization substances) (ROBERTS, et al., 1998).

Um dos genes sob o controle do gene N é o Q, que é um regulador positivo da expressão de genes tardios. Os genes tardios de  $\lambda$  promovem a síntese das proteínas da cabeça (capsídeo) e da cauda, assim como as proteínas que promovem a lise celular. A proteína Q é um antiterminador que atua diferentemente da proteína N. Quando a RNA polimerase inicia a transcrição no PR, ela pausa após a transcrição de apenas 16 nuclotídeos. A proteína Q reconhece o sítio de utilização da proteína Q (*qut*) no DNA, liga-se à RNA polimerase, e faz com que sejam transcritos todos os genes tardios sem terminação (WALDOR et al., 2005).

Assim que o DNA de  $\lambda$  é circularizado e os produtos dos genes O e P são feitos, a replicação se inicia no sítio de origem específico (*ori*) dentro do gene O. A proteína do gene O (*pO*) se liga à seqüência *ori* do DNA. A proteína do gene P (*pP*) se liga à *pO*, ocasionando a ligação da enzima helicase DnaB de *E.coli* no DNA, desenrolando-o perto da *ori* (DODSON et al., 1986). A transcrição do gene O é requerida para a replicação, tanto para separar as fitas de DNA quanto para sintetizar um RNA de PR que serve como primer. Após desenrolar o DNA, o RNA primer é feito pela DnaG primase de *E.coli* para facilitar a replicação em ambas direções, criando a molécula em forma de theta ( $\theta$ ), que se separa em dois círculos no final de um ciclo de replicação (ROWEN e KORNBERG, 1978).

Um lado da fita é feito continuamente, enquanto o outro requer a síntese de vários primers de RNA para ser produzida. Após vários ciclos da replicação em forma de theta, começa a replicação unidirecional. Essa forma de replicação, chamada ciclo-rolante, gera uma molécula longa de DNA chamada de concatêmero. Usando esse concatêmero como um substrato, os capsídeos

vazios empacotam um DNA de uma região com até a próxima. A exonuclease RecBC do hospedeiro digere esse concatêmero (SKALKA, 1977).

### **3.2.5.2 Regulação da transcrição - ciclo lítico ou lisogênico?**

O programa temporal da transcrição dos RNAs do fago  $\lambda$  começa com a expressão de genes precoces de dois promotores, denominados PL e PR. Esses transcritos iniciais terminam com muitos terminadores, como o TR1. O terminador TR1 não é muito eficiente, aproximadamente 50% dos transcritos de PR passam por ele, mas eles param em TR2. O transcrito inicial de PL codifica uma proteína viral chamada de N, que atua modificando as propriedades da RNA polimerase, tornando-a incapaz de reconhecer quase todos os sítios de terminação (NUDLER e GOTTESMAN, 2002).

No estado lisogênico, uma proteína regulatória chamada CI, ou repressora de lambda, bloqueia a expressão dos promotores PL e PR. Assim CI bloqueia o mecanismo lítico e estabiliza o estado alternativo lisogênico. Durante a decisão lise-lisogenia, CI é expressa por um promotor denominado PRE (promotor for repressor establishment) (HERSKOWITZ e HAGEN, 1980; ECHOLS, 1986). A expressão de PRE depende completamente da presença de um ativador denominado CII. Quando o nível de CII está alto, a expressão de CI do promotor PRE leva a um estado de lisogenia (KOBLETER et al., 2002).

No estado lisogênico, CI é expresso de um promotor diferente, denominado PRM (promoter for repressor maintenance), que mantém um estado lisogênico. A expressão de PRM, que é um promotor fraco é estimulada cerca de 10 vezes pelo próprio CI. CI também regula negativamente sua própria expressão, mantendo um nível relativamente constante de CI durante o crescimento normal da célula (MEYER e PTASHNE, 1980).

Finalmente, durante um processo de indução do profago, os níveis de CI são controlados por um evento proteolítico específico que cliva CI em dois fragmentos, inativando sua atividade repressora (LITTLE, 1984, 1993). Quando os níveis de CI caem a níveis críticos, dois eventos ocorrem, provavelmente trabalhando juntos para prevenir a expressão de mais CI:

- A autoregulação positiva não ocorre mais;

- Uma proteína repressora, denominada Cro, começa a ser expressa do promotor PR. Cro atua reprimindo a expressão de mais CI. Em consequência, a expressão de CI é desligada e a mudança é irreversivelmente engatilhada, fazendo o fago entrar no ciclo lítico (PTASHNE, M. 2004).

A decisão lise-lisogenia é feita cerca de 10 a 15 minutos após a infecção de  $\lambda$  no hospedeiro. Acredita-se que o estado fisiológico da célula influencie no resultado dessa decisão. Como já falado, a decisão depende do nível da proteína ativadora CII. Se os níveis de CII são altos, então CII direciona a expressão de altos níveis do repressor CI, e a célula infectada segue o mecanismo lisogênico. Quando CII é ausente ou em baixos níveis, ocorre o ciclo lítico. Muitos diferentes fatores parecem controlar o nível de CII (ECHOLS, 1986).

Primeiro, CII é instável. Ele é degradado por proteases bacterianas denominadas HflB ou FtsH. É plausível que a atividade de FtsH seja modulada pelo estado fisiológico da célula. Sabe-se que o fato de se deixar as células crescendo em um meio pobre ou em baixas temperaturas favorece o estado lisogênico (SHOTLAND, et al., 2000).

Segundo, a atividade das proteases bacterianas pode também ser modulada por uma segunda proteína de  $\lambda$ , denominada CIII, que aparentemente atua como um inibidor competitivo de HflB. Então altos níveis de CIII estabiliza CII (SHOTLAND, et al., 2000).

Terceiro, CIII e CII são expressos pelos promotores PL e PR, respectivamente. Conseqüentemente, eles são expressos precocemente no curso da infecção. Células infectadas com vários fagos são mais prováveis de caírem em lisogenia e acredita-se que isso seja resultado de uma alta expressão de CII e CIII (SHOTLAND, et al., 2000).

Finalmente, outras proteínas celulares aparentemente influenciam no resultado da decisão lise-lisogenia. Mutantes nos genes hflK, hflC ou hflD também levam a altas freqüências de lisogenia (KIHARA et. al., 2001).

### 3.2.5.3 Manutenção do estado lisogênico

Para se manter o estado lisogênico, CI precisa estar continuamente presente. Numa célula lisogênica, CI é expresso por um promotor diferente, o PRM. Esse promotor está dentro de uma complexa região regulatória, denominada região OR. Duas proteínas regulatórias, CI e Cro, atuam nessa região de maneira oposta. Se a célula contém CI e não Cro, então ela está no estado lisogênico e continua a produzir CI e não Cro. Se, por outro lado, a célula possui Cro e não CI, ocorre o ciclo lítico e a célula continua a produzir Cro e não CI. No entanto, essa última regra pode ser anulada pela expressão de CI pelo promotor PRE (DODD et al., 2001)

A maioria dos eventos que estabilizam os estados regulatórios ocorre na região OR. A região OR contém três sítios de ligação denominados OR1, OR2 e OR3, onde tanto CI quanto Cro podem se ligar (KIHARA et al., 2001).

PRM e PR são ativados durante o estado lisogênico e lítico, respectivamente. Cada promotor expressa uma de duas proteínas regulatórias. A expressão de PRM leva à síntese de CI. Expressão de PR leva à síntese de Cro, assim como de produtos gênicos do estado lítico O, P e Q. CI permite a expressão de PRM, mas não de PR, e Cro permite a expressão de PR mas não de PRM (KIHARA et al., 2001).

Apesar de Cro se ligar à OR3, OR2 e OR1, ele se liga mais firmemente à OR3. Conseqüentemente, em moderados níveis de Cro, OR3 é ocupada, mas OR2 e OR1 estão livres. Quando Cro se liga à OR3, ele reprime completamente PRM, já que esse promotor sobrepõe OR3. No entanto, a ligação de Cro em OR3 não tem nenhum efeito em PR, que não sobrepõe à OR3. Assim que os níveis de Cro aumentam, Cro consegue se ligar à OR2 e/ou OR1, reprimindo PR, conseqüentemente os níveis de Cro é auto-limitado devido a uma auto-regulação negativa (DARLING, et al., 2000).

CI se liga mais fortemente à OR1 e mais fracamente à OR2 e OR3. Contudo, CI tem uma característica adicional (ligação cooperativa a sítios adjacentes), que leva à ocupação de OR2. A ocupação de um sítio aumenta a afinidade da proteína aos sítios adjacentes, em torno de 100 vezes, no caso de CI (KOBLAN e ACKERS, 1991). Assim que OR1 é fortemente ligada em seu

sítio, ela leva a uma ligação muito mais forte de OR2, assim esses dois sítios são ocupados (KOBLAN E ACKERS, 1991).

A ocupação de OR1 e OR2 tem duas diferentes conseqüências, ambas a favor do estado de lisogenia: primeira, isso leva à repressão de PR, que sobrepõe esses dois sítios, desligando Cro e os genes líticos; segunda, isso leva à ativação de PRM: CI ligada à OR2 contacta a subunidade  $\sigma 70$  da RNA polimerase, aumentando a força do promotor PRM em 10 vezes. Essa autorregulação positiva da expressão de CI aumenta a força do estado lisogênico. Se os níveis de CI aumentam muito, CI começa a se ligar à OR3, fechando parcialmente PRM (KIHARA et al., 2001).

CI permite a expressão de PRM, estimulando-o e reprimindo Cro pelo bloqueio de PR. A níveis moderados, Cro permite a expressão de PR porque ele não se liga a sítios que sobrepõem PR, e Cro reprime CI bloqueando PRM. CI e Cro também se ligam a uma segunda região, denominada região OL, que está a 2.4 kb a esquerda de OR. No estado lisogênico, a ligação de CI a OL é necessária para reprimir a expressão do promotor lítico PL, que codifica a proteína N (KIHARA et al., 2001).

#### **3.2.5.4 Indução do profago - sistema de regulação SOS**

Embora o estado lisogênico seja muito estável, ele pode se mudar para o estado lítico. Isso normalmente ocorre após tratamentos que danificam o DNA celular ou inibem a replicação do DNA. Esse tratamento engatilha uma resposta celular denominada resposta SOS, que é designada para conter os danos, reparando o DNA e restaurando a replicação. A mudança do ciclo lisogênico para o lítico acontece em pequenas taxas na ausência de dano no DNA (ROBERTS e DEVORET, 1983; LITTLE, et al., 1999).

O sistema de regulação SOS envolve duas proteínas: LexA, que reprime uma série de aproximadamente 40 genes (denominados genes SOS) durante o crescimento normal da célula; RecA, que é ativada quando ocorre algum dano no DNA.

RecA ativada promove a clivagem proteolítica de LexA. A clivagem inativa o repressor funcional LexA, levando à não repressão dos genes SOS.

Se a célula contém o profago  $\lambda$ , RecA ativada promove a clivagem do repressor CI em uma reação paralela (COURCELLE, J. et al., 2001).

### 3.2.6 Fagos de *Staphylococcus* sp.

A gama de doenças que uma espécie ou cepa de *Staphylococcus* sp. pode produzir é determinada pelo arsenal de fatores de virulência que ele carrega. Essa coleção de fatores de virulência das bactérias pode ser obtida por meio dos bacteriófagos (WALDOR et al., 2005).

Os fagos de *Staphylococcus* sp. são altamente lisogênicos. Félix d'Helle foi o primeiro a isolar um bacteriófago de *Staphylococcus* sp., que ele detectou no pus de um dedo infectado (WALDOR et al., 2005).

Alguns profagos alteram o fenótipo do hospedeiro bacteriano. Esses são chamados de fagos conversores, e o processo é conhecido como conversão lisogênica. Se o profago tem um gene de toxina, então as bactérias são lisogenicamente convertidas para produção dessa toxina. Toxinas codificadas por *Staphylococcus* sp. inclui staphylokinase (SAK), staphylococcica enterotoxina A (SEA), diversas enterotoxinas relatadas, toxina esfoliativa (ETA), e Panton-Valentine leucocidin (PVL). O ganho na produção da toxina representa uma conversão lisogênica positiva. Alternativamente, quando a lisogenação resulta na perda de um fenótipo particular, isso é referido como conversão lisogênica negativa (BIRMINGHAM e PATTEE, 1981).

Genes de resistência a antibiótico foram encontrados em genomas de profagos de *Staphylococcus* sp.. A transferência de genes de resistência a antibióticos mediados por fagos ocorre por transdução ou por transformação. Para *S. aureus*, a competência para a transformação é influenciada por fagos (WALDOR et al., 2005).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Caneca de fundo escuro e California Mastitis Test (CMT)**

Foram submetidos à caneca de fundo escuro, amostras de leite de 607 animais, 2408 tetos, provenientes de 24 propriedades rurais. Vacas submetidas à antibioticoterapia foram excluídas do presente estudo. Para a realização do teste da caneca de fundo escuro, os primeiros jatos de leite foram colocados na caneca. A presença de leite coagulado, sangue ou substância purulenta considerava a amostra positiva para mastite clínica. Amostras negativas ao teste da caneca foram submetidas ao California Mastitis Test – CMT (SCHALM e NOORLANDER, 1957).

Em seguida, foram colhidos, em tubos plásticos estéreis de 15 ml com tampa de rosca, aproximadamente 10 ml de leite dos tetos que apresentavam resultado positivo à mastite clínica ou à prova de CMT com escores de +, ++ ou +++. Após a colheita, os tubos foram acondicionados em caixas térmicas, contendo gelo e transportados para o Laboratório de Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), para posterior análise.

### **4.2. Isolamento e identificação das bactérias**

Foi feita estria simples de 101 amostras de leite, previamente coletadas nas propriedades rurais, em placa de Petri com ágar-sangue de ovino e em

ágar McConkey. As placas estriadas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Logo após, foi feita coloração de Gram a partir das colônias que cresceram nas placas. Para as bactérias cocos gram-positivas, foram realizados testes de catalase. As bactérias catalase positivo foram submetidas ao teste da coagulase e as bactérias catalase negativas foram submetidas ao teste CAMP. No caso de bactérias gram-negativas, foi feito o uso do kit Bactray I (Laborclin, cód. LB 880108).

### 4.3. Estirpe bacteriana

Foram utilizadas bactérias isoladas e caracterizadas a partir de amostras de leite diagnosticado com mastite clínica ou subclínica de propriedades da cidade de Viçosa-MG e região. Esses isolados fazem parte da coleção de patógenos causadores de mastite do Laboratório de Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As estirpes dessa coleção utilizadas foram: *S. aureus* 1, *S. aureus* 3, *S. aureus* 9, *S. aureus* 17, *S. aureus* 49, *S. aureus* 51, *S. aureus* 53, *S. aureus* 54, *S. aureus* 56, *S. aureus* 59, *Staphylococcus* coagulase negativo 8, *Staphylococcus* coagulase negativo 12, *Staphylococcus* coagulase negativo 14, *Staphylococcus* coagulase negativo 16, *Staphylococcus* coagulase negativo 27, *Staphylococcus* coagulase negativo 28, *Staphylococcus* coagulase negativo 30, *Staphylococcus* coagulase negativo 31, *Staphylococcus* coagulase negativo 39, *Staphylococcus* coagulase negativo 40, *Staphylococcus* coagulase negativo 41, *Staphylococcus* coagulase negativo 44, *Staphylococcus* coagulase negativo 45, *Staphylococcus* coagulase negativo 46, *Staphylococcus* coagulase negativo 47, *Staphylococcus* coagulase negativo 48, *Staphylococcus* coagulase negativo 64, *Staphylococcus* coagulase negativo 65, Bacilo gram positivo 34, Bacilo gram positivo 55, Bacilo gram positivo 60, Bacilo gram positivo 61, Bacilo gram positivo 62, Bacilo gram positivo 63, *Streptococcus* sp. 33 (CAMP negativo).

Também foram utilizadas estirpes bacterianas que fazem parte da coleção de patógenos causadoras da mastite, mantidos pela Dra. Maria Aparecida V. Paiva Brito, na Embrapa de Gado de Leite (CNPGL), em Juiz de Fora, MG. As estirpes utilizadas dessa coleção foram: *S. aureus* 3820, *S.*

*aureus* 3216, *S. aureus* 3654, *S. aureus* 3810, *S. aureus* 3010, *S. aureus* 2878, *S. aureus* 3627, *S. aureus* 3017, *S. aureus* 3166, *S. aureus* 3930.

#### **4.4. Antibiograma**

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizado com 20 isolados de *S. aureus*, 18 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativo, 6 isolados de bacilos gram positivos e 1 isolado de *Streptococcus* sp. (CAMP negativo). As estirpes utilizadas estão descritas no item 4.3. O teste foi realizado usando a técnica de difusão em placas (NCCLS, 2003). Os antibióticos usados foram ampicilina (AMP 10), gentamicina (GEN 10), cefalotina (CFL 30), ciprofloxacina (CIP 05), sulfazotrim (SUT 25), amoxicilina / ácido clavulânico (AMC 30), ceftriaxona (CRO 30), tetraciclina (TET 30), penicilina G (PEN 10), oxacilina (OXA 01), eritromicina (ERI 15), vancomicina (VAN 30), clindamicina (CLI 02), rifampicina (RIF 05) e cloranfenicol (CLO 30). A interpretação dos resultados foi feita de acordo com os padrões do NCCLS (2003).

#### **4.5. Isolamento de bacteriófagos**

Amostras de fagos foram isoladas a partir da Estação de Tratamento de Esgoto (SAAE) da cidade de Viçosa/MG. O isolamento foi realizado adicionando 58 g de NaCl para cada litro da amostra, seguido por centrifugação a 12.000xg por 15 minutos. O sobrenadante foi decantado em recipiente separado e misturado com polietilenoglicol (PEG 8.000), sendo a concentração final de PEG igual a 10% (m/v). Este sobrenadante contendo PEG foi decantado durante a noite a 4°C. Em seguida, foi centrifugado a 11.000xg por 20 min. O precipitado resultante foi suspenso em 8-10ml de tampão de diluição de fago (SAMBROOK e RUSSELL, 2001) e extraído uma vez, com igual volume de clorofórmio. O clorofórmio e os restos celulares bacterianos foram removidos por decantação a 4°C por 12 horas com posterior

centrifugação (4000xg , 10 min, 4°C). O concentrado de vírus resultante foi mantido a 4°C, por até 12 meses, com recuperação bem sucedida de fagos neste período. Este concentrado serviu como fonte de bacteriófagos para o plaqueamento.

#### **4.6. Preparo da solução de bactéria estoque**

Uma colônia bacteriana isolada da estirpe de *S. aureus* 3930 foi repicada em meio BHI (50 ml em um Erlenmeyer de 250-ml). Essa cultura foi cultivada durante 18 horas a 37°C com agitação de 100 rpm. Foi realizado também o cultivo a 30°C em vez de 37°C para redução da quantidade de restos celulares no meio.

Logo após, as células foram centrifugadas a 4000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de célula foi suspenso em 20 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Uma alíquota da solução contendo as células suspensas foi diluída (1/100) e mensurada em espectrofotômetro (DO<sub>600</sub>). A solução com as células foi então diluída a uma concentração final de 2 DO<sub>600</sub> com MgSO<sub>4</sub>10 mM. A suspensão de bactérias para plaqueamento foi armazenada a 4°C.

#### **4.7. Plaqueamento dos bacteriófagos**

Uma alíquota de 100 µl do concentrado de vírus foi misturada com 100 µl da solução de bactéria estoque. A suspensão resultante foi incubada por 5-30 min a 37°C e recebeu, em seguida, 3 ml de meio apropriado semi-sólido (0,6-0,8% ágar) fundido a 50°C. Após agitação manual, a mistura resultante foi despejada em placa de petri contendo o meio apropriado. Foi esperada a solidificação do meio semi-sólido, à temperatura ambiente, e logo após as placas foram incubadas durante a noite em estufa a 37°C. No dia seguinte, a presença de placas de lise foi observada para cada amostra. Após esta preparação, placas de lise individuais foram colhidas com palitos autoclavados

para servirem como fonte para propagação de fagos em cultura líquida. A repetição deste protocolo, ao menos três vezes para cada isolado, garantiu o isolamento de um único fago, por amostra bacteriana, para análises posteriores.

#### **4.8. Propagação de bacteriófagos**

Para a propagação foi realizado o plaqueamento do fago e a incubação da placa sem inversão durante 12-16 horas a 37°C. As placas não foram invertidas para que ocorresse a concensação de líquido sobre a superfície da placa de petri, com posterior precipitação do mesmo sobre o meio, permitindo que o bacteriófago se espalhasse com maior facilidade.

Removeram-se as placas da incubadora e adicionou-se meio SM (7 ml para cada placa). As placas foram deixadas durante 12-16 horas a 15°C em agitador a 60 rpm. Logo após, com uma micropipeta, transferiu-se o SM para um tubo estéril. Adicionou-se mais 1 ml de SM fresco a cada placa, espalhando-o suavemente, e armazenaram-se as placas durante 15 minutos em posição inclinada permitindo que todo o fluido escoasse em uma área. Novamente o SM foi removido e transferido para o tubo que havia sido colocado o SM primeiramente.

Nesse meio SM foram acrescentados 125 µl de clorofórmio a cada um dos tubos, agitaram-se os tubos brevemente, e então removeram-se os restos bacterianos através de centrifugação a 4000xg durante 10 minutos a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante contendo os fagos foi armazenado a 4°C.

#### **4.9. Titulação de bacteriófagos**

A amostra de fagos foi diluída até o título aproximado, determinado empiricamente e incubada 15 minutos com a solução de bactéria estoque. Foi então misturada com meio semi-sólido fundido a 50°C e despejada em placa de petri com meio de cultura apropriado. Após solidificação do meio semi-

sólido, a placa foi incubada em estufa a 37°C. No dia seguinte, o número de placas de lise foi enumerado e o título de bacteriófagos, expresso em unidades formadoras de placas (UFPs), de acordo com a fórmula abaixo:

$$\frac{\text{Número de placas de lise} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume da diluição (mL)}} = \text{UFP/mL}$$

#### **4.10. Teste do potencial lítico dos fagos**

O teste foi realizado colocando-se em um erlenmeyer 1 ml da solução estoque de *Staphylococcus aureus* diluída 10<sup>5</sup> vezes, 1 ml da solução de fago (PFU/ml≈10<sup>8</sup>) e 50 ml de meio Brain Heart Infusion (BHI). Esses fagos foram previamente isolados no Laboratório de Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em outro erlenmeyer além da cultura bacteriana e da solução de fago foram colocados mitomicina (indutor do ciclo lítico) na concentração de 0.5 µg/ml. Realizaram-se dois controles: o primeiro com a cultura estoque de bactéria; o outro com a cultura de bactéria mais mitomicina. Ambos os controles sem a adição de fago. As amostras foram colocadas no agitador a 37°C a 200 rpm.

Todas as amostras foram diluídas 10 vezes em água destilada e em seguida, foram feitas leituras das mesmas em espectrofotômetro a 600 nm nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20 e 24 horas.

#### **4.11. Avaliação da especificidade de hospedeiro**

Realizaram-se plaqueamentos de cada fago com diversas estirpes de *Staphylococcus aureus*. Para isso, misturaram-se 150 µl de uma solução estoque da cepa bacteriana com 150 µl da solução do fago-teste (PFU/ml≈10<sup>8</sup>) e incubaram-as a 37°C por 30 minutos com agitações

intermitentes. A solução resultante recebeu 3 ml de BHI com 0.7% de ágar fundido a 45°C. Após agitação manual, a mistura resultante foi despejada em placa de cultura contendo o meio apropriado. Seguiu-se a solidificação do meio semi-sólido à temperatura ambiente, e as placas foram incubadas durante a noite em estufa, a 37°C. O teste foi realizado com 20 cepas bacterianas diferentes para cada fago. Para cada cepa bacteriana foi realizado um plaqueamento sem a presença de fago, como controle negativo. No dia seguinte, a presença de falhas no tapete de bactérias foi observada para cada amostra. As placas que não sofreram nenhuma alteração foram sinalizadas com um sinal negativo (-). Placas contendo falhas no tapete foram classificadas com escores de sinal positivo que foram de +, ++, +++, +++++, indo de placas com menos falhas a placas com mais falhas, respectivamente (figura 2).

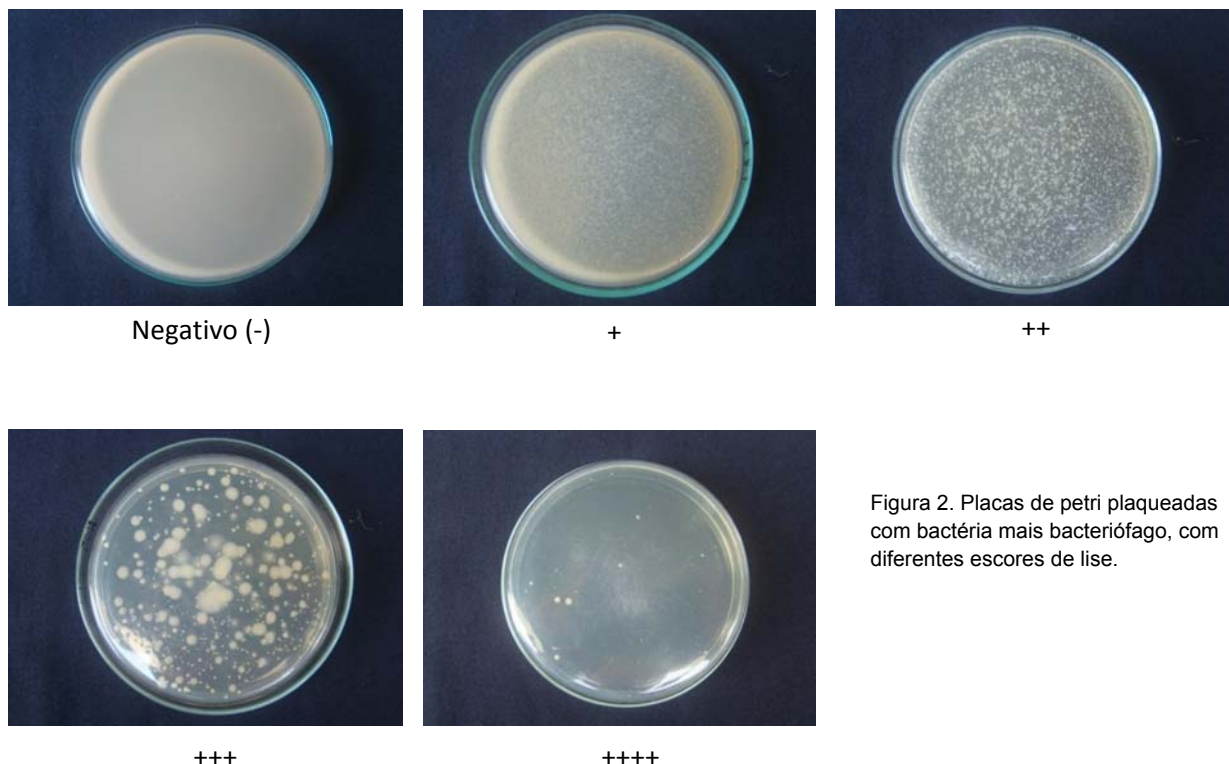


Figura 2. Placas de petri plaqueadas com bactéria mais bacteriófago, com diferentes escores de lise.

#### **4.12. Teste de termoestabilidade**

Para tanto, foram colocados 150 µl da suspensão de fago a ser testada em tubo plástico e incubado à temperatura controlada em banho-maria por 5 minutos. As temperaturas testadas foram de 70°C, 80°C, 90°C e 100°C. Logo em seguida foi feita a titulação da amostra, determinando as unidades formadoras de placas por ml (PFU/ml). Paralelamente, o PFU/ml da suspensão de fago sem qualquer tratamento de temperatura foi realizado para servir de controle.

#### **4.13. Extração do genoma viral e digestão com DNase e RNase**

A extração deu-se pela adição de Proteinase K à suspensão viral a uma concentração final de 50 µM e SDS numa concentração final de 0,5%. O homogeneizado foi incubado em banho-maria por 1 hora a 56°C. Na sequência, o mesmo volume de fenol foi adicionado à suspensão viral. Esta, em seguida, foi centrifugada a 3000xg por 5 minutos para separação da fase orgânica. O sobrenadante foi então separado e colocado em novo tubo, ao qual foi adicionado volume igual aos anteriores de fenol:clorofórmio (1:1), seguido de nova centrifugação, como descrito acima. A fase aquosa foi novamente separada e recebeu igual volume de clorofórmio, havendo novamente a centrifugação. À fase aquosa, previamente separada, foi adicionado o dobro do volume de etanol e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, seguiu-se nova centrifugação a 12.000xg por 20 minutos. O precipitado foi, então, suspenso em TE ou água deionizada.

Após extração do genoma, foram realizados ensaios com DNase e RNase para a averiguação do tipo de material genético que é composto os bacteriófagos. Essas enzimas foram utilizadas de acordo com as recomendações feitas pelo fabricante Sigma.

Os ácidos nucleicos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose de acordo com metodologia descrita em Sambrook e Russell (2001).

#### **4.14. Eletroforese em campo pulsado**

Um gel de agarose a 1% foi preparado utilizando TBE 0,5X. As amostras de genoma dos fagos Ufv aur2, Ufv aur3, Ufv aur4, Ufv aur5, Ufv aur6, Ufv aur7, Ufv aur8, Ufv aur9, Ufv aur10, Ufv aur11, foram adicionadas nesse gel e corridas em TBE 0,5x a 14°C por 35 horas a 150 V. O tempo de pulsação foi de 5-120 segundos. O gel foi analisado após coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml e visualizado com luz ultra-violeta.

#### **4.15. Perfil protéico dos bacteriófagos**

Foram aliqüotados 13 mL de suspensão viral previamente centrifugada visando a retirada de restos celulares. Esses 13 mL foram filtrados em filtro 0,22 micrometros. Após esta etapa foram adicionados 8% de PEG 6000 no filtrado resultante e mantidos a 4°C, por 24 horas. Decorrido esse tempo, a suspensão fágica contendo PEG foi centrifugada a 11000xg por 20 min. O precipitado foi suspenso em 1 mL de tampão SM e igual volume de clorofórmio. A amostra foi centrifugada a 4000xg por 10 minutos a 4°C para remoção do clorofórmio. Foi adicionado à fase superior (aquosa) ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v) e centrifugado a 14.000xg. O precipitado foi suspenso em tampão de corrida e separado em SDS-PAGE (eletroforese desnaturante).

#### **4.16. Eletroforese SDS-PAGE**

Foram preparados os géis de separação e o de empilhamento. Para o gel de separação foram utilizados 2,4 ml de água destilada, 4 ml de acrilamida, 1 ml de glicerol, 2,5 ml de Tris (1,5 M, pH = 8,8), 100 µl de SDS 10%, 50 µl de persulfato de amônia 10% e 5 µl de TEMED. Para o gel de empilhamento foram utilizados 1,8 ml de água destilada, 0,4 ml de acrilamida, 0,75 ml de Tris (0,5 M, pH = 6,8), 100 µl de SDS 10%, 15 µl de persulfato de amônia 10% e 5 µl de TEMED.

O tampão de corrida foi realizado utilizando 3 g de Tris, 14,4 g de glicina e 1 g de SDS para 1000 ml de água destilada. As amostras foram colocadas no gel e separadas a 200 volts por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. O marcador utilizado foi o Sigma SDS 6H2-1VL. Logo após o gel foi revelado passando pelas seguintes etapas:

- 1° - 20 minutos no etanol 50%
- 2° - Lavagem com tiosulfato de sódio por 1 minuto
- 3° - Lavagem três vezes com água destilada por 30 segundos
- 4° - Incubação com  $\text{AgNO}_3$  por no mínimo 20 minutos
- 5° - Lavagem três vezes com água destilada por 30 segundos
- 6° - Adição do revelador, que é uma solução com 2 ml de tiosulfato de sódio, 50 ml de carbonato de sódio e 100  $\mu\text{l}$  de formol.

#### **4.17. Microscopia eletrônica**

Uma alíquota de 5-10  $\mu\text{l}$  de uma suspensão viral diluída 10 vezes de cada bacteriófago, após purificação em sacarose, foi aplicada sobre uma tela de microscopia eletrônica de 200 mesh, de níquel ou cobre, previamente revestida com Formvar. A amostra foi seca, após 5 min de incubação à temperatura ambiente, utilizando papel de filtro umedecido. Cada tela foi então flutuada separadamente sobre uma gota de acetato de uranila 2% por 20 segundos. O excesso de contrastante foi também seco utilizando papel de filtro umedecido, foi realizada incubação mínima de 40 minutos à temperatura ambiente antes da deposição da tela na caixa de armazenamento. As telas foram posteriormente submetidas à visualização por microscopia eletrônica de transmissão, no laboratório de microscopia eletrônica da UFMG. O microscópio eletrônico de transmissão utilizado foi o Zeiss EM 109 TEM, operando a 80Kv.

De acordo com a morfologia, os fagos foram classificados em suas respectivas famílias, baseando-se nas diretrizes do Comitê Internacional na Taxonomia de Vírus (MURPHY et al., 1995).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caneca de fundo escuro, CMT, isolamento e identificação das bactérias causadoras de mastite

Observou-se que a prevalência da mastite nas diferentes propriedades foi de 19,19%, sendo que 17% apresentavam-se na forma clínica e 83% na forma subclínica.

Como pode ser observado na tabela 1, os microrganismos isolados das amostras de leite provenientes de vacas com mastite clínica e subclínica foram *Staphylococcus aureus* (46,53%), *Staphylococcus* sp. (coagulase negativo) (30,69%), *Streptococcus* sp. (CAMP negativo) (10,89%), bacilos gram-positivos (6,93%), leveduras (1,98%), *Escherichia coli* (1,98%), *Streptococcus agalactiae* (0,99%).

### 5.2. Antibiograma

Nesse estudo, as bactérias isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade a antibióticos. As porcentagens das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas que são sensíveis, intermediárias e resistentes aos antibióticos estão apresentadas na figura 3.

Na figura 4 podemos observar a susceptibilidade de cada cepa de *S. aureus* aos diferentes antibióticos testados; na figura 5, observamos a susceptibilidade a antibióticos de cepas de *Staphylococcus* sp. coagulase negativo, bacilos gram positivos e uma cepa de *Streptococcus* sp. (CAMP negativo).

Tabela 1. Frequência dos principais grupos e gêneros de microrganismos isolados de amostras de leite de animais em lactação com mastite clínica ou subclínica provenientes de 18 propriedades da zona da mata mineira.

Microrganismo	Número	Frequência (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	47	46.53
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	31	30.69
<i>Streptococcus</i> sp. (CAMP negativo)	11	10.89
Bacilos gram-positivos	7	6.93
Leveduras	2	1.98
<i>Escherichia coli</i>	2	1.98
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0.99
<b>Total</b>	<b>101</b>	<b>100%</b>

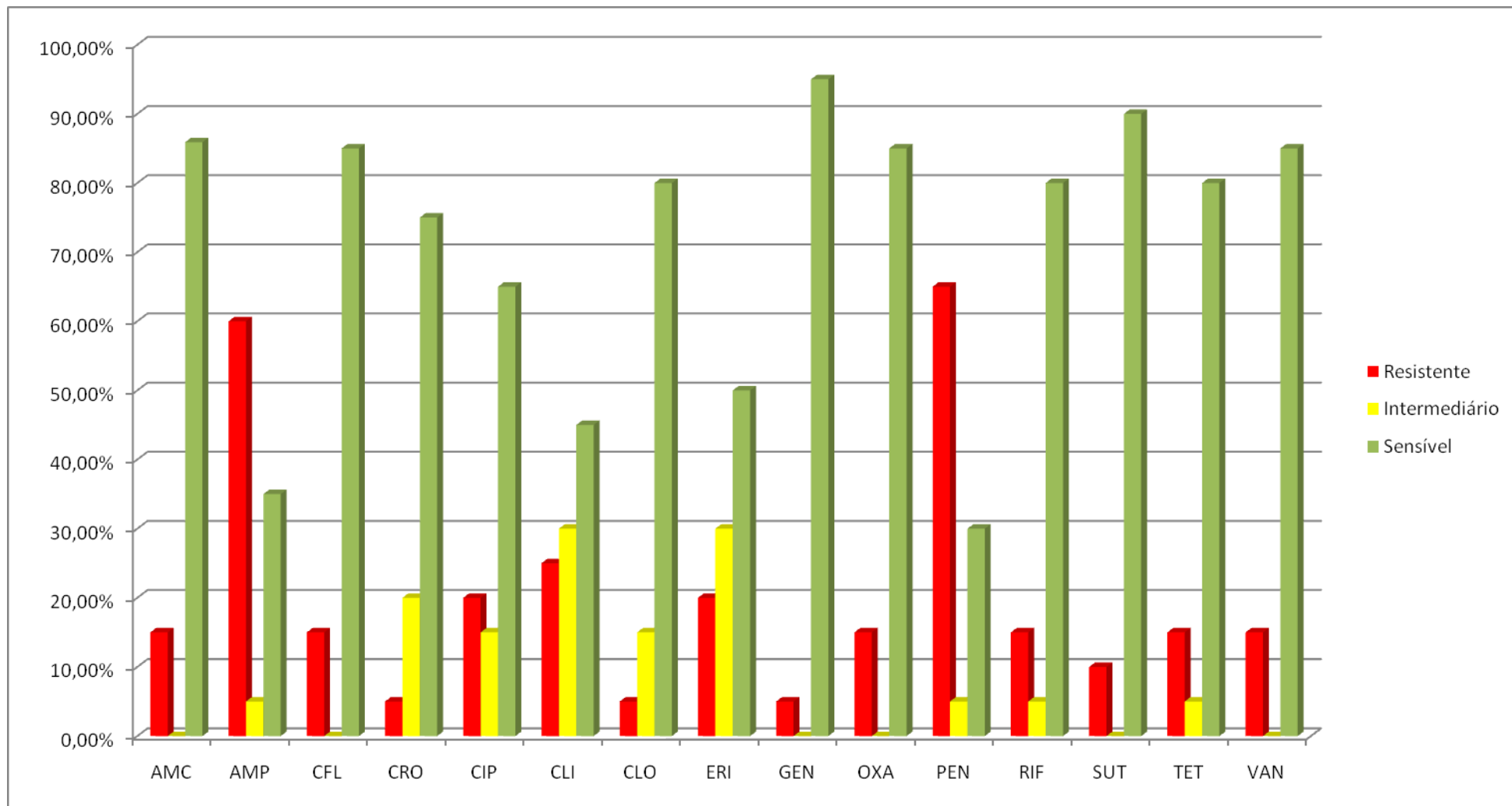


Figura 3. Susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras leite com mastite clínica ou subclínica. AMP, ampicilina; GEN, gentamicina; CFL, cefalotina; CIP, ciprofloxacina; SUT, sulfazotrim; AMC, amoxicilina / ácido clavulânico; CRO, ceftriaxona; TET, tetraciclina; PEN, penicilina; OXA, oxacilina; ERI, eritromicina; VAN, vancomicina; CLI, clindamicina; RIF, rifampicina; CLO, cloranfenicol.

	RIF	AMC	CRO	CFL	CIP	SUT	AMP	TET	ERI	GEN	PEN	CLO	OXA	CLI	VAN
<i>S. aureus</i> 3820	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>S. aureus</i> 3216	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde
<i>S. aureus</i> 3654	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Amarelo	Verde
<i>S. aureus</i> 3810	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>S. aureus</i> 3019	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Amarelo	Verde
<i>S. aureus</i> 2878	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>S. aureus</i> 3627	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde
<i>S. aureus</i> 3017	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>S. aureus</i> 3166	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>S. aureus</i> 3930	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Amarelo	Verde
<i>S. aureus</i> 1	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Vermelho	Verde
<i>S. aureus</i> 3	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Vermelho	Verde
<i>S. aureus</i> 9	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Vermelho	Amarelo	Amarelo	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde
<i>S. aureus</i> 17	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>S. aureus</i> 49	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho
<i>S. aureus</i> 51	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho
<i>S. aureus</i> 53	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho
<i>S. aureus</i> 54	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Amarelo	Verde	Verde	Verde
<i>S. aureus</i> 56	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
<i>S. aureus</i> 59	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Amarelo	Verde

Figura 4. Suscetibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus* causadores de mastite a antibióticos. Vermelho – resistente, amarelo – intermediário, verde – sensível. AMP, ampicilina; GEN, gentamicina; CFL, cefalotina; CIP, ciprofloxacina; SUT, sulfazotrim; AMC, amoxicilina / ácido clavulânico; CRO, ceftriaxona; TET, tetraciclina; PEN, penicilina; OXA, oxacilina; ERI, eritromicina; VAN, vancomicina; CLI, clindamicina; RIF, rifampicina; CLO, cloranfenicol.

	RIF	AMC	CRO	CFL	CIP	SUT	AMP	TET	ERI	GEN	PEN	CLO	OXA	CLI	VAN
Staphylococcus coagulase negativo 8	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 12	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Staphylococcus coagulase negativo 14	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 16	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 27	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Amarelo	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 28	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Staphylococcus coagulase negativo 30	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 31	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 39	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 40	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 41	Vermelho	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Verde	Vermelho
Staphylococcus coagulase negativo 44	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Staphylococcus coagulase negativo 45	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 46	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 47	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Staphylococcus coagulase negativo 48	Amarelo	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Amarelo	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 64	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Staphylococcus coagulase negativo 65	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde
Bacilo gram positivo 34	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho
Bacilo gram positivo 55	Vermelho	Verde	Amarelo	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Bacilo gram positivo 60	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Amarelo	Verde
Bacilo gram positivo 61	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Amarelo	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Amarelo	Verde
Bacilo gram positivo 62	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Vermelho	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Amarelo	Verde
Bacilo gram positivo 63	Amarelo	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Verde	Amarelo	Vermelho	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Amarelo	Verde
Streptococcus sp. 33(CAMP negativo)	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarelo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde

Figura 5. Susceptibilidade de bactérias causadoras de mastite a antibióticos. Vermelho – resistente, amarelo – intermediário, verde – sensível. AMP, ampicilina; GEN, gentamicina; CFL, cefalotina; CIP, ciprofloxacina; SUT, sulfazotrim; AMC, amoxicilina / ácido clavulânico; CRO, ceftriaxona; TET, tetraciclina; PEN, penicilina; OXA, oxacilina; ERI, eritromicina; VAN, vancomicina; CLI, clindamicina; RIF, rifampicina; CLO, cloranfenicol.

### 5.3. Isolamento e propagação

Foram isolados 11 bacteriófagos diferentes a partir de placas de lise como representado na figura 6, que foram nomeados de Ufv aur1 a Ufv aur11.

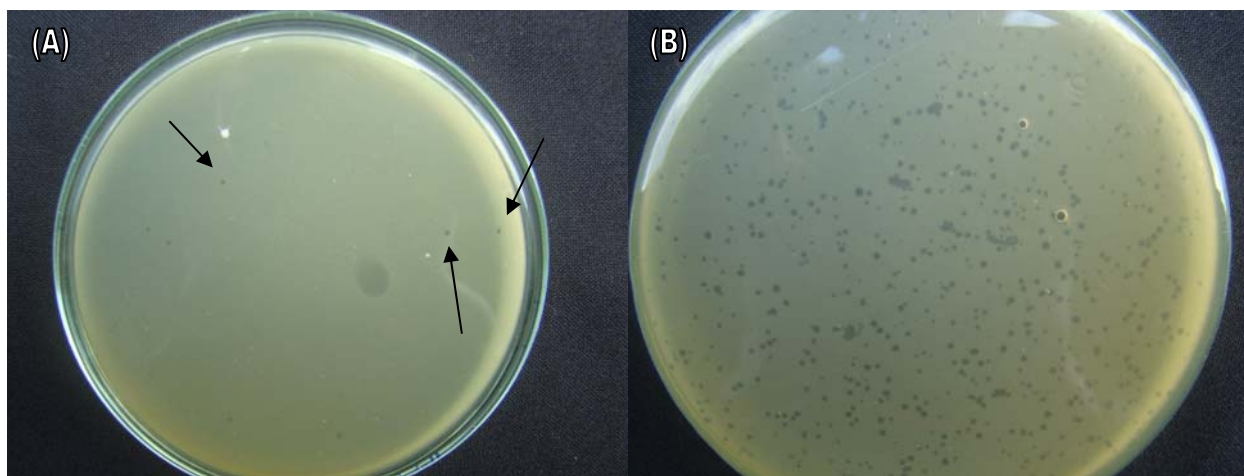


Figura 6. A) As setas demonstram placas de lise formadas por bacteriófagos isolados da Estação de Tratamento de Esgoto (SAAE) da cidade de Viçosa/MG. B) Placa com grande número de placas de lise.

### 5.4. Teste para o potencial lítico dos fagos

Conforme mostrado na figura 7, todos os fagos isolados foram responsáveis por uma queda na densidade óptica (DO) da amostra. Porém em todas as amostras ocorreu aumento da DO com o passar das horas, principalmente após a 12<sup>o</sup> hora.

Todas as amostras que continham cultura bacteriana, bacteriófagos mais mitomicina C tiveram os valores da DO menores que as amostras que dispunham apenas de cultura bacteriana mais o fago. Amostras contendo apenas a cultura bacteriana com a mitomicina C tiveram valores de DO próximos das amostras que continham apenas a cultura bacteriana.

A tabela 2 mostra as DO de todas as amostras nos tempos de 12 e 24 horas, respectivamente.

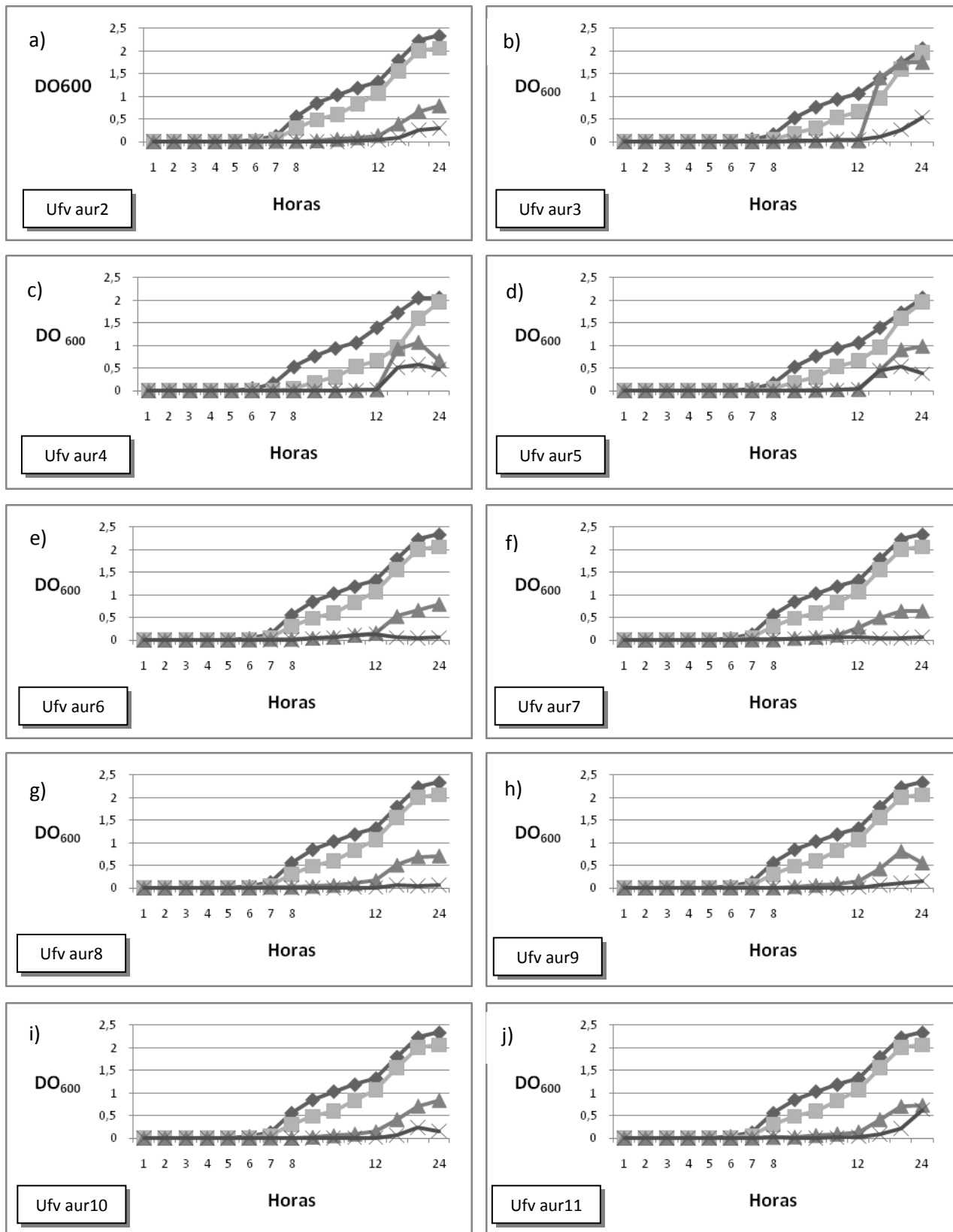


Figura 7. Teste do potencial lítico dos bacteriófagos. DO<sub>600</sub> (Densidade óptica lida em um comprimento de luz de 600nm)

Tabela 2. Densidade óptica das amostras determinadas nos tempos de 12 e 24 horas.

	<b>DO<sub>600</sub> após 12 horas</b>	<b>DO<sub>600</sub> após 24 horas</b>
<b>Bactéria</b>	1,325	2,34
<b>Bactéria + mitomicina</b>	1,071	2,062
<b>Bactéria + Ufv aur2</b>	0,138	0,79
<b>Bactéria + Ufv aur2 + mitomicina</b>	0,042	0,3
<b>Bactéria + Ufv aur3</b>	0,021	1,756
<b>Bactéria + Ufv aur3 + mitomicina</b>	0,04	0,545
<b>Bactéria + Ufv aur4</b>	0,02	0,666
<b>Bactéria + Ufv aur4 + mitomicina</b>	0,035	0,468
<b>Bactéria + Ufv aur5</b>	0,035	0,985
<b>Bactéria + Ufv aur5 + mitomicina</b>	0,036	0,38
<b>Bactéria + Ufv aur6</b>	0,163	0,8
<b>Bactéria + Ufv aur6 + mitomicina</b>	0,128	0,06
<b>Bactéria + Ufv aur7</b>	0,289	0,644
<b>Bactéria + Ufv aur7 + mitomicina</b>	0,075	0,073
<b>Bactéria + Ufv aur8</b>	0,169	0,715
<b>Bactéria + Ufv aur8 + mitomicina</b>	0,012	0,073
<b>Bactéria + Ufv aur9</b>	0,158	0,554
<b>Bactéria + Ufv aur9 + mitomicina</b>	0,011	0,16
<b>Bactéria + Ufv aur10</b>	0,147	0,833
<b>Bactéria + Ufv aur10 + mitomicina</b>	0,011	0,16
<b>Bactéria + Ufv aur11</b>	0,14	0,725
<b>Bactéria + Ufv aur11 + mitomicina</b>	0,035	0,632

### **5.5. Avaliação da especificidade dos fagos em relação a diferentes estirpes bacterianas**

Os resultados obtidos a partir desse ensaio estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Avaliação da especificidade dos fagos em relação a diferentes estirpes bacterianas. (+): pouca lise; (++): lise moderada; (+++): lise pronunciada; (++++): lise muito pronunciada

	Ufv aur2	Ufv aur3	Ufv aur4	Ufv aur5	Ufv aur6	Ufv aur7	Ufv aur8	Ufv aur9	Ufv aur10	Ufv aur11
<i>S. aureus</i> 3820	++++	++++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++++	++++
<i>S. aureus</i> 3216	+++	+++	+++	+++	++	+	++	+++	++++	++++
<i>S. aureus</i> 3654	++++	+++	++++	++++	++++	+	++++	+++	++++	++++
<i>S. aureus</i> 3810	++	+++	+	++	+	+	+++	+	++	+
<i>S. aureus</i> 3019	+++	+++	++	+++	++	+	++++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> 2878	++++	++++	++++	++++	++	+	++++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> 3627	++	+++	++	++	+++	+	++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> 3017	++	+++	+	+	+	++	++	++	+++	++
<i>S. aureus</i> 3166	++++	+++	++	++++	+++	+	+++	+++	+++	++++
<i>S. aureus</i> 3930	++++	++++	+++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
<i>S. aureus</i> 1	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	+	++++	++++
<i>S. aureus</i> 3	+++	-	++	+	++++	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i> 9	++	++	+	+	+++	+	+	++	-	+
<i>S. aureus</i> 17	+	-	++	++	++++	-	++	+	+	+
<i>S. aureus</i> 49	++	+	+	+	+++	+	++	++	+	++
<i>S. aureus</i> 51	++	+	-	+	++	++	+	+++	+	+
<i>S. aureus</i> 53	+	-	+	+	++	-	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> 54	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++
<i>S. aureus</i> 56	+	-	+	+	+	-	+	++	+	++
<i>S. aureus</i> 59	++	-	+	+	+	-	+++	+	+	+++

## 5.6. Teste de termoestabilidade

Podemos observar na figura 8 o título viral de cada fago, sem qualquer tratamento e com aquecimentos que variaram de 70° a 100°C por cinco minutos. A tabela 4 nos mostra o quanto cada título viral foi reduzido a partir de cada tratamento.

Tabela 4. Redução do título dos bacteriófagos após tratamento térmico de 70°C a 100°C por 5 minutos. Azul – título menos reduzido; vermelho – título mais reduzido.

	70° C - 5 min.	80°C - 5 min.	90°C - 5 min.	100°C - 5 min.
Ufv aur2	7,55 x 10 <sup>3</sup>	5,1 x 10 <sup>3</sup>	3,11 x 10 <sup>4</sup>	1,84 x 10 <sup>6</sup>
Ufv aur3	7,43 x 10 <sup>1</sup>	7,65 x 10 <sup>2</sup>	5,05 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>7</sup>
Ufv aur4	1,64 x 10 <sup>2</sup>	4,05 x 10 <sup>2</sup>	1,4 x 10 <sup>3</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>
Ufv aur5	1,52 x 10 <sup>2</sup>	2,7 x 10 <sup>2</sup>	1,18 x 10 <sup>4</sup>	1,08 x 10 <sup>5</sup>
Ufv aur6	1,86 x 10 <sup>1</sup>	8,17 x 10 <sup>3</sup>	1,83 x 10 <sup>4</sup>	2,65 x 10 <sup>4</sup>
Ufv aur7	9,87 x 10 <sup>1</sup>	1,1 x 10 <sup>2</sup>	4,1 x 10 <sup>2</sup>	3,45 x 10 <sup>5</sup>
Ufv aur8	8,2 x 10 <sup>1</sup>	9,01 x 10 <sup>2</sup>	9,14 x 10 <sup>2</sup>	1,16 x 10 <sup>6</sup>
Ufv aur9	4,16 x 10 <sup>1</sup>	4,71 x 10 <sup>1</sup>	9,38 x 10 <sup>1</sup>	5,4 x 10 <sup>2</sup>
Ufv aur10	7,44 x 10 <sup>1</sup>	9,56 x 10 <sup>1</sup>	1,26 x 10 <sup>2</sup>	6,5 x 10 <sup>4</sup>
Ufv aur11	2,03 x 10 <sup>2</sup>	2,08 x 10 <sup>3</sup>	1,88 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>

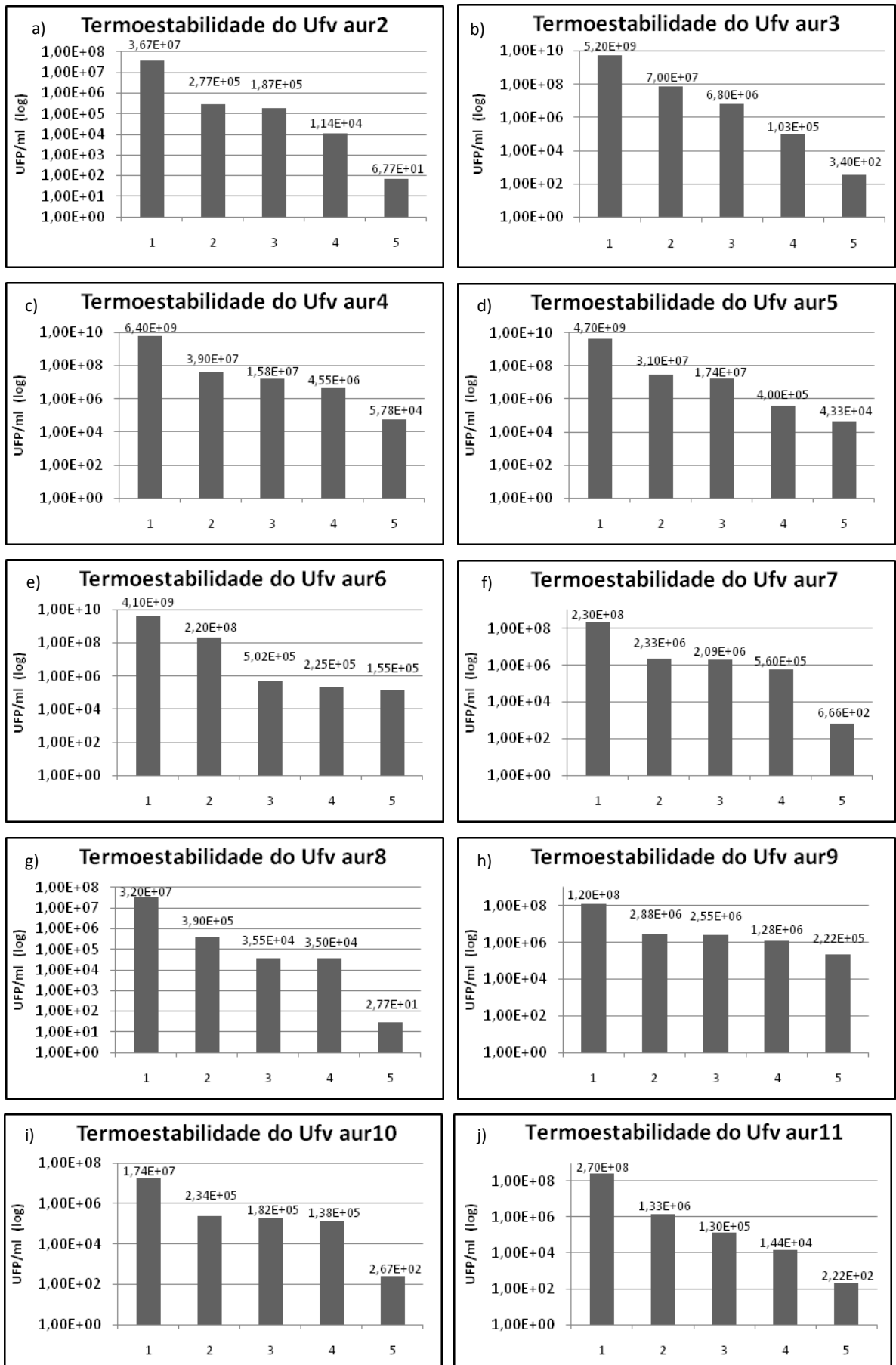


Figura 8. Termoestabilidade dos fagos isolados. (1) sem tratamento térmico, (2) 70°C, 5'; (3) 80°C, 5'; (4) 90°C, 5'; (5) 100°C, 5'.

## 5.7. Extração de genoma viral, ensaio com DNase e RNase

O genoma de todos os bacteriófagos isolados foi extraído com sucesso (figura 9). Todos os fagos isolados tiveram seus genomas digeridos pela Dnase e não pela Rnase (figura 10).

De acordo com o gel de pulse field podemos perceber também que o genoma dos fagos possuem um tamanho aproximado de 175kb (figura 11).

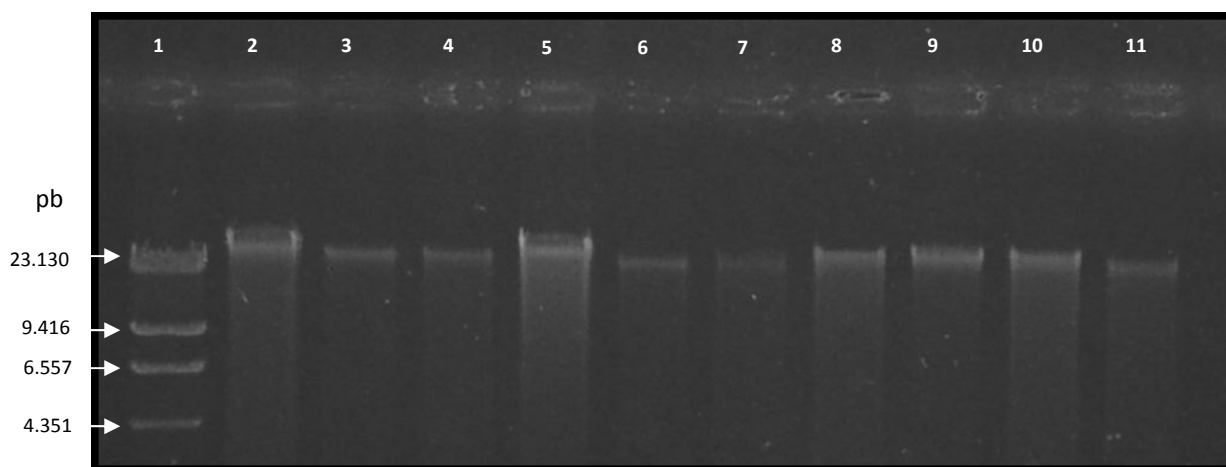


Figura 9. Gel de agarose 0,7%. 1- Marcador  $\lambda$  DNA HindIII; 2- Genoma Ufv aur2; 3- Genoma Ufv aur3; 4- Genoma Ufv aur4; 5- Genoma Ufv aur5; 6- Genoma Ufv aur6; 7- Genoma Ufv aur7; 8- Genoma Ufv aur8; 9- Genoma Ufv aur9; 10- Genoma Ufv aur10; 11- Genoma Ufv aur11.

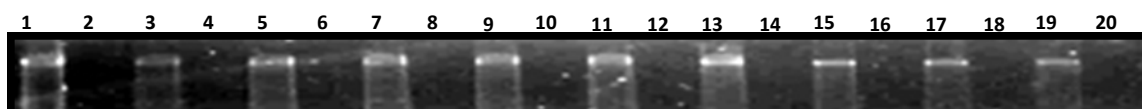


Figura 10. Gel de agarose 0,7%. 1- Genoma Ufv aur2 + RNase; 2- Genoma Ufv aur2 + DNase; 3- Genoma Ufv aur3 + RNase; 4- Genoma Ufv aur3 + DNase; 5- Genoma Ufv aur4 + RNase; 6- Genoma Ufv aur4 + DNase; 7- Genoma Ufv aur5 + RNase; 8- Genoma Ufv aur5 + DNase; 9- Genoma Ufv aur6 + RNase; 10- Genoma Ufv aur6 + DNase; 11- Genoma Ufv aur7 + RNase; 12- Genoma Ufv aur7 + DNase; 13- Genoma Ufv aur8 + RNase; 14- Genoma Ufv aur8 + DNase; 15- Genoma Ufv aur9 + RNase; 16- Genoma Ufv aur9 + DNase; 17- Genoma Ufv aur10 + RNase; 18- Genoma Ufv aur10 + DNase; 19- Genoma Ufv aur11 + RNase; 20- Genoma Ufv aur11 + DNase.

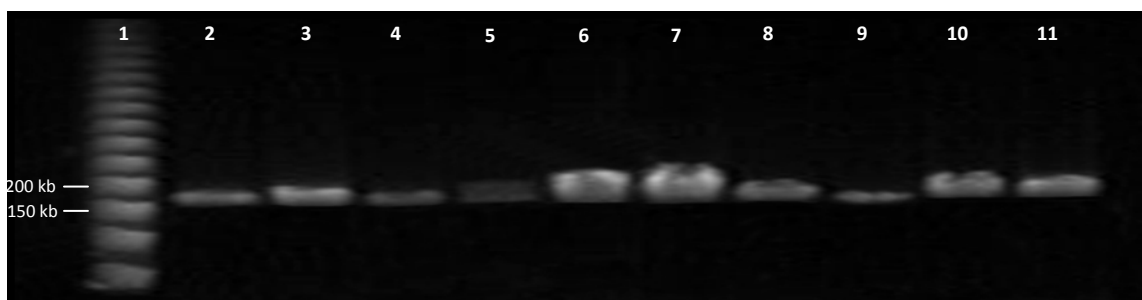


Figura 11. Gel de agarose 1%. 1- Marcador; 2- Genoma Ufv aur2; 3- Genoma Ufv aur3; 4- Genoma Ufv aur4; 5- Genoma Ufv aur5; 6- Genoma Ufv aur6; 7- Genoma Ufv aur7; 8- Genoma Ufv aur8; 9- Genoma Ufv aur9; 10- Genoma Ufv aur10; 11- Genoma Ufv aur11.

## 5.8. Perfil protéico

Nesse estudo não é possível saber a quantidade de proteínas que são codificáveis pelos fagos, porém podemos perceber que os fagos Ufv aur2, Ufv aur3, Ufv aur4, Ufv aur5, Ufv aur8, Ufv aur10 e Ufv aur11, possuem o mesmo perfil protéico (figura 12).

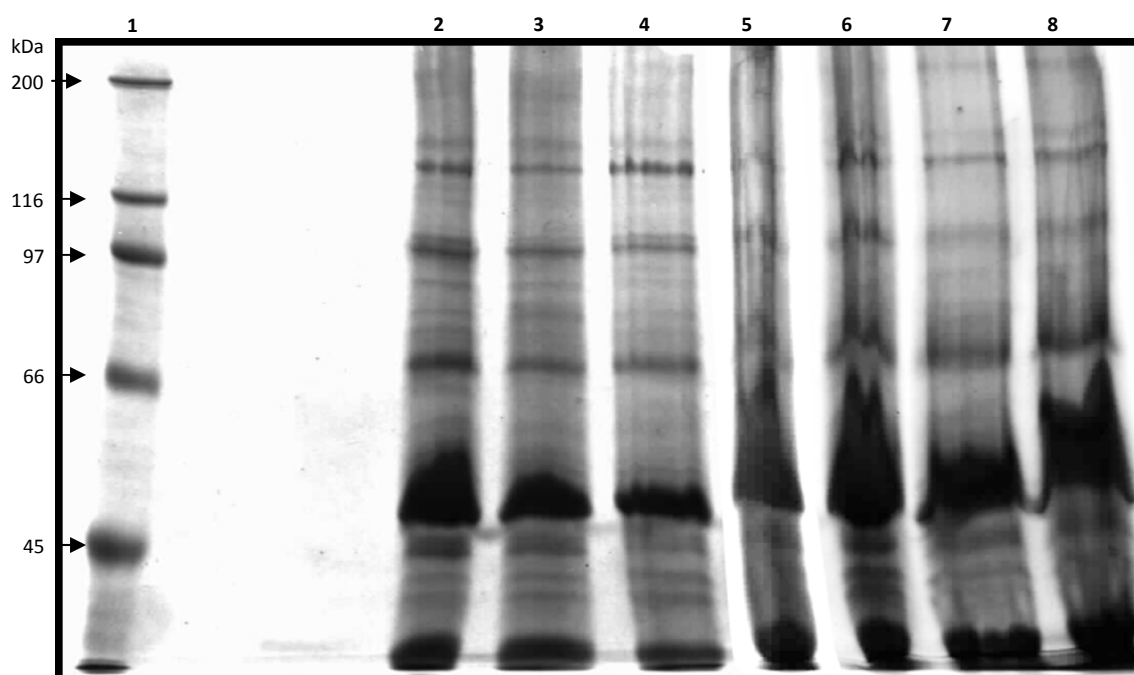


Figura 12. Gel com o perfil protéico dos bacteriófagos. 1- Marcador sigma SDS 6H2-1VL; 2- Ufv aur2; 3- Ufv aur3; 4- Ufv aur4; 5- Ufv aur5; 6- Ufv aur8; 7- Ufv aur10; 8- Ufv aur11

## 5.9. Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica nos demonstrou que os fagos isolados não são envelopados. Eles possuem uma cabeça icosaédrica, um pescoço fino com uma cauda contrátil. Todos apresentando um tamanho aproximado de 200 nm. Essas características são decisivas para classificá-los na ordem Caudovirales e família *Myoviridae* (figura 13).

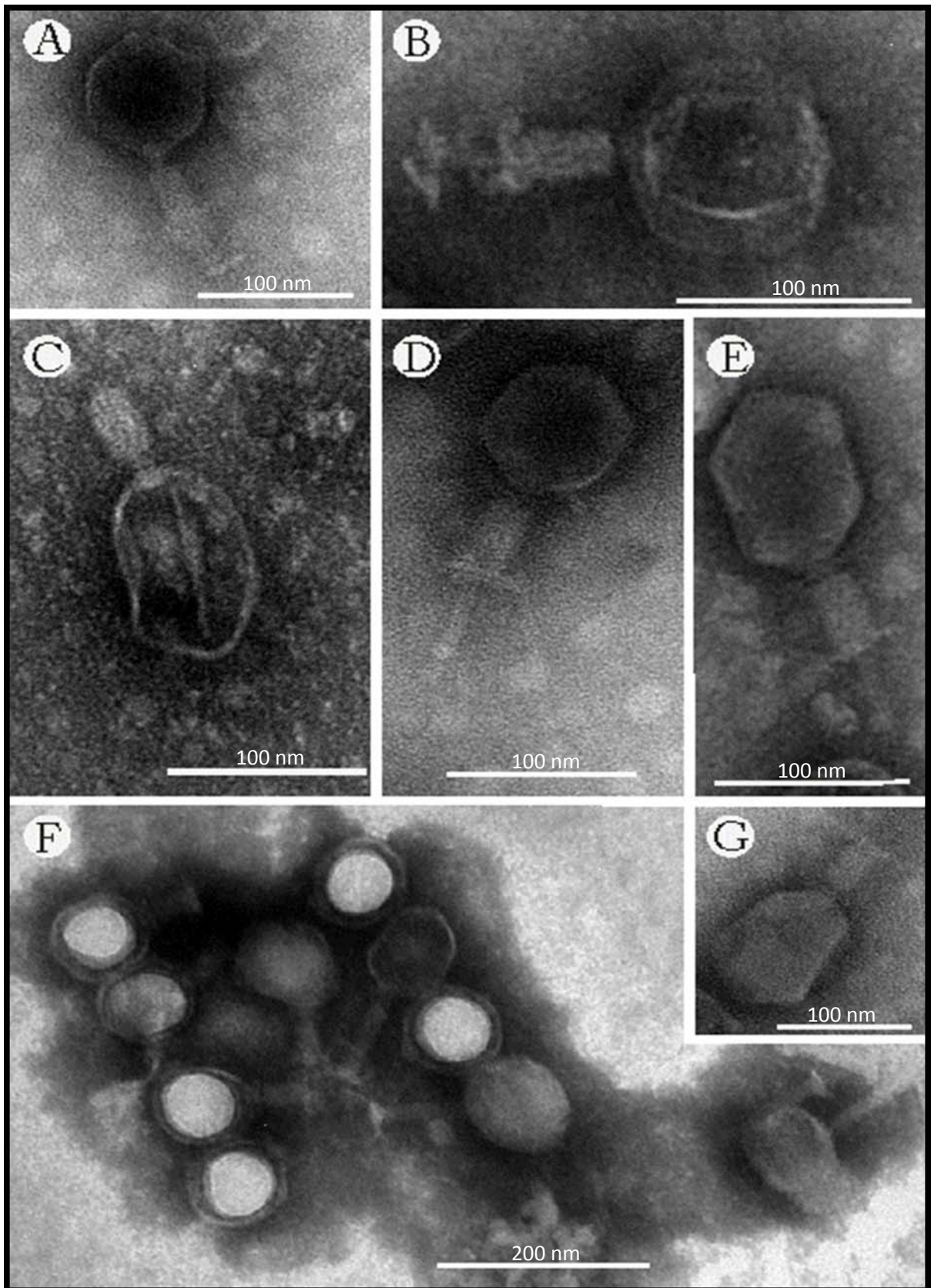


Figura 13. Microscopia eletrônica dos bacteriófagos. A) Ufv aur7; B) Ufv aur11; C) Ufv aur10; D) Ufv aur 7; E) Ufv aur7; F) Ufv aur3; G) Ufv aur7.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Caneca de fundo escuro, CMT, isolamento e identificação das bactérias causadoras de mastite

A prevalência de 19,19% de mastite clínica e subclínica desse trabalho situou-se próximo da média da frequência encontrada em diferentes estudos realizados no Brasil, conforme relatam Nader Filho et al. (1985) 11,9%, Vianni et al. (1992) 40%, Brant e Figueiredo (1994) 42,82%.

Como já era esperado, a maior parte dos casos de mastite apresentava-se na forma clínica (17%), enquanto o restante dos casos apresentava-se na forma subclínica (83%). Segundo Santos & Fonseca, 2007, a mastite subclínica apresenta uma prevalência maior do que a sua forma clínica, sendo responsável em média por 90 a 95% dos casos da doença nos rebanhos leiteiros. Nesse estudo, antes dos testes realizados, muitos proprietários subestimavam a prevalência de mastite em suas propriedades, pois esses identificavam apenas os casos de mastite clínica, cujos sintomas são evidentes e de fácil diagnóstico. Com isso, eles puderam perceber a importância de um controle mais efetivo do seu rebanho, evitando assim grandes perdas econômicas, pela diminuição da qualidade e quantidade da produção de leite.

Dos microrganismos isolados, podemos observar na tabela 1, que existe uma predominância do *Staphylococcus aureus* sobre os demais microrganismos, com 46,53% dos microrganismos isolados. Esses resultados coincidem com os já encontrados na literatura (BRITO e BRITO, 1999, KERRO-DEGO et al. 2002, BOOTH, 1995; BRAMLEY et al., 1996).

Diferentes bactérias podem causar variadas formas da mastite. As mastites causadas pela bactéria *S. aureus*, predominantemente encontrada, possuem uma grande chance de evoluírem para a forma crônica da doença. Interessantemente, a mastite crônica pode permanecer indefinidamente na fase subclínica, ou alternar entre as formas clínica e subclínica (OVIEDO-BOYSO J. et al., 2007).

Infecções de glândulas mamárias em novilhas antes do parto, causadas por uma mesma cepa bacteriana, particularmente *Staphylococcus* sp., têm sido bem documentadas (OLIVER et al., 2007). Esforços para eliminar infecções pré-parto em novilhas têm focado primariamente a terapia intramamária com antibióticos, pouco antes ou durante o parto (MIDDLETON et al., 2005; BORM et al., 2006; OLIVER et al., 2007). Porém essa conduta não foi uniformemente demonstrada como uma prática aplicável e que traz benefícios econômicos (OLIVER et al., 2003; MIDDLETON et al., 2005; BORM et al., 2006).

## 6.2. Antibiograma

Os antibióticos que tiveram a menor porcentagem de ação inibitória contra o *S. aureus* foram a penicilina e a ampicilina. Apenas 30% das cepas testadas apresentaram-se sensíveis à primeira, enquanto 35% das cepas apresentaram-se sensíveis à segunda (figura 3).

A penicilina é um antibiótico natural derivado de um fungo, o *Penicillium chrysogenum* (ou *P. notatum*). O medicamento foi descoberto em setembro de 1928 pelo médico e bacteriologista escocês Alexander Fleming e está disponível como fármaco desde 1941, sendo o primeiro antibiótico utilizado com sucesso. A ampicilina, classificada como uma aminopenicilina, difere estruturalmente da penicilina somente pela presença de um grupo amino no carbono benzílico. Sintetizada em 1959 por Batchelor e colaboradores, foi a primeira penicilina semi-sintética (TORTORA et. al., 2005).

Podemos perceber que os antibióticos menos eficazes, são aqueles que foram os primeiros a serem manipulados pelo o homem. Esses antibióticos foram largamente utilizados pelos humanos, com isso ocorreu uma seleção de bactérias, em todo o globo terrestre, resistentes a esses fármacos.

O uso indiscriminado de antibióticos, muitas vezes de maneira indevida, tem promovido uma verdadeira seleção artificial das bactérias a esse produto. O crescimento da população resistente a antibióticos está ocorrendo de maneira ascendente e constante. A partir desse raciocínio, podemos inferir que antibióticos hoje eficientes no tratamento de doenças bacterianas podem, no futuro, ser ineficazes. Vale ressaltar que já é bastante comum relatos de hospitais em que se faz isolamento de bactérias patogênicas resistentes a todos ou à grande maioria dos antibióticos testados (KUMARI et al., 2010).

O antibiótico que teve a maior porcentagem de ação inibitória foi a gentamicina (figura 3). As cepas testadas foram sensíveis em 95% dos casos. Outros antibióticos com alta porcentagem inibitória são sulfazotrin (90%), amoxicilina/ácido clavulânico (85%), vancomicina (85%), cefalotina (85%), oxacilina (85%), cloranfenicol (80%) e tetraciclina (80%).

Apesar de esses antibióticos terem uma ação inibitória em uma alta porcentagem da população de cepas testadas, nenhum deles foi capaz de matar todas as cepas. Para todo antibiótico testado, existiram cepas que eram resistentes ao mesmo.

Algumas cepas bacterianas apresentaram resistência a uma grande quantidade de antibióticos testados, conforme apresentado na figura 4. Por exemplo, a cepa *S. aureus* 49 apresentou resistência a 10 dos 15 antibióticos testados, sendo sensível apenas à ciprofloxacina, tetraciclina e gentamicina. A cepa *S. aureus* 51 apresentou resistência a 11 antibióticos testados, sendo sensível apenas à ceftriaxona, tetraciclina e gentamicina. A cepa bacteriana que apresentou resistência contra o maior número de antibióticos foi a *Staphylococcus* sp. 47, que apresentou resistência a quase todos os antibióticos testados, sendo sensível a apenas ciprofloxacina (figura 5). Esses dados reforçam ainda mais a busca por terapias alternativas, como a fagoterapia, já que a grande maioria dos antibióticos não estão sendo eficientes no tratamento de mastite causados por essas cepas resistentes.

### 6.3. Isolamento e propagação

O isolamento a partir de água de esgoto apresentou resultados excelentes, possibilitando a obtenção de um concentrado de bacteriófagos, que permitiu o isolamento de vírus individuais (figura 6). Estes concentrados forneceram todos os vírus estudados neste trabalho.

O isolamento de fagos contra *Staphylococcus* sp. no esgoto doméstico é bastante desacreditado por diversos autores, visto a necessidade da presença de algum hospedeiro potencial para persistência dos vírus e a predominância de enterobactérias no ambiente de esgoto (WITHEY et al., 2005). Acredita-se que esses fagos sejam mais facilmente encontrados em ambientes alternativos, como secreções corporais ou esgoto hospitalar. Porém esse trabalho mostrou resultados contrários a essas proposições, pois os fagos contra *Staphylococcus aureus* foram isolados com sucesso dos esgotos domésticos. Isso amplia o nosso entendimento sobre diversidade viral e destaca a necessidade de se realizarem mais estudos sobre ecologia dos bacteriófagos.

Foram isolados 11 bacteriófagos diferentes a partir de placas de lise como representado na figura 6. Eles foram nomeados de Ufv aur1, Ufv aur2, Ufv aur3, Ufv aur4, Ufv aur5, Ufv aur6, Ufv aur7, Ufv aur8, Ufv aur9, Ufv aur10 e Ufv aur11. As amostras foram propagadas a partir de placas de petri com uma grande quantidade de placas de lise de apenas um sorotipo (figura 6b).

A propagação dos fagos apresentou resultados muito diversos. Muitos protocolos foram testados, porém em muitos casos não foi obtido o sucesso nesse processo. Essa propagação nem sempre funciona da mesma maneira, uma vez que os fagos isolados apresentam características distintas de replicação. Porém obtivemos resultados bastante satisfatórios ao propagarmos os fagos a partir de meio sólido com grande quantidade de placas de lise em um protocolo adaptado de Sambrook e Russell, 2001.

Ainda assim, o sorotipo Ufv aur1 não pôde ser propagado adequadamente, sendo perdido durante as primeiras passagens em cultura, impossibilitando a realização de novos testes com esse sorotipo.

A estocagem dos fagos isolados também é um ponto sensível, sujeito a enormes variações. Dada a considerável diversidade estrutural apresentada

por estes vírus, não é surpresa a diferença de condições necessárias para manutenção da estabilidade dos mesmos. Inicialmente optou-se por manter os fagos a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , porém, nessa temperatura, vários fagos não foram reativados com sucesso, o que levou à perda de um grande número de amostras. Posteriormente, seguindo vários trabalhos, optou-se por manter os fagos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Foi observado que a UFP/ml caiu pouco com o passar do tempo. Com isso, reativações foram feitas a intervalos bastante grandes (cerca de 6 meses). Além disso, os fagos isolados nesse estudo apresentavam títulos muito altos (UFP/ml =  $10^{11}$ – $10^{13}$ ). Nesse trabalho, a estocagem das amostras à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  foi plenamente satisfatória para os fagos isolados. A manutenção da viabilidade e estocagem durante longos períodos de tempo é uma característica muito importante, particularmente para fagos com potencial para utilização terapêutica. Para essa característica, os fagos isolados nesse estudo são promissores para este fim.

#### **6.4. Teste para o potencial lítico dos fagos**

Para o teste de potencial lítico dos fagos, conforme mostra a figura 7, todos os isolados reduziram a densidade óptica (DO) das culturas, indicando a lise das bactérias cultivadas em meio BHI. Porém em todas as amostras ocorreu aumento da DO com o passar das horas, principalmente após a 12<sup>o</sup> hora. Uma possível justificativa para esse aumento da DO é a entrada do fago no ciclo lisogênico. Isso evita a lise bacteriana e conseqüentemente aumenta a população bacteriana. Essa proposição condiz com relatos na literatura, que indicam uma predominância de fagos temperados contra o gênero *Staphylococcus* sp. (WALDOR et al.,2005).

Bacteriófagos temperados ora podem estar no ciclo lítico e ora podem estar no ciclo lisogênico. Acredita-se que o estado fisiológico da célula influencia no resultado desse ciclo.

Para o fago  $\lambda$ , que é o mais bem estudado, o ciclo a ser realizado depende do nível da proteína CII. Se os níveis de CII são altos, ela direciona a expressão de altos níveis do repressor CI, e o vírus segue o mecanismo

lisogênico. Quando CII é ausente ou em baixos níveis, ocorre o ciclo lítico. Diferentes fatores parecem controlar o nível de CII. Um deles é que CII pode ser degradado por proteases bacterianas denominadas FtsH. É plausível que a atividade de FtsH seja modulada pelo estado fisiológico da célula. É sabido que deixando as células crescerem em um meio pobre ou em baixas temperaturas, favorece o estado lisogênico (WALDOR et al.,2005).

Nesse experimento houve consumo dos nutrientes pelas bactérias, deixando o meio cada vez mais pobre. Isso pode ter influenciado, por algum mecanismo semelhante, a entrada de grande número de fagos no ciclo lisogênico, matando um menor número da população bacteriana, fazendo com que houvesse um aumento da DO.

A atividade de FtsH pode também ser modulada por uma segunda proteína de  $\lambda$ , denominada CIII, que aparentemente atua como um inibidor competitivo. Então altos níveis de CIII estabilizam CII. Tanto CII quanto CIII são expressos precocemente no curso da infecção. Uma única célula infectada com grande quantidade de fagos propicia à entrada do vírus no ciclo lisogênico e acredita-se que isso seja resultado de uma alta expressão dos genes responsáveis pela produção das proteínas CII e CIII.

De acordo com esses dados, nesse experimento o UFP/ml pode ter se elevado de tal maneira que em determinado momento, principalmente após a 12ª hora, pode ter apresentado uma quantidade de bacteriófagos muito maior que a quantidade de bactérias. Por isso, por algum mecanismo semelhante, pode ter havido um estímulo de entrada no ciclo lisogênico pelo vírus, fazendo com que diminuísse a morte da população bacteriana e com isso ocorresse aumento da DO da amostra.

A justificativa do aumento da DO nas últimas horas devido à entrada do fago no estado lisogênico é bastante plausível. Porém precisamos ter cautela, pois a lise bacteriana não envolve somente a fase de biossíntese do fago. A adsorção é uma etapa limitante nesse processo. Na presença de grandes quantidades de restos bacterianos, mais de um fago pode se adsorver de forma irreversível a esse debris. Como consequência, ao invés do fago se adsorver a uma bactéria permissiva, causando sua morte, ele pode ficar ligado a esse resto bacteriano, tornando-se inativo (ABEDON, 2009b).

Embora o estado lisogênico seja muito estável, ele pode mudar para um estado lítico (LITTLE et al., 1999). Essa mudança pode ocorrer após tratamentos que danificam o DNA celular ou inibem a replicação do mesmo. Esses tratamentos ativam uma resposta celular denominada resposta SOS, que é designada para conter os danos, reparando o DNA e restaurando a replicação. Se a célula contiver o profago, essa resposta SOS também atua paralelamente quebrando o repressor CI, fazendo com que o fago mude para o estado lítico. Indutores bastante conhecidos da mudança do estado lisogênico para o lítico são os raios ultravioletas, mitomicina C e a ciprofloxacina (ACKERMAN & DUBOW, 1987; WEINBAUER & SUTTLE, 1996; MATSUSHIRO et al., 1999).

No presente estudo, a mitomicina C mostrou-se uma potente indutora da troca do estado lisogênico-lítico para todos os isolados virais (figura 7). Todas as amostras, em que foram colocadas a mitomicina C na presença dos bacteriófagos, tiveram os valores da DO mais baixos que as amostras que continham apenas o fago. Um controle colocando apenas a cultura bacteriana com a mitomicina C foi feito, mostrando que apenas a mitomicina C, na ausência desses isolados de bacteriófagos, não era capaz de diminuir a DO a níveis significativos, conforme mostrado na figura 7.

Embora a mitomicina C tenha influenciado todos os fagos nessa troca de estado, ela demonstrou menor influência para o Ufv aur4 e o Ufv aur11 (tabela 2). Após 24 horas, a DO da amostra que continha o Ufv aur4 sem mitomicina C foi de 0,66 enquanto que na amostra com mitomicina C foi de 0,47. Para a amostra que continha o Ufv aur11 sem mitomicina a DO foi de 0,73, enquanto que na amostra com mitomicina C foi de 0,63. Reduções bem menos expressivas se comparadas às das amostras que continham o fago Ufv aur6, que na ausência de mitomicina apresentou a DO de 0,8 e na presença obteve uma DO 0,06. Ou mesmo se comparado ao fago Ufv aur8, que na ausência de mitomicina apresentou a DO de 0,72 e na presença obteve uma DO de 0,07.

## 6.5. Avaliação da especificidade de hospedeiro

Dos fagos testados, o Ufv aur2, Ufv aur5, Ufv aur6 e Ufv aur11 foram capazes de causar lise em todas as cepas bacterianas testadas. Os fagos Ufv aur4, Ufv aur8, Ufv aur9 e Ufv aur10 não conseguiram causar lise em apenas uma das 20 cepas bacterianas testadas, lisando portanto, 95% das cepas (tabela 3). Os fagos que apresentaram os piores resultados em termos de abrangência foram Ufv aur3 e Ufv aur7, que lisaram 70% das amostras testadas. Podemos com isso perceber que mesmo os fagos que apresentaram os piores resultados, foram capazes de lisar a grande maioria das cepas bacterianas testadas. Essa variada gama de hospedeiros por parte desses isolados é uma característica favorável para uma posterior utilização na fagoterapia.

Os fagos Ufv aur3, Ufv aur6 e Ufv aur10 foram capazes de causar lise pronunciada ou muito pronunciada em 50% das amostras testadas. Essas porcentagens já foram menores para os outros fagos, que apresentaram 45% (Ufv aur2, Ufv aur8 e Ufv aur9), 40% (Ufv aur5 e Ufv aur11), 30% (Ufv aur4) e 5% (Ufv aur7) de lise pronunciada ou muito pronunciada nas amostras testadas. Definitivamente o Ufv aur7 foi o que apresentou os piores resultados tanto na abrangência das cepas que ele foi capaz de lisar quanto no escore dessa lise (tabela 3).

Os fagos apresentaram resultados variáveis na eficiência da lise para as diferentes cepas bacterianas. Podemos citar como exemplo o Ufv aur6, que foi o fago com a maior eficiência na lise da cepa *S. aureus* 17. Já para a cepa *S.aureus* 59, esse fago não foi tão eficaz assim, sendo os fagos Ufv aur8 e Ufv aur11 que apresentaram os melhores resultados.

Um dado bastante interessante foi que o Ufv aur6 e o Ufv aur9 foram capazes de causar uma lise pronunciada nas cepas de *S.aureus* 49 e *S. aureus* 51, respectivamente (tabela 3). Essas duas cepas, conforme falado anteriormente apresentaram resistência a maior parte dos antibióticos testados. Dos 15 antibióticos testados, o *S. aureus* 49 foi sensível apenas à ciprofloxacina, tetraciclina e gentamicina e o *S. aureus* 51 foi sensível apenas à ceftriaxona, tetraciclina e gentamicina (figura 4). Esses dados estimulam ainda

mais o uso dos fagos como agentes terapêuticos, já que, pelo menos *in vitro*, eles estão sendo altamente capazes de matar bactérias que grande parte dos antibióticos não está sendo capaz.

Os bacteriófagos possuem várias características que os capacitam como agentes terapêuticos em potencial contra bactérias infecciosas. Uma dessas características é a alta especificidade e a efetividade em lisar a bactéria patogênica alvo. Contudo, devido a essa especificidade, eles estão sujeitos a uma gama de hospedeiros relativamente estreita. Alguns pesquisadores acreditam que, para o uso terapêutico, o agente causador da doença tem que ser isolado e os testes de potencial lítico devem ser realizados para a bactéria patogênica específica (HUFF et al., 2004). Porém, poderíamos driblar esse problema associando um coquetel de fagos efetivos contra a maior parte das bactérias que se tem conhecimento de causarem a doença em questão. Por esse ponto de vista, seria útil desenvolver um produto terapêutico a base de bacteriófagos baseado nas melhores associações dos fagos, aumentando o leque de abrangência do produto antimicrobiano (SLOPEK et al., 1987; SMITH et al. 1997; CARLTON 1999; SULAKVELIDZE et al. 2001; GOODRIDGE & ABEDON 2003; HUFF et al. 2004, OLIVEIRA et al., 2009).

Além disso, curiosamente, vários estudos têm dado destaque à falta de diversidade genética entre bactérias resistentes a várias drogas. Isso pode ser uma consequência da seleção clonal (KNIGHT, 2002). Por exemplo, cerca de 75% dos casos de pneumonia infantil causada por bactérias resistentes aos medicamentos são causadas por 10 cepas de pneumococo (KNIGHT, 2002), com quase metade dos casos causados por uma cepa (Espanha 23-F). Esta falta de variabilidade pode significar que as bactérias antibiótico-resistentes são alvos ideais para a fagoterapia (MERRIL et al. 2006, ATTERBURY, 2009).

## **6.6. Termoestabilidade**

Armazenamento e manipulação de fagos também pode ser um problema, dependendo do sorotipo. Enquanto alguns fagos são muito estáveis

e podem ser armazenados em quase todas as condições, outros são frágeis e precisam de atenção especial durante seu manuseio (SKURNIK et al, 2007).

É interessante que o bacteriófago com fins terapêuticos tenha uma boa estabilidade térmica. Fagos que resistem por longos períodos a temperaturas relativamente elevadas (~40°C) não necessitam de constante refrigeração, facilitando a sua utilização em regiões tropicais e/ou carentes. De nada adiantaria um fago estritamente lítico, que só tivesse sua ação terapêutica em condições especiais no laboratório.

Nesse ensaio foi mostrado que todos os sorotipos tiveram uma boa estabilidade térmica, mantendo elevados títulos virais mesmo a temperaturas de 100°C por cinco minutos (figura 8). Podemos observar na tabela 4, que os isolados que tiveram seus títulos mais reduzidos na temperatura de 70°C foram o Ufv aur2 e o Ufv aur11, na temperatura de 80°C foi o Ufv aur6, e tanto na temperatura de 90°C quanto na de 100°C foi o Ufv aur3. Ainda na mesma tabela, observamos que o fago que teve a menor redução no valor do título na temperatura de 70°C foi o Ufv aur6 e nas temperaturas de 80°C, 90°C e 100°C foi o Ufv aur9. Portanto, nesse ensaio o Ufv aur9 foi o fago que apresentou uma maior estabilidade a altas temperaturas. Para essa característica ele é o melhor candidato para o uso terapêutico. Porém novos estudos com outras temperaturas e um maior tempo de exposição precisam ser realizados para se reforçar esses dados.

#### **6.7. Extração de genoma viral, ensaio com DNase e RNase, perfil de proteínas e microscopia eletrônica**

Todos os fagos isolados tiveram seus genomas digeridos pela DNase e não pela RNase indicando que é um fago com material genético composto de DNA (figura 10). Esse resultado confirma o que já era esperado, pois através da microscopia eletrônica pôde-se perceber que todos os fagos isolados eram caudados (figura13). E todos os bacteriófagos da ordem Caudovirales, até hoje relatados, apresentaram material genético de DNA.

A microscopia eletrônica nos demonstrou que todos os fagos não são envelopados. Eles possuem uma cabeça icosaédrica, um pescoço fino com

uma cauda contrátil. Todos apresentando um tamanho aproximado de 200 nm. Essas características são decisivas para classifica-los na ordem Caudovirales e família *Myoviridae*.

De acordo com o gel de pulse field podemos perceber também que o genoma do fago possui um tamanho aproximado de 175kb (figura 11). Existem bacteriófagos dessa família que possuem genomas bem pequenos como o fago P4 de 11.624 pares de bases e o fago P2 de aproximadamente 30kb (HALLING et al, 1990; HAGGÅRD-LJUNGQUIST et al., 1995). Porém existem relatos de fagos dessa família com genoma bem maior, como o fago S-RSM4 de 194.454 pares de bases (MILLARD et al., 2009). Bacteriófagos de *Staphylococcus* sp. dessa família normalmente apresentam um genoma com tamanho em torno de 130 – 140kb (O'FLAHERTY et. al, 2005; KWAN et. al, 2005).

Com relação às proteínas codificadas pelos fagos de *Staphylococcus* sp. da família *Myoviridae*, sabemos que os fagos G1 e K possuem um total de 214 e 115 proteínas codificáveis respectivamente (KWAN et al., 2005). Nesse estudo não é possível saber a quantidade de proteínas que são codificáveis pelos fagos, porém podemos perceber que os fagos Ufv aur2, Ufv aur3, Ufv aur4, Ufv aur5, Ufv aur8, Ufv aur10 e Ufv aur11, possuem o mesmo perfil protéico (figura 12).

A proteína de maior concentração desses fagos possui uma massa aproximada de 50 kDa. Esses fagos apresentaram ainda grande quantidade de proteínas de aproximadamente 70 kDa, 100kDa e 140 kDa.

Essa caracterização dos fagos é bastante importante, já que uma das principais razões para o fracasso da fagoterapia na era pré-antibiótica foi a aplicação de bacteriófagos não caracterizados, que levaram a resultados incoerentes da terapia. Daí surge a importância do isolamento e da caracterização de novos fagos (VERMA et al., 2009).

## 7. CONCLUSÃO

- A mastite bovina na região da Zona da Mata Mineira possui uma prevalência de 19,19%, apresentando-se 17% na forma clínica e 83% na forma subclínica;
- O principal microrganismo causador da mastite bovina na região da Zona da Mata Mineira é o *Staphylococcus aureus*, responsável por 46,53% dos casos;
- O antibiótico que teve melhor ação inibitória contra o *S. aureus in vitro* foi a gentamicina, inibindo 95% das cepas testadas;
- Os antibióticos que tiveram a pior ação inibitória contra o *S. aureus in vitro* foram a penicilina e a ampicilina. 65% e 60% das cepas testadas eram resistentes a esses antibióticos, respectivamente;
- Foi confirmada a potencialidade do isolamento de bacteriófagos, a partir do esgoto, contra *S. aureus*;
- Foram isolados e proliferados nesse trabalho 10 bacteriófagos temperados, todos possuindo como material genético uma dupla fita de DNA de aproximadamente 175 Kb, sendo todos da ordem Caudovirales e da família *Myoviridae*;

- Os fagos Ufv aur2, Ufv aur3, Ufv aur4, Ufv aur5, Ufv aur8, Ufv aur10 e Ufv aur11 possuem o mesmo perfil protéico;

- Os 10 bacteriófagos isolados são capazes de infectar e causar lise em diferentes cepas bacterianas;

- Os bacteriófagos isolados apresentaram estabilidade térmica, possuindo títulos virais altos mesmo a elevadas temperaturas;

- O mitomicina C é um agente capaz de induzir todos os fagos isolados a entrarem no ciclo lítico;

## 8. REFERÊNCIAS

- ABEDON, S. T. Bacteriophage evolution and ecology. **Adv Appl Microbiol**, v. 67, p. 1–45, 2009a.
- ABEDON, S. T. Kinetics of Phage-Mediated Biocontrol of Bacteria. **Foodborne pathogens and disease**, v. 6, n. 7, p. 807-815, 2009b.
- ACKERMAN, H. W. e DUBOW, M. S. Viruses of Prokaryotes: General Properties of Bacteriophages, **CRC Press**, Boca Raton, Florida, 1987.
- ACKERMANN, H. W. e GERSHMAN, M. Morphology of phages of a general Salmonella typing set. **Research in Virology**, v. 143, p. 303–310, 1992.
- ACKERMANN, H. W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. **Archives of Virology**, v. 146, p. 843–857, 2001.
- ACKERMANN, H. W. Bacteriophage observations and evolution. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 4, p. 245-251, 2003.
- ALISKY, J.; ICZKOWSKI, K.; RAPOPORT, A.; TROITSKY, N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. **J. Infect**, v. 36, p. 5-15, 1998.
- ALMEIDA, R.; TREVILATO, P. B.; BARTOLETI, L. A.; PROENCA-MODENA, J. L.; HANNA, E. S.; GREGORACCI, G. B.; BROCCHI, M. Bacteriophages and insertion sequences of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. **Genetics and Molecular Research**, n. 3, v. 1, p. 76-84, 2004.

- ASHELFORD, K. E.; NORRIS, S. J.; FRY, J. C.; BAILEY, M. J. e DAY, M. J. Seasonal population dynamics and interactions of competing bacteriophages and their host in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4193–4199, 2000.
- ATTERBURY, R. J. Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 601–612, 2009.
- BAMFORD, D. H. Do viruses form lineages across different domains of life? **Research in Microbiology**, v. 154, n. 4, p. 231-236, 2003.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. M.; GALLIGAN, D. T.; BEIBOER, M. L.; BRAND, A. Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. **J Dairy Sci**, v. 80, p. 1592-1599, 1997.
- BARKEMA H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. G. M.; BEIBOER, M. L.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Management practices associated with the incidence rate. **J Dairy Sci**, v. 82, p. 1643-1654, 1999.
- BARROW, P. A. e SOOTHILL, J. S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. **Trends Genet**, v. 5, p. 268–271, 1997.
- BARROW, P. The use of bacteriophages for treatment and prevention of bacterial disease in animals and animals models of human infection. **J. Chem. Technol. Biotechnol**, v. 76, p. 677-682, 2001.
- BEDI, M. S.; VERMA, V.; CHHIBBER, S. Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for the eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 25, p. 1145–1151, 2009.
- BELLO, D. S. e VILA, J. M. Will we still have antibiotics tomorrow? **Arch Bronconeumol**, v. 43, p. 450–459, 2007.
- BIRMINGHAM, V. A. e PATTEE, P. A. Genetic transformation in *Staphylococcus aureus*: isolation and characterization of a competence-conferring factor from bacteriophage 80 alpha lysates. **J. Bacteriol**, v. 148, p. 301-307, 1981.

- BISWAS, B.; ADHYA, S.; WASHART, P.; PAUL, B.; TROSTEL, A. N.; POWELL, B.; CARLTON, R.; MERRIL, C. R. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Infect. Immun**, v. 70, p. 204–210, 2002.
- BOOTH, J. M. Progress in the control of mastitis. In. INTERNATIONAL MASTITIS SEMINAR, **International Dairy Federation**, p. 3- 11, 1995.
- BORM, A. A.; FOX, L. K.; LESLIE, K. E.; HOGAN, J. S.; ANDREW, S. M.; MOYES, K. M.; OLIVER, S. P.; SCHUKKEN, Y. H.; HANCOCK, D. D.; GASKINS, C. T.; OWENS, W. E.; NORMAN, C. Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers. **J. Dairy Sci**, v. 89, p. 2090–2098, 2006.
- BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J. Current concepts of bovine mastitis. 4.ed. Madison: **National Mastitis Council**, 64p, 1996.
- BRANT, M. C.; FIGUEIREDO, J. B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 6, p. 596-596, 1994.
- BREITBART, M.; ROHWER, F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 278-284, 2005.
- BREITBART, M.; SALAMON, P.; ANDRESEN, B.; MAHAFFY, J.M.; SEGALL, A.M.; MEAD, D.; AZAM, F.; ROHWER, F. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14250-14255, 2002.
- BREITBART, M.; MIYAKE, J.H.; ROHWER, F. Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 2, p. 249-256, 2004.
- BRITO, J.R.F. Coleta de amostras de leite para determinação da composição química e contagem de células somáticas. **Circular Técnica**, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, v. 62, 16p., 2001.

- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. In: BRITO, J. R. F., BRESSAN, M. (Ed.). Controle integrado da mastite bovina. **Circular Técnica**, Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, p. 68-96, 1996.
- BRITO, M. A. V. P. e BRITO, J. R. F. Diagnóstico microbiológico da mastite. **Circular Técnica**, Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, v. 55, 26p., 1999.
- BRÜSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W. D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 3, p. 560-602, 2004.
- BRUTTIN, A.; BRUSSOW, H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 2874-2878, 2005.
- BURVENICH, C.; MERRIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. **Vet Res**, v. 34, p. 521-564, 2003.
- CANCHAYA, C.; FOURNOUS, G.; CHIBANI-CHENNOUFI, S.; DILLMANN, M. L.; BRUSSOW, H. Phage as agents of lateral gene transfer. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 417-424, 2003.
- CARLTON, R. M. Phage therapy: past history and future prospects. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 47, p. 267-274, 1999.
- CASJENS, S. R. Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 451-458, 2005.
- CHANISHVILI, N.; CHANISHVILI, T.; TEDIASHVILI, M.; BARROW, P. A. Phages and their application against drug-resistant bacteria. **J. Chem. Technol. Biotechnol**, v. 76, p. 689-699, 2001.
- CHERNOMORDIK, A. B. Bacteriophages and their therapeutic-prophylactic use. **Med. Sestra**, v. 6, p. 44-47, 1989.

- CHHIBBER, S.; KAUR, S.; KUMARI, S. Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice. **J Med Microbiol**, v. 57, p. 1508–1513, 2008.
- CHIBANI-CHENNOUFI, S.; BRUTTIN, A.; DILLMANN, M. L.; BRUSSOW, H. Phagehost interaction: na ecological perspective. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 12, p. 3677-3686, 2004.
- CHOPRA, I.; HODGSON, J.; METCALF, B.; POSTE, G. The search for antimicrobial agents effective against bacterial resistant to multiple antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 41, p. 497-503, 1997.
- COMEAU, A. M.; KRISCH, H. M. War is peace – dispatches from the bacterial and phage killing fields. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 488-494, 2005.
- COURCELLE, J.; KHODURSKY, A.; PETER, B.; BROWN, P. O.; HANAWALT, P. C. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. **Genetics**, v. 158, p. 41-64, 2001.
- CULLOR, J. S.; TYLER, J. W.; SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais**. São Paulo, v.2, p.1041-1060, 1994.
- DABROWSKA, K.; SWITALA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A. Bacteriophage penetration in vertebrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 7-13, 2005.
- DARLING, P. J.; HOLT, J. M.; ACKERS, G. K. Coupled energetics of lambda CRO repressor self-assembly and site-specific DNA operator binding. II. Cooperative interactions of CRO dimers. **J. Mol. Biol**, v. 302, p. 625-638, 2000.
- DAUBIN, V.; OCHMAN, H. Start-up entities in the origin of new genes. **Current opinion in Genetics & Development**, n. 14, v. 6, p. 616-619, 2004.
- DEGO, O. K.; VAN DIJK, J. E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. **Vet Quart**, v. 24, p. 181-198, 2002.

- DIXON, B. New dawn for phage therapy. **Lancet Infect Dis**, v. 4, p. 186–186, 2004.
- DODD, I. B.; PERKINS, A. J.; TSEMITSIDIS, D.; EGAN, J. B. Octamerization of lambda CI repressor is needed for effective repression of P (RM) and efficient switching from lysogeny. **Genes**, v. 15, p. 3013-3022, 2001.
- DODSON, M.; ECHOLS, H.; WICKNER, S.; ALFANO, C.; MENSA-WILMOT, K.; GOMES, B.; LEBOWITZ, J.; ROBERTS, J. D.; McMACKEN, R. Specialized nucleoprotein structures at the origin of replication of bacteriophage  $\lambda$ : localized unwinding of duplex DNA by six-protein reaction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p.7638-7642, 1986.
- DOSKAR, J.; PALLOVA, P.; PANTUCEK, R.; ROSYPAL, S.; RUZICKOVA, V.; PANTUCKOVA, P.; KAILEROVA, J.; KLEPARNIK, K. Genomic relatedness of Staphylococcus aureus phages of the International Typing Set and detection of serogroup A, B, and F prophages in lysogenic strains. **Canadian Journal of Microbiology**, V. 46, p. 1066–1076, 2000.
- ECHOLS, H. Bacteriophage  $\lambda$  development: temporal switches and the choice of lysis or lysogeny. **Annu. Ver. Genet**, v. 2, p. 26-30, 1986.
- FARUQUE, S. M.; ISLAM, M. J.; AHMAD, Q. S.; FARUQUE, A. S.; SACK, D. A.; NAIR, G. B.; MEKALANOS, J. J. Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: Role of host mediated amplification of phage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 17, p. 6119-6124, 2005.
- FEßLER, A.; SCOTT, C., KADLEC, K.; EHRLICH, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from cases of bovine mastitis. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, p. 619–625, 2010a.
- FEßLER, A.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, p. 1576–1582, 2010b.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do Leite e Controle de Mastite. Lemos Editorial, São Paulo, 175p, 2000.

- FUHRMAN, J.A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. **Nature**, v. 399, n. 6736, p.541-548, 1999.
- GOODRIDGE, L. e ABEDON, S.T. Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: Application of phage therapy to industry. **SIM News**, v. 53, p. 254–262, 2003.
- GORSKI, A.; DABROWSKA, K.; SWITA A-JELEN, K.; NOWACZYK, M.; WEBER-DABROWSKA, B.; BORATYNSKI, J.; WIETRZYK, J.; OPOLSKI, A. New insights into the possible role of bacteriophages in host defence and disease. **Medical Immunology**, v. 2, p. 2, 2003.
- GREER, G. G. Bacteriophage control of foodborne bacteria. **J Food Prot**, v. 68, p. 1102–1111, 2005.
- GREGORACCI, G.B.; SILVEIRA, W.D.; BROCCHI, M. The biology of bacteriophages. In: WEGRZYN, G. Modern Bacteriophage Biology and Biotechnology. **Research Signpost**, p. 1-36, 2006a.
- GREGORACCI, G.B. Levantamento de bacteriófagos líticos: Isolamento e caracterização de vírus provenientes de esgoto comum com potencial aplicação antimicrobiana. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), UNICAMP, Campinas, 2006b.
- HAGGÅRD-LJUNGQUIST, E.; JACOBSEN, E.; RISHOVD, S.; SIX, E.W.; NILSSEN, O.; SUNSHINE, M.G.; LINDQVIST, B.H.; KIM, K.J.; BARREIRO, V.; KOONIN, E.V. Bacteriophage P2: genes involved in baseplate assembly. **Virology**, v. 213, n. 1, p. 109-121, 1995.
- HALLING, C. and CALENDAR, R. The bacteriophage P2 ogr gene and P4 delta genes act independently and are essential for P4 multiplication. **J. Bacteriol**, v. 172, p. 3549-3558, 1990.
- HAMBLY, E.; SUTTLE, C.A. The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 444-450, 2005.
- HERSKOWITZ, I. e HAGEN, D. The lysis-sysogeny decision of phage  $\lambda$ : explicit programming and responsiveness. **Annu. Ver. Genet**, v. 14, p. 399-445, 1980.

- HUDSON, J. A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. **J Food Prot**, v. 68, p. 426–437, 2005.
- HUFF, W. E.; HUFF, G. R.; RATH, N. C.; BALOG, J. M.; DONOGHUE, A. M. Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. **Poult Sci**, v. 83, p. 1944–1947, 2004.
- KARL, T. Old dogma, new tricks—21st century phage therapy. **Nat Biotechnol**, v. 22, p. 31–36, 2004.
- KEHRLI JR, M. E.; NONNECKE, B. J.; ROTH, J. A. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. **Am. J. Vet. Res**, v. 50, p. 207–214, 1989.
- KERRO DEGO, O.; VAN DIJK, J.E.; EDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. **A review. Vet. Q**, v. 24, p. 181–198, 2002.
- KIHARA, A.; AKIYAMA, Y; ITO, K. Revisiting the lysogenization control of bacteriophage lambda: identification and characterization of a new host component, HflD. **J. Biol. Chem**, v. 276, p. 13695–13700, 2001.
- KNIGHT, J. Superbugs reveal chink in armour. **Nature**, v. 417, p. 477, 2002.
- KOBLAN, K. S. e ACKERS, G. K. Cooperative protein – DNA interactions: effects of KCl on lambda cl binding to OR. **Biochemistry**, v. 30, p. 7822–7827, 1991.
- KOBLER, O.; KOBY, S.; TEFF, D.; COURT, D.; OPPENHEIM, A. B. The phage lambda CII transcriptional activator carries a C-terminal domain signaling for rapid proteolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 14964–14969, 2002.
- KUMARI, S.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Isolation and Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Specific Bacteriophages from Sewage Samples. **Folia Microbiol**, v. 55, n. 3, p. 221–227, 2010.

- KUMARI, S.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Efficacy of bacteriophage treatment in murine burn wound infection induced by *Klebsiella pneumoniae*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 19, n. 6, p. 622-628, 2009.
- KUTTER, E. Phage therapy: bacteriophages as natural, self-limiting antibiotics. In *Textbook of Natural Medicine*, 3rd edn. Pizzorno, J.E.; Murray, M.T. (eds). London, UK: Churchill Livingstone, p. 1147–1161, 2005.
- KWAN, T.; LIU, J.; DUBOW, M.; GROS, P.; PELLETIER, J. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages, v.5, p. 5174-5179, 2005.
- LACERDA JR., P. M. G.; ZANI NETO, L.; FREITAS, D. C. Estudos sobre as mastites bovinas. I. Contribuição ao estudo dos agentes etiológicos das mastites bovinas. **Rev. Fac. Med. Vet. USP**, v. 5, p. 55-64, 1954.
- LALEH, G.; KIMBERLEY, D. S.; JONATHAN, D. J.; WARREN, H. F. Toward Modern Inhalational Bacteriophage Therapy: Nebulization of Bacteriophages of *Burkholderia cepacia* Complex. **journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, v. 21, n. 4, p. 351–359, 2008.
- LANGENEGGER, H.; COELHO, N. M.; HANGENEGGER, C. H.; CASTRO, R.P. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 437, 1970.
- LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. F.; LISTONI, F. I. P. Mastite bovina subclínica: etiologia e sensibilidade bacteriana. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga**, v. 14, n. 1, p. 11-31, 1990.
- LINDBERG, A. A. Bacteriophage Receptors. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 27, p. 205-241, 1973.
- LITTLE, J. W. Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 1375-1379, 1984.
- LITTLE, J. W. *LexA* cleavage and other self-processing reactions. **J. Bacteriol**, v. 175, p. 4943-4950, 1993.

- LITTLE, J. W.; SHEPLEY, D. P.; WERT, D. W. Robustness of a gene regulatory circuit. **EMBO J**, v. 18, p. 4299-4307, 1999.
- LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest**, v. 111, p. 1265–1273, 2003.
- LWOFF, A. Lysogeny, **Bacteriol. Ver**, v. 17, p. 269-337, 1953.
- MALLARD, B. A.; DEKKERS, J. C.; IRELAND, M. J.; LESLIE, K. E.; SHARIF, S.; VANKAMPEN, C. L.; WAGTER, L.; WILKIE, B. N. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. **J. Dairy Sci**, v. 81, p. 585–595, 1998.
- MANGEN, M. J. J.; HAVELAAR, A. H.; POPPE, K. P.; WIT, G. A. D. Cost-utility analysis to control *Campylobacter* on chicken meat-dealing with data limitations. **Risk Analysis**, v. 27, p. 815–830, 2007.
- MATSUSHIRO, A.; SATO, K.; MIYAMOTO, H.; YAMAMURA, T.; HONDA, T. Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin. **J Bacteriol**, v. 181, p. 2257–2260, 1999.
- MATSUZAKI, S.; YASUDA, M.; NISHIKAWA, H.; KURODA, M.; UJIHARA, T.; SHUIN, T.; SHEN, Y.; JIN, Z.; FUJIMOTO, S.; NASIMUZZAMAN, M. D.; WAKIGUCHI, H.; SUGIHARA, S.; SUGIURA, T.; KODA, S.; MURAOKA, A.; IMAI, S. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. **J. Infect. Dis**, v. 187, p. 613–624, 2003.
- MERRIL, C.R. Bacteriophage interactions with higher organisms. **Transaction of the New York Academy of Sciences**, v. 36, p. 265– 272, 1974.
- MERRIL, C. R.; SCHOLL, D.; ADHYA, S. L. The prospect of bacteriophage therapy in Western medicine. **Nat. Rev. Drug. Discov**, v. 2, p. 489-497, 2003.
- MERRIL, C. R.; SCHOLL, D.; ADHYA, S. L. Phage therapy. In *The Bacteriophages*. Calendar, R. (ed.). Oxford, UK: Oxford University Press, p. 725–741, 2006.

- MEYER, B. J. e PTASHNE, M. Gene regulation at the right operator (OR) of bacteriophage  $\lambda$ . III.  $\Lambda$  repressor directly activates gene transcription. **J. Mol. Biol.**, v. 139, p. 195-205, 1980.
- MIDDLETON, J. R.; TIMMS, L. L.; BADER, G. R.; LAKRITZ, J.; LUBY, C. D.; STEEVENS, B. J. Effect of prepartum intramammary treatment with pirlimycin hydrochloride on prevalence of early first-lactation mastitis in dairy heifers. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 227, p. 1969–1974, 2005.
- MIDDLETON J. R.; LUBY C. D.; ADAMS D. S. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 177-185, 2009.
- MILLARD, A. D.; ZWIRGLMAIER, K.; DOWNEY, M. J; MANN, N. H.; SCANLAN, D. J. Comparative genomics of marine cyanomyoviruses reveals the widespread occurrence of *Synechococcus* host genes localized to a hyperplastic region: implications for mechanisms of cyanophage evolution. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 11, n. 9, p. 2370-87, 2009.
- MURPHY, F. A.; FAUQUET C. M.; BISHOP D. H. L.; GHABRIAL S. A.; JARVIS A. W.; MARTELLI G. P.; MAYO M. A.; SUMMERS M. D. Virus taxonomy: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer- Verlag, Vienna, Austria, 1995.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standards. M2-A8. 8th ed. Wayne, PA: NCCLS, p.31, 2003.
- NADER FILHO, A. Prevalência e etiologia da mastite bovina na Região de Ribeirão Preto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.5, n.2, p.53-56, 1985.
- NUDLER, E. e GOTTESMAN, M. E. Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. **Genes Cells**, v. 7, p. 755-768, 2002.
- O'FLAHERTY, S.; COFFEY, A.; EDWARDS, R.; MEANEY, W.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P; Genome of staphylococcal phage K: a new lineage of Myoviridae infecting gram-positive bacteria with a low G+C content. **J Bacteriol.**, v. 186, n. 9, p. 2862-2871, 2005.

- OLIVER, S. P.; LEWIS, M. J.; GILLESPIE, B. E.; DOWLEN, H. H.; JAENICKE, E. C., ROBERTS, R. K. Prepartum antibiotic treatment of heifers: Milk production, milk quality, and economic benefit. *J. Dairy Sci.* 86, 1187–1193, 2003.
- OLIVER, S. P.; HEADRICK, S. I.; GILLESPIE, B. E.; LEWIS, M. J.; JOHNSON, D. L.; LAMAR, K. C.; MOOREHEAD, H.; DOWLEN, H. H.; HALLBERG, J. W. Intramammary infections in heifers during early lactation following intramammary infusion of pirlimycin hydrochloride or penicillin–novobiocin at the first milking after parturition. *J. Dairy Res*, v. 74, p. 211–217, 2007.
- OLIVEIRA, A.; SILLANKORVA, S.; QUINTA R.; HENRIQUES, A.; SERENO, R.; AZEREDO, J. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, p. 1919–1927, 2009.
- OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATIÑO, M., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect*, v. 54, p. 399–409, 2007.
- PARISIEN, A.; ALLAIN, B.; ZHANG, J.; MANDEVILLE, R.; LAN, C. Q. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol*, v. 104, p. 1–13, 2008.
- PHILPOT, W.N.; NICKERSN, S.C. Mastitis: Counter Attack. Naperville: Babson Bros, 150p., 1991.
- PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.
- PTASHNE, M. A. Genetic Switch: Phage  $\lambda$  Revisited. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2004.
- ROBERTS, J. W. e DEVORET, R. Lysogenic induction, p. 123-144. In R. W. HENDRIX, J. W. ROBERTS, F. W. STAHL; R.A. WEISBERG, Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983.

- ROBERTS, J. W.; YARNELL, W.; BARTLETT, E.; GUO, J.; MARR, M.; KO, D. C. SUN, H.; ROBERTS. Antitermination by bacteriophage lambda Q protein. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* v. 63, p. 319-325, 1998.
- ROWEN, L., e KORNBERG, A. Primase, the dnaG protein of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, v. 253, p.758-764, 1978.
- SAKAGUCHI, Y.; HAYASHI, T.; KUROKAWA, K.; NAKAYAMA, K.; OSHIMA, K.; FUJINAGA, Y.; OHNISHI, M.; OHTSUBO, E.; HATTORI, M.; OGUMA, K. The genome sequence of Clostridium botulinum type C neurotoxin converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc Natl Acad Sci*, v. 102, p. 17472–17477, 2005.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: A laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 2 e 3, 2001.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite, ed. Manole, 2007.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J Am Vet Med Assoc*, v. 130, p. 199-207, 1957.
- SCHOOLNIK, G. K.; SUMMERS, W.C.; WATSON, J. D. Phage offer a real alternative. *Nature Biotechnology*, v. 22, n. 5, p. 505-506, 2004.
- SCHROEDER J. W. Bovine mastitis and milking management, Mastitis control programs. National Mastitis Council, 1997.
- SHAFFER-WEAVER, K. A.; PIGHETTI, G. M.; SORDILLO, L. M. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 212, p. 271–280, 1996.
- SHOTLAND, Y.; SHIFRIN, A.; ZIV, T.; TEFF, D.; KOBY, S., KOBILER, O.; OPPENHEIN, A. B. Proteolysis of bacteriophage lambda CII by Escherichia coli FtsH (HflB). *J. Bacteriol*, v. 182, p. 3111-3116, 2000.

- SILVER, L. L., BOSTIAN, K. A. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotics resistance. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 37, p. 377-383, 1993.
- SKALKA, A. DNA replication: bacteriophage  $\lambda$ . **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 78, p. 201-211, 1977.
- SKURNIK, M.; PAJUNEN, M.; KILJUNEN, S. Biotechnological challenges of phage therapy. **Biotechnol Lett**, v. 29, p. 995–1003, 2007.
- SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: facts and fiction. **Int J Med Microbiol**, v. 296, p. 5–14, 2006.
- SLOPEK, S.; WEBER-DABROWSKA, B.; DABROWSKI, M.; KUCHAROWICZ-KRUKOWSKA, A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 35, p. 569–583, 1987.
- SMITH, K. L.; HOGAN, J. S.; WEISS, W. P. Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. **J Anim Sci**, v. 75, p. 1659-1665, 1997.
- SMITH, H. W. e HUGGINS, M. B. Successful treatment of experimental Escherichia coli infections in mice using phages: its general superiority over antibiotics. **Journal of General Microbiology**, v. 128, p. 307-318, 1982.
- SONI, K. A.; NANNAPANENI, R.; HAGENS, S. Reduction of Listeria monocytogenes on the Surface of Fresh Channel Catfish Fillets by Bacteriophage Listex P100. **Foodborne pathogens and disease**, v. 7, n. 4, p. 427-434, 2010.
- SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G. JR. Bacteriophage therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 649–659, 2001.
- SUMMERS, W.C. Bacteriophage Therapy. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 55, p. 437-451, 2001.
- SUTTLE, C.A. Viruses in the sea. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 356-361, 2005.

- SUTTLE, C. A. Marine viruses—major players in the global ecosystem. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, p. 801–812, 2007.
- THINGSTAD, T. F.; BRATBAK, G.; HELDAL, M. Aquatic phage ecology. In: *Bacteriophage Ecology*. Abedon S. T. (ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press, p. 251–280, 2008
- TOPLEY, W. W. C.; WILSON, G. S. Principles of bacteriology, virology and immunity. B.C. Decker Publisher, London, United Kingdom, 1990.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 8.ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.
- VERMA, V.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Characterization of a T7-Like Lytic Bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: A Potential Therapeutic Agent. **Curr Microbiol**, v. 59, p. 274–281, 2009.
- VIANNI, M.C.E. Frequência de isolamento de *Staphylococcus coagulase* positiva e *coagulase* negativa na mastite subclínica em bovinos e sua influência na produção Láctea. **Arquivos Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.15, p. 113-9, 1992.
- VINODKUMAR, C. S.; NEELAGUND, Y. F.; KALSURMATH, S. Bacteriophage in the treatment of experimental septicaemia mice from a clinical isolate of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. **J Commun Dis**, v. 37, p. 18–29, 2005.
- WAGTER, L. C.; MALLARD, B. A.; WILKIE, B. N.; LESLIE, K. E.; BOETTCHER, P. J.; DEKKERS, J. C. M. A quantitative approach to classifying Holstein cows based on antibody responsiveness and its relationship to peripartum mastitis occurrence. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 488-498, 2000.
- WALDOR, M. K.; FRIEDMAN, D. I.; ADHYA, S. L. Phages: Their roles in bacterial pathogenesis and biotechnology. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 2005.
- WEINBAUER, M.G.; RASSOULZADEGAN, F. Are viruses driving microbial diversification and diversity? **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2004.

- WEINBAUER, M. G. e SUTTLE, C. A. Potential significance of lysogeny to bacteriophages production and bacterial mortality in coastal waters of the gulf of Mexico. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 4374–4389, 1996.
- WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W. H.; VAN OIRSCHOT, J. T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Vet. Microbiol**, v. 88, p. 27– 45, 2002.
- WILLS, Q. F.; KERRIGAN, C.; SOOTHILL, J. S. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, p. 1220–1221, 2005.
- WITHEY, S.; CARTMELL, E.; AVERY, L.M.; STEPHENSON, T. Bacteriophages – potential for application in wastewater treatment processes. **Science of the Total Environment**, v. 339, n. 1-3, p. 1-18, 2005.
- YAO, J. D. C. e MOELLERING JR, R. C. Antimicrobial agents, p. 1474-1504. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C, 1995.
- ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; WELLENBERG, G. J.; GROHN, Y. T. Cow and quarter level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. **J Dairy Sci**, v. 84, p. 2649-2663, 2001.