

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO ESPECTRO DE LISE DE BACTERIÓFAGOS
LÍTICOS ESPECÍFICOS PARA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
CAUSADORES DE MASTITE BOVINA**

In vitro* spectrum evaluation of four lytic bacteriophages specific for bovine mastitis *Staphylococcus aureus

Ramos, A. I. A. P.¹
Arcuri, E. F.²
Lange, C. C.³
Leite, J. A.⁴

RESUMO

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo. O uso de antibióticos no tratamento de animais é um dos maiores desafios para a indústria de alimentos, uma vez que resíduos do mesmo podem ser eliminados no leite e na carne. A presença de antibióticos no leite interfere na fabricação de produtos lácteos fermentados como queijo e iogurte, além de propiciar seleção de bactérias resistentes. Como alternativa ao uso de antibióticos no tratamento de animais, a utilização de bacteriófagos para o controle biológico de bactérias patogênicas no homem, animais, alimentos e plantas (BARROW *et al.*, 1997; CHANISHVILI *et al.*, 2001; LEVERENTZ *et al.*, 2003). Bacteriófagos foram isolados a partir de amostras de água de lavagem de piso de estabulos do campo experimental da Embrapa Gado de Leite, situado em Coronel Pacheco - Minas Gerais. Esses bacteriófagos foram testados frente a 100 estirpes de *Staphylococcus aureus*. Estas estirpes foram isoladas de vacas com mastite de regiões de Minas Gerais e do Rio Grande do Sul e pertencem ao banco de culturas do Laboratório de Microbiologia do Leite, da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora – MG. Esses bacteriófagos, denominados Fagos 003, 004, 005 e 006, possuem amplo espectro de hospedeiro, possuindo um potencial para utilização no controle biológico de *S. aureus*, sendo assim uma alternativa ao uso de antibióticos.

Palavras-chave: bacteriófagos, *Staphylococcus aureus*, mastite.

1 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. Devido a sua alta prevalência no Brasil, são estimadas perdas de produção de 12 a 15% ou seja, cerca de 3 bilhões de litros de leite/ano (FONSECA & SANTOS, 2000). A ocorrência de mastite afeta a indústria de laticínios, devido às alterações na composição do leite, uma vez que vacas com mastite produzem leite com menor teor de caseína, gordura, lactose, cálcio e potássio, e maior concentração de cloreto de 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.

¹ Estagiária Embrapa Gado de Leite, Graduanda em Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES-JF). E-mail: izispinheiro@yahoo.com.br

² Engenheira de alimentos, PhD – Pesquisadora Embrapa Gado de Leite.

³ Veterinária, DSc – Pesquisadora Embrapa Gado de Leite.

⁴ Bióloga, DSc – Pesquisadora Embrapa Gado de Leite.

Um grande número de bactérias pode causar mastite, que se caracteriza por uma inflamação da glândula mamária. No Brasil, *Staphylococcus aureus* é considerado o agente predominante da mastite (BRITO & BRITO, 1996). Em um estudo realizado por BRITO e colaboradores (1999) no Sudeste do Brasil, *S. aureus* foi isolado em 47 de 48 rebanhos estudados.

S. aureus é uma bactéria gram-positiva na forma de cocos, causadora de mastite sub-clínica, crônica e, em alguns casos, mastite hiperaguda gangrenosa, que geralmente resulta em morte do animal. Essa bactéria é considerada de difícil eliminação dos rebanhos, sendo moderadamente suscetível 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 um dos maiores desafios para a indústria de alimentos, pois resíduos podem ser eliminados no leite e na carne por períodos variáveis de acordo com a preparação e a via de aplicação do medicamento. Em relação ao consumidor, o leite contendo antibióticos pode provocar reações alérgicas, assim como choque anafilático em indivíduos sensíveis. Outro risco a ser considerado é o consumo de leite com altos níveis de resíduos de antibióticos por gestantes, tendo em vista que alguns antibióticos, como nitrofuranos e tetraciclinas, possuem efeitos carcinogênicos que podem levar a alterações no desenvolvimento ósseo fetal. Além de reações alérgicas e de indução de quadros patológicos, como por exemplo, anemia crônica causada pelo cloranfenicol, os resíduos de antibióticos possibilitam o risco de seleção de bactérias resistentes (PEZZA *et al.*, 2006). Essa resistência posteriormente pode ser transferida entre os microrganismos através de plasmídios (PEZZA *et al.*, 2006). Adicionalmente, a presença de resíduos de antibióticos no leite interfere na fabricação de produtos lácteos fermentados como queijos e iogurtes, sendo responsáveis pela redução da produção de ácidos e sabores na produção de manteiga e maturação de queijos. Ainda, concentrações de 1 ppb podem atrasar a atividade de culturas *starter* na produção de queijos, iogurtes e manteiga (NERO, L. A. *et al.*, 2007).

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 (BARROW *et al.*, 1997; CHANISHVILI *et al.*, 2001; LEVERENTZ *et al.*, 2003). Estudos visando alternativas ao uso de antibióticos nos tratamentos de animais têm sido conduzidos. A fagoterapia tem sido proposta como uma possível alternativa, uma vez que, os 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. Resultados de tratamentos eficientes têm estimulado o interesse na fagoterapia, fagos específicos para *Escherichia coli* enteropatogênica foram eficazes no controle de diarréia neonatal em bezerros, suínos e ovelhas e de septicemia em ratos, pintos e bezerros (SMITH & HUGGINS, 1983; BARROW *et al.*, 1998). Outra vantagem da fagoterapia se deve ao fato de que os fagos são autorreplicantes e autolimitantes, ou seja, somente irão se replicar enquanto a bactéria hospedeira estiver presente e, então, desaparecerão gradativamente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para isolamento de bacteriófagos, foram coletadas amostras de água de lavagem de pisos de estábulos do Campo Experimental da Embrapa gado de Leite em Coronel Pacheco, Minas Gerais. Cada amostra de água colhida foi clarificada por centrifugação e filtrada. A seguir, 1 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 (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.

Para os testes de atividade lítica foram utilizadas 100 estirpes de *S. aureus* pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Microbiologia do Leite, da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Essas amostras foram isoladas de vacas com mastite, provenientes de diferentes regiões do estado de Minas Gerais e do Rio Grande do Sul. Os testes de atividade lítica foram realizados por meio do método da gota. Cada estirpe testada foi cultivada em uma placa de ágar BHI contendo CaCl_2 e uma gota do filtrado de bacteriófago foi inoculado na placa, segundo metodologia descrita por Sambrook & Russell (2001). Essa técnica foi realizada em duplicata. Esses testes de atividade lítica foram utilizados para a avaliação *in vitro* do espectro de hospedeiro dos bacteriófagos selecionados.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram isolados 4 bacteriófagos, denominados Fagos 003, 004, 005, 006. Todos os bacteriófagos isolados apresentaram atividade lítica para *S. aureus*. O Fago 004 apresentou um maior espectro de lise bacteriana, lisando 87% das estirpes testadas (Figura 1). Os demais fagos também foram capazes de lisar algumas amostras de *S. aureus*, apresentando uma atividade lítica de 20% a 40% (Figura 1). Leite e colaboradores (2007) isolaram um bacteriófago no mesmo campo experimental da Embrapa Gado de Leite que apresentou uma lise de 99% frente às mesmas estirpes de *S. aureus*. Essas diferenças na atividade lítica destes fagos indicam um diferente espectro de hospedeiro entre estes fagos. Novos testes de atividade líticas utilizando outras estirpes de *S. aureus* serão conduzidos, assim como estudos mais aprofundados de virologia clássica e molecular para a caracterização dos fagos.

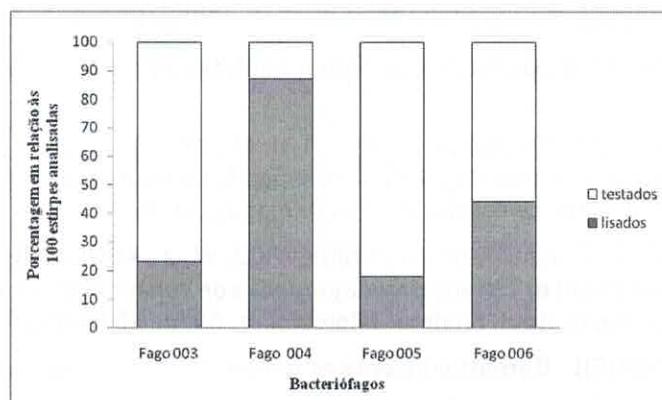


Figura 1 - Teste da atividade lítica dos bacteriófagos 003, 004, 005, 006, isolados frente a *S. aureus*.

4 CONCLUSÕES

O Fago 04 apresentou maior espectro de hospedeiro, indicando uma maior virulência. Esse fago, juntamente com o Fago 02 (Leite *et al.*, 2007) serão utilizados em estudos de avaliação como agente desinfetante ou fagoterapia de mastite bovina.

SUMMARY

Mastitis is considered the main disease that affects dairy herds in the world. The use of antibiotics in the treatment of animals is one of the biggest challenges for the food industry, since antibiotics residues can be eliminated in milk and meat. Its presence in the milk interferes fermented dairy products manufacture, such as cheese and yoghurt and leads to selection of resistant bacteria. As an alternative to the use of antibiotics in animals treatment, the usage of bacteriophages for biological control of pathogenic bacteria have been proposed. Bacteriophages were isolate dfrom samples of flush water collected from the Embrapa Dairy Cattle experimental field located in Coronel Pacheco – Minas Gerais. These bacteriophages were tested agianst 100 *Staphylococcus aureus* strains. These strains were isolated from cows with mastitis from the regions of Minas Gerais and Rio Grande do Sul States and belongs to the culture bank of the Laboratory of Milk Microbiology of Embrapa Dairy Cattle – Juiz de Fora, Brazil. These bacteriofages, named Fagos 003, 004, 005 and 006, presented a wide host range, having a potencial use in biological control of *S. aureus*, being an alternative for the use of antibiotics.

Keywords: bacteriophages, *Staphylococcus aureus*, mastitis

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROW, P. A., LOVELL, M., BERCHIERI Jr., 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.

- BARROW, P. A., SOOTHILL, J. S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in Microbiol.* v. 5, i7, p. 268-271, 1997.
- BRITO, J. R. F., BRITO, M. A. V. P., ARCURI, E. F. Como (re) conhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos. Circular Técnica, n. 70, Embrapa, Juiz de Fora, MG. 2002. 8p.
- BRITO, M. A. V. P., BRITO, J. R. F. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. In: BRITO, J. R. F., BRESSAN, M. (Ed). Controle integrado da mastite bovina. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1996. p. 68-96.
- BRITO, M. A. V. P., BRITO, J. R. F., RIBEIRO, M. T., VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exames de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, v. 51, p. 129-135, 1999.
- 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. 176p.
- LEITE, J. A.; ARCURI, E. F.; RAMOS, A. I. A. P.; SILVA, J. M.; LANGE, C. C.; ALVES, B. R. C. Isolamento e avaliação *in vitro* da eficácia de bacteriófagos líticos específicos para *Staphylococcus aureus* causadores de mastite bovina. XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007.
- 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. 64p.
- NERO, Luís Augusto, MATTOS, Marcos Rodrigues de, BELOTI, Vanerli *et al.* Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, abr./jun. 2007, vol. 27, nº. 2, p. 391-393. ISSN 0101-2061.
- 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.
- PEZZA *et al.* Determinação simultânea de resíduos de Cloranfenicol, Tianfenicol e Florfenicol, em leite bovino por cromatografia eletrocinética micelar. *Quími. Nova*, Vol. 29, No. 5, 926-931, 2006.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY:CSH, 2001. 345p.
- 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.
- 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.

Anais do
**25º Congresso Nacional
de Laticínios**

36ª Expomaq

*Exposição de Máquinas, Equipamentos, Embalagens
e Insumos para a Indústria Laticinista*

**35º Concurso Nacional
de Produtos Lácteos**

35ª Expolac

Exposição de Produtos Lácteos

14 a 17 de julho de 2008

Expominas - Instituto de Laticínios Cândido Tostes
Juiz de Fora - Minas Gerais



ISBN 978-85-99764-11-4