

Isolamento e avaliação *in vitro* da eficácia de bacteriófagos líticos específicos para *Staphylococcus aureus* associados a produtos lácticos e mastite bovina

¹Juliana Almeida Leite

¹Edna Froeder Arcuri

²Alessandra Isis Alves Pinheiro Ramos

¹Carla Christine Lange

¹Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito

³Letícia Caldas Mendonça

³Bruna Rios Coelho Alves

¹ Pesquisadora – Embrapa Gado de Leite. Rua Eugênio do Nascimento, 610, Bairro Dom Bosco, Juiz de Fora, MG. CEP: 36038-330. Tel: 55 32 3249-4885. juliana@cnpagl.embrapa.br

² Estagiária – Embrapa Gado de Leite

³ Analista – Embrapa Gado de Leite

Resumo

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no Brasil, e aquela que causa as maiores perdas econômicas à cadeia produtiva do leite. *Staphylococcus aureus* é o agente causador de mastite mais comum e de difícil controle. *S. aureus* também é um patógeno relevante para as indústrias de produtos lácticos por causa da habilidade de algumas linhagens em produzir enterotoxinas termoestáveis e outros fatores de virulências que causam intoxicação alimentar. A emergência de bactérias patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos tem se tornado um problema crítico e uso de bacteriófagos representa uma terapia alternativa contra esses patógenos. O objetivo deste trabalho foi isolar bacteriófagos e testar a atividade lítica destes contra estirpes de *S. aureus*. Seis bacteriófagos foram isolados a partir de água de lavagem de curral e testados frente a 100 estirpes de *S. aureus* associadas com mastite bovina e produtos lácticos. Dois bacteriófagos apresentaram uma alta atividade lítica e um amplo espectro de hospedeiro, indicando que esses fagos tem potencial para estudos futuros de fagoterapia em bovinos ou como agente para controle de contaminação alimentar por *S. aureus*.

Palavras-chaves: bacteriófagos, *Staphylococcus aureus*, mastite, produtos lácticos.

Introdução

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo, e aquela que causa as maiores perdas econômicas à cadeia produtiva do leite. No Brasil, estima-se, em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, perda de produção entre 12 e 15%, o que significa cerca de 3 bilhões de litros de leite/ano (FONSECA & SANTOS, 2000). Além das perdas relacionadas à redução e descarte do leite produzido, gastos com medicamentos e serviços veterinários, e redução do valor comercial dos animais infectados, a ocorrência de mastite afeta também a indústria de laticínios, devido às alterações na composição do leite. Vacas com mastite produzem leite com menor teor de caseína, gordura, lactose, cálcio e potássio, e concentrações mais elevadas de cloretos, sódio e proteínas séricas, além de apresentar pH alcalino e maior número de células somáticas (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1996). Estas alterações interferem na qualidade do leite e no rendimento e vida de prateleira dos produtos lácteos.

S. aureus é uma bactéria gram-positiva na forma de cocos, causadora de mastite subclínica, clínica, crônica e, em alguns casos, mastite hiperaguda gangrenosa, que geralmente resulta em morte do animal. A antibioticoterapia é componente importante do programa de controle de mastite. Porém, *S. aureus* é considerado de difícil eliminação dos rebanhos, sendo moderadamente susceptível a antibióticos quando a infecção é detectada em seu início e de difícil cura nas infecções crônicas (OWENS et al., 1997; BRITO et al., 2002).

O uso de antibióticos no tratamento de animais é uma preocupação para a saúde pública e um dos maiores desafios para a indústria de alimentos, pois resíduos de antibióticos podem ser eliminados no leite e na carne por períodos variáveis, de acordo com a preparação e a via de aplicação do medicamento. Além dos riscos à saúde do consumidor, a presença de

resíduos de antibióticos no leite interfere na fabricação de produtos lácteos fermentados como queijos e iogurte. Adicionalmente, o uso contínuo e indiscriminado de antibióticos tem resultado na seleção de linhagens bacterianas resistentes (TOLLEFSON & FLYNN, 2002).

Assim sendo, estudos com o intuito de identificar alternativas ao uso dos antibióticos no tratamento de animais têm sido conduzidos. Uma possível alternativa é o uso de bacteriófagos (fagos) líticos. Fagos líticos são vírus de procariotos, cuja multiplicação viral termina com a lise programada da célula bacteriana hospedeira e liberação de centenas de novos fagos. O crescente problema da resistência bacteriana aos antibióticos renovou o interesse no uso de bacteriófagos para o controle biológico de bactérias patogênicas no homem, animais, alimentos e plantas (CHANISHVILI et al., 2001; LEVERENTZ et al., 2003; GARCIA et al., 2009). Vários estudos têm demonstrado que fagos são eficientes tanto na profilaxia como no tratamento de infecções bacterianas em animais. O interesse em torno da fagoterapia tem aumentado devido a tratamentos eficientes de infecções por *Escherichia coli* (*E. coli*) em modelos animais. Fagos específicos para *E. coli* enteropatogênica foram eficazes no controle de diarreia neonatal em bezerros, suínos e ovelhas e de septicemia em ratos, pintos e bezerros (SMITH & HUGGINS, 1983; BARROW et al., 1998). Bacteriófagos também tem se mostrado eficientes no controle de *S. aureus* presentes em produtos lácteos ou causadoras de mastite bovina (O'FLAHERTY et al., 2005; GILL et al., 2006; GARCIA et al., 2007; GARCIA et al., 2009)

Metodologia

Amostras de água de esgoto ou lavagem dos pisos foram colhidas de estábulos localizados na Zona da Mata de Minas Gerais. Para os testes de atividade lítica foram utilizadas 100 estirpes de *S. aureus*. Essas estirpes foram isoladas de leite de vacas, com mastite clínica ou subclínica, ou de amostras de queijo Minas frescal, sendo todas pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Microbiologia do Leite, da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Para os testes de atividade lítica, as estirpes bacterianas foram divididas em três grupos principais, estirpes isoladas a partir de amostras provenientes de leite coletado diretamente dos tetos das vacas, leite coletado de tanque ou queijo Minas frescal.

Cada amostra de água colhida foi clarificada por centrifugação e filtrada. A seguir, 1 (um) mL do filtrado foi adicionado a 100 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Difco) recém-inoculado com uma mistura de 5 estirpes de *S. aureus*, conforme a técnica de enriquecimento descrita por O'Flaherty e colaboradores (2005). Após 48h, essa cultura de enriquecimento foi centrifugada e filtrada. Esse filtrado foi testado frente a 100 estirpes de *S. aureus* pelo método da gota. Filtrados das amostras de água, sem enriquecimento, também foram testados.

Os fagos foram testados frente as 100 estirpes de *S. aureus* por meio do método da gota. Para a técnica da gota, cada estirpe testada foi cultivada em uma placa de ágar BHI contendo CaCl_2 e uma gota do filtrado foi inoculada na placa, segundo metodologia descrita por Sambrook & Russell (2001). Essa técnica foi realizada em triplicata. Esses testes de atividade lítica foram utilizados para a avaliação *in vitro* do espectro de hospedeiro dos bacteriófagos selecionados.

Resultados e Discussão

O isolamento viral foi realizado a partir de água de lavagem dos pisos de estábulos localizados na Zona da Mata de Minas Gerais por meio de filtração das amostras, com o objetivo de se eliminar todos os microrganismos presentes, exceto vírus. Inicialmente, esses filtrados foram utilizados para testes de atividade lítica. Porém algumas amostras não apresentaram atividade lítica diretamente do filtrado. Deste modo, amostras de filtração foram inoculadas em culturas contendo 5 tipos de bactérias e incubadas por 48 horas. Essa cultura de enriquecimento de bacteriófagos foi então utilizada para testes de atividade lítica, demonstrando ser mais eficiente para o isolamento viral. A técnica de enriquecimento de bacteriófagos possibilita uma multiplicação viral em cultura de células bacterianas antes, elevando o título viral do bacteriófago que será testado.

De um total de 20 amostras de água, foi possível o isolamento de seis bacteriófagos, sendo denominados Fago 1, Fago 2, Fago 3, Fago 4, Fago 5 e Fago 6. A figura 1 mostra o resultado de teste de atividade lítica com os seis bacteriófagos isolados. Foram feitas três tentativas de isolamento de bacteriófagos para cada amostra de água onde não houve isolamento viral. O insucesso de isolamento a partir dessas amostras provavelmente se deu

devido à presença de resíduos da solução de pedilúvio que é utilizada para controle de enfermidades de casco das vacas. Essa solução é composta por formol e sulfato de cobre (CuSO₄), o que pode ter inativado os possíveis bacteriófagos presente nas amostras. O isolamento de bacteriófagos foi possível em 30% das amostras. Essa eficiência de isolamento é similar a outras descritas na literatura em que a eficiência de isolamento é na faixa de 20 a 25% (O'Flaherty et al., 2005; García et al., 2009; Synnott et al., 2009). A baixa eficiência de isolamento de bacteriófagos a partir de amostras de água de lavagem de curral pode estar relacionada à presença de resíduo de pedilúvio, à ocorrência de alta temperatura no ambiente, exposição à luz ultravioleta do sol, entre outros fatores que levam à inativação viral devido à desnaturação e lise das proteínas estruturais destes vírus.

Testes de atividade lítica foram realizados com 100 estirpes de *S. aureus* previamente isoladas a partir de amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica, coletado de tanque, ou a partir de amostra de queijo Minas frescal. As estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras leite coletadas dos tetos estão diretamente relacionadas com patógenos infectando a glândula mamária de vacas com mastite. Por outro lado, as estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras leite coletadas de tanque podem representar, além de uma contaminação bacteriana da glândula mamária, uma contaminação no momento da ordenha por bactérias presentes nas mãos de ordenhadores ou utensílios de ordenha. Já as estirpes de *S. aureus* isoladas de queijo Minas frescal podem, além das origens descritas para as amostras de leite, ser originárias de contaminação dos equipamentos ou dos trabalhadores durante a manipulação e fabricação do queijo nos laticínios.

Durante os testes de atividade lítica foram observadas placas de lise claras e turvas, indicando lise bacteriana completa e parcial, respectivamente (Figura 1). Na determinação do espectro de hospedeiro e atividade lítica, foram consideradas positivas apenas as placas que apresentaram lise completa. O bacteriófago que apresentou maior atividade lítica foi o Fago 2, lisando 98 das 100 estirpes de *S. aureus* testadas. O Fago 4 também apresentou uma atividade lítica maior, lisando 86 das estirpes bacterianas testadas. Os espectros de hospedeiros dos Fagos 2 a 6 foram similar, sendo capazes de lisar estirpes de dos três grupos *S. aureus*. No entanto, o Fago 1 não apresentou atividade lítica frente as estirpes bacterianas isoladas dos tetos. O espectro de hospedeiro e a quantidade de estirpes bacterianas susceptíveis à lise pelos bacteriófagos são mostrados na Tabela 1.

A eficiência lítica dos bacteriófagos com relação a cada grupo de *S. aureus* foi determinada (Figura 2). O Fago 2 foi o bacteriófago com maior eficiência de lise para cada grupo analisado, lisando 96%, 100% e 100% das estirpes de *S. aureus* isoladas de leite coletado dos tetos, leite de tanque e queijo Minas frescal, respectivamente. Com relação às estirpes de *S. aureus* isoladas de leite coletado de vaca, o Fago 4 também apresentou uma alta eficiência de lise, similar ao Fago 2, sendo capaz de lisar 91% das amostras testadas. Porém, a eficiência de lise para as estirpes isoladas de leite de tanque e queijo Minas frescal foram de 83% e 69%, respectivamente. Desta forma, a eficiência lítica total do Fago 4 foi de 86%, menor que a do Fago 2, que foi de 98%. Os Fagos 1, 3, 4 e 5 apresentaram uma eficiência de lise menor que 50% para estirpes de todos os três grupos de *S. aureus* testadas.

A alta prevalência de mastite causada por *S. aureus* é um problema sério que eventualmente não consegue ser resolvido apenas com o uso de antibióticos (O'FLAHERTY et al., 2005). Do mesmo modo, *S. aureus* é um patógeno relevante para as indústrias de produtos lácteos por causa da habilidade de algumas linhagens em produzir enterotoxinas termoestáveis e outros fatores de virulências que causam intoxicação alimentar (GARCIA et al., 2009). A emergência de bactérias patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos tem se tornado um problema crítico e o uso de bacteriófagos representa uma terapia alternativa contra esses patógenos (SULAKVELIDZE et al., 2001). Assim sendo, os bacteriófagos líticos isolados nesse trabalho representam uma alternativa para o controle de *S. aureus* associado a produtos lácteos e mastite bovina, principalmente considerando a eficiência lítica do Fago 2.

Conclusões

O isolamento de bacteriófagos utilizando a técnica do enriquecimento demonstrou ser eficiente. Deste modo, essa metodologia é indicada para isolamentos de novos bacteriófagos. O Fago 2 possui um maior espectro de hospedeiro e capacidade lítica, indicando que esse fago seja bastante virulento. Assim sendo, estudos de microbiologia clássica e molecular serão realizados para caracterização desse fago. Adicionalmente, esse fago será utilizado em

estudos de avaliação como agente desinfetante ou fagoterapia de mastite bovina.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

BARROW, P. A.; LOVELL, M.; BERCHIERI JUNIOR, A. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. **Clin. and Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 294-298, 1998.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F. **Como (re) conhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002. 8 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 70).

CHANISHVILI, N.; CHANISHVILI, T.; TEDIASVILI, M.; BARROW, P. A. Phages and their application against drug-resistant bacteria. **J. Chem. Technol. and Biotechnol.**, v. 76, p. 689-699, 2001.

FONSECA, L. F.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 176 p.

GARCIA, P.; MADERA, C.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. **Int. Dairy J.**, v. 17, p. 132-1239, 2007.

GARCIA, P.; MADERA, C.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A, SUAREZ, J. E.. Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potenteial as biocontrol agents. **J. Dairy Sci.**, v. 92, p. 3019-3026, 2009.

GILL, J. J.; PACAN, J. C.; CARSON, M. E.; LESLIE, K. E.; GRIFFITHS, M. W.; SABOUR, P. M. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophages therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lacting dairy cattle. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 50, p. 2912-2918, 2006.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S.; CAMP, M. J.; JANISIEWICZ, W. J.; ABULADZE, T.; YANG, M.; SAFTNER, R.; SULAKVELIDZE, A. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, p. 4519-4526, 2003.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: National mastitis Council, 1996. 64 p.

O'FLAHERTY, S.; ROSS, R. P.; FLYNN, J.; MEANEY, W. J.; FITZGERALD, G. F.; COFFEY, A. Isolation and characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 51, p. 482-486, 2005.

OWENS, W. E.; RAY, C. H.; WATTS, J. L.; YANCEY, R. J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **J. Dairy Sci.** v. 80, p. 313-317, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY: CSH, 2001. 345 p.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhea in calves, piglets and lambs. **J. Gen. Microbiol.**, v. 129, p. 2659-2675, 1983.

SYNNOTT, A. J.; KUANG, Y.; KURIMOTO, M.; YAMAMICHI, K.; IWANO, H.; TANJI, Y. Isolation from sweage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 75, p. 4483-4490, 2009.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS JUNIOR, J. G. Bacteriophage therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 45, p. 649-659, 2001.

TOLLEFSON, L.; FLYNN, W. T. Impact of antimicrobial resistance on regulatory policies in veterinary medicine: status report. **AAPS Pharm Sci**, v. 4, p. 1-10, 2002.

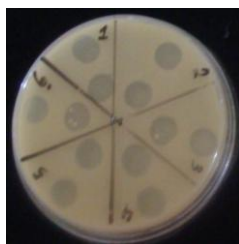


Figura 1. Teste de atividade lítica dos bacteriófagos isolados utilizando uma estirpe de *S. aureus* isolada de leite coletado de tanque. No sentido horário, começando do canto superior direito, Fago 1 (1), Fago 2 (2), Fago 3 (3), Fago 4 (4), Fago 5 (5) e Fago 6 (6).

Tabela 1. Estirpes bacterianas susceptíveis à lise pelos bacteriófagos isolados.

| Origem das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> ^a | Quantidade de estirpes ^b | Susceptibilidade a bacteriófagos ^c | | | | | |
|--|-------------------------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | Fago 1 | Fago 2 | Fago 3 | Fago 4 | Fago 5 | Fago 6 |
| Tetos | 64 | 0 | 62 | 16 | 58 | 9 | 28 |
| Tanque | 23 | 4 | 23 | 5 | 19 | 7 | 8 |
| Queijo | 13 | 5 | 13 | 3 | 9 | 3 | 6 |
| TOTAL | 100 | 9 | 98 | 24 | 86 | 19 | 42 |

^a – estirpes bacterianas isoladas de leite coletado diretamente de tetos de vacas, de leite coletado de tanque ou de queijo Minas frescal; ^b – quantidade de estirpes submetidas a teste de atividade lítica; ^c - quantidade de estirpes bacterianas susceptíveis aos bacteriófagos em testes de atividade lítica.

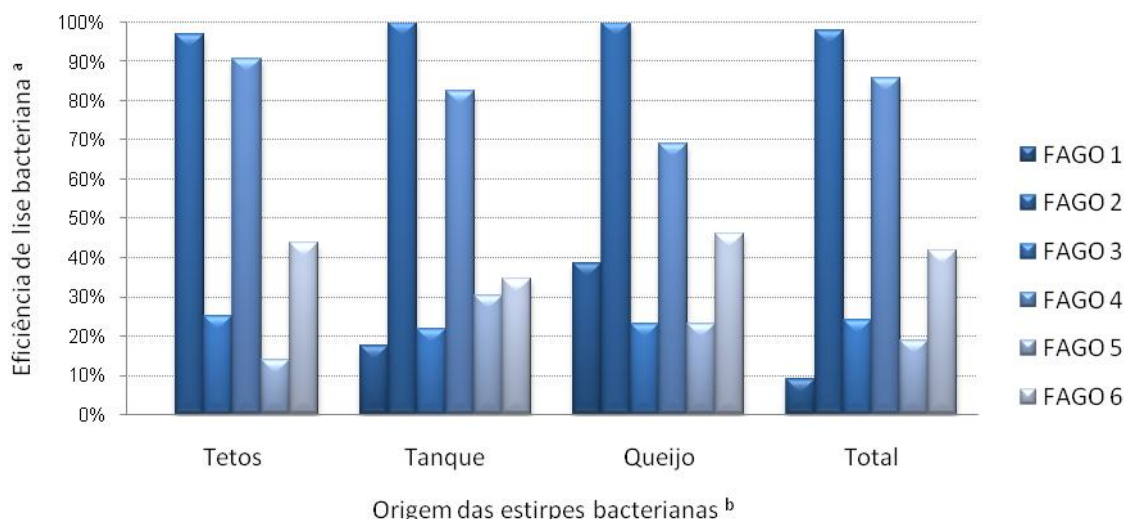


Figura 2. Eficiência de lise de estirpes de *S. aureus*. ^a – Porcentagem de estirpes lisadas pelos bacteriófagos em teste de atividade lítica. ^b – Estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite coletado de tetos de vaca (Tetos), leite coletado de tanque (Tanque), queijo minas frescal (Queijo) ou todas as estirpes (Total).