

ROBERTO SOUSA DIAS

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
BACTERIÓFAGOS ESPECÍFICOS PARA *ESCHERICHIA COLI* CAUSADORA DE
MASTITE BOVINA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

ROBERTO SOUSA DIAS

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
BACTERIÓFAGOS ESPECÍFICOS PARA *ESCHERICHIA COLI* CAUSADORA DE
MASTITE BOVINA**

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

APROVADA: 29 de junho de 2011

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani

Prof. Eduardo de Almeida Marques

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois é o alicerce no qual me apoiei durante todos esses anos!

Agradeço aos meus pais, Dona Maria e Arnaldão, por tudo!! Vocês são os maiores exemplos que tive na vida, isso tudo é muito mais seus que meu...

À minha irmã Carol, por segurar a minha onda por várias vezes nessa Viçosa, valeu Carolzinha! Você é muito importante pra mim!

À minha família, em especial à minha avó Zezé, meus tios nas pessoas do Tio Armando, Tia Dirce, Tia Dora, Tio Bento e Robertão, pelo apoio incondicional. Lui, tô chegando! Vamos ser colegas de profissão!!

Ao Sérjão, pela amizade e confiança durante todos esses anos... quem diria que uma conversa (pelo menos eu estava tentando falar) na madrugada do Leão iria tão longe.

Ao Seu Leandro, pelos ensinamentos, conselhos e pelo apoio durante todos esses anos. Tem um pedaço seu aqui também!

Ao Prof. Murilo Zerbini pela assistência e co-orientação. À Prof.^a Márcia Rogéria, pelo auxílio e prestimosidade constantes. Aos Prof^{os} Hilário Cuquetto e Eduardo Marques pelas valorosas sugestões.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e por ter dado condições para a realização deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, ao coordenador do curso, Prof. José Eduardo Serrão, e aos professores da pós-graduação, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo imprescindível apoio financeiro.

À Michele, companheira das antigas e a Eliziária, figura ilustre.

Aos meus queridos estagiários: Livinha, Vinicius, Flavinha, Ana Clara, Lari e Sarah; Meu mais sincero obrigado!!

Aos técnicos do laboratório, João e Jorge. Vocês foram essenciais pra que esse trabalho existisse. Jones, muito obrigado meu amigo!

Aos amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular, que tornaram esse caminho mais agradável: Victor (Tanga), Tácio, Ângelo, Pâmela, Xisto, Nathália, Monise, Camilo, Eduardo, Marilane, Juju, Marcela, Carine, Luan, Samara e Gabi.

À Janaina pela paciência em ensinar o pulse field, mesmo tendo que lembrar a programação todas as vezes.... Vou comprar um caderno.

Aos amigos de Bocaiuva, que acreditaram em mim e sempre me deram força: Digas, Guinha, Lara, Erley, Esdras, Keilinha, Pedrão, Robertinho, Gordi, Fredinho e Bambas. Valeu galera!!!

Aos amigos de Viçosa: Moraci (Farofa), Caio (Chupinsky), Vinicius (Palmitato), Ricardo (Bituquinha), Lucão, Iarinha, Murilo, Thiago (Bebê), Otávio (Calango), Gustavo (Patolino), Gustavo (Miojo), Rafael (Traça), Rafael (Iconha), Fernandinha (Batata), Silvana (Nuvem negra.. rrsr) pelo companheirismo durante toda a caminhada, que começou no alojamento Pós e que não acaba aqui.

Agradeço todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

Índice

Lista de figuras.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Mastite Bovina.....	3
2.2 <i>Escherichia coli</i>	7
2.3 Bacteriófagos.....	11
3. Justificativa.....	17
4. Materiais	e
Métodos.....	18
4.1 Caracterização Molecular.....	18
4.1.1 Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	18
4.1.2 Estoques bacterianos.....	18
4.1.3 Isolamento de bacteriófagos a partir de amostras líquidas.....	19
4.1.4 Plaqueamento de bacteriófagos.....	19
4.1.5 Propagação de bacteriófagos a partir de placa de lise...	20
4.1.6 Propagação de bacteriófagos em meio líquido.....	20
4.1.7 Titulação de bacteriófagos.....	21
4.1.8 Análise da influência dos bacteriófagos na curva de crescimento bacteriana.....	21
4.1.9 Extração de material genético viral.....	21

4.1.10	Análise da composição do material genético viral.....	22
4.1.11	Eletroforese em campo pulsado.....	22
4.1.12	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	22
4.1.13	Obtenção de anticorpos.....	23
4.1.14	“Western blot”	23
4.2	Purificação.....	23
4.2.1	Padronização das condições de pH.....	24
4.2.2	Otimização das condições de eluição.....	24
4.2.3	Cromatografia de troca iônica.....	25
4.2.4	Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	25
5.	Resultados.....	
..	26	
5.1	Estoque bacteriano.....	26
5.2	Isolamento viral.....	26
5.3	Propagação viral.....	26
5.4	Curva de crescimento bacteriano.....	26
5.5	Extração e análise da composição do material genético viral..	27
5.6	SDS-PAGE.....	28
5.7	“ <i>Western blot</i> ”	28
5.8	Condições de adsorção.....	29
5.9	Condições de eluição.....	30
5.10	Cromatografia de troca iônica.....	30

5.11	Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	32
6.	Discussão.....	.. 35
7.	Conclusão.....	.. 41
8.	Referências.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A fisiopatologia da mama infectada por <i>E. coli</i> patogênica da glândula mamária.....	7
Figura 2: Estrutura organizacional do domínio proposto <i>Akamara</i> , dando ênfase a classificação do <i>Cyanostylvirus</i> presente na família <i>Myoviridae</i>	13
Figura 3: Os diversos ciclos de vida dos bacteriófagos.....	15
Figura 4: Análise da composição genômica de alguns bacteriófagos.....	27
Figura 5: PFGE mostrando as bandas respectivas aos genomas virais...	27
Figura 6: A - Perfil protéico dos isolados virais B - Perfil do fago 008 após propagação.....	28
Figura 7: “ <i>Western blot</i> ”.....	29
Figura 8: Condições de adsorção.....	30
Figura 9: Condições de eluição.....	30
Figura 10: Varreduras realizadas em espectrofotômetro das alíquotas 21, 22, 23 e 24.....	31
Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.....	32
Figura 12: Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	34

RESUMO

DIAS, Roberto Sousa. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2011. **Isolamento, purificação e caracterização molecular de bacteriófagos específicos para *Escherichia coli* causadora de mastite bovina.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Co-orientadores: Leandro Licursi de Oliveira, Francisco Murilo Zerbini Junior, Márcia Rogéria de Almeida Lâmega.

A mastite bovina causa sérios prejuízos tanto ao produtor, quanto à indústria de produtos lácteos. É causada por diversos patógenos, divididos em dois grupos principais: ambientais e contagiosos. Enquanto o número de casos de mastite contagiosa vem diminuindo, os casos causados por patógenos ambientais aumentam, sendo a *Escherichia coli* o principal agente etiológico. Há um significativo aumento no número de novos casos causados por essa bactéria, sendo atualmente o principal responsável por casos de mastite que culminam com a morte do animal. O surgimento cada vez mais freqüente de linhagens multi-droga resistentes e altamente patogênicas torna necessário o estudo de alternativas ao uso da antibioticoterapia. Assim os bacteriófagos, vírus que infectam bactérias e são altamente específicos, surgem como uma opção viável devido principalmente ao baixo custo e a rapidez com que é possível isolar um novo fago específico a linhagens resistentes. Estudos recentes da genética dos fagos e bacteriana tornam mais seguro o uso da fagoterapia, o que torna necessário estudos moleculares, visando obter dados com relação a possível

utilização dos mesmos na fagoterapia. Neste contexto, foram isolados 15 bacteriófagos específicos para linhagens de *Escherichia coli* isoladas em rebanhos acometidos pela mastite bovina. Os isolados foram caracterizados com relação ao seu perfil protéico, evidenciando a presença de 2 proteínas de baixo peso molecular, composição genômica de DNA dupla fita com cerca de 44 kb. Com o objetivo de reduzir os custos e o tempo na obtenção de suspensões com alto grau de pureza, foi padronizada uma metodologia de purificação por cromatografia de troca iônica em um sistema FPLC, sendo possível a obtenção de suspensões virais com grau de pureza apreciável.

ABSTRACT

DIAS, Roberto Sousa. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, June, 2011. **Isolation, purification and molecular characterization of bacteriophages specific for *Escherichia coli* causing bovine mastitis.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisers: Leandro Licursi de Oliveira, Francisco Murilo Zerbini Junior, Márcia Rogéria de Almeida Lâmega.

The bovine mastitis causes serious damage to both the producer and the dairy industry. Caused by various pathogens, divided into two main groups: environmental and contagious. While the number of cases of contagious mastitis has decreased, cases caused by environmental pathogens is greatest, and *Escherichia coli* the primary etiologic agent. There is a significant increase in the number of new cases caused by this bacterium, which is currently the main driver of mastitis cases that culminate in the death of the animal. The frequent emergence of multi-drug resistant strains and highly pathogenic becomes necessary to study alternatives to the use of antibiotics. So bacteriophages, viruses that infect bacteria and are highly specific, appear as a viable option mainly due to the low cost and speed with which you can isolate a specific new phage against resistant strains. Recent studies of the genetics of bacterial phages and make safer the use of fagoterapia, necessitating molecular studies, to obtain data regarding the possible use of them in fagoterapia. In this context, were isolated 15 bacteriophages specific to *Escherichia coli* strains, isolated in herds affected by bovine mastitis. The isolates were characterized with respect to their protein

profile, indicating the presence of two proteins of low molecular weight, composition of double-stranded DNA genome of about 44 kb. In order to reduce costs and time to obtain suspensions with a high degree of purity, was a standardized methodology for purification by ion exchange chromatography in a FPLC system, it is possible to obtain viral suspensions with a appreciable purity.

1. Introdução

A mastite pode ter etiologia infecciosa ou não-infecciosa (Bradley, 2002), sendo a infecciosa que gera mais prejuízos econômicos em rebanhos leiteiros (Wilson *et al*, 1997; Pitkala *et al*, 2004; Zhao e Lacasse, 2008) o que a torna um problema mundial, que leva a perdas multibilionárias (Sordillo e Streicher, 2002). Organismos tão diversos como bactérias, micoplasmas, leveduras e algas podem estar implicadas como causas da doença. Com relação à classificação dos patógenos, estes podem ser divididos em contagiosos ou ambientais (Watts, 1988; Blowey e Edmondson, 1995; Bradley, 2002). A mastite ambiental vem aumentando em alguns países e rebanhos, na mesma velocidade com que o controle da mastite contagiosa vem obtendo sucesso (Lam *et al*, 1996; Kaipainen *et al*, 2002, Peeler *et al*, 2002), sendo que os principais ambientais são *Enterobacteriaceae* (particularmente *E. coli*) e *Streptococcus uberis* (Bradley, 2002). Diferente das linhagens enteropatogênicas e bacterêmicas, as quais são um número relativamente baixo de sorotipos de *E. coli* (China e Goffaux, 1999), os isolados de mastite pertencem a um número muito grande de grupos sorológicos que, apesar de não patogênicas, podem adquirir genes que as convertem em linhagens patogênicas (Shpigel *et al*, 2008). *Escherichia coli* não sobrevive bem no ambiente, sendo as espécies naturalmente susceptíveis a ampicilina. No entanto, atualmente cerca de 50–60%, tanto de linhagens isoladas de humanos quanto ambientais, são resistentes a ampicilina (Wu *et al*, 1992; Stapleton *et al*, 1995; French, 2010). Carbapenemas são agora o último recurso no tratamento de *E. coli* multi-droga resistente (MDR) e a emergência de organismos resistentes aos carbapenemas é, portanto, um motivo de preocupação. Organismos portadores do gene da carbapenemase são raros em muitas partes do mundo, mas tem havido relatos do aumento desses organismos (Nordmann *et al*, 2009; French, 2010). A resistência bacteriana aos antibióticos fez com que houvesse um maior interesse pela fagoterapia (Merril *et al*, 1996). Esse interesse vem sendo observado na literatura científica, parte deriva de uma série de experimentos conduzidos com lisinas de fagos (Loeffler *et al*, 2001; Schuch *et al*, 2002), do grande número

de experimentos com com animais utilizando fagos viáveis como agentes antibacterianos (Merril *et al*, 1996; Biswas *et al*, 2002; Westwater *et al*, 2003) e de revisões históricas da experiência soviética com a fagoterapia (Carlton, 1999; Sulakvelidze *et al*, 2001).

2. Revisão bibliográfica

2.1 Mastite Bovina

A inflamação protege o tecido contra infecções e injúrias, no entanto pode ter consequências deletérias quando não devidamente regulada. Notavelmente, as três semanas que antecedem o parto até as três primeiras semanas de lactação têm sido reconhecido como um período onde os mecanismos chave da regulação do sistema imunológico do hospedeiro são alterados dramaticamente. Como consequência, o rebanho leiteiro está mais susceptível a doenças metabólicas e infecciosas durante o período perinatal (Drackley *et al*, 2001; Goff, 2006; Sordillo *et al*, 2009). Desordens ocorridas durante este período podem grandemente impactar a eficiência na produtividade durante a lactação (Sordillo e Aitken, 2009). Sordillo *et al* (2009) observou que a tremenda carga metabólica experimentada pelo gado leiteiro durante o período perinatal pode interferir no sutil balanço existente entre a indução da resposta imune e o fim do processo inflamatório, o que deixa o gado mais susceptível a várias doenças de grande importância econômica, dentre elas a mastite, uma inflamação da glândula mamária. Em suma, células epiteliais bovinas podem ser danificadas durante uma infecção intramamária por 1) liberação de variados produtos celulares e extracelulares de patógenos bacterianos; 2) enzimas lisossomais e produtos oxidativos liberados de fagócitos durante a fagocitose de organismos invasores e 3) proteases do sangue e citocinas liberadas durante a resposta imune.

Pode ocorrer naturalmente necrose do tecido epitelial mamário durante a mastite clínica, bem como durante mastites experimentais mais severas. Em casos moderados de mastite causada por *Escherichia coli*, ocorre um dano mínimo ao tecido alveolar, como demonstrado por Frost *et al* (1980). Neste experimento ele mostrou que as principais mudanças foram superficiais e confinadas ao epitélio da cavidade do teto, seios lactíferos e dutos largos, sem sérios envolvimento do tecido secretor. Em casos mais graves, a infecção progride via sistema de dutos, causando uma reação

inflamatória limitada, mas com intenso comprometimento do tecido secretor (Frost e Brooker, 1986).

A mastite pode ter etiologia infecciosa ou não-infecciosa (Bradley, 2002), sendo a infecciosa que gera mais prejuízos em rebanhos leiteiros (Wilson *et al*, 1997; Pitkala *et al*, 2004; Zhao e Lacasse, 2008) o que a torna um problema mundial, que leva a perdas multibilionárias (Sordillo e Streicher, 2002). Organismos tão diversos como bactérias, micoplasmas, leveduras e algas podem estar implicadas como causas da doença. Com relação à classificação dos patógenos, estes podem ser divididos em contagiosos ou ambientais (Watts, 1988; Blowey e Edmondson, 1995; Bradley, 2002).

Na essência, os patógenos contagiosos podem ser considerados como organismos adaptados a sobreviverem dentro do hospedeiro, em especial no interior da glândula mamária. São capazes de estabelecer infecções sub-clínicas, as quais tipicamente se manifestam como uma elevação na contagem de células somáticas (predominantemente neutrófilos e células epiteliais) presentes no leite e se dispersam entre as vacas do rebanho no período de lactação ou próximo a este (Radostits *et al*, 1994; Bradley, 2002).

A mastite sub-clínica é a principal forma de mastite presente nos rebanhos atuais, excedendo 20 a 50% de casos da doença (Wilson *et al*, 1997; Pitkala *et al*, 2004; Zhao e Lacasse, 2008). O custo desse tipo de mastite é dificilmente quantificável, mas muitos especialistas concordam que o custo para o produtor médio é maior que da mastite clínica. No entanto, considerando uma prevalência de 45% de mastite sub-clínica, o custo tem sido estimado em torno de \$180 a \$320 dólares por caso (Zhao e Lacasse, 2008). Aproximadamente 70% desse custo está associado com a redução na produção de leite e em grande parte resulta de danos irreversíveis ao tecido mamário (Oliver e Calvino, 1995).

Em contraste aos patógenos contagiosos, patógenos ambientais são bem descritos como invasores oportunistas da glândula mamária, pouco adaptados a sobreviverem dentro do hospedeiro, normalmente invadem,

multiplicam, induzem resposta imune no hospedeiro e são eliminados rapidamente. A mastite ambiental vem aumentando em alguns países e rebanhos, na mesma velocidade com que o controle da mastite contagiosa vem obtendo sucesso (Lam *et al*, 1996; Kaipainen *et al*, 2002, Peeler *et al*, 2002;). Os principais patógenos contagiosos compreendem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*; os principais patógenos ambientais são *Enterobacteriaceae* (particularmente *E. coli*) e *Streptococcus uberis* (Bradley, 2002). A maioria das bactérias coliformes isoladas é caracterizada como *E. coli*, sendo também a principal causa de mastite crônica (Shpigel *et al*, 1998, Grohn *et al*, 2005).

As infecções se originam em ambientes contaminados com fezes do gado e invadem o úbere via o canal do teto (Eberhart, 1984; Kaipainen *et al*, 2002). O teto e o canal do teto são as primeiras linhas de defesa da glândula mamária. A queratina presente no canal do teto provê uma barreira química e física contra a penetração bacteriana (Capuco *et al*, 1992). Contudo, bactérias podem escapar aos mecanismos de defesa naturais pela multiplicação ao longo do canal do teto (especialmente após a ordenha) ou pela propulsão pela cisterna do teto causada por flutuações do vácuo durante a ordenha. Após superar as defesas anatômicas, para estabelecer a doença, as bactérias devem também evadir dos mecanismos celulares e humorais de defesa (Sordillo e Streicher, 2002). A imunidade inata é mais ampla e com resposta mais rápida (Beutler, 2004; Burvenich *et al*, 2007), sendo na glândula mamária bovina o sistema mais importante de defesa, pois a eliminação de apenas um conjunto de células efetoras (por exemplo, neutrófilos) pode ser suficiente para causar uma profunda imunodeficiência (Jain *et al*, 1971; Burvenich *et al*, 2007).

Em vertebrados, a resposta inata celular é amplamente dependente de células mielóides. Células fagocitárias engolfam e destroem os patógenos. Os fagócitos polimorfonucleares (os quais incluem neutrófilos, basófilos e eosinófilos) tem importância chave na contenção da infecção. Em particular, neutrófilos são exterminadores especializados, contando com um amplo espectro de ferramentas, com as quais destroem patógenos invasores (Beutler, 2004). Essas células migram do sangue para a glândula

mamária (Paape *et al*, 2000; Burvenich *et al*, 2007) e são as principais células efectoras do sistema imune inato bovino, sendo amplamente estudadas nos últimos 30 anos (Burvenich *et al*, 2007). No entanto, a proteção oferecida por essas células só é efetiva se há um rápido influxo de neutrófilos com subsequente fagocitose (Paape *et al*, 2002; Paape *et al*, 2003). Após ativação, liberam grânulos protéicos e cromatina que juntas formam redes extracelulares (NET do inglês *neutrophil extracellular traps*) que se ligam a bactéria. Os NET's degradam fatores de virulência e levam a morte bacteriana. Atividade bactericida de histonas tem sido observada há algum tempo (Hirsch, 1958) e recentemente foi mostrado fazer parte do material liberado por neutrófilos estimulados (Burvenich *et al*, 2007) (Figura 1).

Estudos recentes demonstraram que *E. coli* invade as células da glândula mamária por uma via endocítica modificada, podendo ser encontrada em reservatórios intracelulares, *in vivo* e *in vitro*, o que indica que o estabelecimento desses reservatórios são um relevante mecanismo de persistência usado por essas bactérias no ambiente do úbere (Passey *et al*, 2008). Caso a infecção persista, o número de células somáticas presentes no leite continua a aumentar, concomitantemente, os danos ao tecido são agravados. Os alvéolos presentes na glândula mamária começam a perder a integridade estrutural e a barreira hemato-leite é alterada, essas modificações levam a entrada de fluido extracelular na glândula e sua mistura ao leite. Mudanças visíveis no leite e no úbere começam a ocorrer, podendo incluir: inchaço, vermelhidão, formação de coágulos e a produção de leite aguado. Por definição, este é o início dos sintomas clínicos (Zhao e Lacasse, 2008). Em sua forma mais severa, com multiplicação bacteriana descontrolada, todo o epitélio dos seios lactíferos é perdido, gerando hemorragia no tecido intersticial, levando o animal a óbito por toxemia dentro de poucas horas após a infecção (Burvenich *et al*, 2003). A severidade da doença varia consideravelmente variável entre os animais (Zhao e Lacasse, 2008).

Diante da realidade atual nos rebanhos leiteiros e dos prejuízos causados pela mastite, é de suma importância o estudo de métodos de

controle da infecção, principalmente causadas por bactérias ambientais, sobretudo *E. coli*, evitando assim prejuízos ao produtor e conseqüente melhora na qualidade de vida, seja pelo aumento da produtividade do rebanho e ou pelo aumento do valor agregado ao produto.

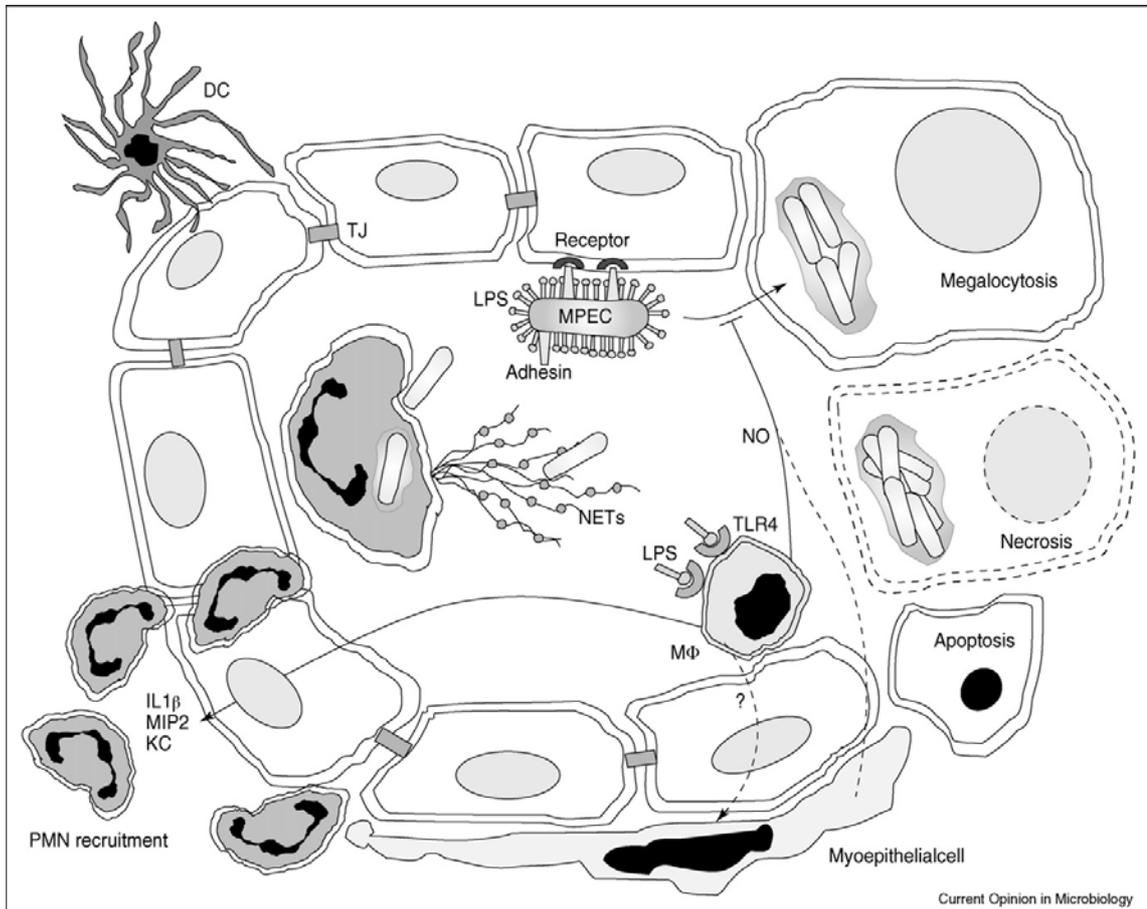


Figura 1 A fisiopatologia da mama infectada por *E. coli* patogênica da glândula mamária (MPEC, do inglês *mammary pathogenic Escherichia coli*). O esquema mostra a replicação no espaço alveolar. LPS interage com receptores do tipo Toll (TLR) e sinalizam a ativação de macrófagos alveolares (MΦ), que produzem citocinas inflamatórias (IL1β, TNFα) e quimiocinas (KC, MIP2), resultando no recrutamento de neutrófilos (PMN, polimorfonucleares) e no tráfego através do epitélio alveolar (TJ, do inglês tight junction) para o espaço alveolar. O recrutamento de neutrófilos leva a morte bacteriana através de fagocitose e pela formação de redes extracelulares de neutrófilos (NET). A invasão do epitélio induz megalocitose, necrose e apoptose. A função das células dendríticas alveolares mamárias (DC, do inglês dendritic cell) é atualmente desconhecida (Shpigel *et al*, 2008).

2.2 *Escherichia coli*

O sistema de classificação atual agrupa os seres vivos em três domínios: *Bacteria*, *Archaea* (formalmente chamada *Archaeobacteria*) e os

Eucarya. As eubactérias são divididas entre dois grandes grupos, conhecidos como Gram-positivas e as Gram-negativas, baseado no teste de coloração de Gram (Snyder e Champness, 2007). *E. coli* é um dos organismos mais estudados no filo *Proteobacteria*. São classificadas como pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, tendo certa importância devido a sua capacidade de fermentar lactose. Mais de 700 linhagens antigenicamente diferentes ou sorotipos foram classificadas, baseado nos antígenos O, H e K. Existem duas classes distintas de coliformes: linhagens que são inofensivas (linhagens não-patogênicas) e linhagens que causam uma variedade de infecções típicas (linhagens patogênicas) (China e Goffaux, 1999; Burvenich *et al*, 2003).

O habitat natural de *E. coli* é o intestino de mamíferos (Shpigel *et al*, 2008), onde vivem milhões de células, fazendo parte da microbiota intestinal de humanos e animais. Elas aderem às mucosas do intestino grosso, onde funcionam como uma barreira à proliferação de bactérias patogênicas, por possuírem atividade antagonista. São massivamente secretadas com as fezes no ambiente, sendo assim ubíquo ao ambiente bovino (Jones, 1990; Burvenich *et al*, 2003). Linhagens encontradas em leite mastítico são similares aos isolados em fezes (Burvenich *et al*, 2003). *E.coli* se comportam como patógenos oportunistas, no entanto tem havido um aumento substancial nos casos de mastite causados por esse patógeno e atualmente já é aceito como a principal causa de óbitos por mastite (Menzies *et al*, 1995).

Diferente das linhagens enteropatogênicas e bacterêmicas, as quais são um número relativamente baixo de sorotipos de *E.coli* (China e Goffaux, 1999), os isolados de mastite pertencem a um número muito grande de grupos sorológicos que, apesar de não serem patogênicas, podem adquirir genes que as convertem em linhagens patogênicas (Shpigel *et al*, 2008). São classificadas por antígenos de superfície, mas com uma camada interna comum a todos os sorotipos (Dosogne *et al*, 2002a; Burvenich *et al*, 2003).

Apesar de ser caracterizado como um patógeno ambiental, a adaptação de *E. coli* ao bovino como hospedeiro, vem sendo observada (Bradley e Green, 2001; Barkema *et al*, 2009). Até o momento, não há relatos de transmissão contagiosa, no entanto medidas de biossegurança para evitar a transmissão de linhagens completamente adaptadas à glândula mamária podem tornar-se necessárias (Barkema *et al*, 2009). Patógenos coliformes são o agente etiológico mais comumente isolado de casos severos, clinicamente diagnosticados em fazendas leiteiras com bom manejo (Anderson *et al*, 1982; Hogan *et al*, 1989; Burvenich *et al*, 2007) ou alta produtividade de leite (Shum *et al*, 2009).

A membrana externa de bactérias Gram-negativas difere em estrutura da membrana interna, e da membrana plasmática de bactérias Gram-positivas. Uma das características mais distintas é a presença de proteínas integrais, conhecidas como porinas, e a alta permeabilidade causada por elas, devido a formação de canais de transporte, um número aproximado de 20.000 por célula (Nikaido, 2003; Rakhuba *et al*, 2010). Outra diferença marcante é a presença de uma camada externa formada por um único glicolípido – o Lipopolissacarídeo (LPS), exclusivo de bactérias Gram-negativas (Rakhuba *et al*, 2010), que pode agravar a infecção. Em estudo, Dosogne *et al* (2002b) obteve 16,8 µg de LPS partindo de um inóculo inicial de 10^5 UFC/mL, incubadas por 6 horas. Sendo a quantidade de LPS calculada para o leite produzido por um quarto infectado 10^5 vezes maior que o valor encontrado no sangue (Van Den Berg *et al*, 1992; Burvenich *et al*, 2003), podemos perceber a importância dessa endotoxina. Proteínas localizadas na membrana e vários sítios presentes no LPS servem como receptores para bacteriófagos (Lindberg, 1973; Rakhuba *et al*, 2010).

Espécies de *E. coli* encontradas no ambiente são naturalmente susceptíveis a ampicilina. No entanto, atualmente cerca de 50–60%, tanto de linhagens isoladas de humanos quanto ambientais, são resistentes a ampicilina, normalmente devido a produção de duas β-lactamases, TEM1 e TEM2. (Wu *et al*, 1992; Stapleton *et al*, 1995; French, 2010). Mutações em TEM1 e TEM2 tem resultado em novas β-lactamases com amplo espectro

de ação, que conferem a *E. coli* resistência a segunda e terceira geração de cefalosporinas. Os genes que codificam estas enzimas estão usualmente localizados em plasmídeos transferíveis e normalmente são associados com resistência a aminoglicosídeos e outros antibióticos (French, 2010). Carbapenemas são agora o último recurso no tratamento de *E. coli* multi-droga resistente (MDR). A emergência de organismos resistentes aos carbapenemas é, portanto, um motivo de preocupação. Organismos portadores do gene da carbapenemase são raros em muitas partes do mundo, mas tem havido relatos do aumento desses organismos. Esse aumento se deve a transmissão mediada por plasmídeos em *Klebsiella pneumoniae* (KPC), principalmente em algumas partes da China, Israel, Grécia, América do Sul e nos EUA (Nordmann *et al*, 2009; French, 2010). Recentemente foi relatado enterobactérias, particularmente *E. coli* e *K. pneumoniae*, produtoras de uma nova e transmissível carbapenemase, New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1) (Kumarasamy *et al*, 2010; French, 2010). Estes organismos são incomuns, mas sua frequência tem aumentado e são resistentes a quase todos os antimicrobianos. Tem sido encontrado na Índia, Paquistão, e no Reino Unido, com evidências de dispersão intercontinental, sendo agora os coliformes multi-droga resistentes uma séria ameaça à saúde pública (French, 2010). Ensaio clínicos e estudos experimentais têm, repetidamente, demonstrado pouco ou nenhum benefício na utilização da antibioticoterapia no tratamento de mastite clínica ou subclínica causada por coliformes em bovinos (Kirk e Barlett, 1984; Jones, 1990; Burvenich *et al*, 2007). Essas observações indicam a necessidade urgente de buscar novas formas para prevenir ou tratar a mastite causada por coliformes (Burvenich *et al*, 2007). Além do problema causado pela resistência, surtos recentes com linhagens de *E. coli* altamente virulentas vem sendo amplamente divulgados nos meios de comunicação, com casos registrados em 8 países europeus, entre eles Alemanha, Áustria, Dinamarca, Holanda, Noruega, Espanha, Suécia, Suíça e Grã-Bretanha (Último Segundo, 2011).

Os resultados e dados apresentados mostram a necessidade de alternativas à antibioticoterapia, uma vez que os antibióticos de última

geração já vêm sendo desafiados por linhagens resistentes. Neste contexto, os bacteriófagos surgem com uma alternativa viável e promissora. Devido ao baixo custo e a rapidez com que um fago específico para uma determinada bactéria pode ser isolado.

2.3 Bacteriófagos

Bacteriófagos são amplamente distribuídos e exibem dramáticas manifestações na ecologia bacteriana, tanto em meio líquido quanto em meio sólido. Alguns pesquisadores já sugeriam a presença de bacteriófagos, no entanto estes estudos não davam suporte suficiente para pesquisas futuras (Waldor *et al*, 2005). Hankin (1896) relatou que as águas dos rios Jumma e Ganges teriam a capacidade de matar alguns tipos de bactérias, especialmente do *Vibrio cholerae*. Ele mostrou que essa capacidade asséptica era filtrável e sensível à fervura, o que o levou a crer que se tratava de uma substância química volátil (Hankin, 1896; Waldor *et al*, 2005). Em 1901, Emmerich e Löw descreveram uma substância presente em culturas autolisadas que tinha a capacidade de lisar diversas culturas, efeito curativo em infecções experimentais e provia imunidade profilática a inoculações subseqüentes. Estes experimentos iniciais foram limitados a observações em culturas líquidas já que no início da bacteriologia as culturas eram conceitualizadas como um organismo em si e não como uma população dinâmica de células individuais. Os primeiros e mais claros experimentos usaram o espalhamento de culturas em meio sólido e se basearam na observação de bacteriólise, isto é placas de lise (Waldor *et al*, 2005). Frederick W. Twort publicou artigo em 1915, em que notou o crescimento de algumas colônias contaminantes de *micrococcus*, e que algumas possuíam aparência mucóide, aquosas ou vítreas. Ele interpretou esses resultados como sendo algo semelhante a uma doença infecciosa aguda de *micrococcus* (Twort, 1915). Independentemente, em 1917 Félix d'Herelle descreve um "micróbio" antagonista às bactérias, lisando-as em culturas líquidas e formando manchas discretas, as quais ele chamou de placas, na superfície de ágar com bactérias semeadas. Pensando em se tratar de ultra-virus que invadem bactérias e se multiplicam, tais organismos foram denominados bacteriófagos (d'Herelle, 1917).

Algumas das mais importantes descobertas na área da genética foram realizadas por meio de estudos com bacteriófagos, ou resumidamente fagos. Os fagos são seres não vivos, com material genético envolto em uma capa protéica e/ou uma membrana. Por se tratar de seres com vida intracelular obrigatória, os vírus não podem se multiplicar fora das células bacterianas. No entanto, se encontram um tipo bacteriano susceptível, inserem seu material genético, DNA ou RNA, que utiliza a maquinaria celular no sentido de produzir mais fagos. Carregam apenas uma cópia de cada gene, o que torna o isolamento de fagos mutantes relativamente simples, já que todos os mutantes irão apresentar o fenótipo desejado, sem que haja a necessidade de cruzamentos (Snyder e Champness, 2007).

Logo após sua descoberta, os fagos foram usados para combater patógenos bacterianos (Levin e Bull, 1996; Weinbauer, 2004). No entanto, a fagoterapia foi abandonada no ocidente, devido principalmente a resultados ambíguos e a descoberta dos antibióticos. Em alguns países da Europa Oriental e os que formavam a União Soviética, a fagoterapia continuou a ser utilizada (Weinbauer, 2004). A ameaça de resistência aos antibióticos renovou o interesse pela fagoterapia (Merril *et al*, 1996).

Um novo domínio biológico foi proposto, ao lado dos domínios celulares *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*, o domínio Akamara (ακαμαρα; do grego sem câmara ou vazio), i.e., agentes infecciosos acelulares contendo ácido nucléico como genoma (Hurst, 2000, Weinbauer, 2004). Uma possível estrutura organizacional deste domínio foi sugerida com dois reinos e vários filos e classes, como mostrado na figura 2.

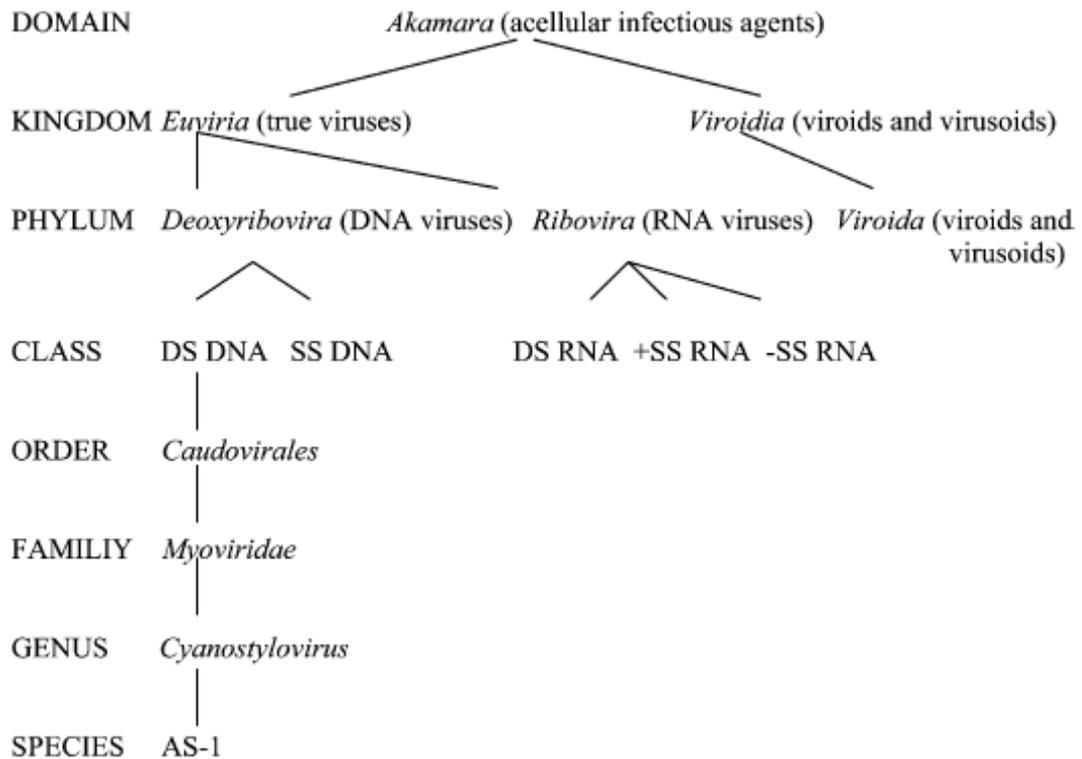


Figura 2 Estrutura organizacional do domínio proposto *Akamara*, dando ênfase a classificação do *Cyanostylovirus* presente na família *Myoviridae* (Weinbauer, 2004)

Vários passos durante o ciclo de vida dos fagos são comuns a todos os vírus: adsorção, liberação do ácido nucléico do capsídeo, expressão e replicação, montagem, liberação e transmissão (Duckworth, 1987). A adsorção dos bacteriófagos ocorre em duas etapas. Na primeira, a adsorção ocorre pela interação com uma estrutura definida na superfície celular (após um contato inicial) e é reversível, podendo ainda o fago perder a interação com o receptor, culminando com a não infecção da célula. Durante a segunda etapa, uma ligação irreversível ocorre entre a estrutura fágica (por exemplo fibras da cauda) e o receptor presente na superfície bacteriana. Após a adsorção, a parede celular é permeabilizável (pelo uso de enzimas presentes na cauda ou capsídeo, por exemplo) possibilitando a inserção do material genético viral, enquanto o capsídeo permanece fora da célula. Após a inoculação do genoma, este pode seguir dois caminhos, ser integrado ao genoma do hospedeiro ou permanecer no citoplasma. Para os vírus, este é um estágio onde o genoma do fago existe dentro do hospedeiro, mas fora do seu genoma, no entanto a expressão gênica, replicação do genoma e morfogênese ocorrem normalmente (Weinbauer,

2004). O período de latência é a fase da infecção onde não há fagos livres ou extracelulares detectáveis e descreve a fase do ciclo que varia entre a adsorção e a lise celular. O período anterior a montagem dos capsídeos e inclusão dos genomas é conhecido como período de eclipse. O período de crescimento é caracterizado pela liberação de fagos maduros para o meio ambiente, devido à lise celular e à detecção de fagos livres (virions). O número de virions liberados por célula para o meio é chamado o *burst size*.

Fagos caudados causam a lise celular por um sistema duplo de lise, constituído por hidrolases de peptidoglicanos (endolisinas), que atacam a mureína presente na parede celular, e holinas, que danificam a membrana plasmática e permitem que as endolisinas tenham acesso ao peptidoglicano (Ackermann, 1999). Podem também ser liberados por brotamento ou extrusão. O estágio extracelular termina com a inviabilidade do fago ou uma nova infecção. Os fagos mostram vários ciclos de vida: lítico, lisogênico, pseudolisogênico e infecções crônicas (Figura 3). No ciclo lítico, os fagos (líticos ou virulentos) direcionam a maquinaria do hospedeiro para a produção de novos fagos, os quais são liberados pela lise celular. O ciclo lisogênico se caracteriza pela manutenção do genoma (lisogênico ou temperado) em um estado de dormência (profago), em que se replica juntamente com o genoma do hospedeiro, até que o ciclo lítico seja induzido. A decisão lisogênica dos fagos temperados, pelo estabelecimento do prófago ou não, acontece após a introdução do material genético no interior celular. Infecções crônicas ocorrem quando uma célula é infectada e a progênie viral é constantemente liberada por brotamento ou extrusão. Em infecções persistentes (Pseudolisogenia, estado de carreador), fagos multiplicam em uma fração da população. Pseudolisogenia e estado de carreador são amplamente usados como sinônimos, no entanto estado de carreador é mais estritamente utilizado para bactérias contendo profago na forma de plasmídeo (Ackermann e Dubow, 1987; Weinbauer, 2004).

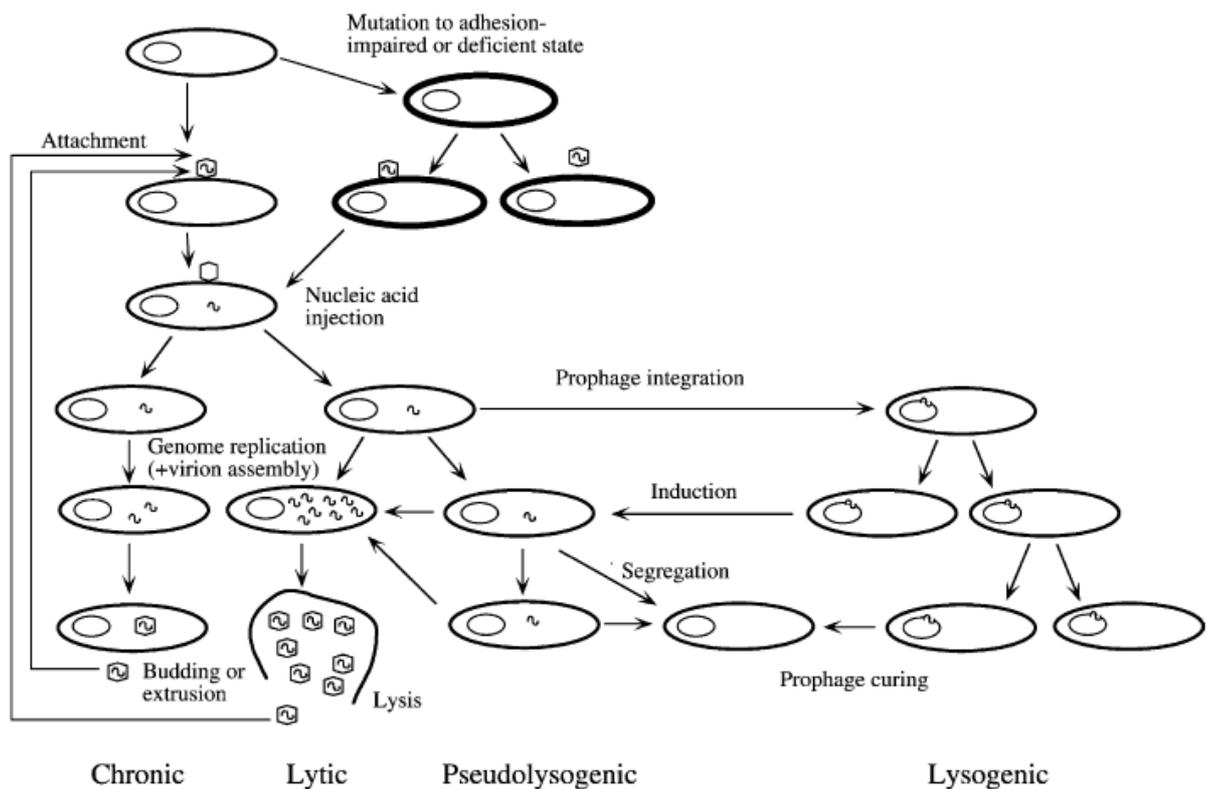


Figura 3 Os diversos ciclos de vida dos bacteriófagos são apresentados. Infecções crônicas, com o brotamento ou extrusão de virions; ciclo lítico, levando a lise celular; pseudolisogenia, algumas células se mantêm não infectadas e lisogenia, onde é observada a presença do prófago (Weinbauer, 2004). No entanto, tais classificações são provavelmente uma simplificação da diversidade de ciclos de vida dos bacteriófagos (Lenski, 1988)

A observação de que 96% dos fagos isolados de procariotos são caudados (Ackermann, 1996) sugere que a maioria dos bacteriófagos pertencem ao grupo monofilético de fagos caudados (ordem *Caudovirales*). Possuem DNA de fita dupla como material genético e são divididos em três famílias, de acordo com características bioquímicas e moleculares da cauda (Ackermann, 1999), com uma cauda longa e flexível (*Siphoviridae*), fagos com cauda contrátil (*Myoviridae*) e fagos com cauda muito curta (*Podoviridae*) (Weinbauer, 2004). A origem dos fagos caudados ocorreu antes da separação dos três domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*, tendo provavelmente cerca de 3,5-3,7 bilhões de anos. Fagos são relatados para *Eubacteria* e *Archaea*, considerando sua presença para células do domínio *Eukarya* uma dúvida (Ackermann, 1999, Hendrix *et al*, 1999).

Um renovado interesse na fagoterapia vem sendo observado na literatura científica. Parte desse interesse deriva de uma série de experimentos conduzidos com lisinas de fagos (Loeffler *et al*, 2001; Schuch

et al, 2002), do grande número de experimentos com animais utilizando fagos viáveis como agentes antibacterianos (Merril *et al*, 1996; Biswas *et al*, 2002; Westwater *et al*, 2003) e de revisões históricas da experiência soviética com a fagoterapia (Carlton, 1999; Sulakvelidze *et al*, 2001).

3. Justificativa

A mastite bovina causa sérios prejuízos, tanto aos produtores rurais quanto à indústria de laticínios, além de significar sérios riscos à saúde dos consumidores. A mastite ambiental vem aumentando em alguns países e rebanhos, na mesma proporção com que a mastite contagiosa vem obtendo sucesso no controle.

A antibioticoterapia ainda é o método mais utilizado no tratamento e prevenção da mastite, no entanto o surgimento de linhagens mais virulentas e resistentes aos antibióticos comumente utilizados traz a necessidade de novas alternativas a antibioticoterapia. Nesse contexto, os bacteriófagos surgem como uma alternativa viável, pois o isolamento de um novo bacteriófago contra bactérias resistentes é mais rápido e com custo reduzido, quando comparado a obtenção de um novo antibiótico.

Sendo a *Escherichia coli* um dos principais patógenos ambientais, o estudo de alternativas no controle do patógeno é algo necessário, principalmente após os recentes surtos de linhagens altamente virulentas. Neste trabalho buscamos isolar e caracterizar, tanto molecular quanto morfológicamente bacteriófagos específicos para *Escherichia coli* isolada em casos de mastite clínica e sub-clínica de rebanhos leiteiros da Região da Cidade de Viçosa/MG, além de padronizar um método de purificação de bacteriófagos caudados por cromatografia de troca iônica.

4. Material e métodos

4.1 Isolamento e Caracterização Molecular

4.1.1 Linhagens de *Escherichia coli*

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho fazem parte da coleção de patógenos causadores de mastite do Laboratório Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral (DBG) - Universidade Federal de Viçosa (UFV). São linhagens isoladas do leite de animais com mastite clínica e sub-clínica: *E. coli* 28, *E. coli* 29, *E. coli* 30 e *E. coli* 31. As amostras de leite foram estriadas em placa de Petri com ágar-sangue de ovino e em ágar McConkey de cada uma das amostras coletadas e incubadas a 37°C, por 24 horas. Logo após, foi feita coloração de Gram a partir das colônias que cresceram nas placas. Para as bactérias cocos Gram-positivas, foram realizados testes de catalase. As bactérias catalase positivo foram submetidas ao teste da coagulase e as bactérias catalase negativas foram submetidas ao teste CAMP. No caso de bactérias Gram-negativas, foi utilizado o kit BacTray I (Laborclin, cód. LB 880108).

4.1.2 Estoques bacterianos

Estoques bacterianos utilizados durante os ensaios com bacteriófagos foram obtidos seguindo metodologia descrita por Sambrook e Russell, 2001. Bactérias foram estriadas em placas contendo meio Luria - Bertani, composto por Triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%, pH 7,0) suplementado com 1,4% de ágar bacteriológico (LB-ágar) e incubadas a 37°C. Colônias isoladas foram cultivadas em meio LB líquido sob as mesmas condições. Após o período de incubação, com as culturas em fase log (considerada aqui culturas com DO igual a 0,5), foram centrifugadas a 4000xg por 20 minutos e o precipitado ressuspenso em 2 mL de MgSO₄ 10 mM. A densidade óptica medida no comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀) foi ajustada para 2. Este estoque bacteriano foi utilizado nos ensaios posteriores de plaqueamento. As linhagens utilizadas foram mantidas em glicerol 50% à temperatura de -20°C para estudos futuros.

4.1.3 Isolamento de bacteriófagos a partir de amostras líquidas

O isolamento dos bacteriófagos seguiu metodologia descrita por Tanji *et al* (2008) com modificações. Amostras líquidas foram colhidas nas centrais de captação da rede de esgoto do Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) da cidade de Viçosa, acondicionadas em tubos de 50 mL protegidos da luz solar, sendo mantidos no gelo durante todo o transporte. Em laboratório foram centrifugadas a 12.000xg por 15 minutos para precipitação de partículas maiores. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e a esse adicionado polietilenoglicol (PEG, massa molecular 8.000) na concentração final de 10% (m/v). Os tubos foram mantidos durante a noite a 4°C e em seguida centrifugados a 11.000xg por 20 minutos, visando a precipitação das partículas virais. O precipitado resultante foi suspenso em 5 mL de tampão de diluição de fago (SM: 5,8 g de NaCl, 2,0 g de MgSO₄.7H₂O, 50 mL Tris-HCl 1M pH 7,5, 5 mL gelatina 2% e H₂O q.s.p 1L) e extraído uma vez com igual volume de clorofórmio. O clorofórmio e os restos celulares foram removidos por centrifugação (4000xg, 10 minutos, 4°C). O concentrado viral resultante foi mantido a 4°C e serviu como fonte de bacteriófagos para o plaqueamento, por até 10 meses.

4.1.4 Plaqueamento de bacteriófagos

As suspensões obtidas no processo de isolamento foram testadas quanto a presença de partículas virais viáveis pelo método de '*pour plate*', seguindo metodologia descrita em Sambrook e Russell, 2001. Alíquotas de 100 µL das suspensões foram incubadas com 100 µL do estoque bacteriano (linhagem *E. coli* 30, escolhido aleatoriamente entre as linhagens presentes na coleção de patógenos causadores de mastite do Laboratório de Imunovirologia – DBG/UFV e utilizado em todos os procedimentos de propagação), por 30 minutos e a estas adicionado 3 mL de LB acrescentado de ágar bacteriológico na concentração de 0,7%, fundido a 55°C. Após homogeneização com o auxílio de uma micropipeta, a mistura resultante foi vertida em placa de cultura contendo LB-ágar. Após a solidificação à

temperatura ambiente, as placas foram incubadas por 1 hora sem inversão, visando facilitar a dispersão dos fagos e aumentar o diâmetro da placa de lise. Em seguida, as placas foram invertidas e mantidas por 24 horas em estufa a 37°C. No dia seguinte, a presença de placas de lise foi observada para cada amostra. Placas de lise individuais foram colhidas com o auxílio de ponteiros para servir como fonte de propagação de fagos em cultura líquida. A repetição deste procedimento, por três vezes para cada placa, sugeria a obtenção de fagos isolados.

4.1.5 Propagação de bacteriófagos a partir de placas de lise

A linhagem bacteriana de isolamento foi ativada pela incubação a temperatura de 37°C, até atingir com DO_{600} entre 0,7 e 0,5 foi então repicada em 15 mL de meio LB até atingir DO_{600} igual a 0,5. Placas de lise individuais foram adicionadas e incubadas por 12 horas sem agitação, a 37°C. Após o período de incubação foi adicionado igual volume de LB estéril, sendo incubado por 4 horas sob as mesmas condições. Em seguida foi acrescentado clorofórmio 10% (v/v) e NaCl 1M, com o objetivo de lisar as bactérias e dissociar os fagos dos restos celulares. As misturas foram homogeneizadas e mantidas a 4°C por 1 hora, seguido por centrifugação a 5000xg, por 20 minutos à 4°C para sedimentação de restos celulares e separação de fases. A fase aquosa foi cuidadosamente recolhida e transferida para tubos estéreis, sendo armazenados a 4°C. As amostras foram plaqueadas em seguida para avaliação do sucesso da técnica e viabilidade dos fagos, sem a adição de mitomicina.

4.1.6 Propagação de bacteriófagos em meio líquido

A metodologia empregada seguiu procedimento descrito por Sambrook e Russell, 2001, com algumas modificações. Foram adicionados 100 µL (aproximadamente 10^6 UFC/mL) de culturas bacterianas (DO_{600} 0,5) e 100 µL das suspensões de fagos a 250 mL de meio BHI. As culturas foram mantidas a 37°C sem agitação até a completa lise celular, seguida pela adição de clorofórmio e NaCl e posterior centrifugação para separação das fases. Este procedimento visou obter um número maior de partículas

virais infectivas. Posteriormente, as suspensões obtidas foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA).

4.1.7 Titulação de bacteriófagos

Foram realizadas diluições seriadas das suspensões fágicas a serem tituladas e plaqueadas conforme descrito no item 3.1.4. As faixas de diluição empregadas foram determinadas empiricamente, obtendo diluições máximas da ordem de 10^{-15} . As placas foram mantidas em estufa, após solidificação, sob temperatura de 37°C por um período de 8 a 12 horas. Após este período foi observada a formação de placas de lise. Para a obtenção do título viral, foram levadas em consideração diluições onde o número de placas de lise variava entre 30 e 300. O título viral foi expresso em unidades formadoras de placas/mL (UFP/mL), e foi determinado pelo uso da seguinte fórmula:

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

4.1.9 Extração de material genético viral

A extração foi realizada pelo método com Proteinase K (Sambrook e Russell, 2001). Foram adicionados Proteinase K 50 µg/mL e SDS 0,5% (p/v) à suspensão viral. As amostras foram incubadas por 1 hora a 56°C, após o período de incubação foi adicionado igual volume de fenol equilibrado (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, Missouri, USA). Os tubos foram agitados por 10 segundos, e as fases separadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi recolhida e a ela adicionado igual volume de uma solução 1:1 fenol-clorofórmio. À fase aquosa foi adicionado igual volume de clorofórmio e após nova centrifugação a fase aquosa foi recolhida e misturada a etanol gelado na proporção de 2:1, visando a precipitação do DNA. A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e então

centrifugado a 15.000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em água deionizada.

4.1.10 Análise da composição do material genético viral

O material genético obtido foi tratado com enzimas capazes de degradar RNA (Ribonuclease A, Fermentas International, Inc. Canada) ou DNA (Desoxirribonuclease I, Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, Missouri, USA), conforme recomendação do fabricante. Após os tratamentos as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris 0.89 M - Borato 0.89 M - EDTA 0.02 M), sob uma voltagem de 90V (Ogden e Adams, 1987).

4.1.11 Eletroforese em campo pulsado

O tamanho dos genomas virais foi determinado por eletroforese em campo pulsado, realizada em gel de agarose 1% em solução TBE 0,5X a 14°C por 14 horas, com uma voltagem de 6 V/cm. O tempo de pulsação variou de 5 a 10 segundos. O gel foi analisado após coloração com brometo de etídio 0,5 µg/ml e visualizado com luz ultravioleta.

4.1.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Para obtenção de proteínas em quantidade suficiente, cerca de 10 mL da suspensão viral foram concentrados pela adição de PEG 8.000, seguida por incubação a 4°C e posterior centrifugação. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de água destilada e deionizada. As proteínas foram então precipitadas com ácido tricloroacético na concentração final de 10%. O precipitado protéico foi suspenso em 30 µL de H₂O destilada e tampão de amostra 1X. A corrida foi realizada em gel de poliacrilamida 14%, em condições desnaturantes a uma voltagem constante de 190 V seguindo o protocolo descrito por Laemmli, 1970. O gel foi corado com Coomassie® Brilliant Blue G-250 e descorado em solução contendo metanol 50%/ácido acético 30%.

4.1.13 Análise de antigenicidade e reatividade cruzada dos isolados virais

Camundongos Swiss com 5 semanas de idade foram inoculados com proteínas de concentrados virais, divididos em grupos de 4 animais para cada isolado, obtidas pela metodologia citada no item 3.1.12. As proteínas foram solubilizadas em tampão PBS 1X (NaCl 0,13 M, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 9 mM, KH₂PO₄ 1 mM), e inoculadas com duas doses de reforço, todas tendo PBS como veículo. A administração seguiu protocolo descrito por Galikowska *et al* (2011), com algumas modificações. A primeira inoculação, assim como as seguintes, foram por via intraperitoneal, tendo sido realizada uma dose de reforço com uma semana após a primeira inoculação, e uma segunda dose de reforço após mais uma semana, visando estimular a maior proliferação de clones de linfócitos produtores de anticorpos específicos aos bacteriófagos.

4.1.14 “Western Blot” das proteínas virais

Proteínas virais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, seguindo procedimento descrito no item 3.1.12. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando tampão de transferência PBS-tween (PBS 1x acrescentado de tween 20 a 0,5% (v/v)) usando sistema de transferência Digel DGV10. A transferência se deu por duas horas a 190v e foi confirmada por coloração em Ponceau (Ponceau S 0,1% (p/v), metanol 5% (v/v)). O bloqueio foi realizado com BSA 0,5% por um período de 15 a 30 minutos. A membrana foi lavada 3x com PBS-tween e adicionado o anticorpo primário (policlonal 1:100) obtido pela imunização de camundongos, item 3.1.13. Após o período de incubação de 1 h à temperatura ambiente, a membrana foi novamente lavada 3x com PBS-tween e adicionado o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (1:100). Após adição do revelador a reação foi observada por um período mínimo de 10 minutos. Seguindo metodologia de Towbin *et al* (1979), com modificações.

4.2 Purificação de bacteriófagos

Na etapa de purificação foi utilizada coluna DEAE-Sephadex A50, contendo dietilaminoetil ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$) que se comporta como uma base fraca e matriz formada de dextrana. Após o empacotamento a coluna foi conectada a um sistema cromatográfico LKB FPLC (GE Healthcare, Pennsylvania, USA).

4.2.1 Padronização das condições de pH

A padronização das condições de iniciais se deu pela análise do ponto isoelétrico, valor de pH no qual a carga líquida é igual a 0, das proteínas que compõem o capsídeo viral (todo o procedimento de padronização foi realizada com o fago 008). Para tanto, foram realizados ensaios em diferentes valores de pH, onde pudemos determinar o pH no qual a carga líquida da partícula viral é negativa, possibilitando sua ligação aos grânulos da resina. Uma quantidade de 0,1 g de resina DEAE-Sephadex A-50 foi equilibrada com 10 lavagens de 10 mL dos tampões com os valores de pH a serem testados (4,5-9,5). Em seguida 5 mL das suspensões virais foram misturados com igual volume dos tampões indicados e mantidos sob agitação em tubos Falcon® de 15 mL, por no mínimo 30 minutos. Após o período de agitação, os tubos foram mantidos a temperatura ambiente, por 15 minutos, para completa sedimentação da resina. Foi analisada a presença de material genético no sobrenadante, seguindo metodologia descrita no item 3.1.9. A ausência do genoma do bacteriófago no sobrenadante indicava a ligação das partículas virais à resina .

4.2.2 Otimização das condições de eluição dos bacteriófagos

Foram testados três eluentes, sendo um com baixo pH (5,5) e dois com altas concentrações salinas (1M e 2M) em pH 7,5. Após a homogeneização das suspensões virais com a resina, a mesma foi lavada 10 vezes com 10 mL de solução com baixa salinidade (Tris-HCl pH 7,0/0,5M NaCl). A presença de contaminantes foi observada por espectrofotometria no ultravioleta (UV). A resina foi eluída com diferentes tampões e a presença do vírus no sobrenadante foi analisada por eletroforese em gel de

agarose e métodos espectrofotométricos. Todo o procedimento de padronização foi realizado em tubos Falcon de 15 mL.

4.2.3 Cromatografia de troca iônica

Os ensaios cromatográficos foram realizados em coluna empacotada com resina DEAE-Sephadex A-50, (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, Missouri, USA) conectada a um aparelho LKB - FPLC (GE Healthcare, Pennsylvania, USA). A coluna foi equilibrada com 10 volumes do tampão A (0,5 mM Tris-HCl, pH 7,5). Um volume de 25 mL da amostra foi misturado com igual volume do tampão A, visando manter a suspensão em pH ideal. Após a passagem da amostra a um fluxo contínuo de 0,3 mL/min, o fluxo de B (2M NaCl, 0,5 mM Tris-HCl, pH 7,5) foi elevado para 100%. Os picos coletados tiveram a presença e a pureza dos vírus confirmada por eletroforese em gel de agarose e por varredura em espectrofotômetro Evolution 60 (Thermo Scientific), com o comprimento de onda variando de 220 a 320nm.

4.2.4 Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Alíquotas com a presença de partículas virais confirmadas foram utilizadas. Um volume de 10 µL foi pipetado sobre um *grid* (200 *mesh*), previamente coberto com Formvar. O *grid* permaneceu incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e o excesso de líquido retirado com papel de filtro. As partículas virais aderidas foram contrastadas com acetato de uranila 2% por 20 segundos e analisadas em microscópio eletrônico Zeiss EM 109 TEM operando a 80 Kv, no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

5. Resultados

5.1 Estoques bacterianos

Os estoques bacterianos se mostraram viáveis e foram utilizados por até duas semanas. Não foram utilizados estoques bacterianos por mais de duas semanas devido a relatos da literatura (Sambrook e Russell, 2001).

5.2 Isolamento viral

Foi isolado um total de 15 bacteriófagos, todos da rede de esgoto da cidade de Viçosa. Estes foram nomeados da seguinte maneira: UFVEcophage001 (001), UFVEcophage002 (002), UFVEcophage003 (003), UFVEcophage004 (004), UFVEcophage005 (005), UFVEcophage006 (006), UFVEcophage007 (007), UFVEcophage008 (008), UFVEcophage009 (009), UFVEcophage010 (010), UFVEcophage011 (011), UFVEcophage012 (012), UFVEcophage013 (013), UFVEcophage014 (014) e UFVEcophage015 (015). Sendo mantidos a 4 °C para utilização nos experimentos.

5.3 Propagação viral

Ambas as propagações foram bem sucedidas, no entanto a propagação em pequena escala, a partir da placa de lise, se mostrou mais eficiente. A técnica nos permite obter um volume menor, no entanto com títulos extremamente altos. Foi observado aumento no título de bacteriófagos após a adição de Mitomicina C à cultura de *E.coli*, um antibiótico isolado do *Streptomyces caespitosus*, solúvel em água e solventes orgânicos com massa molecular de 334 daltons (Verweij e Pinedo, 1990). A Mitomicina C é um alquilante (eletrofílico) que forma ligações covalentes com o material genético em qualquer estágio do ciclo celular, o que bloqueia a replicação do DNA (Jampel, 1992), causando a ativação dos mecanismos de reparo e do sistema SOS (Snyder e Champness, 2007). A ativação do sistema leva a clivagem de proteínas virais que inibem a entrada em ciclo lítico. O sucesso da propagação foi confirmado pela presença do material genético viral nas suspensões por meio de plaqueamento.

5.5 Extração e análise da composição do material genético viral

O procedimento de extração do material genético viral se mostrou eficiente, pois foi possível detectar a presença do material genético em todas as amostras, apesar do baixo rendimento obtido para algumas amostras. O material genético obtido foi tratado com nucleases e análise por eletroforese indicou que os genomas se mostraram resistentes a RNase e sensíveis a DNase, o que indica genoma constituído de DNA (Figura 4). A análise por eletroforese em campo pulsado, relevou que os genomas virais apresentavam aproximadamente 44 kb (Figura 5).

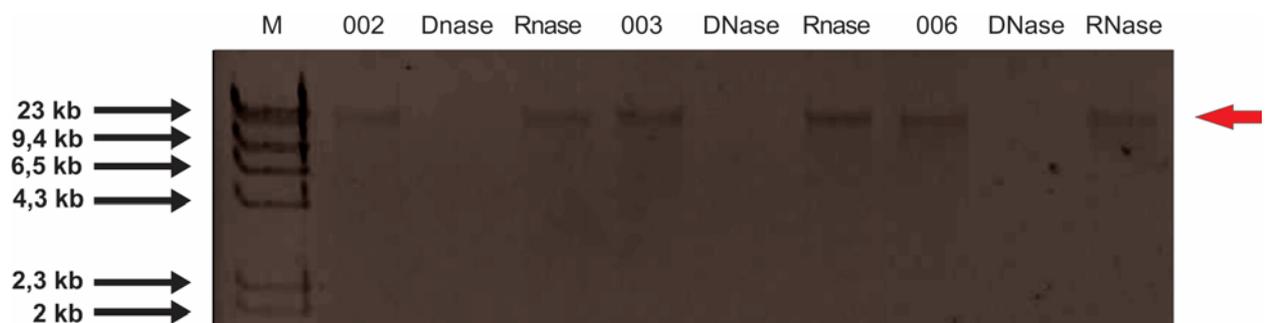


Figura 4 Análise da composição genômica de alguns bacteriófagos. A figura mostra os bacteriófagos 002, 003 e 006 tratados com DNase (Dnase) e RNase (Rnase). A ausência de genoma íntegro quando tratado com DNase, indica se tratar de material genético constituído de ácido dextrribonucléico (DNA). Os mesmos tratamentos foram repetidos para os demais isolados e o mesmo resultado foi encontrado.

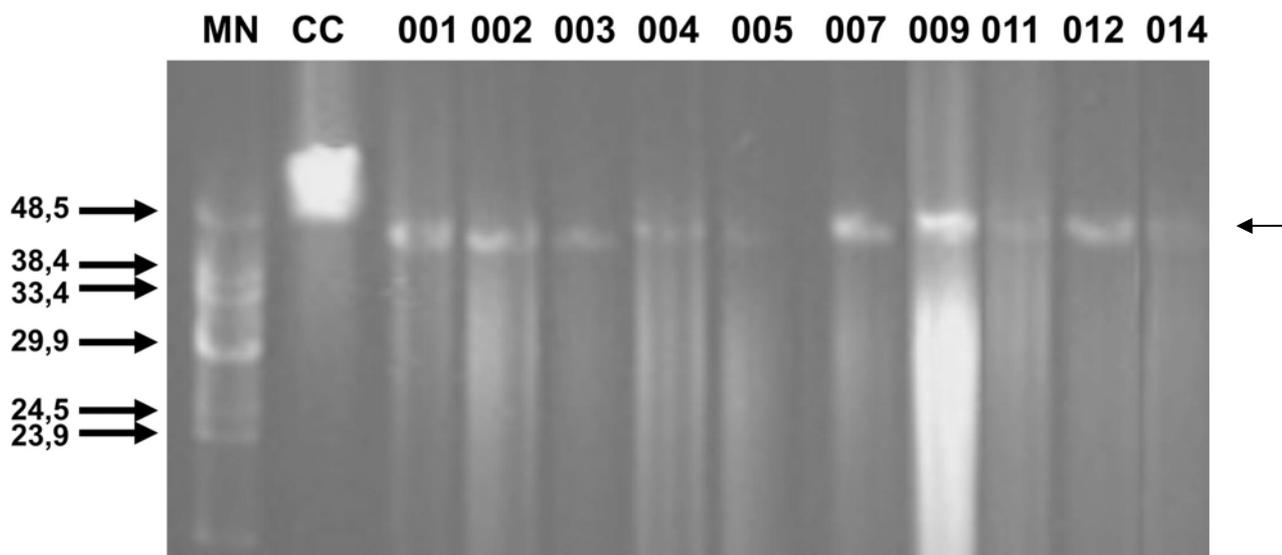


Figura 5 Análise por PFGE dos genomas virais mostrando as bandas respectivas aos genomas virais, com cerca de 44 kb, indicado pela seta. Foram utilizados os seguintes marcadores: MN - MonoCut; CC

– *Pulse Field · Concatamers*. Alguns genomas não são apresentados nesta figura, mas outros resultados demonstram que também possuem genomas com aproximadamente 44 kb.

5.6 SDS-PAGE

A análise por SDS-PAGE revelou a presença de três proteínas principais constituintes das partículas virais, duas com massas moleculares de 26,9 kDa e 23,4 kDa, e a terceira com cerca de 87 kDa. Os isolados apresentaram, além das duas mais conservadas, algumas outras proteínas com massas moleculares em torno de 132 kDa, 77,4 kDa e 7 kDa. Essas proteínas foram comuns a mais de um fago, estando presentes em mais de um isolado, sendo que alguns continham duas ou mais das proteínas citadas (Figura 6).

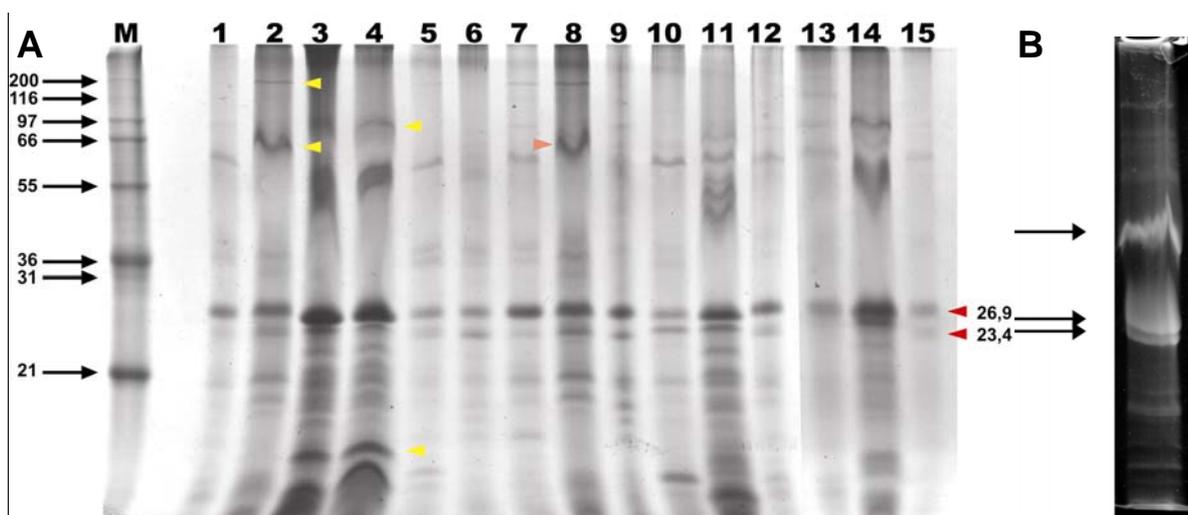


Figura 6 A – Análise por SDS-PAGE do perfil protéico dos isolados virais. As cabeças de seta amarelas mostram proteínas que são comuns a apenas alguns isolados, enquanto as cabeças de seta vermelhas mostram proteínas conservadas em todos os isolados. B - Perfil do fago 008 após propagação, evidenciando as bandas mais intensas referentes ao fago, primeiro fago a obtermos altos títulos.

5.7 Western blot

Os anticorpos obtidos contra todos os isolados virais foram utilizados no ensaio de “*Western blot*”. Os resultados sugerem que as duas proteínas principais, com massas moleculares iguais a 26,9 kDa e 23,4 kDa, observadas no SDS-PAGE, possuem capacidade antigênica, induzindo a produção de anticorpos específicos. No entanto, apresentaram reatividade cruzada entre os isolados analisados, demonstrando haver epítomos antigênicos comuns entre eles (Figura 7).

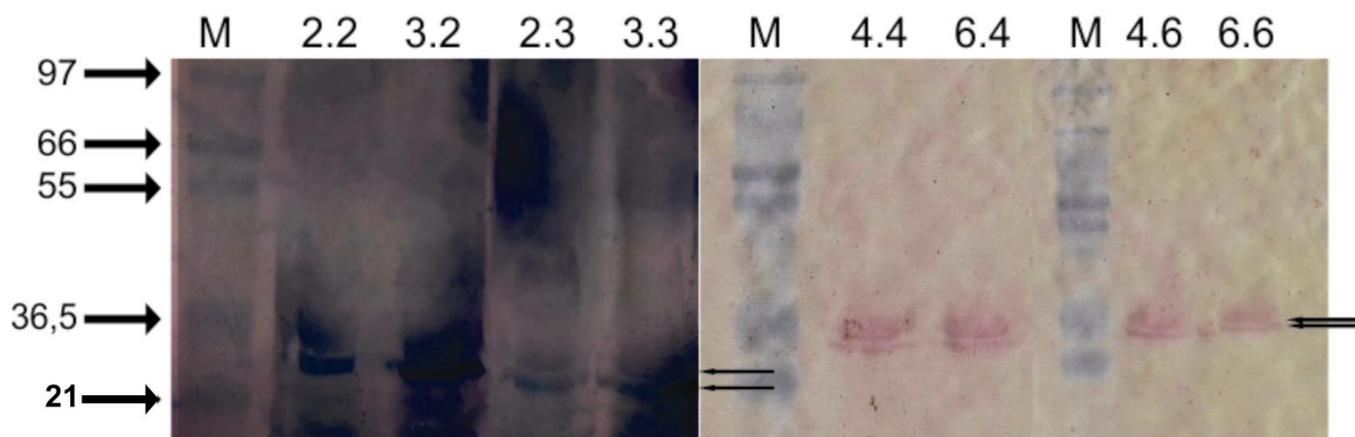


Figura 7 Foi analisada a reatividade cruzada entre os 15 bacteriófagos isolados. Os bacteriófagos foram testados contra anticorpos específicos contra outro isolado. M - marcador de peso molecular; 2.2 - 002 incubado com anticorpos anti 002; 3.2 - 003 incubado com anticorpos anti 002; 2.3 - 002 incubado com anticorpos anti 003; 3.3 - 003 incubado com anticorpos anti 003; 4.4 - 004 incubado com anticorpos anti 003; 6.4 - 006 incubado com anticorpos anti 004; 4.6 - 004 incubado com anticorpos anti 006; 6.6 - 006 incubado com anticorpos anti 006.

5.8 Condições de adsorção

Pela análise da presença do material genômico, foi observado que a partir do valor de pH 6,5 há uma significativa redução na quantidade de material genético presente no sobrenadante, estando completamente ausente a partir do valor de pH 7,0. Estes resultados sugerem que as proteínas constituintes do capsídeo viral possuem ponto isoelétrico próximo ao pH 6,5 e adquirem carga negativa líquida a partir do pH 7,0, permanecendo ligado à resina (Figura 8).



Figura 8 Gel de agarose revelando a presença do genoma do fago 008 no sobrenadante após agitação em presença da resina, do pH 4,5 ao pH 6,0. Em valores de pH acima de 6,0 não foi possível observar o genoma viral no sobrenadante, o que indica que a permanência das partículas virais ligadas a resina. Em pH 6,5 ainda podemos observar algum material genético, o que não ocorre em valores superiores. M – Marcador de peso molecular □ Hind III.

5.9 Condições de eluição

Apenas o pH 5,5 foi incapaz de interferir nas interações eletrostáticas entre a resina e as partículas virais, assim como as concentrações de 0,5 M e 1,0 M de NaCl em tampão Tris-HCl, pH 7,5. Porém quando utiliza-se o tampão com concentração de 2 M de NaCl foi possível observar a presença dos bacteriófagos no sobrenadante após agitação do fago 008, previamente agitado em presença da resina com concentração salina inferior, a qual garantiu a permanência dos fagos ligados a resina (Figura 9).

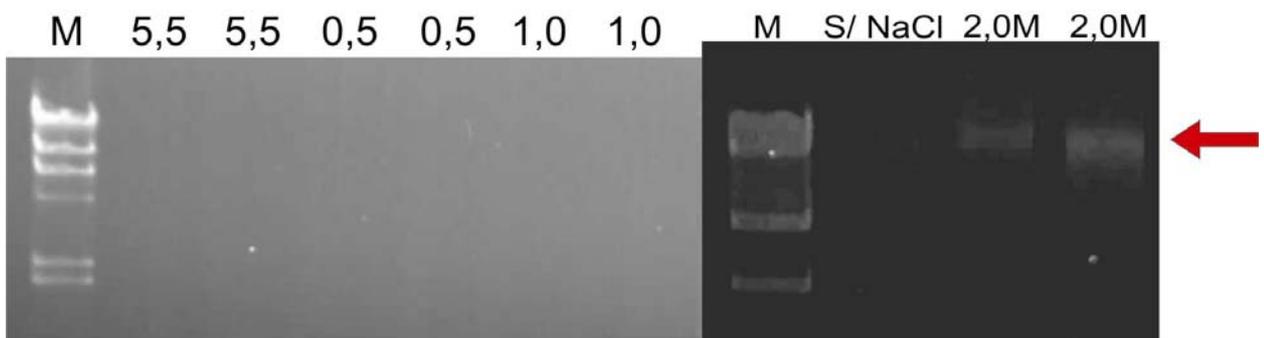


Figura 9 Gel de agarose do genoma viral eluído com 2 M e ausência do mesmo nas outras condições analisadas: baixo pH (pH 5,5), baixa salinidade (NaCl 0,5 M) e salinidade média (NaCl 1,0 M).

5.10 Cromatografia de troca iônica

A análise cromatográfica sugeriu a presença dos bacteriófagos em mais de uma alíquota (alíquotas 21, 22, 23 e 24) (Figura 10), no entanto

a alíquota 24, que concorda com o pico de absorvância, apresentou maior concentração protéica, evidenciado por uma maior absorvância no comprimento de onda de 280 nm e maior grau de pureza quando comparado com as demais alíquotas, demonstrando pela observação de proteínas adicionais presentes tanto no *pool* quanto no concentrado com PEG (Figura 11).

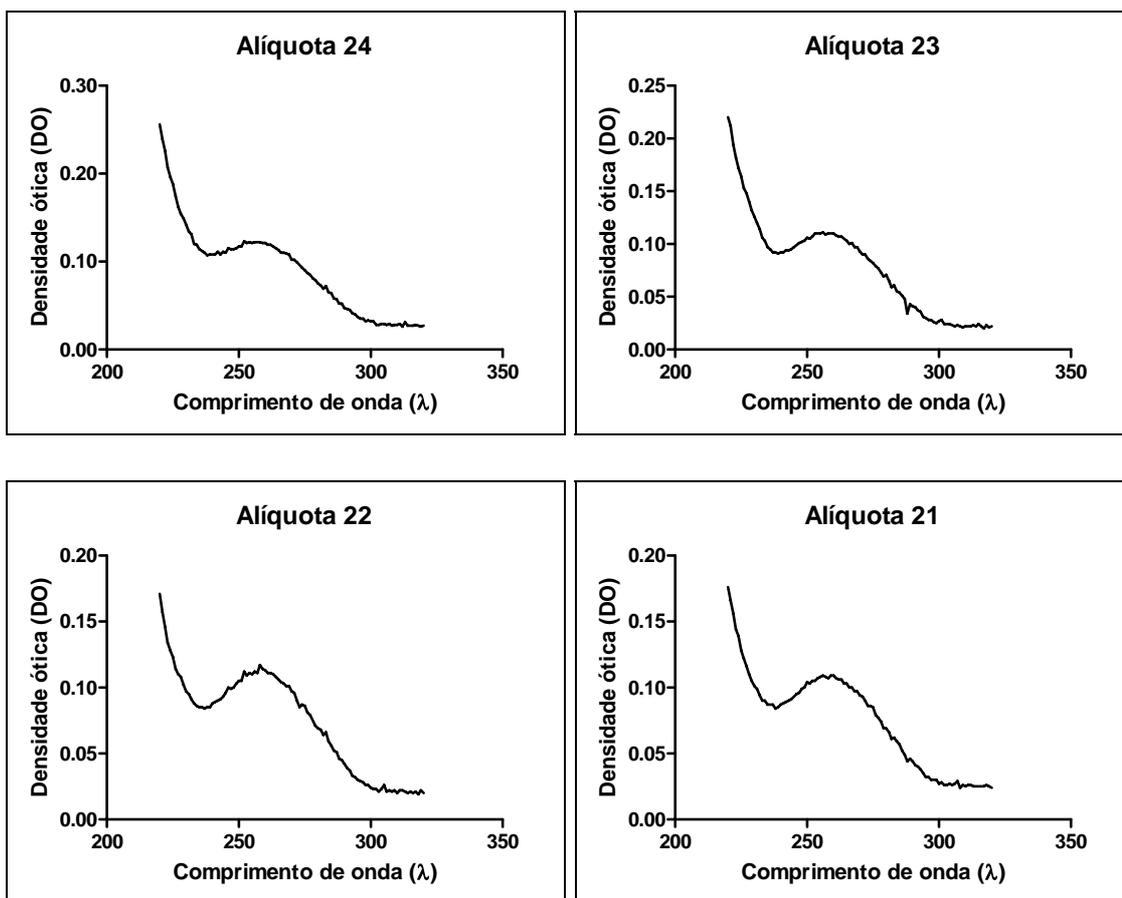


Figura 10 Varreduras realizadas em espectrofotômetro das alíquotas 21, 22, 23 e 24, com comprimento de onda variando de 220 nm a 320 nm, a fim de analisar a concentração protéica e inferir sobre a pureza das alíquotas.

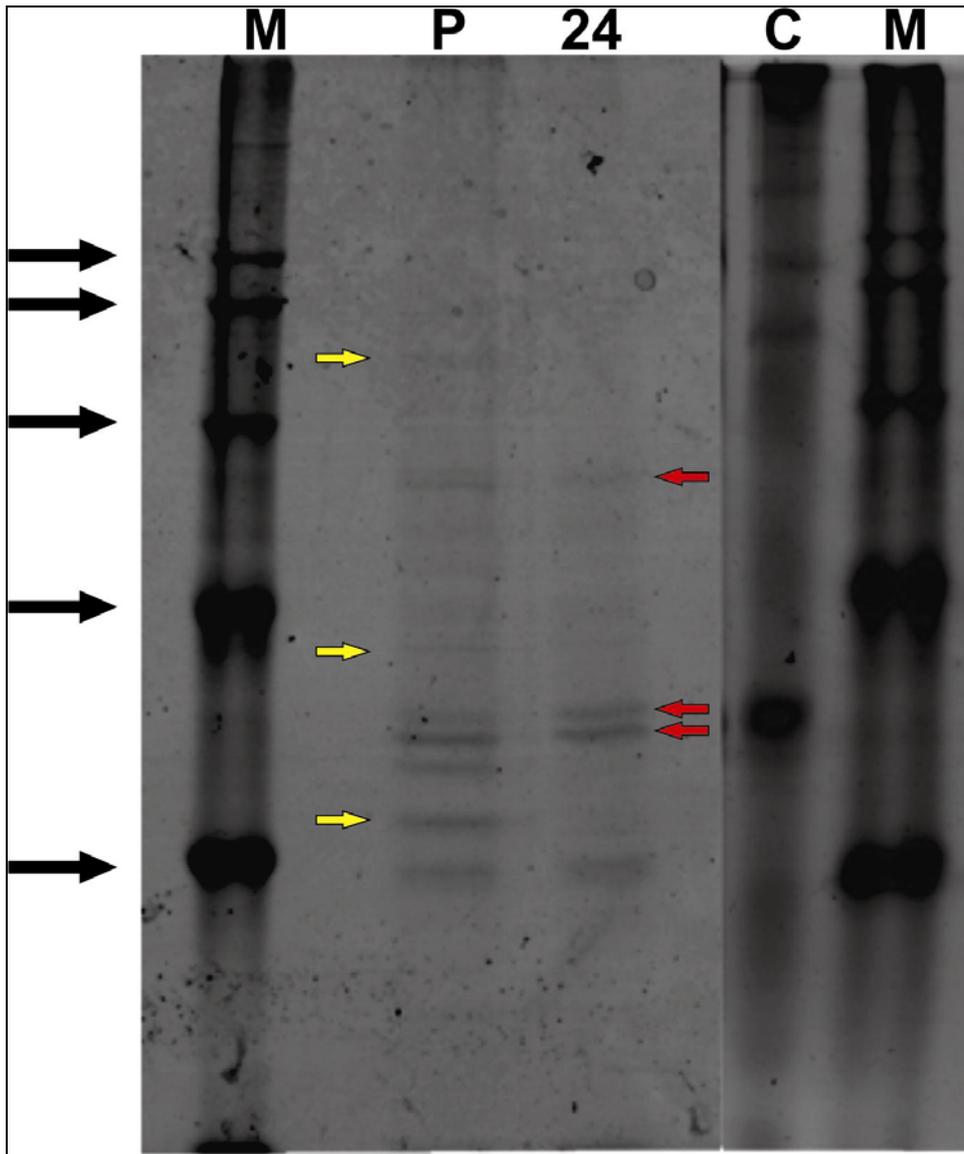


Figura 11 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) mostrando na ordem: M - marcador de peso molecular, P - *pool* alíquotas 21, 22 e 23, 24 - alíquota 24, C - fago não purificado concentrado com polietilenoglicol 8000 kDa (PEG8000). As setas vermelhas indicam algumas proteínas virais; as setas amarelas indicam proteínas contaminantes presentes no *pool* das alíquotas 21, 22 e 23.

5.11 Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão

A análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que o isolado 008 é um fago caudado, portanto pertencente à ordem *Caudovirales*, com cabeça icosaédrica de aproximadamente 57 nm de largura, cauda curta não-contrátil com 36 nm de comprimento. Tais

características morfológicas, relacionadas ao tamanho do genoma o classificam dentro da família *Podoviridae* (Figura 13).

A eficiência não pode ser analisada devido às dificuldades no plaqueamento, encontradas durante parte dos experimentos. Sendo este o último passo para obtermos uma metodologia rápida, barata, confiável e com bom rendimento na purificação de bacteriófagos.

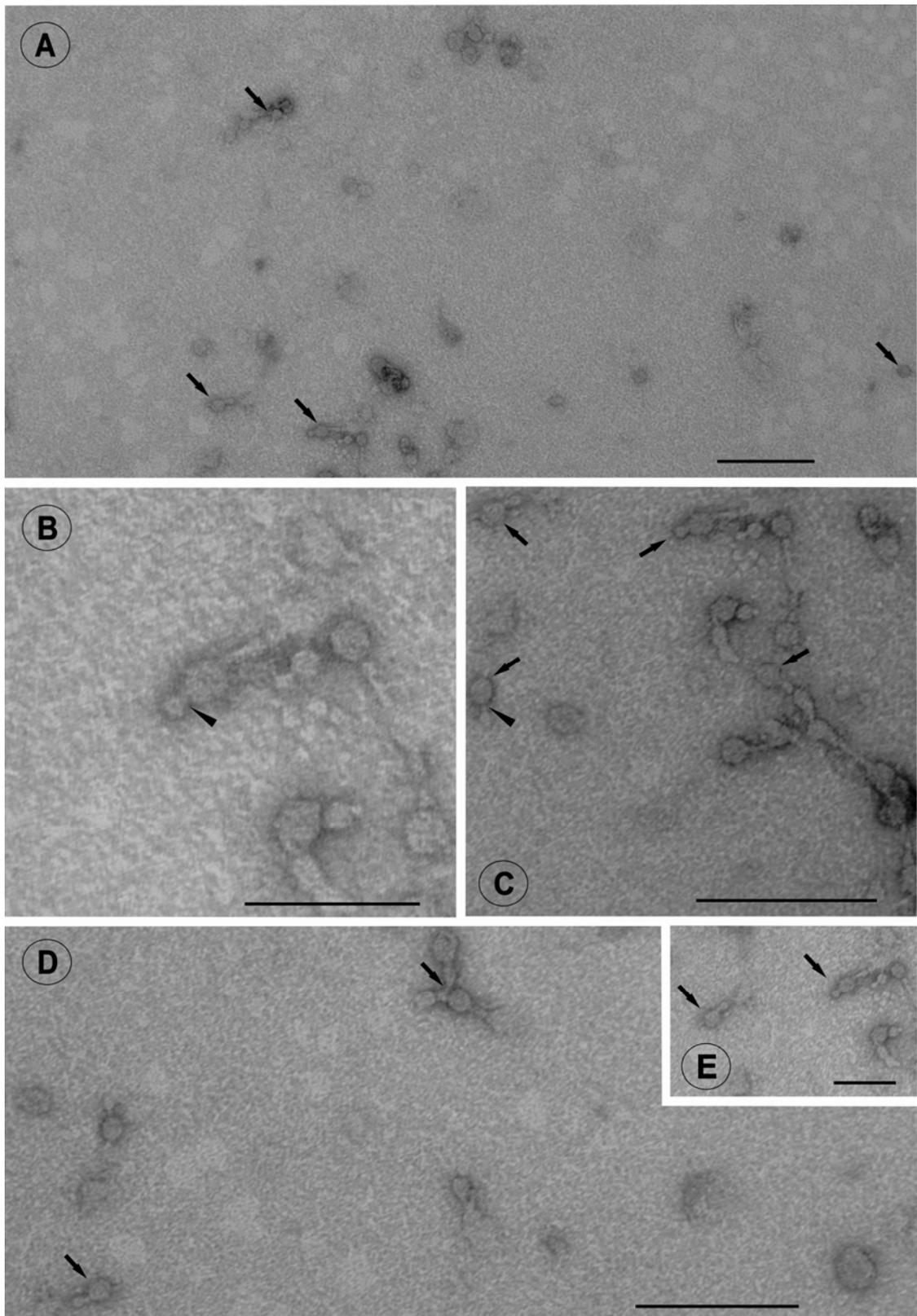


Figura 12 Microscopia eletrônica de transmissão da alíquota 24, contrastado com acetato de uranila 2%. As setas indicam partículas virais. As cabeças de seta mostram a região de interseção entre a cabeça e a cauda, curta e não-contrátil. É possível observar em A, onde foi visualizado um campo maior do *grid*, uma região com poucos contaminantes, sugerindo uma boa pureza da amostra. As barras valem: A, C e D – 200 nm; B e E – 100 nm.

6. Discussão

Neste trabalho foram utilizados bacteriófagos isolados na rede de esgoto da cidade Viçosa/MG, Brasil. O isolamento a partir da rede de esgoto se mostrou eficiente contra linhagens bacterianas isoladas em casos clínicos de mastite bovina. Foram testados isolamentos em outros ambientes, entre eles o córrego São Bartolomeu, a lagoa e o estábulo da UFV. No entanto, a rede de esgoto mostrou resultados mais interessantes, tendo sido o único lugar onde o procedimento de isolamento obteve sucesso, possivelmente devido se tratar de bacteriófagos contra uma enterobactéria (Shpigel *et al*, 2008).

O procedimento de propagação a partir de placa de lise foi bastante eficiente, o que não foi observado com a propagação líquida, podendo ser obtidos títulos mais altos. Após o isolamento, cujo procedimento se assemelha com a propagação a partir da placa de lise, os bacteriófagos foram obtidos por meio da propagação líquida. No entanto, com a repetição do procedimento por cerca de três vezes os títulos virais caíram vertiginosamente, sendo possível observar poucas placas de lise por mL, inviabilizando a titulação. A presença dos bacteriófagos nas suspensões era evidenciada pela presença do material genético (Figura 4) e das proteínas virais (Figura 6). Inicialmente imaginou-se ser a concentração, bacteriana e fágica, o fator chave na eficiência da infecção viral. Wiggins e Alexander (1985) demonstraram que partindo da concentração de *E. coli* de 100 UFC/mL e de fagos de 1000 UFP/mL, poderia demorar em média 4000 min para um fago fazer contato com uma célula, entretanto quando a concentração bacteriana subia para 10^5 UFC/mL esse tempo era reduzido para 4 min. Diante desse resultado, a propagação a partir da placa de lise foi retomada, agora induzida com Mitomicina C, obtendo ótimos resultados.

A relação do estado fisiológico e a decisão entre o ciclo lítico e lisogênico já havia sido descrita por Echols, 1986. Além do estado fisiológico, outro fator para a obtenção de altos títulos foi a adição de Mitomicina C, a qual interfere na replicação, ativando o sistema SOS e induzindo os fagos a entrarem em ciclo lítico pela clivagem da proteína CI,

um repressor ligado a genes relacionados ao ciclo lítico (Waldor *et al*, 2005). O estado fisiológico teve forte influência sobre a decisão entre os ciclos líticos e lisogênicos. No entanto foi observado um aumento significativo nos títulos obtidos na presença da Mitomicina C. Durante as propagações líquidas, os fagos se mantinham em estado de lisogenia estável, que era quebrado pela adição de um agente causador de danos ao DNA (Mitomicina). A presença do material genético viral observado durante as propagações líquidas pode ser devido à liberação de fagos sem indução, originalmente chamada liberação de fagos espontânea (Lwoff, 1953). Os dados sugerem se tratar de isolados lisogênicos.

Todos os 15 bacteriófagos isolados possuem dupla fita de DNA como material genético, podendo pertencer aos 96% dos bacteriófagos pertencentes ao grupo monofilético dos fagos caudados (ordem *Caudovirales*) (Ackermann, 1996), na qual os membros possuem genoma composto por dupla fita de DNA e são divididos em três famílias: *Podoviridae*, *Siphoviridae* e *Myoviridae*, por suas características de cauda, bioquímicas e moleculares (Weinbauer, 2004).

A análise de composição genômica foi realizada por eletroforese em gel de agarose simples, esta se mostrou satisfatória nesse tipo de análise, no entanto não apresentava resolução suficiente para estimarmos o tamanho preciso do genoma viral. Para isso, utilizamos o PFGE no qual obtivemos um valor de aproximadamente 44 kb, possibilitando sua classificação em qualquer uma das 3 famílias, que possuem genomas variando de 19 kb (*Podoviridae*) a 170 kb (*Myoviridae*) (Ackermann, 1998). Foram realizados diversos ensaios de PFGE para a determinação do tamanho do genoma de todos os bacteriófagos, no entanto, devido a baixa concentração viral o genoma de alguns isolados eram nitidamente visíveis em alguns ensaios, enquanto outros não, já em outros ensaios outros isolados eram visíveis, de maneira que no final todos possuíam o tamanho determinado, mas em ensaios diferentes, tendo sido apresentado o ensaio onde foi possível observar o maior número de isolados.

O perfil protéico apresentado na figura 6 diverge entre os fagos, sendo que algumas proteínas estão presentes em todos os isolados, algumas apontadas com setas vermelhas, com massas moleculares de 26,9 e 23,4 kDa. Outras (marcadas com setas amarelas), com massas moleculares de 98,2 e 10,6 kDa no UFVEcophage 004, 132,16 e 87,25 kDa no UFVEcophage002, sendo possível observar a presença de uma banda com massa molecular semelhante também no isolado 008, marcada com a seta laranja. São relatadas enzimas presentes na cauda de fagos específicos para *E.coli* com atividade endosialidásica, o fago K1F possui uma endosialidase com 119 kDa (Waldor *et al*, 2005), um valor aproximado ao encontrado para as maiores proteínas encontradas em alguns isolados (p. e. 132,16 kDa no isolado UFVEcophage 002). Fagos possuindo endosialidases são comumente encontrados na família *Podoviridae* (Waldor *et al*, 2005). Devido à baixa massa molecular das proteínas comuns a todos os isolados, levantamos a possibilidade de se tratarem de proteínas ribossomais, já que estas possuem massas moleculares, em sua grande maioria, com valores abaixo de 20 kDa, para ambos as sub-unidades (30s e 50s), no entanto são observadas proteínas com massas variando entre 10,9 a 65 kDa para a subunidade 30s e entre 9,6 a 31,5 kDa para a sub-unidade 50s, não podendo ser descartada a possibilidade de serem proteínas bacterianas (Dzionara *et al*, 1970). No entanto quando conseguimos obter títulos mais altos percebemos que as bandas vistas anteriormente continuavam presentes e agora mais intensas, evidenciando se tratarem de proteínas virais (Fig 6b).

Visando analisar a imunogenicidade dos isolados virais, devido à importância da resposta imune numa possível fagoterapia, camundongos “Swiss” foram utilizados para a produção de anticorpos específicos, utilizados nos ensaios de “Western blot”. A inoculação das proteínas virais foi intraperitoneal, já que estudos anteriores mostraram não haver diferenças significativas entre as vias de inoculação (Adams, 1959). Até o início da década de 50, acreditava-se que cada fago possuía um único antígeno, o qual induzia a produção do anticorpo neutralizante. Lanni e Lanni (1953) apresentaram evidências claras da existência de, no mínimo

dois antígenos distintos no fago T2, sendo um localizado na cauda, alvo do anticorpo neutralizante. O segundo, provavelmente presente na cabeça, participa da agregação específica e na fixação do complemento, estando os dois epítomos antigênicos presentes em proteínas da superfície viral (Adams, 1959). Os nossos resultados corroboram com o observado por Adams (1959), podendo ser observadas duas proteínas com atividade imunogênica (Figura 7). Tais proteínas demonstraram possuir homologia em seus epítomos antigênicos, sendo observada reatividade cruzada entre os isolados 2 e 3, e entre os isolados 4 e 6. Estes resultados são coerentes, já que todos os fagos isolados possuem perfis protéicos semelhantes e fagos induzem produção de anticorpos anti-fagos (Budynek *et al*, 2010) entre eles anticorpos neutralizantes (Adams, 1959), que podem interferir na eficiência da fagoterapia.

A utilização de partículas virais em terapias requer um alto grau de pureza desses isolados. O procedimento deve ser rápido, para que seja possível o isolamento, propagação e purificação de partículas virais em curto espaço de tempo, sendo capaz assim de atender demandas induzidas. Deve também ser barata, para que o tratamento de um rebanho seja viável economicamente ao pecuarista leiteiro, seja ele de grande, médio ou pequeno porte.

A cromatografia de troca iônica é a técnica mais popular na purificação de peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos, ácido nucléico e moléculas carregadas. A popularidade se deve, sobretudo, ao alto poder de resolução, alta capacidade, simplicidade e controlabilidade. Esta técnica foi utilizada na purificação de fagos filamentosos (Monjezi *et al*, 2010), no entanto não há relatos de sua utilização em fagos caudados. Assim, buscava-se uma metodologia rápida de obtenção do valor de pH ideal para ligação das partículas virais à resina DEAE. No trabalho foram realizados ensaios com 11 diferentes valores de pH (4,5-9,5), objetivando encontrar o ponto isoelétrico (*pI*) do conjunto de proteínas formadoras do capsídeo viral, sendo este um fator importante na determinação do pH de ligação das mesmas à resina. Buscou-se condições onde as partículas virais possuiriam carga líquida negativa, possibilitando sua adsorção íntegra à resina de

carga positiva. Pela observação dos resultados foi possível perceber que em pH 4,0 há uma pequena redução na quantidade de material genético, o que pode ser causado pelo baixo pH em que a análise foi realizada, comprometendo a eficiência da técnica de extração por fenol-clorofórmio. Sendo o interesse obter partículas virias para sua utilização em fagoterapias, obter condições de ligação em pH 7,5, próximo ao fisiológico 7,4 é de extrema importância para sua aplicação, além de estar num valor próximo ao do tampão SM, no qual os fagos são estocados (Figura 8).

Foram analisadas condições de eluição, duas diferentes concentrações de salinidade e em pH 5,5. Foram testados os valores de 0,5 M, 1,0 M e 2 M de NaCl em tampão Tris-HCl, pH 7,5. O valor de pH 5,5 foi testado devido a observação no primeiro ensaio de que em tal pH o vírus era incapaz de se ligar à resina. Os resultados sugerem que, uma vez a interação entre os fagos carregados negativamente e a resina positivamente, tenha sido feita, a redução no pH não é capaz de desfazer a interação eletrostática (Figura 9). Pela análise das curvas obtidas, foi possível perceber uma maior concentração de ácido nucléico no pico 24 que nos demais, indicando a presença de um número maior partículas virais, a grande inflexão também nesta alíquota mostra uma baixa contaminação com proteínas não virais (Figura 10). O que é possível observar melhor na figura 11 onde há a presença das proteínas virais no *pool* das alíquotas anteriores, coincidente com proteínas presente no pico 24, entretanto no pico 24 podemos ver as proteínas presentes na figura 8 (as comuns a todos, marcadas em vermelho e a de massa mais alta, indicada com seta laranja), no entanto não vemos várias proteínas presentes no *pool*.

Outro método utilizado visando obter maiores informações com relação a morfologia viral e pode oferecer uma idéia do grau de pureza foi a microscopia eletrônica de transmissão, na qual é possível visualizar os fagos caudados em áreas limpas do *grid* (Figura 12), o que demonstra alto grau de pureza, sem contaminantes ou artefatos, confirmando o observado no SDS-PAGE. Unindo as imagens obtidas, com os dados moleculares, é

possível caracterizar os fagos isolados dentro da família *Podoviridae*, como um *P22-like phage* (Ackermann, 1998).

7. Conclusões

- Os fagos UFVEcophage 001-015 possuem perfis protéicos semelhantes, com algumas variações nas proteínas de alta massa molecular;

- Os bacteriófagos isolados são do tipo *P22-like*, temperados, e aparentemente sofrem influência do estado fisiológico do hospedeiro na decisão entre ciclo lítico e lisogênico, sendo a mitomicina C um agente capaz de induzir todos os fagos isolados a entrarem no ciclo lítico;

- A cromatografia de troca iônica demonstrou ser uma técnica mais rápida e menos laboriosa na obtenção de purificados virais, quando comparado a ultracentrifugação em gradiente de cloreto de césio;

- Foram isolados e proliferados nesse trabalho 15 bacteriófagos temperados, todos possuindo como material genético uma dupla fita de DNA de aproximadamente 44 Kb, sendo todos da ordem *Caudovirales* e da família *Podoviridae*;

Foram obtidas suspensões com alto grau de pureza pela técnica de cromatografia de troca iônica, no entanto, são necessários estudos futuros com o objetivo de definir o rendimento da técnica.

8. Referências

ACKERMANN, H. W. and DUBOW, M.S. (1987) Viruses of Prokaryotes. In: General Properties of Bacteriophages, Vol. I. CRC Press, Boca Raton. 202 p.

ACKERMANN, H. W. (1996) Frequency of morphological phage descriptions in 1995. *Arch. Virol* 141, 209–218.

ACKERMANN, H. W. (1999). Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Adv. Virus Res.* 51:135–201.

ADAMS, M. H. (1959) Bacteriophages. Interscience Publishers, New York p. 100.

ANDERSON, K. L., SMITH, A. R., GUSTAFFSON, B. K., SPAHR, S. L. and WHITMORE. H. L. (1982). Diagnosis and treatment of acute mastitis in a large dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181:690–693.

BARKEMA, H. W., GREEN, M. J., BRADLEY, A. J. and ZADOKS, R. N. (2009) The role of contagious disease in udder health. *J Dairy Sci.*; 92(10): 4717–4729.

BEUTLER, B. 2004. Innate immunity: An overview. *Mol. Immunol.* 40:845–859.

BISWAS, B., ADHYA, S., WASHART, P., PAUL, B., TROSTEL, A. N., POWELL, B., CARLTON, R., and MERRIL, C. R. (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.* 70:204–210

BRADLEY, A. J., GREEN, M. J. (2001). Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J. Clin. Microbiol.* 39:1845–1849.

BRADLEY, A. J. (2002). Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*, 164, 116-128.

BUDYNEK, P., DABROWSKA, K., SKARADZIJSKI, G., GÓRSKI, and A. (2010) Bacteriophages and cancer. *Arch Microbiol.* 192:315–320.

BURVENICH, C., VAN MERRIS, V., MEHRZAD, J., DIEZ-FRAILE, A. and DUCHATEAU, L. (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34:521–564.

BURVENICH, C., BANNERMAN, D. D., LIPPOLIS, J. D., PEELMAN, L., NONNECKE, B. J., KEHRLI JR., M. E., AND PAAPE, M. J. (2007) Cumulative Physiological Events Influence the Inflammatory Response of the Bovine Udder to *Escherichia coli* Infections During the Transition Period. *J. Dairy Sci.* 90(E. Suppl.):E39–E54.

CARLTON, R. M. (1999). Phage therapy: past history and future prospects. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsaw)* 47:267–274.

CHINA B., GOFFAUX F., (1999). Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 30:181–202.

COSTA, M. M., SILVA, M. S., SPRICIGO, D. A., WITT, N. M., MARCHIORO, S. B., KOLLING, L., e VARGAS, A. P. C. (2006). Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 26(1):5-8.

DRACKLEY, J. K., OVERTON, T. R. AND DOUGLAS, G. N. (2001). Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 84: E100–E112.

CAPUCO, A. V., BRIGHT, S. A., PANKEY, J. W., WOOD, D. L., MILLER, R. H. AND BITMAN, J. (1992). Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 75:2126–2130.

D'HERELLE, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 165:373-375.

DOSOGNE, H., VANGROENWEGHE, F., and BURVENICH, C. (2002a). Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis, *Vet. Res.* 33 1–12.

DOSOGNE, H., MEYER, E., STURK, A., VAN LOON, J., MASSART-LEËN, A. M., and BURVENICH, C. (2002b). Effect of enrofloxacin treatment on plasma endotoxin during bovine *Escherichia coli* mastitis, *Inflammation Res.* 51:201–205.

DUCKWORTH, D. (1987) History and basic properties of bacterial viruses. In: *Phage Ecology* (Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Bitton, G., Eds.), pp. 1–44. John Wiley & Sons, New York.

DZIONARA, M., KALTSCHMIDT, E. and WITTMANN, H. G. (1970) Ribosomal Proteins, XIII. Molecular Weights of Isolated Ribosomal Proteins of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 67(4):1909-1913.

EBERHART, R. J. (1984). Coliform mastitis. *Vet. Clin. North. Am.* 6:287-301.

ECHOLS, H. (1986) Bacteriophage · development: temporal switches and the choice of lysis or lysogeny. *Annu. Rev. Genet.* 2:26-30.

FRENCH, G.L. (2010). The continuing crisis in antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* S3–S7.

FROST, A. J., HILL, A. W. and BROOKER, B. E. (1980). The early pathogenesis of bovine mastitis due to *Escherichia coli*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 209:419–431.

FROST, A. J. and BROOKER, B. E. (1986). Hyperacute *Escherichia coli* mastitis of cattle in the immediate post-partum period. *Aust. Vet. J.* 63:327–331.

GALIKOWSKA, H., KUNIKOWSKA, D., TOKARSKA-PIETRZAK, E., DZIADZIUSZKO, H., ŁOŚ, J. M., GOLEC, P., WĘGRZYN, G., ŁOŚ, M. (2011). Specific detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1-7.

GOFF, J. P. (2006). Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *Journal of Dairy Science* 89: 1292–1301.

GROHN, Y. T., GONZALEZ, R. N., WILSON, D. J., HERTL, J. A., BENNETT, G., SCHULTE, H., SCHUKKEN, Y. H. (2005) Effect of pathogen-specific clinical mastitis on herd life in two New York State dairy herds. *Prev Vet Med*, 71:105.

HANKIN, E. H. (1896) L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe du choléra. *Ann. Inst. Pasteur* 10:511-523.

HENDRIX, R., SMITH, M., BURNS, R., FORD, M. and HATFULL, G. (1999). Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the worlds a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2192–2197.

HIRSCH, J. G. 1958. Bactericidal action of histone. *J. Exp. Med.* 108:925–944.

HOGAN, J. S., SMITH, K. L., HOBLET, K. H., SCHOENBERGER, P. S., TODHUNTER, D. A., HUESTON, W. D., PRITCHARD, D. E., BOWMAN, G. L., HEIDER, L. E., BROCKETT, B. L. and CONARD, H. R. (1989). Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J. Dairy Sci.* 72:1547–1556.

HURST, C. (2000) An introduction to viral taxonomy and the proposal of Akamara, a potential domain for the genomic acellular agents. In: *Viral Ecology* (Hurst, C., Ed.), pp. 41–62. Academic Press, San Diego.

JAIN, N. C., SCHALM, O. W., AND LASMANIS, J.. (1971). Experimentally induced coliform (*Aerobacter aerogenes*) mastitis in normal cows and in cows made neutropenic by an equine anti-bovine leukocyte serum. *Am. J. Vet. Res.* 32:1929–1935.

JAMPEL, H. D. (1992) Effect of brief exposure of mitomycin C on viability and proliferation of cultured human Tenon's capsule fibroblasts. *Ophthalmology*, 99:1471-6.

JONES T.Q. (1990). *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle – A review of the literature, *Vet. Bull.* 60:205–220.

KAIPAINEN, T., POHJANVIRTA, T., SHPIGEL, N. Y., SHWIMMER, A., PYÖRÄLÄ, S., PELKONEN, S. (2002). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Veterinary Microbiology.* 85:37-46.

KUMARASAMY, K. K., TOLEMAN, M. A., WALSH, T. R., BAGARIA, J., BUTT, F., BALAKRISHNAN, R. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan and the UK: a molecular, biological and epidemiological study. *Lancet Infect Dis;* 10:597–601.

LAEMMLI, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685,

LAM, T.J.G.M., LIPMAN, L.J.A., SCHUKKEN, Y.H., GAASTRA, W., BRAND, A. (1996). Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* studied by DNA fingerprinting. *Am. J. Vet. Res.* 57:38-42.

LEVIN, B. and BULL, J. (1996) Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. *Am. Nat.* 147:881–898.

LINDBERG, A. A. (1973) Bacteriophage receptors. *Ann. Rev. Microbiol.* 27:205-241.

LOEFFLER, J. M., NELSON, D., and FISCHETTI, V. A. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294: 2170–2172.

LWOFF, A. (1953) Lysogeny. *Bacteriol Rev.* 17(4):269-337.

MENZIES F.D., BRYSON D.G., MCCALLION T., and MATTHEWS D.I., (1995). A study of mortality among suckler and dairy cows in Northern Ireland in 1992, *Vet. Rec.* 137:531–536.

MERRIL, C.R., BISWAS, B., CARLTON, R., JENSEN, N.C., CREED, G.J., ZULLO, S. and ADHYA, S. (1996). Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 :3188–3192.

MONJEZI, R., TEY, B. T., SIEO, C. C., and TAN, W. S. (2010) Purification of bacteriophage M13 by anion exchange chromatography. *Journal of Chromatography B*, 878:1855–1859.

NELSON, D., LOOMIS, L. and FISCHETTI, V. A. (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:4107–4112.

NORDMANN, P., CUZON, G., and NAAS, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*; 9:228–36.

NIKAIDO, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:593-656.

OGDEN, R.C., and ADAMS, D.A. (1987). Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Meth. Enzymol.* 152:61-87.

OLIVER, S. P., and CALVINHO. L. F. (1995). Influence of inflammation on mammary gland metabolism and milk composition. *J. Anim. Sci.* 73(Suppl. 2):18–33.

PAAPE, M. J., K. SHAFER-WEAVER, A. V. CAPUCO, K. VAN OOSTVELDT, AND C. BURVENICH. (2000). Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:259–277.

PAAPE, M. J., MEHRZAD, J., ZHAO, X., DETILLEUX, J., and BURVENICH, C. (2002). Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7:109–121.

PAAPE, M. J., BANNERMAN, D. D., ZHAO, X., and LEE, J. W. (2003). The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34:597–627.

PASSEY, S., BRADLEY, A., and MELLOR, H. (2008) *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway. *Veterinary Microbiology.* 130:151–164.

PEELER, E.J., GREEN, M.J., FITZPATRICK, J.L. and GREEN, L.E. (2002) Study of clinical mastitis in British dairy herds with bulk milk somatic cell counts less than 150,000 cells/ml. *Vet. Rec.* 10:170-176.

PITKALA, A., HAVERI, M., PYORALA, S., MYLLYS, V. and HONKANEN-BUZALSKI, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001- Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433–2441.

RADOSTITS, O. M., LESLIE, K. E. and FETROW, J. (1994). *Herd Health: Food Animal Production Medicine.* Philadelphia, PA., Saunders. p. 233.

RAKHUBA, D. V., KOLOMIETS, E. I., SZWAJECER DEY, E. and NOVIK, G. I. (2010) Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology.* 59:145-155.

SCHUCH, R., NELSON, D. and FISCHETTI, V. A. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418:884–889.

SHPIGEL, N. Y., WINKLER, M., ZIV, G., SARAN, A. (1998). Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. *Prev Vet Med,* 35:1-9.

SHPIGEL, N. Y., ELAZAR, S. and ROSENSHINE, I. (2008). Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology,* 11:60–65.

SHUM, L. W. C., MCCONNEL, C. S., GUNN, A. A., and HOUSE, J. K. (2009) Environmental mastitis in intensive high-producing dairy herds in New South Wales. *Australian Veterinary Journal* 87,12: 469-475.

SNYDER, L., CHAMPNESS, W., (2007) *Molecular genetics of bacteria*. 3rd edition. ASM Press. Washington, D. C.

SORDILLO, L. M., STREICHER, K. L. (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:135-146.

SORDILLO, L. M.; CONTRERAS, G. A. and AITKEN, S. L. (2009). Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Animal Health Research Reviews* 10(1): 53–63.

SORDILLO, L. M. and AITKEN, S. L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: 104–109.

SAVALIA, D., WESTBLADE, L. F., GOEL, M., FLORENS, L., KEMP, P., AKULENKO, N., PAVLOVA, O., PADOVAN, J. C., CHAIT, B. T., WASHBURN, M. P., ACKERMANN, H. W., MUSHEGIAN, A., GABISONIA, T., MOLINEUX, I. and SEVERINOV, K. (2008) Genomic and Proteomic Analysis of phiEco32, a Novel *Escherichia coli* Phage. *J Mol Biol.* 377(3): 774–789.

STAPLETON P, WU P-J, KING A, SHANNON K, FRENCH G, and PHILLIPS I. (1995). Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*; 39:2478–83.

SULAKVELIDZE, A., ALAVIDZE, Z. and MORRIS JR, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:649–659

TANJI, Y., HATTORI, K., SUZUKI, K.; and MIYANAGA, K. (2008). Spontaneous Deletion of a 209-Kilobase-Pair Fragment from the *Escherichia coli* Genome Occurs with Acquisition of Resistance to an Assortment of Infectious Phages. *Applied And Environmental Microbiology*, 4256–4263.

TOWBIN, H., STAEHELINT, T., and GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76:9, 4350-4354.

TWORT, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* ii:1241-1243.

ultimosegundo.ig.com.br/mundo/surto+da+e+coli+na+europa+e+causado+por+nova+cepa+da+bacteria/n1596996844856.html Download da página realizado no dia 05/06/2011.

VAN DEN BERG, C., DE NEELING, A.J., SCHOT, C.S., HUSTINX, W.N., WEMER, J., and DE WILDT, D.J., (1992). Delayed antibiotic-induced lysis of *Escherichia coli* in vitro is correlated with enhancement of LPS release, *Scand. J. Infect. Dis.* 24 619–627.

VERWEIJ, J., PINEDO, H. M. (1990) Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs.* 1:5-13.

WALDOR, M. K., FRIEDMAN, D. I., and ADHYA, S. L., (2005) PHAGES Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology. ASM Press. Washington, D. C.

WATTS, J. L. (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 16, 41-66.

WEINBAUER, M. G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews.* 28:127–181.

WESTWATER, C., KASMAN, L. M., SCHOFIELD, D. A., WERNER, P. A., DOLAN, J. W., SCHMIDT, M. G., and NORRIS, J. S. (2003). Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1301–1307.

WIGGINS, B. A. and ALEXANDER, M. (1985) Minimum Bacterial Density for Bacteriophage Replication: Implications for Significance of

Bacteriophages in Natural Ecosystems. *Applied And Environmental Microbiology*, 49:19-23.

WILSON, D. J., GONZALES, R. N. AND DAS, H. H. (1997). Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80:2592–2598.

WU, P. J., SHANNON, K., and PHILLIPS, I (1992). Beta-lactamases and susceptibility to beta-lactam antibiotics in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 30:868–71.

ZHAO, X. AND LACASSE, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J. Anim. Sci.* 86(Suppl. 1):57–65.