

VINÍCIUS DA SILVA DUARTE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LÍTICA DOS BACTERIÓFAGOS
vB_TpyM_UFV13, vB_TpyP_UFV21 e vB_TpyM_UFV26
ESPECÍFICOS PARA *Trueperella pyogenes* ASSOCIADA A
PROBLEMAS REPRODUTIVOS NO PUERPÉRIO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

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

T

Duarte, Vinícius da Silva, 1987-
D812a Avaliação da atividade lítica dos bacteriófagos vB_TpyM_
2014 UFV13, vB_TpyP_UFV21 e vB_TpyM_UFV26 específicos para
Trueperella pyogenes associada a problemas reprodutivos no
puerpério / Vinícius da Silva Duarte. – Viçosa, MG, 2014.
xvi, 50f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 43-50.

1. Bovino de leite. 2. Bovino de leite -Reprodução.
3. Bovino de leite - Doenças. 4. Puerpério. 5. Bacteriófagos. 6.
Trueperella pyogenes. 7. Biofilme. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 636.2142

VINÍCIUS DA SILVA DUARTE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LÍTICA DOS BACTERÍOFAGOS
vB_TpyM_UFV13, vB_TpyP_UFV21 e vB_TpyM_UFV26
ESPECÍFICOS PARA *Trueperella pyogenes* ASSOCIADA A
PROBLEMAS REPRODUTIVOS NO PUERPÉRIO**

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

APROVADA: 25 de Julho de 2014

Prof. Poliane Alfenas Zerbini

Prof. Monique Renon Eller

Prof. Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

Prof. Cynthia Canêdo da Silva
(Coorientadora)

Dedico este trabalho às bases da minha vida: amado DEUS, aos meus pais ADALBERTO e MARIA, minhas irmãs LARISSA e FRANCIELE, minha FAMÍLIA querida, aos bons e velhos AMIGOS e a JESSIKA, amor da minha vida.

*"Bons ventos para nós
Para assim sempre
Soprar sobre nós..."*

(O Teatro Mágico)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pelo dom da vida! Por colocar em minha trajetória pessoas sem as quais não teria chegado até aqui. Por me dar força para concluir mais uma sonhada etapa, o Mestrado.

Agradeço aos meus pais Adalberto e Maria, exemplos de vida, de dedicação, trabalho, superação e amor incondicional. Os maiores incentivadores da minha vida! Obrigado por existirem, amo vocês!!!

Agradeço às minhas irmãs Larissa e Franciele pelas palavras amorosas e incentivadoras. Vocês são um exemplo de dedicação e amizade. Eu amo vocês!!!

Agradeço à minha família, a base de tudo. Como a família é muito grande, seria leviano citar nomes, pois certamente me esqueceria de alguém. Contudo, em especial, gostaria de agradecer aos meus avós! Vô Zé Lopes e Vô Pedro, muita saudade e certeza de que vocês iluminam a minha trajetória. Vó Nega e Vó Pitita, mães duas vezes, que sempre em suas orações pediram que Deus guiasse a minha vida pelo melhor caminho.

Agradeço ao meu Orientador Sérgio Oliveira de Paula. Sinceramente não tenho palavras para agradecer o que você me proporcionou desde 2009 quando entrei no laboratório, uma mistura de crescimento pessoal e profissional. Sem dúvida alguma todas as conversas que tivemos foram decisivas na minha vida! Obrigado por me aturar nas teimosias! Tenho certeza que a palavra orientador é mera formalidade, o sentimento que tenho é de um eterno amigo e irmão.

Agradeço ao Roberto Sousa Dias, o eterno MESTRE, no sentido literário da palavra mesmo. Brother, você sabe a admiração e respeito que tenho por ti. Muito obrigado pelos ensinamentos esses anos todos. Obrigado pela amizade sincera, por aguentar a minha teimosia. O ambiente de trabalho irreverente, a superação nos momentos difíceis, só foi possível porque você estava lá! Este trabalho é tão seu quanto meu. Que esta parceria jamais acabe!

Agradeço aos amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM), amizades de longos anos, por estarem sempre dispostos a sanar quaisquer tipo de dúvida, pelo ambiente de trabalho ímpar, com certeza não encontrado em nenhum outro lugar.

Agradeço aos Professores Leandro Licursi e Eduardo Marques pelos ensinamentos e prontidão em me atender.

Agradeço aos meus coorientadores, Professor Hilário Cuquetto Mantovani e Professora Cynthia Canêdo da Silva, sempre dispostos a me atender e contribuir com sugestões de grande valia ao meu trabalho.

Agradeço ao meu IC Jonas, figuraça!!! Obrigado pela contribuição, por aguentar a minha chatice e me ensinar também! Desde o cursinho você sempre se destacou, espero que esta parceria esteja apenas começando.

Agradeço aos meus amigos do mestrado, em especial Josi, Renato e Fernando. As disciplinas não seriam as mesmas sem vocês. Que venha o Doutorado!

Agradeço aos meus amigos da Vet-08, Capivaras, [D.C] e a eterna República T.Q.P, minha segunda casa. Aos amigos de São Paulo, desde o tempo do Vaquinha, até as quintas no *Oliverrá*. Aos que acompanharam mais de perto esta trajetória: Cleitinho, brother de infância; Mi Harumi, amizade rara; Le Lepore, parceira das antigas! Muitas amizades construídas, todas contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional e, de alguma forma, este trabalho é reflexo disso. Amo vocês!

Agradeço à minha namorada Jessika pelo amor, paciência e palavras de incentivo. Por sempre acreditar no meu potencial. Ao meu sogro João, minha sogra Lucimar, pessoas diferenciadas! Amo vocês!

Agradeço à curadora da Embrapa Gado de Leite, Dra. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito, pela gentileza e atenção em ceder os isolados de *T. pyogenes*.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa e à cidade de Viçosa por me proporcionarem tamanho aprendizado desde a Graduação.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, aos Professores, colegas, técnicos de laboratório e secretárias. Obrigado pela oportunidade!

Agradeço à banca examinadora pela disponibilidade e considerações.

Agradeço aos Núcleos de Biomoléculas e Microscopia da UFV. Obrigado pela atenção e disposição em me ajudar.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e a conclusão de mais uma etapa na minha vida.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	x
Lista de figuras	xi
Lista de abreviaturas e símbolos	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. Introdução	1
1.1. Pecuária leiteira no Brasil	1
1.2. Relação entre estado reprodutivo animal e custo de produção na bovinocultura leiteira	1
1.3. Patologias infecciosas e inflamatórias uterinas do puerpério de origem bacteriana inespecífica	2
1.4. A utilização de antibióticos e hormônios no tratamento das patologias infecciosas do puerpério	4
1.5. Vacina para metrite puerperal	7
1.6. Bacteriófagos e a fagoterapia	7
1.7. Utilização de bacteriófagos no controle de formação de biofilmes ...	11
2. Objetivo	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. Materiais e Métodos	13
3.1. Isolamento e caracterização de isolados bacterianos	13
3.1.1. Coleta do lóquio uterino	13
3.1.2. Isolamento, identificação bacteriana e linhagens de <i>T. pyogenes</i>	13
3.1.3. Preparo do inóculo e preservação dos isolados	14
3.1.4. Extração do DNA genômico bacteriano	14

3.1.5. Amplificação, sequenciamento e análise filogenética do gene RNAr 16S	15
3.1.6. <i>Screening</i> de genes que codificam fatores de virulência por PCR	15
3.2. Isolamento e caracterização de bacteriófagos	16
3.2.1. Isolamento e plaqueamento de bacteriófagos	16
3.2.2. Propagação de bacteriófagos a partir de placas de lise	17
3.2.3. Titulação de bacteriófagos	17
3.2.4. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	17
3.2.5. Extração de material genético viral	18
3.2.6. Análise do tamanho dos genomas virais	18
3.2.7. Diversidade genômica dos bacteriófagos por RAPD	19
3.2.8. Perfil de proteínas virais por SDS-PAGE	19
3.2.9. Obtenção de anticorpos específicos para proteínas virais	20
3.2.10. Immunoblot	20
3.3. Formação de biofilmes e controle por bacteriófagos	20
3.3.1. Densidade populacional e quantificação de biofilmes	20
3.3.2. Efeito na densidade populacional de <i>T. pyogenes</i> e na formação do biofilme	21
3.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	22
4. Resultados e Discussão	22
4.1. Isolamento e caracterização bacterianas	22
4.1.1. Coleta do lóquio uterino e identificação bacteriana	22
4.1.2. Análise filogenética utilizando-se o gene RNAr 16S	23
4.1.3. <i>Screening</i> de genes que codificam fatores de virulência	24
4.2. Isolamento e caracterização de bacteriófagos	30
4.2.1. Isolamento de bacteriófagos	30
4.2.2. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	30
4.2.3. Plaqueamento, propagação e titulação de bacteriófagos	31

4.2.4. Material genético dos fagos	31
4.2.5. Perfil de proteínas virais e immunoblot	32
4.2.6. Diversidade genômica de bacteriófagos por RAPD-PCR	33
4.3. Ação de bacteriófagos na formação de biofilme de T. pyogenes	34
4.3.1. Densidade populacional bacteriana e formação de biofilmes na presença de fagos	34
4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
5. Conclusão	42
6. Perspectiva	42
7. Referências	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de sequências depositadas no Genbank para o gene *luxS*, que varia em tamanho e gêneros bacterianos26

Tabela 2 – Porcentagem de redução de crescimento bacteriano dos isolados *T. pyogenes* 3933 e *T. pyogenes* 3934 na presença dos bacteriófagos vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26 (MOI de 0,1)36

Tabela 3 – Porcentagem de redução na formação de biofilme dos isolados *T. pyogenes* 3933 e *T. pyogenes* 3934 na presença dos bacteriófagos vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26 (MOI de 0,1)36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Principais morfotipos de bacteriófagos caracterizados8
- Figura 2** – Número de vírus procarióticos descritos de 1967 até 20119
- Figura 3** – Dendograma filogenético baseado na análise “Neighbour-Joining” da região 16S RNAr dos isolados *E. cloacae* (11, 19 e 24), *Shigella sonnei* (7 e 12), *Bacillus licheniformes* (3) e *Enterococcus faecium* (23) e das linhagens de *T. pyogenes* 3933 (9) e 3934 (5) baseado em 1000 réplicas de *bootstrap*. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*. A cepa de *Sulfolobus shibatae* foi utilizada como *outgroup*23
- Figura 4** – Dendograma filogenético baseado na análise “Neighbour-Joining” dos genes que codificam fatores de virulência *fimA* (A), *plo* (B), *nanH* (C) e *luxS* (D) baseado em 1000 réplicas de *bootstrap*. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*29
- Figura 5** – Gel de eletroforese em campo pulsado de DNA de bacteriófagos. C (Concatâmero), L (Lambda HindIII), 13 (vB_TpyM-UFV13), 21 (vB_TpyP-UFV21) e 2631
- Figura 6** – A – SDS-Page evidenciando as principais proteínas dos três bacteriófagos. Setas representam proteínas comuns aos três vírus. Os asteriscos significam proteínas presentes em cada fago. M.M (Marcador Molecular); 13 (vB_TpyM-UFV13), 21 (vB_TpyP-UFV21) e 26 (vB_TpyM-UFV26). B – Immunoblot mostrando as principais proteínas capazes de gerar anticorpos neutralizantes. Ac anti-26 e Ac anti-21 representam, respectivamente, anticorpos primários produzidos para os vírus 26 e 21. Setas vermelhas e asteriscos preto indicam proteínas comuns aos dois vírus, enquanto que setas verdes e asterisco azul indicam proteínas ínticas a cada vírus32
- Figura 7** – A – Padrão polimórfico gerado a partir do *primer* OPL5 par os genomas virais e bacteriano. M.M (Marcador Molecular 1kb); 6 (vB_TpyP-UFV6), 13 (vB_TpyM-UFV13), 21 (vB_TpyP-UFV21), 26 (vB_TpyM-UFV26) e B (bactéria). B – Dendograma filogenético montado a partir do perfil polimórfico gerado em A com base em 1000 réplicas de *bootstrap*. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*34

Figura 8 – MET dos bacteriófagos vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26. Aumentos de 140.000 e 250.000 X35

Figura 9 – Porcentagem de crescimento bacteriano dos isolados *T. pyogenes* 3933 e 3934 na presença dos bacteriófagos vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26 (MOI de 0,1) e na ausência dos mesmos (controle). Asteriscos referem-se à diferença significativa em relação ao controle (** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$ e * $P \leq 0,05$) 37

Figura 10 – Porcentagem de inibição de formação do biofilme pelos isolados *T. pyogenes* 3933 e 3934 na presença dos bacteriófagos vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26 (MOI de 0,1) e na ausência dos mesmos (controle). Asteriscos referem-se à diferença significativa em relação ao controle (** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$ e * $P \leq 0,05$)37

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABC – *ATP-Binding Cassette*
AHLs – N-Acil-L-Homoserina Lactonas
AI's – Autoindutores
ANOVA - Análise de Variância
BHI – Brain Heart Infusion
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
CbpA - Proteína de Ligação ao Colágeno
CDC – *Cholesterol-Dependent Cytolysin*
DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*
DIM – *Days in Milk*
D.O – Densidade Óptica
FDA – *Food and Drug Administration*
FimH – Fimbria H
IDSA – *Infectious Disease Society of America*
MBEC – *Minimum Biofilm Eradication Concentration*
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MOI – *Multiplicity of Infection*
MRSA – *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*
NanH e NanP – Neuraminidases H e P
NMM – Núcleo de Microscopia e Microanálise
PDPL-RV – Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira da Região de Viçosa
PFGE – *Pulse-Field Gel Electrophoresis*
PGF2 α – Prostaglandina F2 alfa
Plo – Piolisina
RAPD – *Randomly Amplified Polymorphic DNA*
RDP – *Ribosomal Database Project*
RPM – Rotações por minuto
SPE – Substância Polimérica Extracelular
Tampão SM – Tampão de diluição de fago SM
TCA – Ácido Tricloroacético

UFP – Unidades Formadoras de Placas

VRE – *Vancomycin-Resistant Enterococcus*

RESUMO

DUARTE, Vinícius da Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2014. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LÍTICA DOS BACTERÍOFAGOS vB_TpyoM_UFV13, vB_TpyoP_UFV21 e vB_TpyoM_UFV26 ESPECÍFICOS PARA *Trueperella pyogenes* ASSOCIADA A PROBLEMAS REPRODUTIVOS NO PUERPÉRIO.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Cynthia Canêdo da Silva.

A bovinocultura leiteira vem sofrendo por profundas transformações nos últimos anos no que diz respeito, principalmente, ao aumento da produtividade com um custo de produção cada vez menor. Em meio a todos os fatores que comprometem o êxito de um sistema de produção de leite, o estado reprodutivo dos animais ocupa um lugar de destaque. Problemas reprodutivos em uma fazenda levam a perdas econômicas devido ao aumento no intervalo entre partos, custos extras com o tratamento da enfermidade, aumento no descarte involuntário de animais e uma diminuição no potencial genético do rebanho. Neste cenário, as patologias infecciosas e inflamatórias uterinas do puerpério (período pós-parto) como metrite, endometrite clínica e endometrite subclínica são as mais comuns, sendo, geralmente, causadas por microorganismos de origem ambiental como *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella* spp. A utilização de antibióticos e hormônios são os tratamentos mais utilizados no controle destas enfermidades, porém o uso indiscriminado de antibióticos nas últimas décadas proporcionou o aparecimento de bactérias resistentes a mais de uma classe de agentes antimicrobianos. Sendo assim, a fagoterapia surge como uma alternativa natural, não tóxica e economicamente viável para o controle destes microorganismos. Neste estudo, isolamos e caracterizamos três bacteriófagos (vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-26) que apresentaram perfil protéico e padrão de bandas (RAPD) diferentes, o que auxiliou na diferenciação viral, principalmente entre os membros da família *Myoviridae*. Estes fagos reduziram o número de células viáveis de *T. pyogenes* (variação de 9,7 a 17,4%). Além disso, foram capazes de prevenir a formação de biofilme, com valores de redução que oscilarem entre 42,5 a 63,1%. Este trabalho possui como perspectiva o sequenciamento de seus genomas, testes farmacocinéticos utilização destes vírus no controle de enfermidades que acometem vacas de leite como mastite e metrite.

ABSTRACT

DUARTE, Vinícius da Silva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **EVALUATION OF THE LYTIC ACTIVITY OF vB_TpyoM_UFV13, vB_TpyoP_UFV21 e vB_TpyoM_UFV26 BACTERIOPHAGES SPECIFIC FOR *Trueperella pyogenes* ASSOCIATED WITH PROBLEMS IN THE REPRODUCTIVE PUERPERIUM.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani and Cynthia Canêdo da Silva.

The dairy cattle has suffered profound changes in recent years with regard mainly to increased productivity with a cost of production dwindling. Amid all the factors that impact the success of a system of milk production, reproductive status of animals takes a prominent place. Reproductive problems in a farm lead to economic losses due to increased calving interval, extra costs to the treatment of disease, increased involuntary culling of animals and a decrease in the genetic potential of the herd. In this setting, uterine infectious and inflammatory diseases of the puerperium (postpartum) as metritis, clinical endometritis and subclinical endometritis are the most common and are usually caused by organisms of environmental origin such as *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* and *Prevotella* spp. The use of antibiotics and hormones are the most commonly used treatments in the control and treatment of these diseases, but the indiscriminate use of antibiotics over the past decades afforded the appearance of bacteria resistant to more than one class of antimicrobial agents. Thus, the phage appears as a non-toxic, natural and economically viable alternative for the control of these microorganisms. In this study, we isolated and characterized three bacteriophages (vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 and vB_TpyM-26) that showed protein profile and banding pattern (RAPD) different, which helped in the their differentiation, especially among members of the family Myoviridae. These phages reduced the number of viable cells of *T. pyogenes* (range 9.7 to 17.4%). In addition, they were able to prevent biofilm formation, with reduction values that oscillate between 42.5 to 63.1%. This work has as perspective the genome sequence of their genomes and pharmacokinetic tests using these viruses in the control of diseases that affect dairy cows as mastitis and metritis.

1. Introdução

1.1. Pecuária leiteira no Brasil

A atividade leiteira sofreu profundas transformações nos últimos anos no que diz respeito, principalmente, ao aumento da produtividade com um custo de produção cada vez menor. Frente a esta situação, o animal é invariavelmente desafiado a atender índices zootécnicos extremos (Lemos *et al.*, 2003; Faria & Corsi, 1993).

De acordo com IBGE (Brasil, 2012), associado a dados fornecidos pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, o Brasil é terceiro maior produtor de leite no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e Índia. Contudo, apesar de possuir um dos maiores rebanhos leiteiros do mundo, a produtividade brasileira é muito baixa, superando apenas a do rebanho da Índia dentre os dez maiores produtores de leite no mundo (Maia *et al.*, 2013).

1.2. Relação entre estado reprodutivo animal e custo de produção na bovinocultura leiteira

Para Faria & Corsi (1993), em meio a todos os fatores que comprometem o êxito de um sistema de produção de leite, o estado reprodutivo dos animais ocupa um lugar de destaque. O período de serviço (intervalo entre o parto até a prenhez) deve ser mantido em torno de 82 dias, e para que isso ocorra, é importante que o animal no puerpério volte à reprodução novamente, garantindo, assim, um intervalo de 12 meses entre partos.

Problemas reprodutivos em uma fazenda de leite levam a perdas econômicas devido ao aumento no intervalo entre partos, custos extras com o tratamento da enfermidade, aumento na taxa de descarte de animais e redução no potencial genético do rebanho (Malinowski *et al.*, 2011). Além disso, o bem estar animal é comprometido, devido ao desconforto e dor ocasionados pela inflamação e aumento de volume do útero (Bicalho *et al.*, 2012). Segundo Machado *et al.* (2014), na América do Norte, a metrite afeta entre 10 a 20 % das vacas, enquanto que a incidência de endometrite fica entorno de 28 % (varia de 5,3 a 52,6 %), com um custo que oscila entre US\$ 329-386 para cada caso de metrite devido ao tratamento e aos efeitos da doença no rebanho, como baixa produção de leite e descarte do animal.

1.3. Patologias infecciosas e inflamatórias uterinas do puerpério de origem bacteriana inespecífica

Inúmeros fatores podem atrasar o retorno da vaca ao cio no momento adequado, mas as patologias infecciosas e inflamatórias uterinas do puerpério são as mais comuns, sendo, geralmente de origem ambiental e inespecífica, por serem desconhecidas as bactérias que inicialmente colonizaram o órgão, assim como aquelas que causam os sinais clínicos típicos da infecção (Azawi, 2008).

Segundo Sheldon *et al.* (2009), as patologias inflamatórias do útero podem ser classificadas em metrite puerperal, metrite clínica e endometrites clínica e subclínica. A metrite puerperal é caracterizada pelo aumento anormal do útero, descarga uterina fétida de aspecto aquoso e coloração vermelha/marrom, sinais de toxemia e temperatura retal acima de 39,5 °C. Na metrite clínica observa-se aumento do útero com descarga purulenta saindo pela vagina e sem sinais de toxemia. Na maioria das vezes são diagnosticadas até o vigésimo primeiro dia após o parto. A endometrite clínica é diferenciada pela presença de descarga vaginal purulenta (mais de 50 % de pus) a partir do 21º ou mais dias após o parto ou descarga mucopurulenta após o 26º dia após o parto. Já na endometrite subclínica não são observadas alterações detectáveis clinicamente, sendo necessário o exame citológico com contagem de neutrófilos (maior que 18 % entre os dias 21 e 33 do pós-parto ou maior que 10 % no período entre os dias 34 e 37 do puerpério).

Recentes trabalhos têm utilizado técnicas independentes de cultivo (metagenômica), como o *PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) e o pirosequenciamento da subunidade 16S do RNA ribossomal, no estudo do microbioma uterino de vacas de leite. Machado *et al.* (2012) encontrou a presença de patógenos conhecidos como *Fusobacterium* spp., *Trueperella* spp., *Ureaplasma* spp., *Prevotella* spp. e *Bacteroides* spp. Já outros micro-organismos identificados, como *Odoribacter* spp., *Peptoniphillus* spp. e *Helcococcus* spp., podem ser potencialmente patogênicos (Machado *et al.*, 2012). Para Santos & Bicalho (2012) o estudo da complexa ecologia microbiana uterina é crítico para o desenvolvimento de estratégias para controle das enfermidades uterinas no puerpério. Neste trabalho, Santos & Bicalho (2012) mostraram que membros de diversos filos estão presentes nos

fluidos uterinos coletados de vacas sadias e doentes (metrite e endometrite), como Bacteroidetes, Fusobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Tenericutes. Além disso, representantes de filos denominados co-dominantes, que aparecem menos frequentemente, como os filos Spirochaetes, Synergistetes, e Actinobacteria foram encontrados.

Embora uma diversidade imensa de bactérias possa ser isolada de infecções uterinas no período pós-parto, *Trueperella pyogenes*, anteriormente chamado *Arcanobacterium pyogenes* (Yassin *et al.*, 2011) é frequentemente associada à essas enfermidades (Azawi, 2008). *T. pyogenes* é uma bactéria gram-positiva, sem motilidade, não formadora de esporos, bastonete, comensal e oportunista quando causadora de prejuízos econômicos em animais domésticos como ruminantes e suínos devido a infecções supurativas na pele, articulações e outros órgãos que levam a doenças como metrite, mastite, abscesso hepático, pneumonia, artrite, vesiculite, endocardite, além de episódios de aborto (Santos *et al.*, 2012; Jost & Billington, 2005).

Estudos demonstram que o isolamento de cepas de *T. pyogenes* de secreções uterinas de vacas no 21º dia pós-parto está relacionado a uma endometrite severa e infertilidade ao primeiro serviço, podendo ou não estar combinado com *E. coli* (Azawi, 2008). Já Santos *et al.* (2012) citam infecções uterinas crônicas e tardias durante a lactação, a partir do 35º DIM (*Days in Milk*) associadas a *T. pyogenes*. Admite-se que o crescimento de *T. pyogenes* seja favorecido pela infecção intrauterina precedente de *E. coli* durante a primeira semana do puerpério. Este micro-organismo modifica o ambiente uterino, tornando-o hipóxico devido ao maior metabolismo microbiano pré-existente, e à atividade de células inflamatórias polimorfonucleadas como os neutrófilos, oferecendo suporte ao estabelecimento de *T. pyogenes* (Azawi, 2008).

Adicionalmente, alguns estudos mostram a prevalência de anaeróbios em infecções uterinas, mas é possível inferir que manifestações severas sejam ocasionadas por um sinergismo entre *T. pyogenes* e organismos anaeróbios como *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella* spp., anteriormente chamado *Bacteroides* spp. (Azawi, 2008). Este sinergismo entre *T. pyogenes* e anaeróbios é proporcionado pela produção de fatores de crescimento que auxiliam o desenvolvimento de *F. necrophorum*, que é secundário à

colonização de *T. pyogenes*, produtor de leucotoxina, hemolisina, hemaglutinina, adesinas, fator de agregação plaquetária, proteases e DNases, enquanto *Prevotella spp.* produz substâncias que evitam a fagocitose. Para Santos *et al.* (2012) e Bicalho *et al.* (2012) *F. necrophorum* está associado com infecção uterina aguda, principalmente na segunda semana pós-parto.

1.4. A utilização de antibióticos e hormônios no tratamento das patologias infecciosas do puerpério

O uso incorreto e indiscriminado de antibióticos tem levado a seleção de bactérias resistentes a antimicrobianos e cepas mais patogênicas, além de problemas de saúde pública, principalmente atribuídos ao uso de antibióticos como fatores de crescimento e uso profilático (Santos *et al.*, 2010).

Golkar *et al.* (2014) relatam que, já no ano de 2008, o IDSA (*Infectious Disease Society of America*) ratificou que o mundo vive uma crise emergente de resistência microbiana à antibióticos, como verificado nas pandemias causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA – *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE – *vancomycin-resistant enterococci*). Estes autores também apresenta a estimativa de que $2,3 \times 10^7$ kg de antibióticos são usados anualmente nos Estados Unidos, enquanto que 7×10^6 kg de antibióticos, principalmente penicilinas e tetraciclina, são utilizados como promotores de crescimento em animais de produção. Já na agricultura, aproximadamente 7×10^6 kg de antimicrobianos como tetraciclina e estreptomicina são empregados como pesticidas.

Neste mesmo trabalho, Golkar *et al.* (2014) revelaram que o custo de um paciente acometido por uma infecção originária de um dado micro-organismo droga-resistente varia entre US\$18.588,00 e US\$29.069,00, totalizando um gasto de mais de 20 bilhões de dólares no sistema de saúde dos Estados Unidos.

Mesmo diante deste cenário, a terapia com o uso de antibióticos ainda é o tratamento mais comum para infecções uterinas no puerpério, podendo ser de uso sistêmico ou local (Santos *et al.*, 2012; Azawi, 2008). Além de ser o tratamento de escolha, nos Estados Unidos, por exemplo, é comum administrar o antibiótico tilosina (classe dos macrolídeos) em doses sub-terapêuticas

profiláticas para abscessos hepáticos (Jost & Billington, 2005). Ainda, a tetraciclina é utilizada como promotor de crescimento na prevenção de diversas enfermidades em doses sub-terapêuticas, como citado anteriormente, ou no tratamento de metrite, por exemplo. Tendo em vista o uso indiscriminado destes dois antibióticos, é comum na literatura trabalhos que relatam a resistência de *T. pyogenes* a estes compostos ou análogos pertencentes à classe destas substâncias (Jost & Billington, 2005).

Santos *et al.* (2010) avaliaram a resistência antimicrobiana de setenta e dois isolados de *T. pyogenes* provenientes de vacas leiteiras da raça holandesa no puerpério, que exibiram resistência aos sete agentes testados (amoxicilina (56,9 %; ampicilina 86,1 %; cloranfenicol 100 %; florfenicol 59,7 %, oxitetraciclina 54,2 %, penicilina 86,1 % e tetraciclina 50 %). 88,9 % dos isolados foram resistentes a pelo menos três antibióticos, sendo, portanto, classificados como multidroga resistentes.

Já Malinowski *et al.* (2011) avaliaram 161 isolados de *T. pyogenes* oriundas de vacas leiteiras diagnosticadas com metrite e endometrite. Foram testados dezesseis antibióticos (amoxicilina com ácido clavulânico, ampicilina, bacitracina, cefoperazona, gentamicina, cefapirina, ceftiofur, marbofloxacina, lincomicina, neomicina, norfloxacin, cloxacilina, oxitetraciclina, penicilina, rifaximina e estreptomicina). Observou-se 63,7 % de resistência a oxitetraciclina e a terapia mais eficaz foi a combinação amoxicilina com ácido clavulânico (97,3 %).

Desta forma, o êxito no tratamento depende de um conjunto de ações que deve ser realizado, como: eliminação dos fluídos uterino; estudo dos principais micro-organismos envolvidos; avaliação da susceptibilidade dos organismos com relação às drogas usadas; determinação da concentração inibitória mínima do antibiótico que seja efetiva; número de antibióticos usados e o grau de exposição do endométrio ao antimicrobiano (Santos *et al.*, 2012; Azawi, 2008).

De acordo com Azawi (2008) alguns critérios devem ser levados em consideração na escolha do antibiótico:

a) Atividade antimicrobiana contra os principais patógenos e manutenção da eficácia no ambiente uterino (anaeróbico, lóquio de composição orgânica, como debris celulares, e presença de bactérias aeróbias e anaeróbias gram-

negativas e gram-positivas). Sendo assim, o uso de aminoglicosídeos (ineficaz em meios anaeróbios), sulfonamidas (sem eficácia na presença de compostos orgânicos) e administração intrauterina de penicilinas (algumas bactérias produzem penicilinase) não são recomendados;

b) Presença do antibiótico em concentração mínima no sítio de ação. É dependente das propriedades do veículo e da droga, devendo apresentar uma farmacocinética de rápida distribuição na cavidade uterina e eficaz penetração no endométrio;

c) A droga não deve inibir os mecanismos naturais de defesa do útero, além de não produzir irritação ao endométrio. Vacas com puerpério anormal ocasionado por distocia, retenção de placenta ou metrite apresentam uma diminuição da atividade fagocitária uterina.

Infusões intrauterinas com antibióticos são visadas para o tratamento da endometrite e aconselhadas na situação em que se deseja a irritação do endométrio, o que leva a um efeito luteolítico com conseqüente remoção dos efeitos inibitórios da progesterona nos mecanismos de defesa natural do útero (Azawi, 2008; Chaudhery *et al.*, 1987; Paisley *et al.*, 1986).

Mesmo de utilização cotidiana por muitos veterinários, a infusão intrauterina tem sido desencorajada (Azawi, 2008; Bretzlaff, 1987). Acredita-se que a fertilidade seja afetada devido ao longo tempo para reestabelecimento histológico do endométrio após a necrose do mesmo (Azawi, 2008; Dwivedi and Singh, 1975). Além disso, há possibilidade de irritação do oviduto e suas conseqüências na ovocitação (Azawi, 2008; Noakes *et al.*, 2002; Roberts, 1986).

O uso de um antibiótico de amplo espectro é aconselhado devido à diversidade microbiana no útero, destacando-se o grupo das tetraciclina, como a oxitetraciclina (Azawi, 2008; Sheldon *et al.*, 2004), e as cefalosporinas de terceira geração, exemplo o ceftiofur. Outra opção de tratamento é o hormonal, a partir do uso de prostaglandinas ou estradiol (Azawi, 2008).

A utilização de Prostaglandina F2 alfa (PGF₂α) tem sido o tratamento de escolha em vacas com endometrite (Azawi, 2008; Drillich *et al.*, 2005; Janowski *et al.*, 2001) devido ao decréscimo no nível de progesterona e o aumento na concentração de estrógeno associados à luteólise e ao crescimento folicular, proporcionando uma resistência eficiente contra a infecção uterina e com efeito

pernicioso mínimo no leite, o que não leva ao seu descarte (Azawi, 2008; Mansour *et al.*, 2003).

O estradiol é indicado por estimular as contrações do miométrio, a fagocitose e a secreção de muco (Hussain, 1989; Bretzlaff, 1987; Roberts, 1986), entretanto o real efeito benéfico sobre a metrite e o desempenho reprodutivo não é um consenso, como descrito por Azawi (2008).

1.5. Vacina para metrite puerperal

O desenvolvimento de uma vacina eficaz para metrite tem sido estudado, o que acarretaria em uma diminuição no uso de antibióticos. Para Jost & Billington (2005), a hemolisina piolisina (PLO) seria um bom candidato vacinal para uma vacina de subunidade, como demonstrado na vacinação de camundongos com piolisina recombinante, que se tornaram protegidos depois de um desafio intraperitoneal com 10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) de *T. pyogenes*. Entretanto, a capacidade desta vacina é apenas a indução de resposta imune humoral, mas deficiente em gerar uma resposta imune celular, o que pode desempenhar importante papel na defesa contra a infecção por *T. pyogenes* em vacas leiteiras a campo. A resposta imune celular é importante porque esta bactéria possui a capacidade de invadir e sobreviver dentro de células epiteliais e macrófagos (Jost & Billington, 2005).

É sabido, também, que o estabelecimento da doença não é devido apenas à infecção por *T. pyogenes*, mas sim por um sinergismo entre *E. coli* e *F. necrophorum*, aliado a fatores intrínsecos do hospedeiro. Sendo assim, Machado *et al.* (2014) avaliou a eficiência de cinco vacinas que possuíam diferentes combinações, que englobavam antígenos presentes em *T. pyogenes* (PLO), *E. coli* (Fimbria H, FimH) e *F. necrophorum* (leucotoxina), além de células completas inativadas. A vacinação subcutânea reduziu, de forma significativa, a incidência de metrite puerperal na primeira lactação, com aumento nos títulos de IgG contra todos os antígenos. Contudo, este trabalho não avaliou a resposta celular que, segundo Jost & Billington (2005), pode desempenhar importante papel na imunidade da vaca de leite.

1.6. Bacteriófagos e a fagoterapia

Tendo em vista as diversas limitações ao uso de antibióticos e hormônios como auxiliares no combate a infecções uterinas no pós-parto, além de vacinas em fase de desenvolvimento, a utilização de bacteriófagos como instrumento no controle de patógenos tem crescido nos últimos anos, principalmente devido ao surgimento de cepas bacterianas resistentes a diversos antibióticos (Dias *et al.*, 2013; Merrill *et al.*, 2003, Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Descobertos por Twort em 1915 (Merrill *et al.*, 2003), os vírus procarióticos infectam membros dos domínios Bacteria (bacteriófagos ou fagos) e Archaea (archeovírus), possuem estrutura análoga a de outros vírus, consistindo em um ácido nucléico envolto por capsídeo de origem protéica, complexado ou não por um envelope lipoprotéico. Os procariotos são hospedeiros fundamentais, dotados de receptores específicos para que esses vírus possam adsorver e replicar seu material genético (Ackermann & Prangishvili, 2012).

Existem fagos de DNA ou RNA, com diferentes formas e tamanhos. 96,3 % dos bacteriófagos descritos são pertencentes à ordem *Caudovirales*, que engloba as famílias *Siphoviridae*, maior representante (57,3 % dos fagos descritos), *Myoviridae* e *Podoviridae* (Figura 1). Baseado na forma do

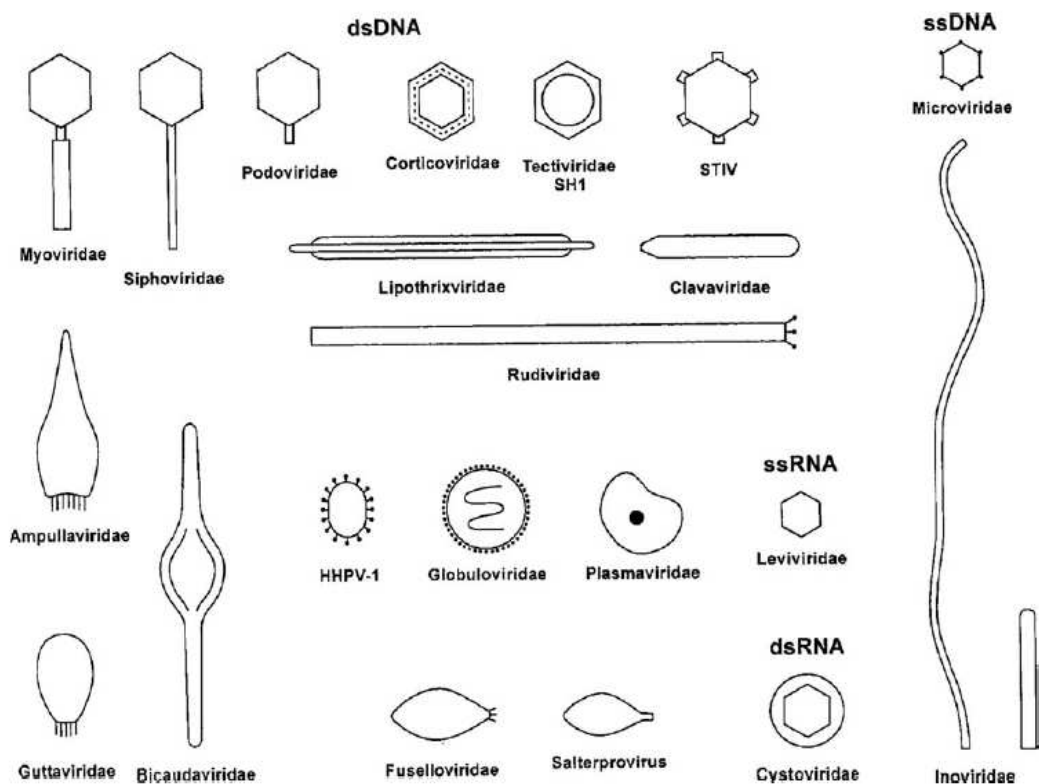


Figura 1 – Principais morfotipos de bacteriófagos caracterizados. Fonte: 8 Ackermann, 2012.

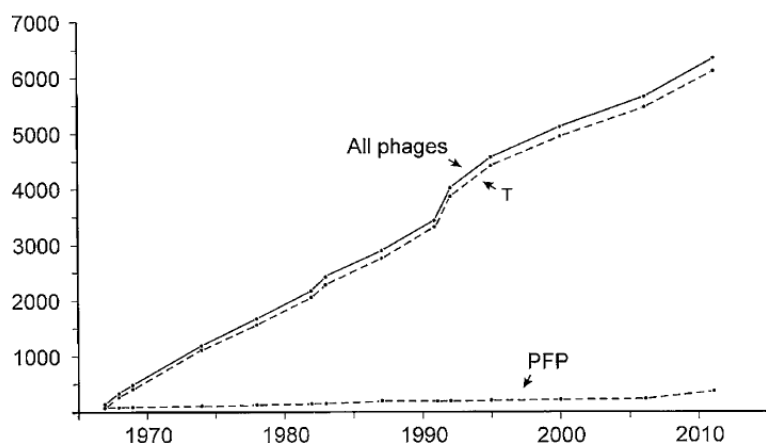
capsídeo, as famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* apresentam três morfotipos cada uma: A1, A2 e A3 para *Myoviridae*, B1, B2 e B3 para *Siphoviridae* e C1, C2 e C3 para *Podoviridae* (King *et al.*, 2012). Os outros 3,7 % constituem fagos poliédricos, filamentosos e pleomórficos (Ackermann & Prangishvili, 2012; Figura 2).

São descritos vírus que infectam membros de 16 gêneros de archaeas, principalmente hipertermófilos e halófilos, e que infectam 179 gêneros bacterianos, sendo maioria membros dos filos Firmicutes e γ -proteobacteria (Ackermann & Prangishvili, 2012).

Os fagos são uma alternativa natural, não tóxica, economicamente viável e podem ser isolados de praticamente qualquer ambiente, como solo, água, leite oceânico, esgoto e trato gastrointestinal dos animais (Gorski *et al.*, 2003; Ashelford *et al.*, 2000).

A atividade antibacteriana dos fagos possui vantagens sobre os antibióticos: alta especificidade (Sulakvelidze *et al.*, 2001); replicação no local da infecção (Smith & Huggins, 1982); ausência de efeito colateral (Sulakvelidze *et al.*, 2001); bactérias resistentes a determinados bacteriófagos permanecem suscetíveis a outros fagos e o isolamento de novos fagos contra tais bactérias é relativamente rápido, podendo ser montado um coquetel de bacteriófagos contra vários isolados microbianos (Chopra *et al.*, 1997).

A aplicação da fagoterapia, apesar de relatos do século XIX, tornou-se disseminada por Felix d'Herelle no início do século XX no tratamento da febre tifóide em aves, disenteria por *Shigella* em coelhos e disenteria bacilar (shigelose) em humanos (Merril *et al.*, 2003). Atualmente, diversos trabalhos têm demonstrado a importância da terapia como alternativa ao uso de



antibióticos em diversos gêneros bacterianos. Por exemplo, Biswas *et al.* (2002) recuperaram camundongos que foram inoculados com

Figura 2 - Número de vírus procarióticos descritos de 1967 até 2011. PFP (Poliédrico, Filamentoso e Pleomórfico), T (Caudados). Fonte: Ackermann, 2012.

cepas de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina com uma única injeção de bacteriófagos específicos contendo 3×10^8 Unidades Formadoras de Placas (UFP). Outros exemplos de patógenos que podem ser controlados pela utilização de fagos são: *Pseudomonas aeruginosa* (Soothill, 1994), *Staphylococcus aureus* (Dias *et al.*, 2013; Matsuzaki *et al.*, 2003) e *Acinetobacter baumannii* (Soothill, 1992). Bacteriófagos também foram utilizados no tratamento de patógenos intracelulares (*Mycobacterium avium* ou *Mycobacterium tuberculosis*), doenças bacterianas em peixes e, até mesmo, em fitopatógenos do tomate (Merril *et al.*, 2003). Recentemente, nos Estados Unidos, o FDA (*Food and Drug Administration*) consentiu o uso de fagos para o controle de *Listeria monocytogenes*, cuja contaminação ocorre durante a manipulação do alimento (Golkar *et al.*, 2014).

Santos & Bicalho (2011) isolaram e sequenciaram o bacteriófago vB_EcoM_ECO1230-10, um “coliphage”, ou seja, um fago com atividade contra *E. coli*. Este fago foi testado em *E. coli* isolada de secreções uterinas advindas do útero de vacas holandesas com metrite puerperal. Este vírus tem potencial terapêutico para metrite bovina, visto que não possui módulos de controle do ciclo lisogênico, o que pode possibilitar a integração do DNA viral ao genoma hospedeiro e, quando excisado, transferir genes envolvidos com patogenicidade.

Merril *et al.* (2003) relatam que o estudo apenas qualitativo sobre a eficácia da fagoterapia é um dos principais entraves ao uso comercial de fagos. A grande maioria dos países ocidentais requer certificação farmacêutica baseada em estudos de eficácia farmacocinética em animais e humanos para que sejam liberados comercialmente. Os princípios farmacocinéticos dos fagos podem diferir entre eles, o que requer análises virais individuais (Golkar *et al.* 2013).

Nas décadas de 20 e 30, a empresa Norte Americana Eli Lilly & Co. chegou a comercializar produtos em géis a base de fagos específicos para *Staphylococcus* spp. como “Staphylo jel”, contudo a falta e a falha de estudos clínicos, preocupações teóricas e o ofuscamento com o uso dos antibióticos foram alguns dos motivos do abandono da fagoterapia nos Estados Unidos e na Europa Ocidental no século XX (Merril *et al.*, 2003).

Dois países atualmente fazem uso da fagoterapia na Europa: Geórgia e Polónia. Adicionalmente, o *Wound Care Center in Lubbock*, Texas, Estados Unidos, conduz fase de testes clínicos com fagos para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

1.7. Utilização de bacteriófagos no controle de formação de biofilmes

Biofilmes são comunidades bacterianas densas e pluricelulares aderidas (forma sésil de vida) a uma superfície (biótica ou não). Os componentes mínimos de um biofilme são os micro-organismos, a matriz extracelular - Substância Polimérica Extracelular (SPE) e a superfície de crescimento (Ribeiro, 2012; Donlan & Costerton, 2002).

Este modo de crescimento abriga e protege os micro-organismos em ambientes hostis, como a presença de antimicrobianos, de bacteriófagos e de componentes do sistema imune. Esta forma de crescimento induz a expressão gênica diferenciada das células bacterianas que estão livre no ambiente, o que modifica o metabolismo e estabelece uma nova forma de desenvolvimento (Ribeiro, 2012; Donlan & Costerton, 2002).

Muitas bactérias desenvolveram um sistema de sinalização célula-célula (*Quorum-Sensing*) a partir de pequenas moléculas, como os autoindutores (AI's) e os pequenos peptídeos (Winzer *et al.*, 2002). Estas moléculas sinalizadoras estão em baixa concentração quando o número de células é pequeno, mas à medida que o número de células aumenta a concentração molecular também se eleva, o que gera uma resposta “em concerto” que altera o comportamento celular (fisiologia-morfologia) como para geração de bioluminescência, biossíntese de antibióticos, diferenciação em biofilme, competência celular para captação de DNA exógeno (transformação), esporulação e expressão de fatores de virulência em patógenos (Winzer *et al.*, 2002).

Diversas famílias distintas de autoindutores estão sendo caracterizados, como por exemplo: *N*-Acyl-L-Homoserina Lactonas (AHLs), exclusivamente sintetizadas por bactérias gram-negativas, são pertencentes à família de proteínas LuxI que, quando acumuladas na fase exponencial de crescimento, ativam o fator de transcrição LuxR; já em bactérias gram-positivas é comum pequenos peptídeos serem utilizados como moléculas sinalizadoras, os quais

são secretados via sistema de transporte ABC (acrônimo de *ATP-Binding Cassette*) (Winzer *et al.*, 2002).

Uma nova família de autoindutores tem sido descrita, presente tanto em bactérias gram-positivas, quanto gram-negativas. O gene *luxS* expressa uma proteína que é importante para a produção do autoindutor 2 (AI-2), contudo pouco é conhecido sobre sua síntese e degradação. Sabe-se que o estado fisiológico da célula é importante, como por exemplo, a presença de glicose, ferro e NaCl induzem sua síntese, enquanto que o choque-térmico, a presença de etanol ou de peróxido de hidrogênio reprime sua produção (Winzer *et al.*, 2002).

Apesar da escassez de sequências depositadas para o gene *luxS* relacionadas ao gênero *Arcanobacterium* (apenas uma relacionada à *A. haemolyticum*), a presença desta nova classe de autoindutores pode estar associada formação de biofilme, entretanto nenhum trabalho buscou avaliar a presença deste gene com a formação de biofilme por *T. pyogenes*.

Esta forma séssil de desenvolvimento por parte de *T. pyogenes* é associada com mastites crônicas, usualmente refratárias ao uso de antibióticos (Jost & Billington 2005; Olson *et al.*, 2001). *T. pyogenes* possui um sistema de dois componentes chamado PloRS, onde PloR é um regulador de resposta que possui um domínio C-terminal LuxR e PloS é uma quinase sensora (Jost & Billington 2005). Cepas de *T. pyogenes* mutantes *ploR* são incapazes de formar biofilme. É possível, também, que esta abordagem possa ser extrapolada para a metrite bovina, visto que casos de cronicidade da doença oriunda de *T. pyogenes* são bem relatadas (Jost & Billington 2005).

Bacteriófagos podem interferir na formação ou até mesmo na estabilidade de biofilmes já estabelecidos. Além disso, fagos vêm sendo modificados geneticamente para expressar moléculas que desestabilizem o biofilme, como o fago T7, específico para *E. coli*, capaz de expressar a dispersina B, capaz de degradar um dos principais componentes do biofilme, a β -1,6-N-Acetil-d-glicosamina, polissacarídeo associado à adesão celular (Golkar *et al.*, 2014; Itoh *et al.*, 2005). Já Ribeiro (2012) investigou a capacidade do bacteriófago lítico Ecofago 17 em prevenir a formação de biofilme por *Escherichia coli* com dose de 10^2 UFP/mL e degradar até 85% de biofilmes já estabelecidos.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Isolar bacteriófagos líticos específicos para *Trueperella pyogenes*.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizações morfológica e molecular dos vírus isolados;
- Análise filogenética dos fatores de virulência produzidos por *T. pyogenes* e outras bactérias isoladas do útero de vacas leiteiras no puerpério;
- Avaliação dos isolados virais na densidade populacional de *T. pyogenes* e na prevenção na formação de biofilme por esta bactéria.

3. Materiais e Métodos

3.1. Isolamento e caracterização de isolados bacterianos

3.1.1. Coleta do lóquio uterino

Isolados bacterianos foram obtidas de vacas de leite pertencentes a propriedades ligadas ao Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira da Região de Viçosa (PDPL-RV).

A coleta do lóquio uterino foi realizada por um médico veterinário, técnico responsável pelas propriedades do Programa, em 18 vacas leiteiras que foram diagnosticadas com metrite puerperal. A obtenção do conteúdo uterino foi feita como descrito por Santos *et al.* (2010) com modificação, visto que foi utilizado cateter do tipo “Foley” número 18, ao invés de bacia de inseminação artificial.

3.1.2. Isolamento, identificação bacteriana e linhagens de *T. pyogenes*

Alíquotas diluídas do lóquio uterino foram semeadas em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com 5 % de sangue fresco de carneiro desfibrinado e incubadas por, aproximadamente, 48 horas sob condições de aerobiose e em atmosfera de 5 % de CO₂, a 37 °C (Santos *et al.*, 2010).

Colônias bacterianas foram isoladas a partir de distintas características morfológicas como, por exemplo, beta e alfa hemólises. Tais colônias foram repicadas no intuito de obterem-se culturas puras para formação de uma bacterioteca com cepas oriundas de vacas acometidas por metrite. Estes isolados foram corados pela técnica de coloração diferencial de Gram e

identificados molecularmente pela amplificação e sequenciamento da região 16S do RNA ribossomal, como descrito a seguir no item 2.1.6.

Duas linhagens de *T. pyogenes*, *T. pyogenes* 3933 e *T. pyogenes* 3934, pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, Minas Gerais), foram cedidos gentilmente pela curadora Dra. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito.

3.1.3. Preparo do inóculo e preservação dos isolados

Os isolados bacterianos utilizados durante os ensaios foram obtidos de acordo com a metodologia adaptada de Sambrook & Russell (2001), como descrito brevemente abaixo.

As bactérias foram estriadas em placas contendo meio BHI sólido (1,5 % de ágar) e incubadas a 37 °C. Após este período, colônias isoladas foram cultivadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C com agitação de 180 rotações por minuto (RPM) até alcançarem a fase exponencial de crescimento (D.O₆₀₀ entre 0,6 e 0,8). Após alcançarem esta fase, as culturas foram centrifugadas a 4.000 g por 20 minutos e o precipitado ressuscitado em 2 mL de MgSO₄ 10 mM, sendo ajustada a D.O₆₀₀ para 2.

Para preservação e utilização em estudos posteriores, os isolados foram mantidos em glicerol 50 % à temperatura de -20 °C e fazem parte da coleção de patógenos causadores de mastite e metrite bovina do Laboratório de Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral (DBG) – Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.1.4. Extração do DNA genômico bacteriano

A obtenção do genoma bacteriano seguiu a metodologia descrita por Pospiech & Neumann (1995), descrita brevemente abaixo.

Uma suspensão bacteriana em fase exponencial de crescimento foi obtida como descrito no item 2.1.4 e centrifugada a 4.000 g por 20 minutos para obtenção de um sedimento de células que foi ressuscitado em 500 µL de tampão SET (75 mM de NaCl, 25 mM de EDTA, 20 mM de Tris, pH 7.5). A esta suspensão foi adicionado lisozima (1 mg/mL) e incubado a 37 °C por 30 minutos. Após este período de incubação foram adicionados SDS (10 % v/v) e

proteínase K (0,5 mg/mL) e incubados a 55 °C por 1 hora. A seguir, 1/3 de NaCl e 1 volume de clorofórmio foram adicionados e homogeneizados manualmente por 30 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se com a centrifugação a 12.000 rpm e recolhimento do sobrenadante, e este, transferido a um novo tubo do tipo *ependorf*. Neste novo tubo 1 volume de isopropanol foi adicionado. Após a homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm, foi feita uma nova centrifugação, agora com etanol 70 %. Após essa lavagem, o tubo permaneceu aberto a temperatura ambiente para evaporação de álcool residual da amostra. Após a extração do DNA bacteriano, o mesmo foi quantificado em NanoDrop (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, EUA) e diluído para a concentração final de 100 ng/μL.

3.1.5. Amplificação, sequenciamento e análise filogenética do gene RNAr 16S

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para amplificação do DNA entre as posições 27 e 1492 da região 16S do RNA ribossomal como descrito por Line (1995). Os *amplicons* foram purificados com o kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação, os mesmos foram encaminhados para sequenciamento, que foi realizado pela empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul). *Contigs* foram montados utilizando-se o programa “BioEdit” (Califórnia, USA) e as sequências resultantes foram comparadas com as já depositadas em bancos de dados como RDP (*Ribosomal Database Project*) e BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). O alinhamento das sequências foi feito pelo programa ClustalX e as análises evolutivas filogenéticas e moleculares foram realizadas utilizando-se o software MEGA versão 6 (Tamura *et al.*, 2013). A análise estatística foi feita pelo teste Neighbor-Joining, com simulação de 1.000 *bootstrap* e *cut-off* de 70 %.

3.1.6. Screening de genes que codificam fatores de virulência por PCR

A presença de genes que codificam fatores de virulência como piolisina (*plo*), proteína de ligação ao colágeno (*cbpA*), fimbrias (*fimA*) e neuraminidases H e P (*nanH* e *nanP*) foram avaliados por PCR utilizando-se os pares de

primers descritos por Hijazin *et al.* (2011). Os produtos do PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % (m/v) e corados com brometo de etídio. *Amplicons* com tamanho molecular próximo ao esperado foram considerados positivos e enviados para sequenciamento na Macrogen®. Assim como no item 2.1.5 as sequências obtidas foram usadas para uma análise filogenética.

3.2. Isolamento e caracterização de bacteriófagos

3.2.1. Isolamento e plaqueamento de bacteriófagos

Os bacteriófagos foram isolados a partir de amostras obtidas da rede de esgoto da cidade de Viçosa/MG, como descrito por Dias *et al.* (2013).

As amostras foram centrifugadas a 12.000 *g* por 15 minutos para deposição de partículas maiores, sendo o sobrenadante transferido e acrescido de cloreto de sódio na concentração final de 1 M e clorofórmio 10 % (v/v), permanecendo a 4 °C por, aproximadamente, 12 horas. Após uma nova centrifugação (12.000 *g*, 15 minutos) foi feita a filtração da fase aquosa em membranas filtrantes (Millipore, Billerica, MA, USA) de 0,45 µm e, em seguida, 0,22 µm.

A suspensão viral resultante foi mantida a 4 °C, servindo como fonte de isolamento de bacteriófagos utilizando as linhagens bacterianas isoladas neste trabalho.

O plaqueamento dos bacteriófagos obedeceu à metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001) com modificação, que consistiu na utilização de um maior volume da suspensão viral (900 µL), a qual foi incubada a 37 °C por 30 minutos com 100 µL do estoque bacteriano como descrito em 2.1.3. Após a incubação, a mistura total de fago mais bactéria recebeu 5 mL de meio BHI semi-sólido (0,7 % de ágar) mantido a 55 °C. Depois da homogeneização com pipeta, a mistura resultante foi vertida em placa de Petri contendo o meio BHI sólido (1,5 % de ágar). As placas foram incubadas a 37 °C, por 12 horas, para posterior visualização de placas de lise, que foram recolhidas com ponteiros autoclavados, servindo como fonte para propagação de fagos em cultura líquida. Para aumentar a probabilidade de isolamento um único bacteriófago por amostra, o procedimento foi repetido três vezes para cada isolado.

3.2.2. Propagação de bacteriófagos a partir de placas de lise

Isolados bacterianos foram cultivados em caldo BHI e uma alíquota de 500 µL foi retirada na fase exponencial de crescimento e inoculada em 5 mL de caldo BHI estéril junto com placas de lise individuais obtidas, sendo então incubadas a 37 °C por 12 horas. Após este período, foram adicionados clorofórmio e NaCl, respectivamente com concentrações finais de 10 % (v/v) e 1 M, com o intuito de romper células bacterianas e separar os fagos ainda associados a restos celulares. Para separação da fase aquosa do clorofórmio, as amostras permaneceram em repouso a 4 °C por 1 hora. Após este período, procedeu-se a centrifugação (5.000 g, 20 minutos, 4 °C), sendo o sobrenadante cuidadosamente recolhido e transferido para novos tubos.

3.2.3. Titulação de bacteriófagos

Visando avaliar o sucesso da técnica de propagação dos bacteriófagos e viabilidade dos mesmos, foi realizada titulação das amostras obtidas anteriormente. Diluição seriada do estoque viral (1:10) foi realizada em tampão de diluição de fago (SM: 5,8 g de NaCl, 2,0 g de MgSO₄.7H₂O, 50 mL de Tris-HCl 1M pH 7,5, 5 mL de gelatina 2 % e H₂O q.s.p 1 L) (Sambrook & Russell, 2001), procedendo-se à adição de 100 µL das diluições com o mesmo volume do estoque de uma cultura bacteriana. A mistura foi então adicionada ao meio BHI semi-sólido fundido a 55 °C e vertido em placas de Petri contendo BHI sólido, e incubados em estufa sob temperatura de 37 °C. No dia seguinte, o número de placas de lise foi contado e o título de bacteriófagos expressos em unidades formadoras de placas de lise (UFP/mL) de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{UFP/mL} = \text{N}^{\circ} \text{ de placas de lise} \times \text{fator de diluição} \div \text{volume da diluição (mL)}$$

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

Uma alíquota de 10 µl de cada isolado viral foi aplicada sobre uma tela de microscopia eletrônica (*grid*) de 200 *mesh*, previamente coberta com Formvar[®]. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, o excesso de líquido foi retirado utilizando-se papel de filtro, e as partículas virais aderidas foram,

então, contrastadas com acetato de uranila 2 % (m/v) por 20 segundos. As telas foram submetidas à visualização por microscopia eletrônica de transmissão (Zeiss EM 109 TEM) no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM).

Para análise da morfológica viral foi utilizado o software ImageJ (Rasband, W. S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), sendo estimado diâmetro do capsídeo e comprimento da cauda, por exemplo. Após esta análise, os fagos foram classificados em suas respectivas famílias, tendo como referência o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV; King *et al.*, 2012).

3.2.5. Extração de material genético viral

A extração de DNA viral seguiu o método com Proteinase K descrito por Sambrook e Russell (2001). Foram adicionados 50 µg/mL de Proteinase K e 0,5 % (m/v) de SDS à suspensão viral, seguido de incubação por 1 hora a 56 °C. Após a incubação, foi adicionado igual volume de fenol e o tubo agitado por 10 segundos, procedendo-se após a agitação uma centrifugação a 2.041 g por 5 minutos para separação das fases. À fase aquosa recolhida foi adicionado igual volume de uma solução 1:1 de fenol-clorofórmio, centrifugação (2.041 g, 5 minutos), e recolhimento da fase aquosa. A esta nova fase aquosa foi adicionado igual volume de clorofórmio, centrifugação (2.041 g, 5 minutos) e recolhimento da fase aquosa, adicionado a esta etanol na proporção 2:1. A mistura foi mantida no gelo por 30 minutos e então centrifugada a 15.000 g por 20 minutos. Ao centrifugado foi acrescido 50 µL de água livre de nuclease. Posterior à extração, o mesmo foi quantificado e diluído para a concentração de 100 ng/µL em espectrofotômetro NanoDrop.

3.2.6. Análise do tamanho dos genomas virais

O tamanho dos genomas virais foi estimado por PFGE (*Pulse-Field Gel Electrophoresis*) em gel de agarose 1 % com tampão TBE 0,5 X (TBE 1 X: Tris 0,89 M, Borato 0,89 M e EDTA 0,02 M) a 14 °C por 14 horas, com uma voltagem de 6 V/cm, tempo de pulsação variando de 5 a 10 segundos. O gel foi analisado após coloração por brometo de etídio 0,5 µg/mL e visualizado sob luz ultravioleta. Foram utilizados como marcadores de peso molecular o

concatâmero obtido do fago lambda (50-1.000 kb, New England Biolabs) e o DNA do fago Lambda cortado com a enzima HindIII (Thermo Scientific, EUA).

3.2.7. Diversidade genômica dos bacteriófagos por RAPD

Ainda visando discriminar os fagos isolados, utilizamos uma variação da técnica de PCR que emprega *primers* randômicos para formação de um padrão polimórfico, próprio para cada fago. Para o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) dos fagos isolados, foi utilizado o oligonucleotídeo iniciador OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') e P1 (5'-CCGCAGCCAA-3'). As condições do PCR foram utilizadas como descrito por Gutiérrez *et al.* (2011). Os fragmentos genômicos obtidos foram comparados com relação ao número de bandas, intensidade e altura das mesmas, além da montagem de um dendograma utilizando-se o programa BioNumerics versão 7 (Applied Maths NV, Bélgica).

3.2.8. Perfil de proteínas virais por SDS-PAGE

Visando obter perfil proteico dos diferentes isolados virais e diferenciar os mesmos baseando-se nesta característica, foi realizada a extração de proteínas. Para isso, adicionou-se PEG 8.000, 10 % (m/v), à suspensão viral e incubou-se a 4 °C por 12 horas. Após centrifugação a 10.000 g por 15 minutos, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de tampão SM e igual volume de clorofórmio, sendo realizada uma nova centrifugação (4.000 g, 10 minutos) e recuperação da fase aquosa para um novo tubo. Foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) na concentração final de 10 % (v/v). Após três lavagens com acetona (11.753 g, 10 minutos), o centrifugado formado foi ressuspendido em 50 µL de água destilada e deionizada.

Antes da aplicação no gel, o precipitado protéico foi quantificado utilizando-se o *kit* comercial *BCA Protein Assay Kit* (Boster Biological Technology, Wuhan, China) em leitor de placa (Thermo Scientific Multiskan GO, EUA). Após a quantificação, foi adicionado 20 µL de tampão de amostra (TA) 1 X (TA 1 X: 0,25 % (m/v) azul de bromofenol e 40 % (m/v) de sacarose em água). A corrida foi realizada em gel de poliacrilamida 12,5 % (m/v), voltagem de 190 V, como descrito por Laemmli (1970). O gel foi corado com prata.

3.2.9. Obtenção de anticorpos específicos para proteínas virais

Camundongos Swiss (dois animais por grupo) foram inoculados com 20 µg de proteínas virais concentradas e quantificadas dos vírus vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26 como descrito no item 2.2.6. O veículo utilizado foi o tampão PBS 1 X (NaCl 0,13 M, KCl 2mM, Na₂HPO₄ 9mM, KH₂PO₄ 1 mM), tendo sido realizada três inoculações, com intervalo de sete dias entre elas, todas por via intraperitoneal. Estes procedimentos seguiram o protocolo descrito por Galikowska *et al* (2011), com algumas alterações. As doses de reforço visaram estimular uma maior produção de anticorpos específicos aos bacteriófagos.

3.2.10. Immunoblot

De acordo com o protocolo descrito por Towbin *et al* (1979), com modificações, as proteínas virais foram separadas em gel de poliacrilamida como descrito no item 2.2.6 e transferidas para membrana de nitrocelulose com a utilização de tampão de transferência PBS-Tween (PBS 1 X acrescido de Tween 20 a 0,5 % (v/v)) usando o sistema de transferência Digel DGV10. O tempo de transferência foi de duas horas, com voltagem de 190 V e a transferência foi confirmada por coloração em Ponceau (Ponceau S 0,1 % (m/v), metanol 5 % (v/v)). O bloqueio foi realizado com BSA 0,5 % por um período de trinta minutos, seguido de três lavagens com PBS-Tween e adição do anticorpo (Ac) primário (1:100), Ac anti-21 e Ac anti-26, às proteínas dos dois bacteriófagos juntos na mesma membrana, com tempo de incubação de uma hora à temperatura ambiente. Por fim, após três lavagens com PBS-Tween, o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:100) foi adicionado, procedendo-se à adição da solução reveladora.

3.3. Formação de biofilmes e controle por bacteriófagos

3.3.1. Densidade populacional e quantificação de biofilmes

A quantificação de biofilmes formados por *T. pyogenes* foi feita em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato e seguiu a metodologia descrita por Ribeiro (2012).

A cultura bacteriana a ser avaliada foi cultivada em caldo BHI até D.O₆₀₀ igual a 0,1 (10⁸ UFC/mL), como descrito no item 1.1.4. Logo após, 20 µL de

solução contendo a cultura bacteriana foram acrescentados a 180 µL de caldo BHI, o que levou a concentração final da solução igual a 10^7 UFC/mL por poço. Os tratamentos foram feitos em triplicata.

Após incubação a 37 °C, por 24 horas, foi medida a densidade populacional bacteriana ($D.O_{600}$) em leitor de microplacas. Em seguida, a placa foi vertida e colocada em contato com papel toalha para que a cultura bacteriana em excesso fosse retirada. Após duas lavagens com PBS 0,2 M pH 7,2 as células aderidas foram coradas com 250 µL de cristal violeta (CV) 0,1 % (m/v) por 30 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, o mesmo foi removido, os poços lavados quatro vezes com 250 µL de tampão PBS e secos a temperatura ambiente por uma hora. Posteriormente, 250 µL de uma mistura etanol-acetona 80:20 foram acrescentados aos poços e a placa mantida a temperatura ambiente por 30 minutos para remoção completa do corante. Por fim, 200 µL da solução corada (CV-etanol-acetona) foram transferidos para uma nova placa e a absorvância (Abs) medida a 590 nm em um leitor de microplacas, sendo uma medida indireta da quantidade de biofilme.

Estas análises foram feitas em triplicata e submetidas à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 5, sendo os grupos comparados pelo Teste de Bonferroni com 95 % de confiança.

3.3.2. Efeito na densidade populacional de *T. pyogenes* e na formação do biofilme

As culturas bacterianas foram obtidas como descrito no item 2.3.1. 20 µL de uma cultura bacteriana com $D.O_{600}$ igual a 0,1 e bacteriófagos em diferentes diluições, equivalente aos MOI's (*Multiplicity of Infection*), ou seja, razão vírus/bactéria de 0,1, 0,001, 0,0001 e 0,00001, foram adicionadas a 160 µL de BHI em placa de poliestireno de 96 poços. Os controles foram realizados com cultura bacteriana sem fago (positivo) e apenas com o meio de cultura BHI (negativo). Após incubação (37° C, 24 horas), a Abs_{600} foi estimada e aos poços adicionado CV como descrito no item 2.3.1. Para se determinar a massa relativa do biofilme, foi normalizado a absorvância do controle positivo em 100 %.

O ensaio foi repetido três vezes e a análise estatística realizada como descrito no 2.3.1.

3.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Neste ensaio, foi utilizado o dispositivo MBEC (*Minimum Biofilm Eradication Concentration*) Assays™ (Innovatech, Canadá), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os pinos foram quebrados e lavados duas vezes em PBS 0,2 M pH 7,2 e fixados em glutaraldeído 2,5 % (v/v) preparado em tampão PBS 0,2 M pH 7,2, a temperatura ambiente por 2 horas. Após este período, os pinos foram submetidos a uma desidratação em série com aumento gradativo de etanol (30 a 100 % v/v) por 10 minutos cada, com três repetições da última etapa. Após a desidratação, foi realizada a secagem do material no ponto crítico (Critical Point Dryer – CPD_v, Bal-tec, modelo 030). Os pinos foram afixados em *stubs* com fita dupla face, metalizados com ouro (15 nm de espessura – metalizador Sputter coater, Balzers, modelo FDU 010) e analisados no Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 1430 VP, no núcleo de Microscopia e Microanálise, operando a 20 kV. Este protocolo seguiu a metodologia descrita por Ribeiro (2012) com modificações.

4. Resultados e Discussão

4.1. Isolamento e caracterização bacterianas

4.1.1. Coleta do lóquio uterino e identificação bacteriana

A opção por modificar a técnica de coleta uterina descrita por Santos *et al.* (2010) possibilitou um menor grau de contaminação e rapidez na coleta da secreção uterina.

Colônias bacterianas puntiformes e beta-hemolíticas foram isoladas e repicadas do lóquio uterino no intuito de obterem-se culturas puras. Estes isolados foram corados pela técnica de coloração diferencial de Gram e observados microscopicamente, mas nenhum arranjo característico de *T. pyogenes* foi encontrado.

De acordo com Santos *et al.* (2012), infecções uterinas causadas por *T. pyogenes* são tardias, a partir do 35º DIM. Animais diagnosticados com metrite dificilmente alcançam este período sem tratamento no PDPL, visto que são

fazendas com visitas frequentes de médicos veterinários, o que dificulta a presença deste micro-organismo nos animais que fazem parte deste programa.

A ausência de trabalhos sobre a real prevalência desta bactéria em infecções uterinas nos rebanhos brasileiros dificulta qualquer tipo de análise com relação à presença e importância da mesma em nestes processos patológicos. Seria interessante um estudo metagenômico, independente de cultivo, para avaliar a ecologia uterina em nossos rebanhos e estabelecer uma comparação com estudos em outros países, levando-se em consideração, também, as diferentes formas de manejo, genética e nutrição, como mostrado por Santos & Bicalho (2012).

Entretanto, foram isolados e identificados os seguintes micro-organismos: *Enterobacter* sp., *Shigella* sp., *Bacillus* sp., e *Enterococcus* sp (Figura 3). Estes isolados foram utilizados para confecção de uma árvore filogenética e *screening* de genes associados à virulência como *plo*, *cbpA*, *fimA*, *nanH*, *nanP* e *luxS*, uma vez que podem ser patógenos em potencial.

4.1.2. Análise filogenética utilizando-se o gene RNAr 16S

Como mostrado na Figura 3, a análise filogenética utilizando-se o gene

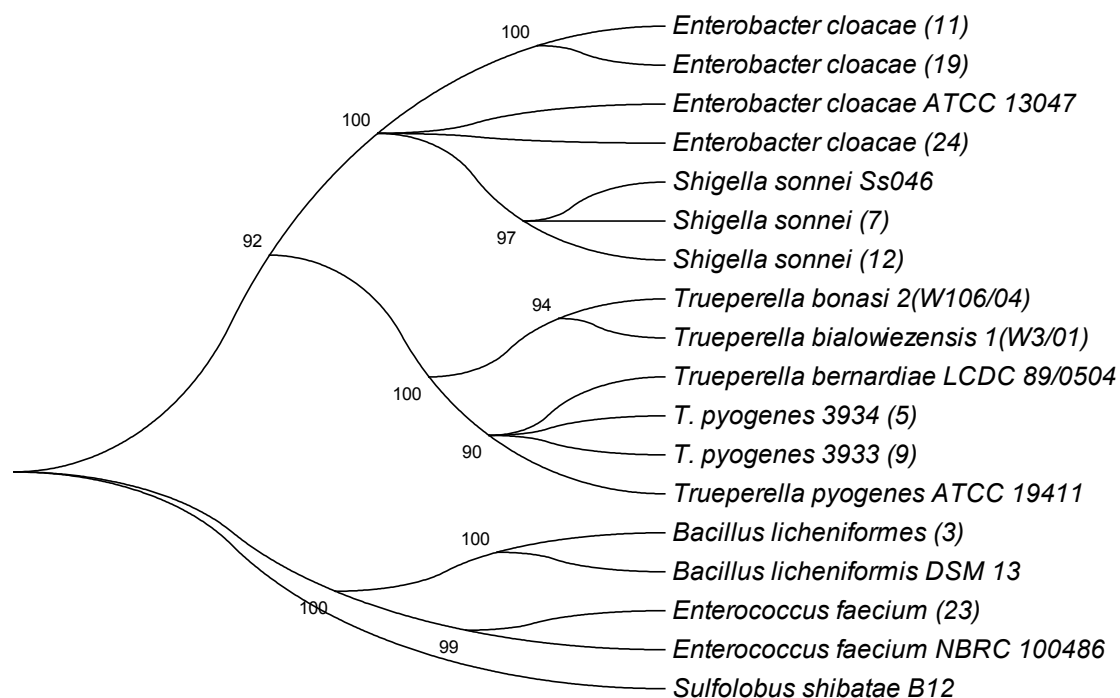


Figura 3 – Dendrograma filogenético baseado na análise “Neighbour-Joining” da região 16S RNAr dos isolados *E. cloacae* (11, 19 e 24), *Shigella sonnei* (7 e 12), *Bacillus licheniformes* (3) e *Enterococcus faecium* (23) e das linhagens de *T. pyogenes* 3933 (9) e 3934 (5) baseado em 1000 réplicas de *bootstrap*. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*. A cepa de *Sulfolobus shibatae* foi utilizada como *outgroup*.

RNAr 16S confirma a identificação taxonômica dos isolados deste estudo, com a formação de *clusters* que agrupam os mesmos em seus devidos gêneros. Os isolados utilizados para confecção da árvore foram: *Enterobacter cloacae* (11), *Enterobacter cloacae* (19), *Enterobacter cloacae* (24), *Shigella sonnei* (7), *Shigella sonnei* (12), *Bacillus licheniformes* (3) e *Enterococcus faecium* (23).

Além destes isolados, as duas linhagens de *T. pyogenes*, 3933 (9) e 3934 (5), e cepas de referência, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Shigella sonnei* Ss046, *Trueperella bonasi* W106/04, *Trueperella bialowiezensis* W3/01, *Trueperella bernardiae* LCDC 89/0504, *Trueperella pyogenes* ATCC 19411, *Bacillus licheniformis* DSM 13 e *Enterococcus faecium* NBRC 100486. *Sulfolobus shibatae* B12 constitui o *outgroup*.

4.1.3. Screening de genes que codificam fatores de virulência

Diversos genes conhecidos e outros putativos que codificam fatores de virulência associados à aderência, colonização e danos teciduais foram pesquisados por meio de PCR, descritos por Hijazin *et al.* (2011). Os genes *plo* e *nanH* foram amplificados apenas nas duas linhagens de *T. pyogenes*, 3933 (9) e 3934 (5). Já o gene *fimA* foi amplificado nas duas linhagens de *T. pyogenes*, 3933 (9) e 3934 (5) e nos isolados *B. licheniformis* (3) e *E. cloacae* (19). Por fim, o gene *luxS* foi identificado na linhagem de *T. pyogenes* 3933 (9), nos isolados de *E. cloacae* (11 e 24), *E. faecium* (23) e *S. sonnei* (7 e 12). Já os genes *cbpA* e *nanP* não foram encontrados em nenhum microorganismo deste estudo.

De acordo com Jost & Billington (2005) a expressão gênica do principal fator de virulência de *T. pyogenes*, a piolisina (PLO) (citolisina dependente de colesterol), uma proteína de 55 kD presente em todos os isolados de *T. pyogenes* identificados até hoje, permite que a célula bacteriana se ligue a membranas que possuam este esterol em sua composição, com concomitante formação de poros, o que acarreta em citólise. Além disto, esta proteína promove hemólise, lise de células do sistema imune do hospedeiro e modula a expressão de citocinas e outras substâncias inflamatórias, como prostaglandina E₂. PLO é pertencente a uma família de toxinas conhecidas como CDC's (do inglês *Cholesterol-Dependent Cytolysin*), que inclui listeriolisina O (LLO),

perfringolisina O (PFO), pneumolisina O (PLY), estreptolisina O (SLO) e intermedilisina O (ILY).

Ainda de acordo com Jost & Billington (2005), pouco é conhecido a respeito da expressão de PLO *in vivo*, contudo, *in vitro*, sabe-se que a expressão de PLO é regulada positivamente no início da fase estacionária. Dentro da ilha gênica de *plo*, *ploR* codifica um regulador de resposta (similar a outros reguladores de resposta) pertencente a um sistema regulatório de dois componentes com um domínio receptor pertencente à família CheY e um outro domínio C-terminal, da família LuxR, de ligação à estrutura hélice-volta-hélice do DNA, que ativa a transcrição de *plo*. Dentro do *operon* e *upstream* a *ploR* encontra-se *ploS*, que codifica a quinase sensora do sistema de dois componentes. Jost & Billington (2005) inferem que mutantes *ploR* são defectivos na formação de biofilme.

Winzer *et al.* (2002) descrevem a síntese do autoindutor 2 (AI-2), molécula sinalizadora (similar à 4-hidroxi-5-metil-3 (2H)-furanona), intra ou interespecífica, utilizada por uma variedade de bactérias como *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella flexneri* e *Salmonella typhimurium*, além de ser produto de vias metabólicas secretado na fase exponencial de crescimento e utilizado em fases tardias. A proteína produto do gene *luxS* é essencial a síntese do AI-2, que pode estar envolvido no controle por *quorum sensing* de diversos processos celulares como bioluminescência, biossíntese de antibióticos, formação de biofilme, transferência de plasmídeos conjugativos, competência para a captação de DNA exógeno (transformação), esporulação e ativação de fatores de virulência de diversos patógenos. O controle e a degradação de AI-2 estão relacionados ao estado metabólico das células. Aumentos de glicose, ferro e cloreto de sódio aumentam a expressão de AI-2, enquanto choque térmico, etanol e peróxido de hidrogênio diminuem a expressão do mesmo em *E. coli*.

As informações citadas acima corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, que identificou em uma das linhagens a presença do gene *luxS* (*T. pyogenes* 3933). Em uma busca pelo gene *luxS* na base de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) foram encontradas 10.595 sequências deste gene com diversos tamanhos e em diferentes

gêneros bacterianos, como mostrado na Tabela 1. Uma árvore com grupos taxonômicos montada pelo próprio GenBank mostra a distribuição destas sequências entre diferentes filos, sendo apresentado um único depósito para o gênero *Arcanobacterium*. A sequência obtida para o isolado *T. pyogenes* 3933 foi sequenciada e comparada com as já disponíveis. Além disso, como citado anteriormente, a presença do gene *luxS* e o sistema de dois componentes PloSR podem estar envolvidos na formação do biofilme, como discutido abaixo.

A adesão de células bacterianas à mucosa hospedeira é de fundamental importância para colonização, tanto no estabelecimento de uma infecção, quanto mecanismo de permanência na microbiota comensal (Jost & Billington, 2005). Sendo assim, diversas proteínas devem ser expressas para posterior ancoragem ou secreção, o que garante a interação com moléculas pertencentes ao hospedeiro (Jost & Billington, 2005).

Segundo Jost & Billington (2005) as neuraminidases, ou sialidases, clivam o ácido siálico de forma que há exposição de receptores celulares do hospedeiro, diminuem a viscosidade do muco e aumentam a suscetibilidade do anticorpo de mucosa IgA a proteases bacterianas. O gene *nanH* expressa uma proteína de 107 kDa que fica ancorada na parede celular de *T. pyogenes* e de outras bactérias Gram-positivas, porém é secretada em bactérias Gram-negativas (Jost & Billington, 2005). Esta neuraminidase possui similaridade

Tabela 1 – Exemplos de sequências depositadas no Genbank para o gene *luxS*, que varia em tamanho e gêneros bacterianos.

Bactéria	Gene (pb)	Número de acesso
<i>Prevotella bryantii</i>	157	DQ336419
<i>Escherichia coli</i>	427	AJ786260
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	461	CP002045
<i>Fusobacterium sp.</i>	479	JANB01000091
<i>Neisseria meningitidis</i>	506	CP002424.1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	512	AF295118
<i>Shigella flexneri</i>	515	CP001063.1
<i>Salmonella enterica</i>	516	AY496970
<i>Helicobacter pylori</i>	520	DQ777750

com outras presente em diversos micro-organismos como *S. pneumoniae*, *Actinomyces viscosus*, *Micromonospora viridifaciens* e *Bacteroides fragilis* (Jost & Billington, 2005). Atualmente admite-se que, baseado em um estudo com 53 cepas de *T. pyogenes*, todos expressaram sialidases codificadas pelo gene *nanH* (Jost & Billington, 2005). Estes dados são condizentes com os achados neste trabalho, visto que os dois isolados de *T. pyogenes* possuíram o gene *nanH*, que foi amplificado.

Uma segunda neuraminidase pode ser codificada por *T. pyogenes* pela presença do gene *nanP*, cujo produto é uma proteína de 186,8 kDa que também está ancorada na parede celular da bactéria (Jost & Billington, 2005). Porém, a prevalência do gene *nanP* é menor se comparada ao gene *nanH*, possuindo predileção por cepas isoladas de bovinos (aproximadamente 64 % dos isolados) (Jost & Billington, 2005). Esta baixa frequência do gene *nanP* foi ratificada neste estudo.

O tecido hospedeiro é composto por glicoproteínas estruturais (fibronectina, fibrinogênio, colágeno, laminina e elastina) que formam a matriz extracelular do tecido conjuntivo, sendo este revestido pelo tecido epitelial que, quando lesado, oferece a micro-organismos patogênicos estas moléculas como receptores para adesão (Jost & Billington, 2005). Neste sentido, *T. pyogenes* pode expressar uma proteína de superfície com domínio de ancoragem a parede celular que se liga principalmente ao colágeno, CbpA, (principalmente os tipos I, II e IV) (Jost & Billington, 2005). 48 % de *T. pyogenes* isolados (n = 75) possuíam este gene, contudo, este gene parece estar presente quando *T. pyogenes* é isolado de osteomielites, como descrito por Jost & Billington (2005). Assim como o gene *nanP*, não houve identificação do gene *cbpA* nas duas linhagens de *T. pyogenes*.

Fímbricas são proteínas filamentosas formadoras de um apêndice extracelular associado à adesão célula-célula ou célula-superfície, disseminado em gram-negativas, porém restrito a poucas bactérias gram-positivas (*Actinomyces* spp., *Streptococcus* da cavidade oral, *Corynebacterium* spp. e *T. pyogenes*) (Jost & Billington, 2005). Jost & Billington (2005) identificou um operon fimbrial com organização gênica similar a encontrada em *Actinomyces naeslundii* que consiste dos genes *fimB*, *fimA* e *srtA*. FimA é uma proteína de 45,7 kDa, enquanto FimB possui uma massa de 90,5 kDa. Já *srtA* codifica uma

sortase de 32,5 kDa responsável por montar e ancorar proteínas na parede celular (Spirig *et al.*, 2011; Jost & Billington, 2005). Este *operon*, responsável pela biogênese fimbrial, não é ubíquo, ou seja, pode estar ausente em estirpes de *T. pyogenes* (94 %, n = 53). Entretanto, SrtA está presente em todos os isolados de *T. pyogenes*, sendo responsável pela montagem de outros complexos proteicos mesmo na ausência dos genes *fimA* e *fimB*. Foi amplificado o gene *fimA* das cepas de *T. pyogenes* 3933 e 3934. A presença deste gene pode ou não auxiliar na formação de biofilme por *T. pyogenes*, visto que, como citado acima, participa da adesão célula-superfície.

Silva *et al.* (2008) buscou avaliar oito fatores de virulência (*plo*, *nanP*, *nanH*, *cbpA*, *fimA*, *fimC*, *fimE* e *fimG*) em cinquenta e sete *T. pyogenes* isolados em vacas leiteiras da raça holandesa sadias ou diagnosticadas com metrite. Todos os isolados expressaram a hemolisina PLO e a neuraminidase H, já esperado, como descrito por Jost & Billington (2005). No entanto, os genes *nanP*, *cbpA* e *fimA* também foram encontrados em todos os isolados, o que é menos comum, mas justificado pelo fato de ser inerente as cepas obtidas destes animais.

Santos *et al.* (2010) buscou identificar quatro fatores de virulência (*plo*, *cbpA*, *fimA* e *fimG*) em setenta e dois isolados de *T. pyogenes* obtidos de secreções uterinas de vacas holandesas no puerpério. O gene que codifica a hemolisina foi encontrado em 100 % dos isolados, assim como descrito por Jost & Billington (2005) e Silva *et al.* (2008). A presença do gene *fimA* foi correlacionado com a presença de *T. pyogenes* em vacas acometidas por metrite (90,9% dos isolados em vacas doentes contra 64,1 % as cepas obtidas de vacas sadias). Já a presença do gene *cbpA* foi observado em apenas 1,4 % dos isolados, o que vai de acordo com o relato de Jost & Billington (2005), que relaciona a presença mais frequente deste gene com infecções causadoras de osteomielite oriundas de *T. pyogenes*.

A Figura 4 traz as árvores construídas com as sequências dos genes que codificam os fatores de virulência *plo*, *cbpA*, *fimA*, *nanH* e *luxS*.

A árvore filogenética criada para o gene *fimA* (Figura 4-A) mostra que as sequências obtidas a partir deste estudo se agrupam em um *cluster*. Quando inseridas no BLAST, essas sequências eram relacionadas apenas ao micro-organismo *T. pyogenes* TP 6375, identidade de 96 %, cobertura de 99 % e

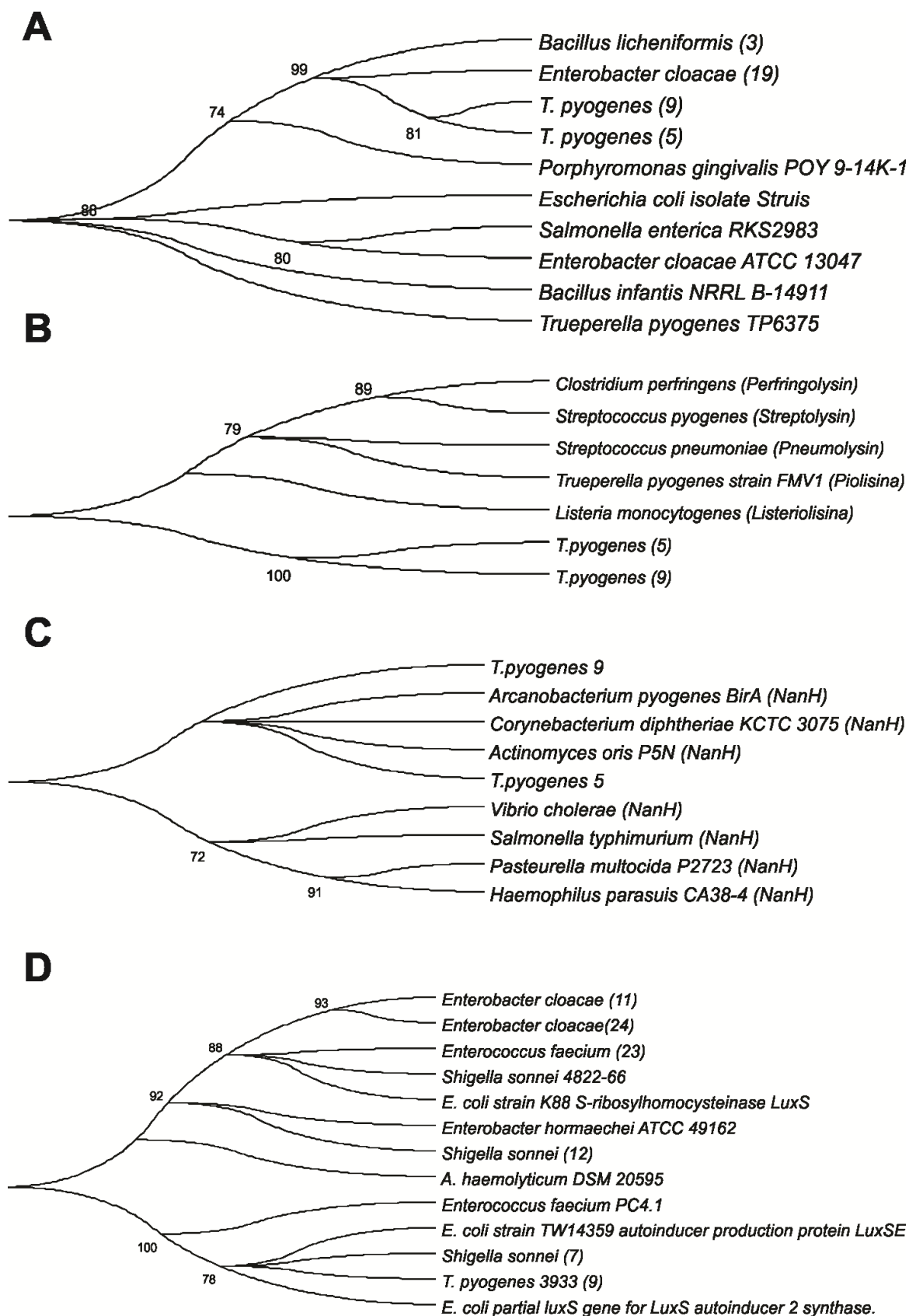


Figura 4 - Dendrograma filogenético baseado na análise “Neighbour-Joining” dos genes que codificam fatoters de virulência *fimA* (A), *plo* (B), *nanH* (C) e *luxS* (D) baseado em 1000 réplicas de *bootstrap*. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*.

e-value de 0,0 (número de acesso [CP007519.1](#)), mesmo para *Bacillus* sp e *Enterobacter* sp. Sendo assim, era esperado que estas sequências fossem agrupadas junto com esta cepa de referência, o que não aconteceu.

Com relação aos genes *plo* e *nanH* (Figuras 4-B e C, respectivamente) a árvore filogenética confirmou o esperado, o agrupamento dos genes amplificados nos isolados de *T. pyogenes* 3933 e 3934 próximos à cepa de referência para *plo* e em um cluster de bactérias coriniformes quando montada através do gene *nanH*.

Por fim, o gene *luxS* (Figura 4-D) sequenciado a partir de *T. pyogenes* 3933 revelou que este gene é mais próximo evolutivamente de *E. coli* do que *A. haemolyticum*, sugerindo que este gene possa ser adquirido por transferência horizontal de genes, uma vez que estas bactérias estão comumente no mesmo ambiente, como útero e glândula mamária. Assim como para *T. pyogenes*, as sequências de *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp e *Shigella* sp. também não foram agrupadas juntas com as sequências já depositadas em bancos de dados, como o Genbank.

4.2. Isolamento e caracterização de bacteriófagos

4.2.1. Isolamento de bacteriófagos

Três bacteriófagos foram isolados a partir de amostras obtidas da rede de esgoto da cidade de Viçosa/MG.

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

A análise morfológica por MET revelou que os três bacteriófagos são pertencentes à ordem *Caudovirales* (Figura 8). As medidas de comprimento e largura do capsídeo foram comparadas com as já descritas por Ackermann & Abedon (2001).

De acordo com a nova nomenclatura proposta para vírus de *Bacteria* e *Archaea* (Kropinski *et al.*, 2009), os três bacteriófagos foram denominados vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26.

O fago vB_TpyM-UFV13 está inserido na família *Myoviridae*, morfotipo A1, mas muito próximo do morfotipo A2 (razão comprimento/largura do capsídeo variando entre 1,3 e 1,8), com cauda contrátil e cabeça semi-

icosaédrica (largura de 62,4 nm e comprimento de 78,2 nm, razão 1,25). É característico para este morfotipo cabeça com diâmetro variando entre 65 e 80 nm.

Já o bacteriófago vB_TpyP-UFV21 está dentro da família *Podoviridae*, morfotipo C1, com cauda não contrátil e cabeça icosaédrica (largura e comprimento de 57,6 nm). O diâmetro do capsídeo para esta família está por volta de 60 nm.

Por fim, o vírus vB_TpyM-UFV26 pode ser agrupado dentro da família *Myoviridae*, morfotipo A1, com cauda contrátil e cabeça icosaédrica (largura e comprimento de 74,3 nm). Assim como para o fago vB_TpyM-UFV13, é típico capsídeo com diâmetro entre 65 e 80 nm.

4.2.3. Plaqueamento, propagação e titulação de bacteriófagos

A propagação dos três bacteriófagos foi bem sucedida, visto que títulos da ordem de 10^8 UFP/mL foram obtidos e utilizados nos ensaios de combate a formação de biofilme.

4.2.4. Material genético dos fagos

A análise por PFGE, revelou um genoma próximo aos 23 kb para os três

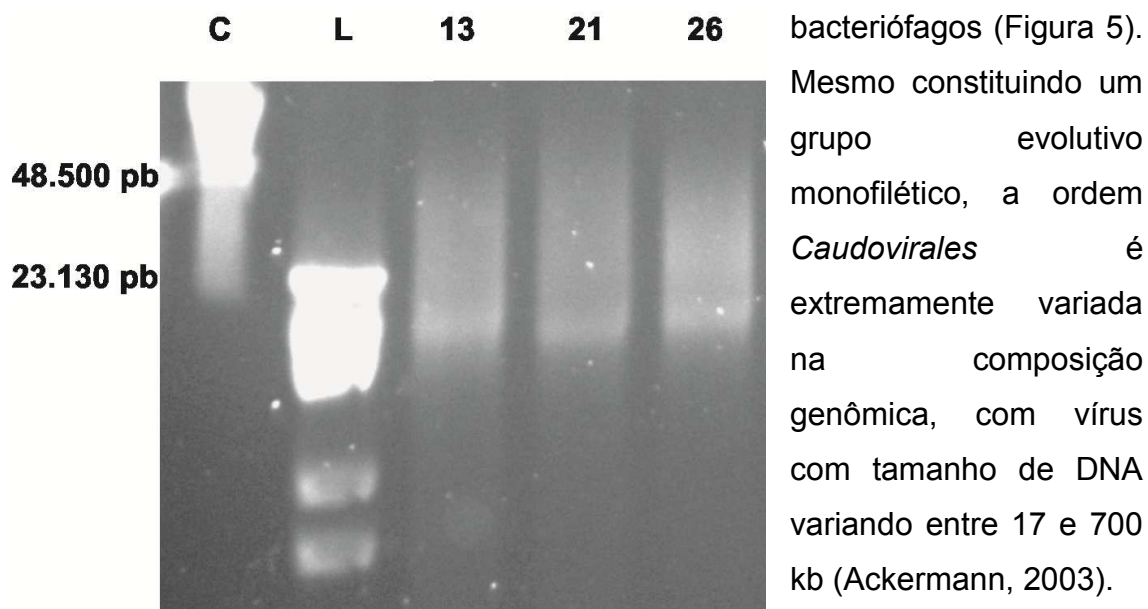


Figura 5 – Gel de eletroforese em campo pulsado de DNA de bacteriófagos. C (Concatâmero), L (Lambda HindIII), 13 (vB TpyM-UFV13), 21 (vB TpyP-UFV21) e 26

4.2.5. Perfil de proteínas virais e imunoblot

Sete proteínas foram comuns aos três bacteriófagos (setas na Figura 6-A), com massas moleculares estimadas em 123 kDa, 117 kDa, 114 kDa, 65 kDa, 64 kDa, 41 kDa e 38 kDa. Além destas sete proteínas compartilhadas entre os três bacteriófagos, os asteriscos na Figura 6 mostram proteínas intrínsecas em todos os vírus. Cuervo *et al.* (2013) em estudos bioquímicos buscando a caracterização da cauda do fago T7, um Podovírus, propôs que esta estrutura é formada pelas seguintes proteínas: gp7.3 (10kDa), gp8 (59 kDa), gp11 (22 kDa) e gp17 (61 kDa).

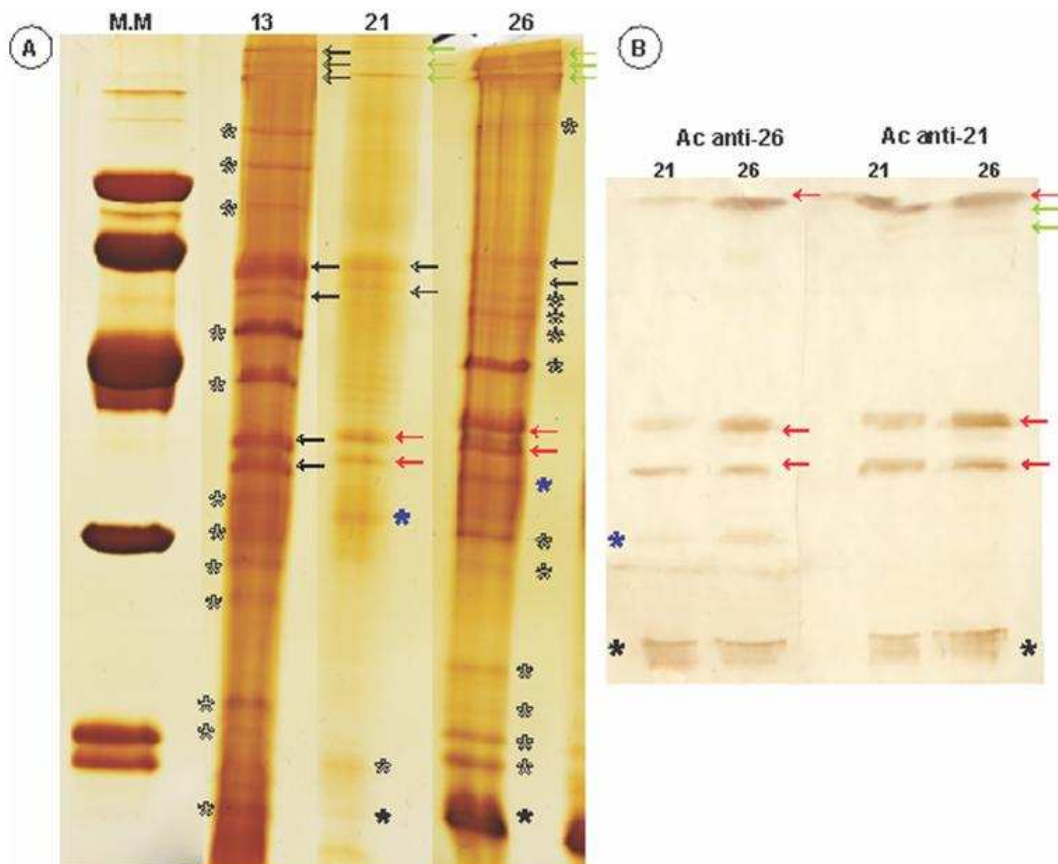


Figura 6 - A - SDS-Page evidenciando as principais proteínas dos três bacteriófagos. Setas representam proteínas comuns aos três vírus. Os asteriscos significam proteínas presentes em cada fago. M.M (Marcador Molecular); 13 (vB_TpyM-UFV13), 21 (vB_TpyP-UFV21) e 26 (vB_TpyM-UFV26). B - Imunoblot mostrando as principais proteínas capazes de gerar anticorpos neutralizantes. Ac anti-26 e Ac anti-21 representam, respectivamente, anticorpos primários produzidos para os vírus 26 e 21. Setas vermelhas e asteriscos preto indicam proteínas comuns aos dois vírus, enquanto que setas verdes e asterisco azul indicam proteínas intrínsecas a cada vírus.

Dias *et al.* (2013) observou uma proteína de 132,2 kDa, comum a todos os isolados pertencentes à família *Podoviridae*, específicos para *E. coli* isoladas de vacas com mastite bovina na Zona da Mata Mineira, e associou esta molécula com a enzima endosialidase (119,0 kDa), comum a esta família viral e próximo ao encontrado neste estudo, 117 kDa.

A avaliação da imunogenicidade dos isolados virais buscou identificar as principais proteínas capazes de provocar uma resposta imune humoral pela produção de anticorpos neutralizantes, o que interferiria negativamente em uma possível fagoterapia para esta enfermidade. Como mostrado na Figura 6-B, as proteínas apontadas pelas setas vermelhas e asterisco preto apresentam epítomos antigênicos comuns, o que caracteriza reação cruzada. Entretanto, a proteína apontada em asterisco azul, comum aos dois bacteriófagos, foi capaz de induzir uma resposta imune quando anticorpos para o fago vB_TpyM-UFV26 foram obtidos, diferente do vírus vB_TpyP-UFV21. Já nas setas de cor verde, é possível notar que estas proteínas foram imunogênicas quando obtidas e administradas a partir do bacteriófago vB_TpyP-UFV21. Como discutido anteriormente, estas proteínas estão presentes comumente na família *Podoviridae*, especificamente na cauda do vírus, a mesma em que se enquadra o vírus vB_TpyP-UFV21. O immunoblot não foi realizado para o bacteriófago vB_TpyM-UFV13, a princípio porque ele é da mesma família do vírus vB_TpyM-UFV26.

4.2.6. Diversidade genômica de bacteriófagos por RAPD-PCR

Apenas o *primer* OPL5 foi utilizado para agrupamento dos fagos, pois produziu variabilidade de bandas entre os fagos, com *amplicons* variando em número, tamanho e intensidade de bandas (Figura 7-A). Este iniciador é o que apresentou maior reprodutibilidade no estudo de Gutiérrez *et al.* (2011) pelo produto do coeficiente de correlação de Pearson's (95%).

Sendo assim, o padrão gerado por OPL5 foi utilizado para produzir um dendograma que agrupou cinco bacteriófagos, três dos quais utilizados neste trabalho, mas ambos de morfologia conhecida. Os bacteriófagos vB_TpyM-UFV13 e vB_TpyM-UFV26 foram agrupados no mesmo cluster, enquanto que o fago vB_TpyP-UFV21 foi colocado em um outro grupo com membros

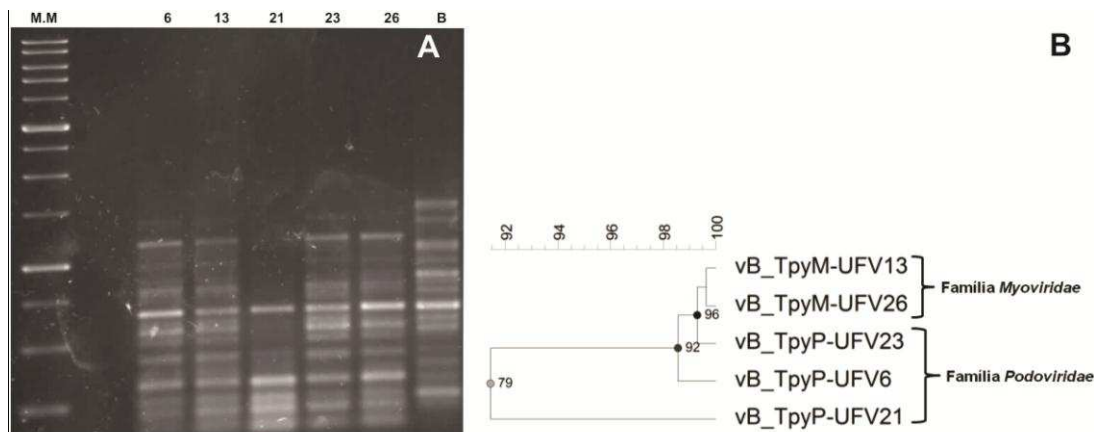


Figura 7 – A – Padrão polimórfico gerado a partir do *primer* OPL5 par os genomas virais e bacteriano. M.M (Marcador Molecular 1kb); 6 (vB_TpyP-UFV6), 13 (vB_TpyM-UFV13), 21 (vB_TpyP-UFV21), 26 (vB_TpyM-UFV26) e B (bactéria). B – Dendrograma filogenético montado a partir do perfil polimórfico gerado em A com base em 1000 réplicas de *bootstrap*. O número nas ramificações representa o valor de *bootstrap*.

pertencentes à família *Podoviridae* (Figura 7-B). Desta forma, o RAPD foi útil na discriminação de vírus pertencentes à famílias diferentes.

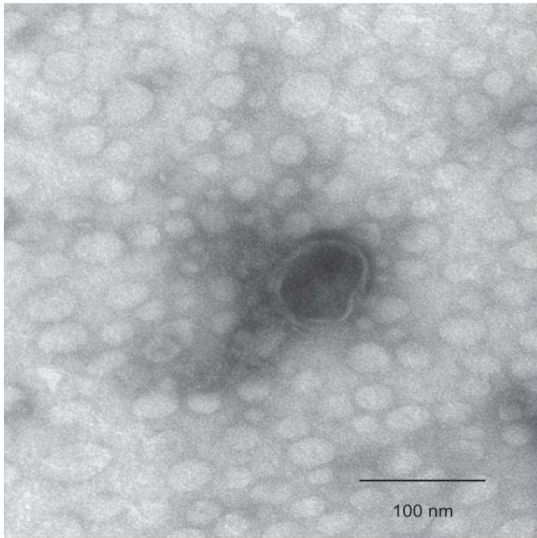
4.3. Ação de bacteriófagos na formação de biofilme de *T. pyogenes*

4.3.1. Densidade populacional bacteriana e formação de biofilmes na presença de fagos

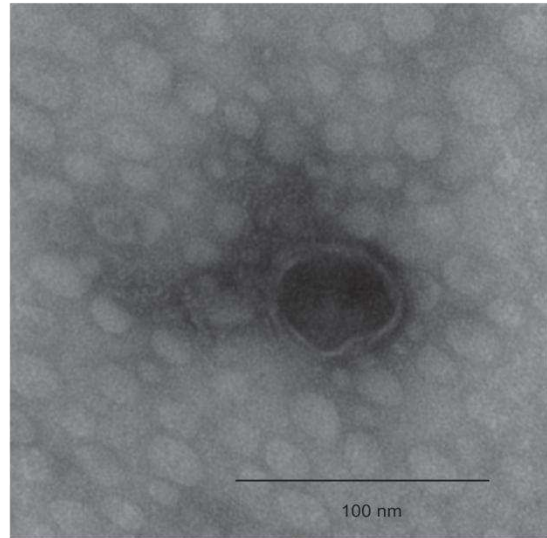
Os três bacteriófagos apresentaram efeito na densidade populacional bacteriana (Tabela 2 e Figura 9) e, na prevenção na formação de biofilme (Tabela 3 e Figura 10). Um único bacteriófago não apresentou redução de biofilme pelo método de coloração por CV, o vírus vB_TpyM-UFV13 para a bactéria *T. pyogenes* 3933.

Os MOI's de 0,01, 0,001 e 0,0001 não apresentaram redução da densidade populacional e formação de biofilme bacteriano. A explicação mais plausível é a de que quanto menor o MOI, menor a porcentagem de células infectadas por pelo menos uma partícula viral. Seria necessário um MOI de 10 para que aproximadamente 100% das células fossem infectadas (Kasman *et al.*, 2002).

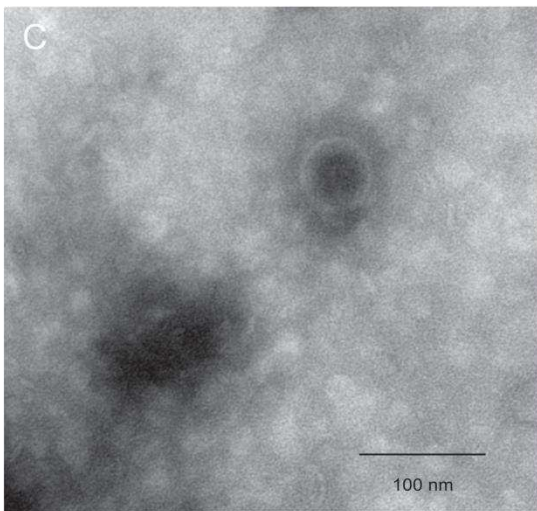
vB_TpyM-UFV13 (140.000 X)



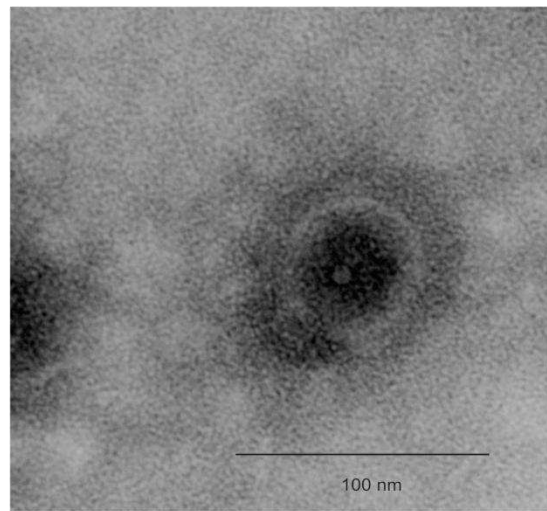
vB_TpyM-UFV13 (250.000 X)



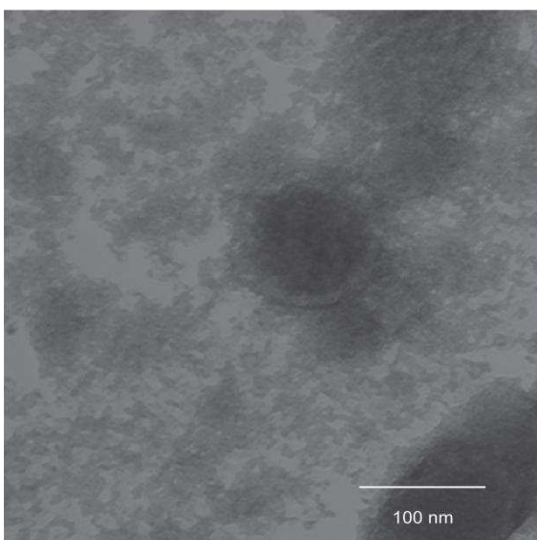
vB_TpyP-UFV21 (140.000 X)



vB_TpyP-UFV21 (250.000 X)



vB_TpyM-UFV26 (140.000 X)



vB_TpyM-UFV26 (250.000 X)

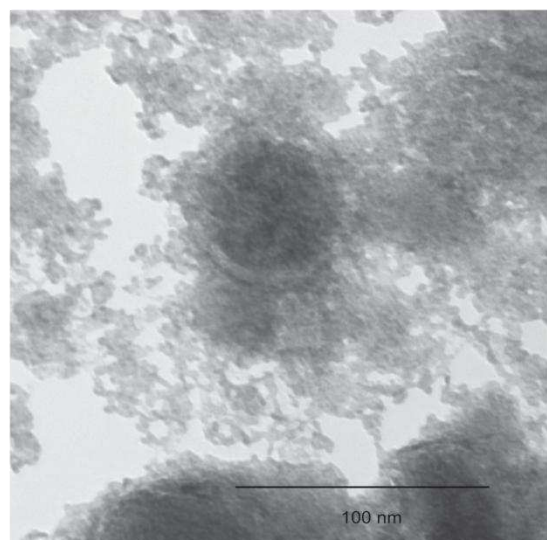


Figura 8 – MET dos bacteriófagos vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26. Aumentos de 140.000 e 250.000 X.

Neste estudo, a diminuição no número de células viáveis refletiu como redução na formação do biofilme produzido por *T. pyogenes*. Ribeiro (2012) considera a prevenção da formação do biofilme como ponto importante no controle de patógenos de animais que possuem esta capacidade, visto que os custos são elevados para destruição dos mesmos, além dos efeitos colaterais provocados por um tratamento severo.

Jost & Billington (2005) consideram que os biofilmes possuem papel relevante na patogênese de doenças crônicas como periodontite, fibrose cística, endocardite, otite média crônica, osteomielite e mastite bovina. Olson *et al.* (2001), em uma avaliação da atividade de antimicrobianos sobre bactérias que formam biofilme, mostra que *T. pyogenes* isolada de bovinos com pneumonia é capaz de formar tal estrutura, mas requer condições *in vitro* como 10% de CO₂, soro fetal bovino e um tempo de incubação maior do que vinte e quatro horas para a formação de uma estrutura mais consolidada.

Tabela 2 – Porcentagem de redução de crescimento bacteriano dos isolados *T. pyogenes* 3933 e *T. pyogenes* 3934 na presença dos bacteriófagos vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26 (MOI de 0,1).

Bactéria		
Bacteriófago	<i>T. pyogenes</i> 3933	<i>T. pyogenes</i> 3934
vB_TpyM-UFV13	9,64%	17,4%
vB_TpyP-UFV21	3,15%	8,8%
vB_TpyM-UFV26	6,12%	11,4%

Tabela 3 – Porcentagem de redução na formação de biofilme dos isolados *T. pyogenes* 3933 e *T. pyogenes* 3934 na presença dos bacteriófagos vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26 (MOI de 0,1).

Bactéria	<i>T. pyogenes</i> 3933	<i>T. pyogenes</i> 3934
Bacteriófago		
vB_TpyM-UFV13	Não significativo	44,8%
vB_TpyP-UFV21	63,1%	49,0%
vB_TpyM-UFV26	52,5%	42,5%

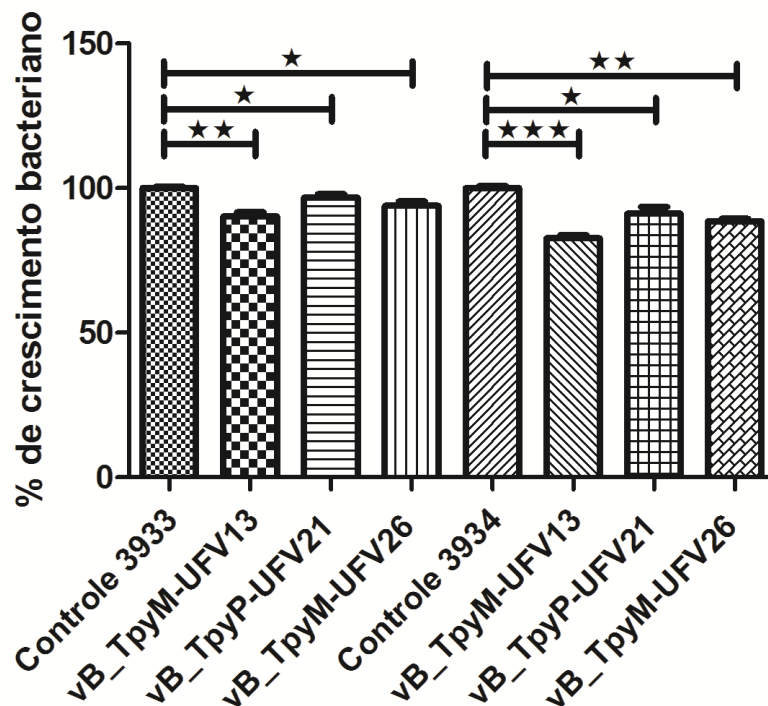


Figura 9 – Porcentagem de crescimento bacteriano dos isolados *T. pyogenes* 3933 e 3934 na presença dos bacteriófagos vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26 (MOI de 0,1) e na ausência dos mesmos (controle). Asteriscos referem-se à diferença significativa em relação ao controle (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$).

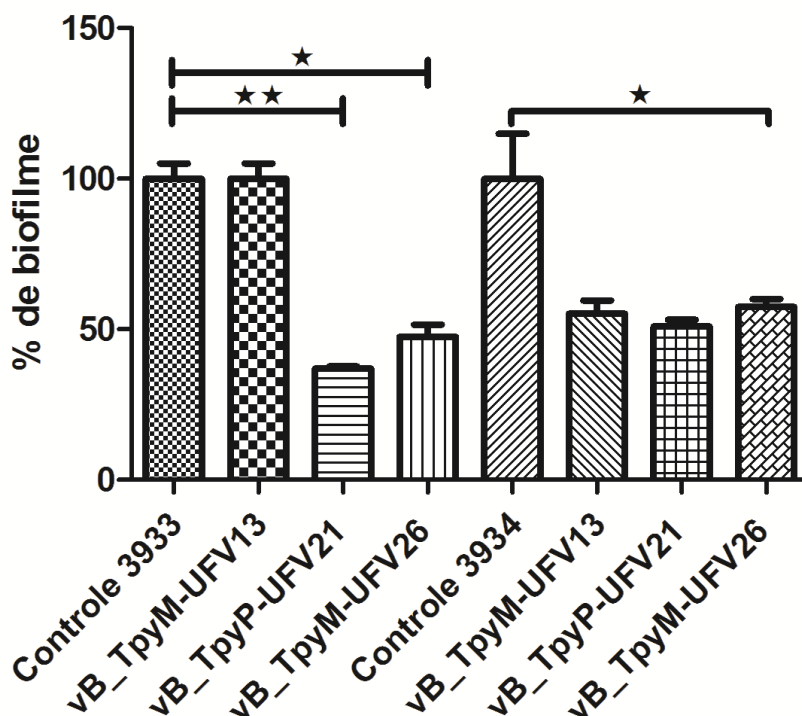


Figura 10 - Porcentagem de inibição de formação do biofilme pelos isolados *T. pyogenes* 3933 e 3934 na presença dos bacteriófagos vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-UFV26 (MOI de 0,1) e na ausência dos mesmos (controle). Asteriscos referem-se à diferença significativa em relação ao controle (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$).

4.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Como discutido no item anterior, a MEV corroborou os resultados encontrados com relação à diminuição na biomassa bacteriana. No controle positivo (somente bactéria), a formação do biofilme foi difusa, principalmente para o biofilme formado pelo isolado 3934, que apresentou, visualmente, uma maior massa celular. Esta diferença pode ser consequência de características intrínsecas de cada bactéria, ou mesmo uma maior exigência nutricional por parte de *T. pyogenes*, como relatado por Olson *et al.* (2001).

A Figura 11 mostra em um menor aumento (67 X) a formação do biofilme nos tratamentos controle e tratados com os três bacteriófagos. Curiosamente, o vírus vB_TpyM-UFV13 interferiu negativamente na formação do biofilme, fato não constatado através da análise por cristal violeta. Nesta mesma figura, é notado crescimento bacteriano apenas na interface líquido-ar, propiciado pela maior disponibilidade de oxigênio (setas na Figura 11 – C-H), mas reduzido na suspensão bactéria/fago.

Com os aumentos de 1000 e 2000 X (Figuras 11 e 12) “vacúolos” são notados no interior da aglomeração celular na matriz do biofilme (C, D e F), diferente do encontrado nos controles, onde as células encontram-se organizadas. Já em E é visível o crescimento apenas na interface líquido-ar, sendo observado apenas células isoladas ou pequenas aglomerações abaixo desta área. Em G e H desagregação e restos celulares são notados.

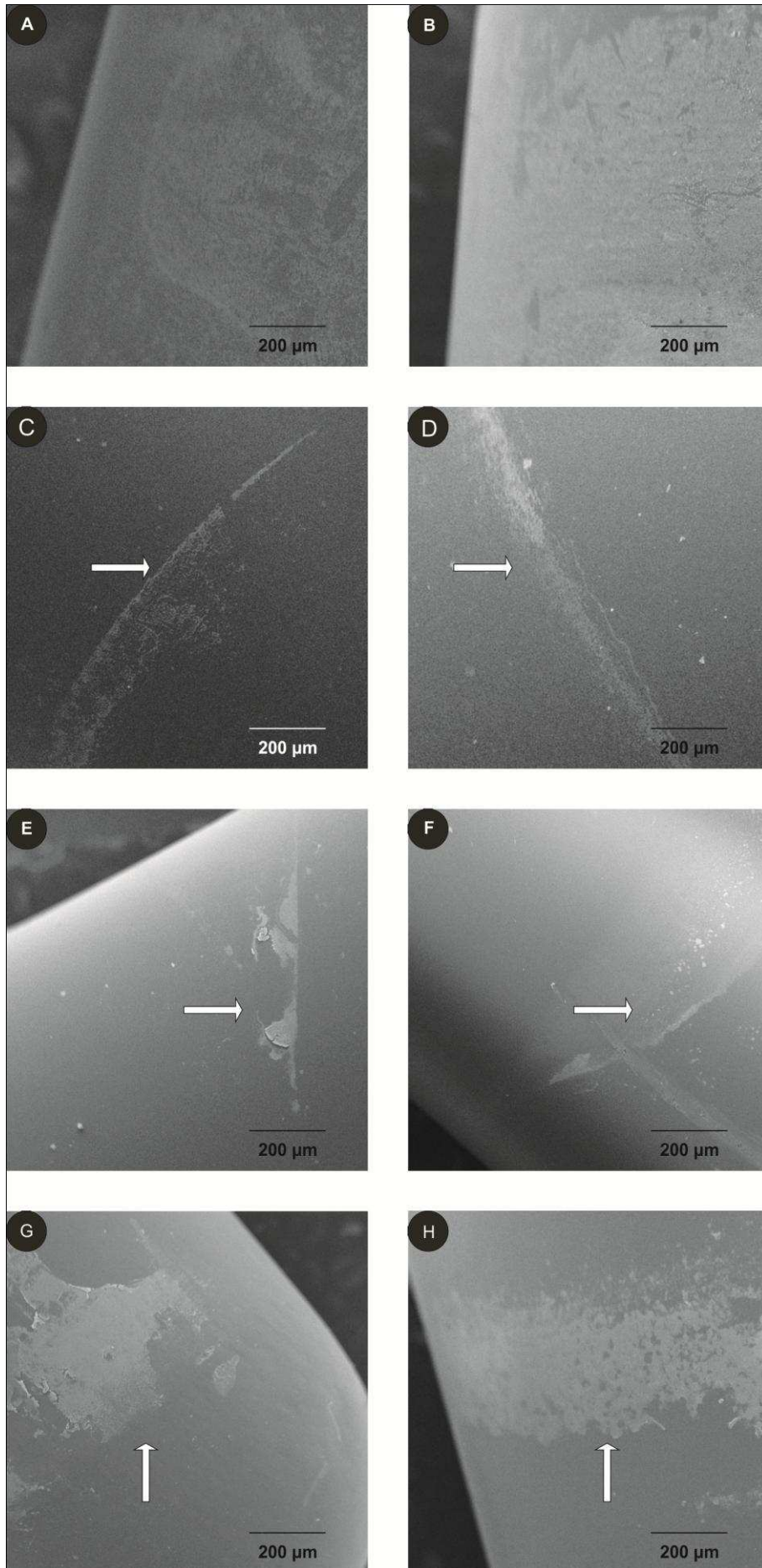


Figura 11 – MEV dos biofilmes formados por *T. pyogenes* 3933 e *T. pyogenes* 3934 (A e B), tratamento com os vírus vB_TpyM-UFV13 (C e D), vB_TpyP-UFV21 (E e F) e vB_TpyM-26 (G e H). Setas mostram crescimento apenas na interface líquido-ar. Aumento de 67 X.

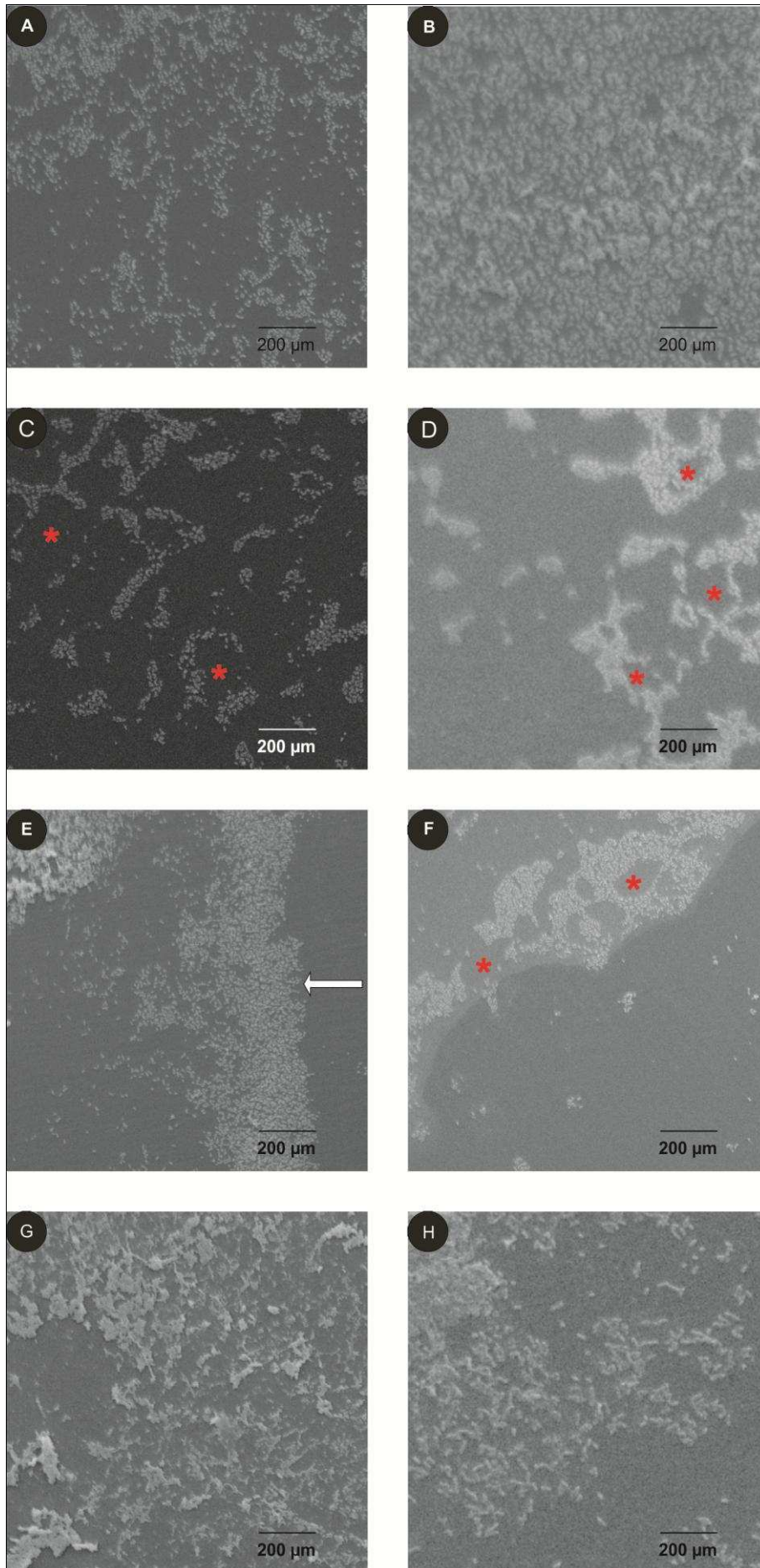


Figura 12 - MEV dos biofilmes formados por *T. pyogenes* 3933 e *T. pyogenes* 3934 (A e B), tratamento com os vírus vB_TpyM-UFV13 (C e D), vB_TpyP-UFV21 (E e F) e vB_TpyM-26 (G e H). Asteriscos evidenciam vacúolos, enquanto que a seta mostra o crescimento bacteriano apenas na interface líquido-ar. Aumento de 1000 X.

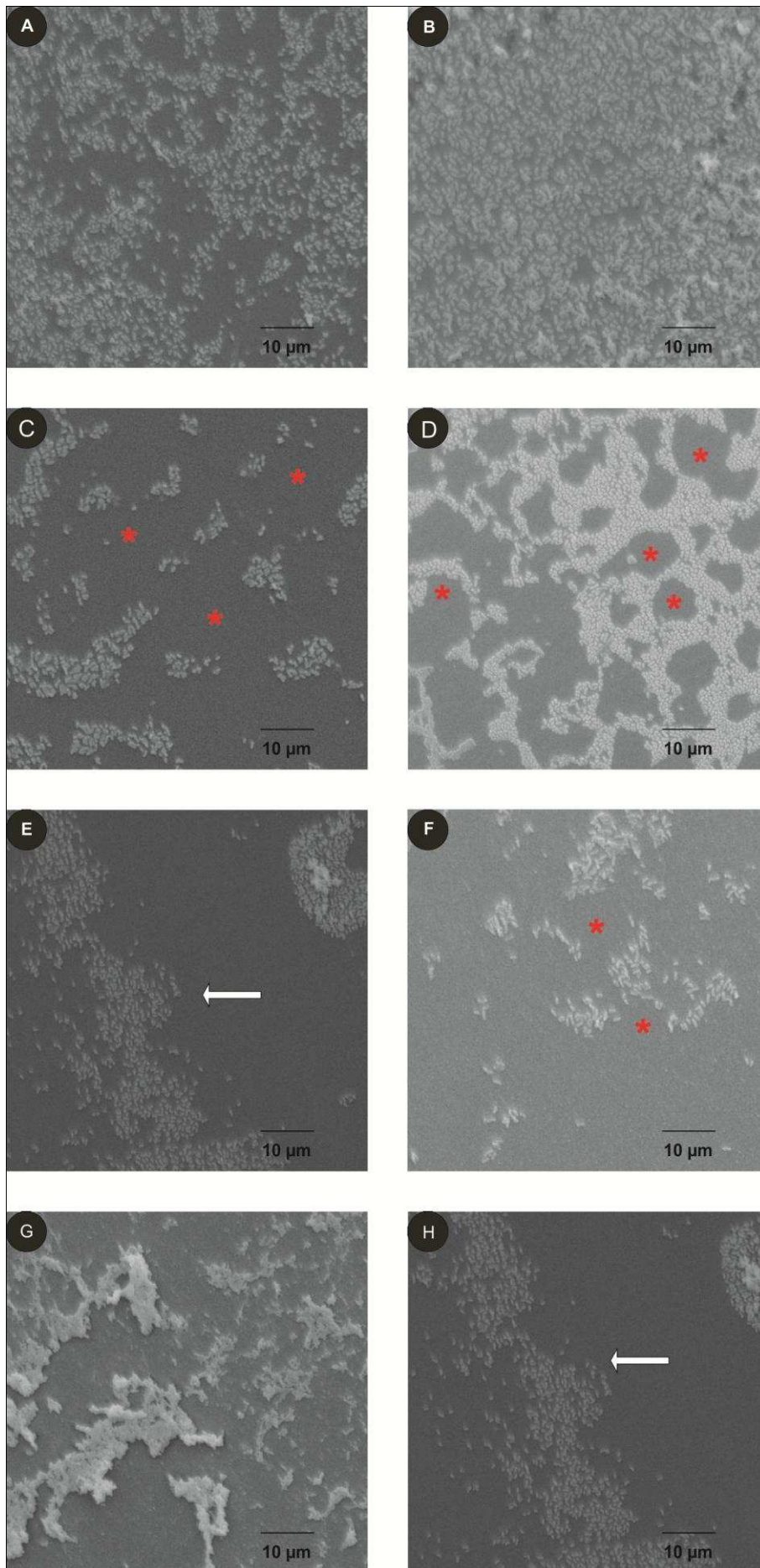


Figura 13 - MEV dos biofilmes formados por *T. pyogenes* 3933 e *T. pyogenes* 3934 (A e B), tratamento com os vírus vB_TpyM-UFV13 (C e D), vB_TpyP-UFV21 (E e F) e vB_TpyM-26 (G e H). Asteriscos evidenciam vacúolos, enquanto que a seta mostra o crescimento bacteriano apenas na interface líquido-ar. Aumento de 2000 X.

5. Conclusão

- Não foram isolados *T. pyogenes* a partir de 18 secreções uterinas de vacas leiteiras participantes do PDPL;
- Foram isolados os microorganismos *Enterobacter cloacae*, *Shigella sonnei*, *Bacillus licheniformes* e *Enterococcus faecium*;
- As duas linhagens de *T. pyogenes* utilizadas nesse estudo possuíam como fatores de virulência os seguintes genes: *plo*, *fimA* e *nanH*. O gene *luxS* foi encontrado apenas no isolado *T. pyogenes* 3933;
- Apenas os genes *plo*, *nanH* e 16S RNAr foram relevantes como marcadores moleculares;
- Foram isolados três bacteriófagos, nomeados como vB_TpyM-UFV13, vB_TpyP-UFV21 e vB_TpyM-26;
- Esses bacteriófagos apresentaram perfil protéico e padrão de bandas (RAPD) diferentes, o que auxiliou na diferenciação viral, principalmente entre os membros da família *Myoviridae*;
- Os três bacteriófagos apresentaram atividade contra *T. pyogenes*, com diminuição da densidade populacional e ação preventiva na formação de biofilme.

6. Perspectivas

A caracterização destes bacteriófagos foi de grande importância, o que abre perspectiva para o sequenciamento de seus genomas. A partir daí, testes farmacocinéticos poderão ser realizados com o intuito de se estabelecer um protocolo de tratamento que utiliza bacteriófagos no controle de enfermidades que acometem vacas de leite como mastite e metrite.

7. Referências

- ACKERMANN, H. & PRANGISHVILI, D. – Prokaryote viruses studied by electron microscopy – **Archives of Virology (2012)**, Volume 157, Pages 1843-1849.
- ACKERMANN, H. W – Bacteriophage Taxonomy – **Microbiology Australia (2011)**, Volume 32, Number 2, Pages 90-94.
- ACKERMANN, H. W – Bacteriophage observations and evolution – **Research in Microbiology (2003)**, Volume 154, Issue 4, Pages 245–251.
- ACKERMANN, H. W – Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000 – **Archives of Virology (2001)**, Volume 146, Pages 843–857.
- ASHELFORD, K. E; NORRIS, S. J; FRY, J. C; BAILEY, M. J. B, DAY, M. J – Seasonal Population Dynamics and Interactions of Competing Bacteriophages and Their Host in the Rhizosphere – **Applied Environmental Microbiology (2000)**, Volume 66, Number 10, Pages 4193-4199.
- AZAWI, O.I – Postpartum uterine infection in cattle – **Animal Reproduction Science (2008)**, Volume 105, Pages 187–208.
- BICALHO, M.L.S; MACHADO, V.S; OIKONOMOU, G; GILBERT, R.O; BICALHO, R.C – Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows – **Veterinary Microbiology (2012)**, Volume 157, Issues 1-2, Pages 125–131.
- 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* – **Infection Immunology (2002)**, Volume 70, Number 1, Pages 204–210.
- BRETZLAFF, K – Rationale for treatment of endometritis in dairy cows – The Veterinary clinics North American – **Food Animal Practice (1987)**, Volume 3, Pages 593–598.
- CHAUDHERY, S.K, GUPTA, R.C, UPPAL, R.P – Administration of experimentally induced metritis condition in buffaloes – **Theriogenology (1987)**, Volume 28, Pages 961–969.
- CHOPRA, I, HODGSON, J, METCALF, B, POSTE, G – The search for antimicrobial agents effective against bacterial resistant to multiple antibiotics –

Antimicrobial Agents Chemotherapy (1997), Volume 41, Number 3, Pages 497-503.

- CUERVO, A, PULIDO-CID, M, CHAGOYEN, M, ARRANZ R, GONZÁLEZ-GARCÍA, V. A, GARCIA-DOVAL, C, CASTÓN, J. R, VALPUESTA, J, M, VAN RAAIJ, M. J, MARTÍN-BENITO, J, CARRASCOSA, J.L – Structural characterization of the bacteriophage T7 tail machinery – **The Journal of Biological Chemistry (2013)**, Volume 288, Issue 36, Pages 26290-26299.
- DELVAUX, J. C, – Comunidade Microbiana e Nitrogênio Mineral no Solo sob Florestas de Eucalipto em Função do Fluxo de Carbono para a Rizosfera. Dissertação (Mestrado), **Universidade Federal de Viçosa (2012)**.
- DIAS, R. S, ELLER, M. R, DUARTE, V. S, PEREIRA, Â. L, SILVA, C. C, MANTOVANI, H. C, OLIVEIRA, L. L, SILVA, E. DE A. M, DE PAULA, S. O – Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis – **Journal of Animal Science (2013)**, Volume 91, Pages 3930-3939.
- DONLAN, R. M – Biofilms: Microbial Life on Surfaces – **Emerging Infectious Diseases (2002)**, Volume 8, Pages 881-890.
- DRILLICH, M, RAAB, D, WITTKER, M, HEUWIESER, W – Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes a field trial – **Theriogenology (2005)**, Volume 63, Pages 1811–1823.
- DWIVEDI, J.N, SINGH, S – Studies on the histopathology of uterus of Indian buffalo – **Indian Journal of Animal Science (1975)**, Volume 45, Pages 21–24.
- FARIA, V. P, CORSI, M – Índices de Produtividade em Gado de Leite. In: Bovinocultura Leiteira: fundamentos da exploração racional, Piracicaba: **FEALQ (1993)**, Pages 01-22.

- GALIKOWSKA, E, KUNIKOWSKA, D, TOKARSKA-PIETRZAK, E H. DZIADZIUSZKO, E. H, J. M. ŁOŚ, J. M, GOLEC, P G. WĘGRZYN, G, ¹ AND ŁOŚ, M – Specific detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents – **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease (2011)**, Volume 30, Issue 9, Pages 1067-1073.
- GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- GOLKAR, Z, BAGASRA, O, PACE, D. G – Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis – **The Journal of Infection in Developing Countries (2014)**, Volume 8, Issue 2, Pages 129-136.
- GORSKI, A, DABROWSKA, K, SWITALA-JELE, K, NOWACZYK, M, WEBER-DABROWSKA, M, BORATYNSKI, J, WIETRZYK, J, OPOLSKI, A – New insights into the possible role of bacteriophages in host defense and disease – **Medical Immunology (2003)**, Volume 2.
- GUTIÉRREZ, D, MARTÍN-PLATERO, A, M, RODRÍGUEZ, A, MARTÍNEZ-BUENO, M, GARCÍA, P, MARTÍNEZ, B – Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) – PCR to assess genetic diversity – **FEMS Microbiology Letters (2011)**, Volume 322, Issue 1, Pages 90–97.
- HIJAZIN, M, ÜLBEGI-MOHYLA, H, ALBER, J, LÄMMLER, C, HASSAN, A. A, ABDULMAWJOOD, A, PRENGER-BERNINGHOFF, E, WEIß, R, ZSCHÖCK, M – Molecular identification and further characterization of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine mastitis and from various other origins – **Journal of Dairy Science (2011)**, Volume 94, Issue 4, Pages 1813-1819.
- HUSSAIN, A.M – Bovine uterine defense mechanisms: a review – **Journal of Veterinary Medicine Series B (1989)**, Volume 36, Issue 9, Pages 641–651.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/Pesquisa da Pecuária Municipal e Censo Agropecuário. SIDRA. Disponível em www.sidra.ibge.gov.br. Acesso: Julho de 2014.
- JANOWSKI, S, ZDUNCZYK, S, MWAANYA, E.S – Combined GnRH and PGF2alpha application in cows with endometrites puerperal is treated with

antibiotics – **Reproduction in Domestic Animal (2001)**, Volume 36, Pages 244–246.

- JOST, B. H & BILLINGTON, S. J – *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist – **Journal Antonie van Leeuwenhoek (2005)**, Volume 88, Issue 2, Pages 87-102.
- KASMAN, L.M, KASMAN, A, WESTWATER, C, DOLAN, J, SCHMIDT, M. G, NORRIS, J. S – Overcoming the Phage Replication Threshold: a Mathematical Model with Implications for Phage Therapy – **Journal of Virology (2002)**, Volume 76, Issue 11, Pages 5557-5564.
- KING, A.M.Q., ADAMS, M.J., CARSTENS, E.B. AND LEFKOWITZ, E.J. SAN DIEGO – **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012)**: Elsevier Academic Press.
- KROPINSKI, A. M, DAVID PRANGISHVILI, D, LAVIGNE, R – Position paper: The creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of *Bacteria* and *Archaea* – **Environmental Microbiology (2009)**, Volume 11, Issue 11, Pages 2775-2777.
- LAEMMLI, U.K – Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 – **Nature (1970)**, Volume 227, Pages 680-685.
- LEMOS, M, B, GALINARI, R, CAMPOS, B, BIASI, E, SANTOS, F – Tecnologia, especialização regional e produtividade: um estudo da pecuária leiteira em Minas Gerais – **Revista de Economia e Sociologia Rural (2003)**, Volume 41, Número 3, Páginas 117-138.
- MACHADO, V. S, BICALHO, M. L. DE MEIRA, JUNIOR, E. B. DE, ROSSI, R, RIBEIRO, B. L, ROSSI, R, RIBEIRO, B. L, LIMA, S, SANTOS, T, KUSSLER, A, FODITSCH, C, GANDA, E. K, OIKONOMOU, G, CHEONG, S. H, GILBERT, R. O AND BICALHO, R. C – Purified protein of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* and *Trueperella pyogenes* prevents puerperal metritis in holstein dairy cows – **PloS ONE (2014)**, Volume 9, Issue 3, Pages 1-11.
- MACHADO, V. S, OIKONOMOU, G, BICALHO, M. L. S, KNAUER, W. A AND BICALHO, R. C – Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial

diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA – **Veterinary Microbiology (2012)**, Volume 159, Pages 460-469.

- MAIA, GUILHERME BAPTISTA DA SILVA. PINTO, ARTHUR DE REZENDE. MARQUES, CRISTIANE YAIKA TAKAOKA. ROITMAN, FÁBIO BRENER. LYRA, DANIELLE DIDIER. Produção leiteira no Brasil. **Agropecuária. BNDES Setorial 37 (2013)**, Páginas 371-398.

- MALINOWSKI, E, LASSA, H, MARKIEWICZ, H, KAPTUR, M, NADOLNY, M, NIEWITECKI, W, ZIETARA, J – Sensitivity to antibiotics of *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli* from the uteri of cows with metritis/endometrites – **The Veterinary Journal (2011)**, Volume 187, Pages 234–238.

- MANSOUR, U.M, WAHBA, T.M, HEGAZY, M.A, ESSAMY, S.A – Biophysical changes in cervical mucus of buffaloes in response to PGF₂alpha treatment – **Assiut Veterinary Medical Journal (2003)**, Volume 49, Issue 98, Pages 232–248.

- MATSUZAKI, S, YASUDA M, NISHIKAWA H, KURODA M, UJIHARA T, SHUIN T, SHEN Y, JIN Z, FUJIMOTO S, NASIMUZZAMAN MD, WAKIGUCHI H, SUGIHARA S, SUGIURA T, KODA S, MURAOKA A, IMAI S – Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage MR11 – **The Journal of Infectious Disease (2003)**, Volume 187, Issue 4, Pages 613–624.

- MERRIL, C.R, SANKAR, D. S, ADHYA, S.L – The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine – **Nature Reviews/Drug Discovery (2003)**, Volume 2, Pages 489-497.

- NOAKES, D.E, PARKINSON, T.J, ENGLAND, G.C.W, ARTHUR, G.H – **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics (2002)**, eighth edition, Pages 399–408.

- OLSON, M. E, CERI, H, MORCK, D. W, BURET, A. G, READ, R. R - Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics – **The Canadian Journal of Veterinary Research (2002)**, Volume 66, Issue 2, Pages 86-92.
- PAISLEY, L.G, MICKELSEN,W.D, ANDERSON, P.B – Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review – **Theriogenology (1986)**, Volume 25, Pages 353–381.
- POSPIECH, A. & NEUMANN, B – Versatile quick-prep of genomic DNA from Gram -positive bacteria – **Trends in Genetics (1985)**, Volume 11, Pages 217-218.
- RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.
- ROBERTS, S.J – **Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (1986)**, Third edition, S.J. Roberts-Woodstock, New York, Pages 359–381.
- RIBEIRO, KARLA VELOSO GONÇALVES – Ecofago 017 atua na prevenção e degradação de biofilme de *Escherichia coli* – Dissertação (Mestrado), **Universidade Federal de Viçosa (2012)**.
- SAMBROOK, J, RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: A laboratory manual, Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)**, Volumes 1, 2 and 3.
- SANTOS, T.M.A, CAIXETA, L.S, MACHADO, V.S, RAUF, A.K, GILBERT, R.O, BICALHO, R.C – Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows – **Veterinary Microbiology (2012)**, Volume 157, Pages 125–131.
- SANTOS, T. M. A & BICALHO, R. C – Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and ealthy dairy cows – **PLoS ONE (2012)**, Volume 7, Issue 12, Pages 1-10.
- SANTOS, T. M. A & BICALHO, R. C – Complete genome sequence of vB_EcoM_ECO1230-10: A coliphage with therapeutic potential for bovine metritis – **Veterinary Microbiology (2011)**, Volume 148, Pages 267-275.

- SANTOS, T.M.A, CAIXETA, L.S, MACHADO, V.S, RAUF, A.K, GILBERT, R.O, BICALHO, R.C – Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Arcanobacterium pyogenes* isolated from the uterus of postpartum dairy cows – **Veterinary Microbiology (2010)**, Volume 145, Pages 84–89.
- SHELDON, I.M, CRONIN, J, GOETZE, L, DONOFRIO, G, SCHUBERTH, H.J – Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle – **Biology of Reproduction (2009)**, Volume 81, Number 6, Pages 1025-1032.
- SHELDON, I.M, NOAKES, D.E, RYCROFT, A.N, DOBSON, H – Effect of intrauterine administration of estradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle – **Animal Reproduction Science (2004)**, Volume 8, Pages 13–23.
- SILVA, E, GALVÃO, M, LEITÃO, S, JOST, B. H, CARNEIRO, C, VILELA, C. L, DA COSTA, L. L, MATEUS, L – **Veterinary Microbiology (2008)**, Volume 132, Pages 111-118.
- SMITH, H.W & HUGGINS, M.B – Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phages: its general superiority over antibiotics – **Journal of General Microbiology (1982)**, Volume 128, Pages 307-318.
- SOOTHILL, J. S – Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages – **Journal of Medical Microbiology (1992)**, Volume 37, Pages 258–262.
- SPIRIG, T, WEINER, E. M, CLUBB, R. T – Sortase enzymes in Gram-positive bacteria – **Molecular Microbiology (2011)**, Volume 82, Issue 5, Pages 1044-1059.
- SULAKVELIDZE, A, ALAVIDZE, Z, JUNIOR, J. G. M – Bacteriophage Therapy – **Antimicrobial Agents Chemotherapy (2001)**, Volume 45, Issue 3, Page 649.
- TOWBIN, H, STAHELINT, T, GORDON, J – Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets – **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America (1979)**, Volume 76, Issue 9, Pages 4350-4354.

- YASSIN, A. F; HUPFER, H; SIERING, C; SCHUMANN, P. – Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins *et al.* 1982 emend. Lehnen *et al.* 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium* – **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2011)**, Volume 61, Pages 1265–1274.
- WINZER, K, HARDIE, K. R, BURGESS, N, DOHERTY, N, KIRKE, D, HOLDEN, M. T. G, LINFORTH, R, COMELL, K. A, TAYLOR, A. J, HILL, P. J, WILLIAMS, P – LuxS: its role in central metabolism and the *in vitro* synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone – **Microbiology (2002)**, Volume 148, Pages 909-922.