UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
NÚCLEO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO EM PECUÁRIA

Administração oral e retal de bacteriófagos no controle de *Escherchia coli O157:H7* em bovinos confinados.

Introdução

Apresentadores

Juliano Peres Prietsch
Graduando em Medicina Veterinária
6° Semestre

Ludgero Rehermann Loureiro da Silva
Graduando em Zootecnia
5° Semestre

Evandro Schmoeller
Médico Veterinário
Mestrando no PPGZ

Introdução

Revista

Jornal of Food Protection

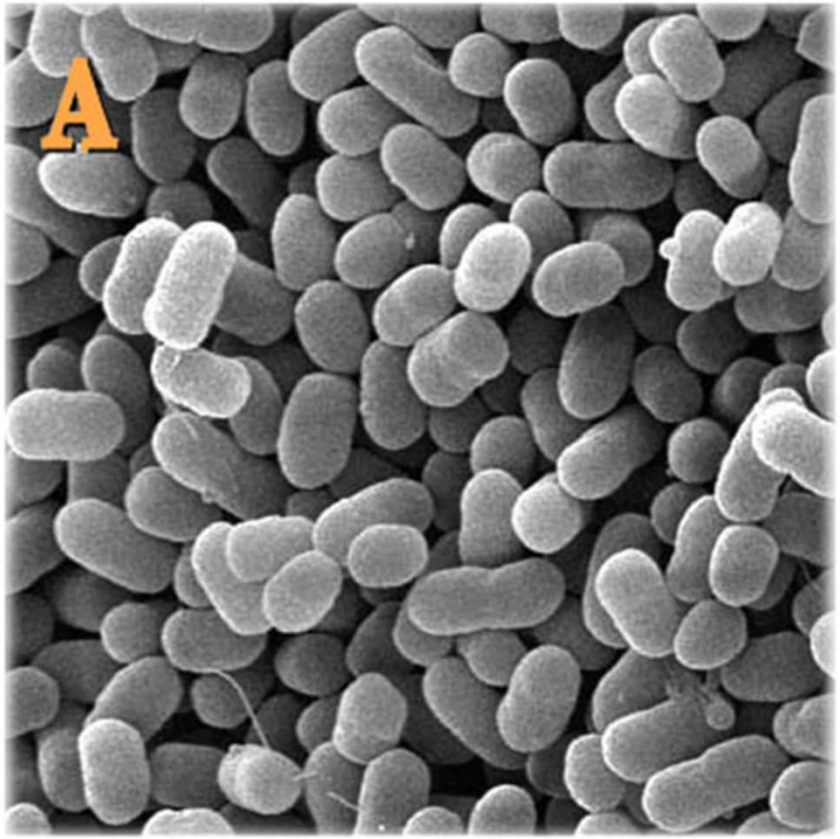
$$Fator\ de\ Impacto_{2009} = 2{,}45$$

$$Fator\ de\ Impacto_{2017} = 1{,}51$$

Introdução

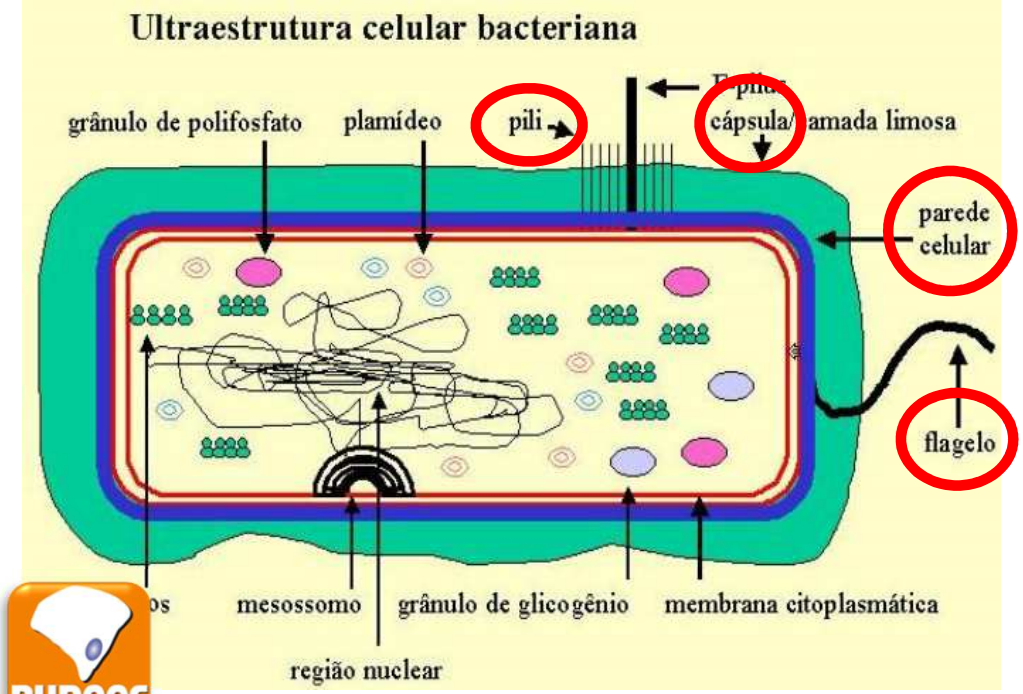
Escherichia Coli

- ✓ É uma bactéria
- ✓ Forma de bastonete
- ✓ Anaeróbia facultativa
- ✓ Gran -
- ✓ Comensal do TGI
- ✓ Colonização junção reto-anal



Introdução

Escherichia Coli



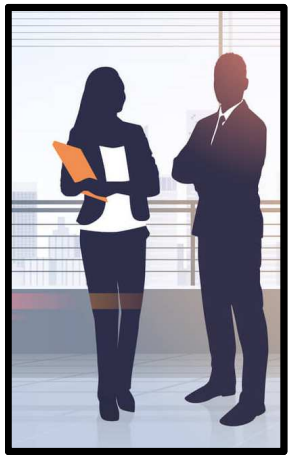
E. coli Enteropatogênica (EPEC)
E. coli Enterotoxigênica (ETEC)
E. coli Enteroinvasiva (EIEC)
E. coli Enteroagregativa (EAEC)
E. coli de aderência difusa (DAEC)
★ E. coli Shiga Toxigênica (STEC)

E. Coli O157:H7

Sorotipo

Introdução

Escherichia Coli O157:H7



Saúde Pública

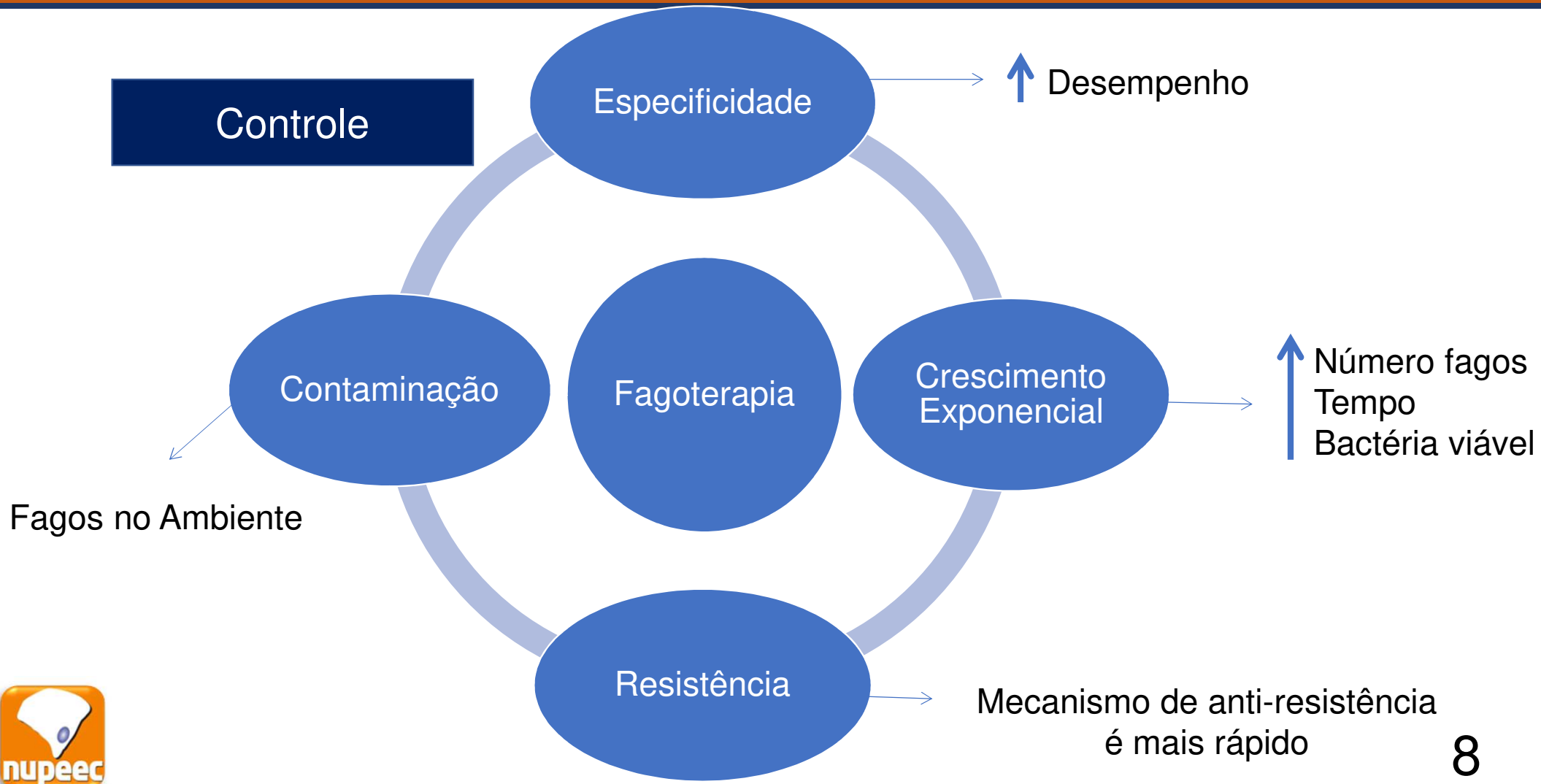
Patógeno Humano
Diarréia Aquosa
Colite hemorrágica
Sindrome hemolítica-urêmica
Carne crua, Água e vegetais

Insensível as Toxinas
Reservatório
Contaminação da carne se dá por fezes e falta de higiene no abate

Introdução

Controle
Portador assintomático
Cultura
Uso indiscriminado
Contaminação
Antibiótico terapia
Resistência Bacteriana
Tempo molécula no organismo
Especificidade
Morte microbiota gastointestinal
Desempenho

Introdução


Controle
Especificidade
Desempenho
Contaminação
Fagoterapia
Crescimento Exponencial
Número fagos
Tempo
Bactéria viável
Fagos no Ambiente
Resistência
Mecanismo de anti-resistência é mais rápido

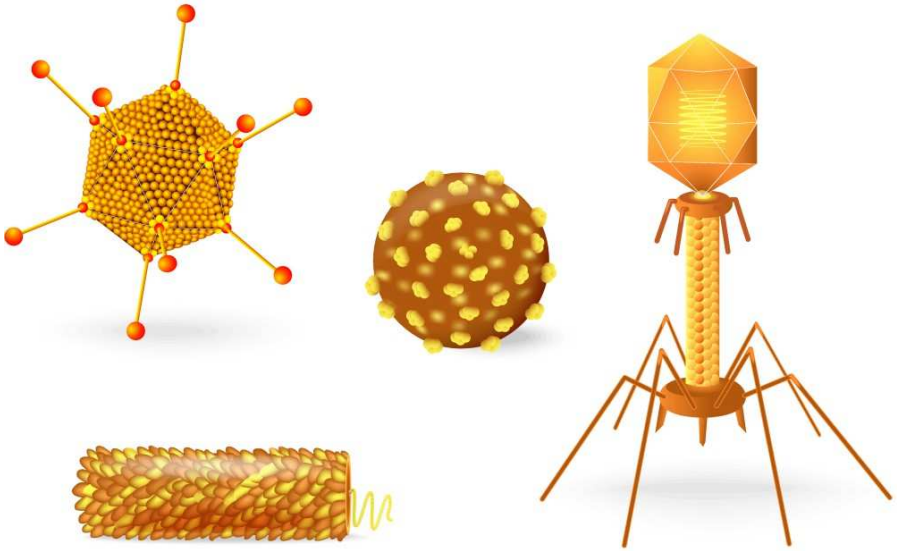
Introdução

Bacteriófagos

O que são ?

Composto por um ácido nucleico (DNA OU RNA)

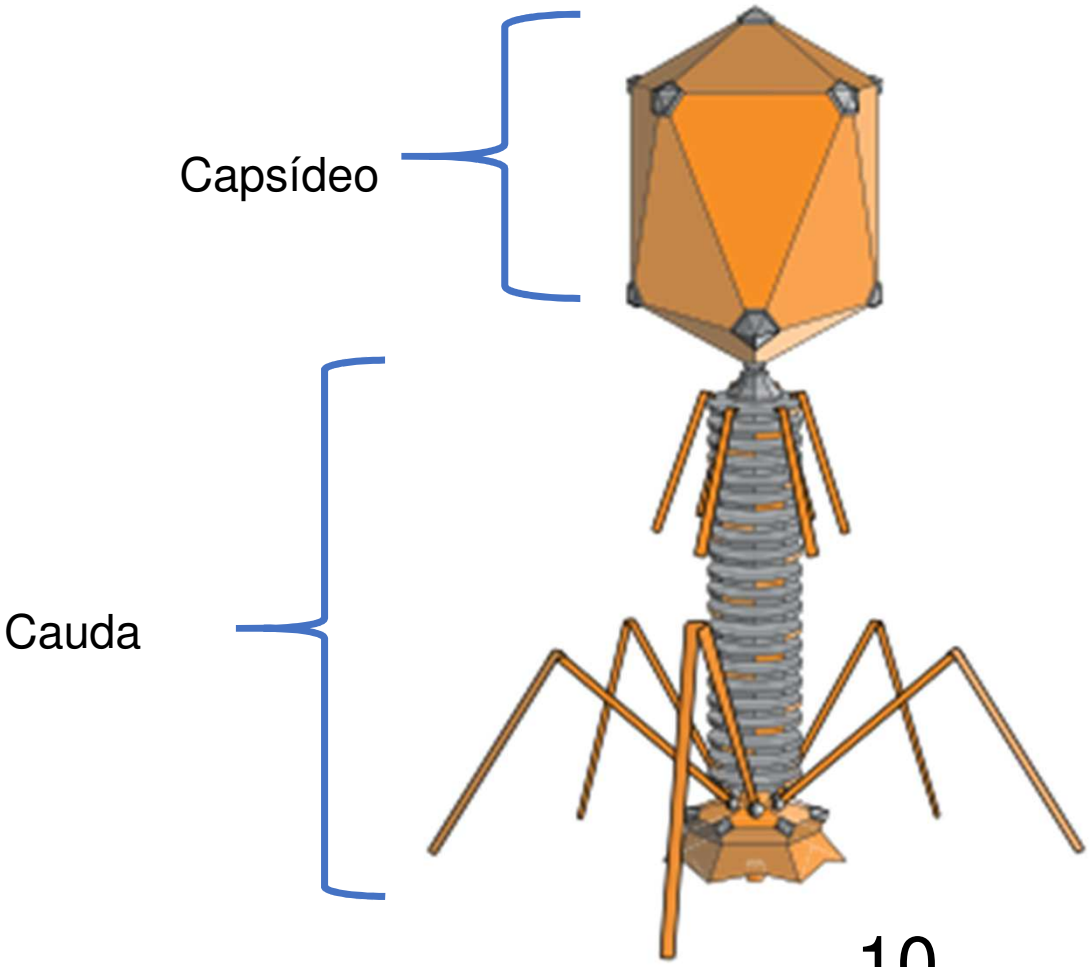
Morfologia diversa



Introdução

Bacteriófagos

- ✓ Modelo clássico de fago é o lambda,apresentando capsídeo e cauda contrátil
- ✓ Genomas de RNA ou DNA.
- ✓ Replicação: ciclos líticos ou lisogênicos



Introdução

Replicação

- ✓ Os fagos, assim como outros vírus são parasitas obrigatórios.
- ✓ Não possuem metabolismo próprio.
- ✓ Contato do fago ocorre por sua cauda que contem receptores específicos.

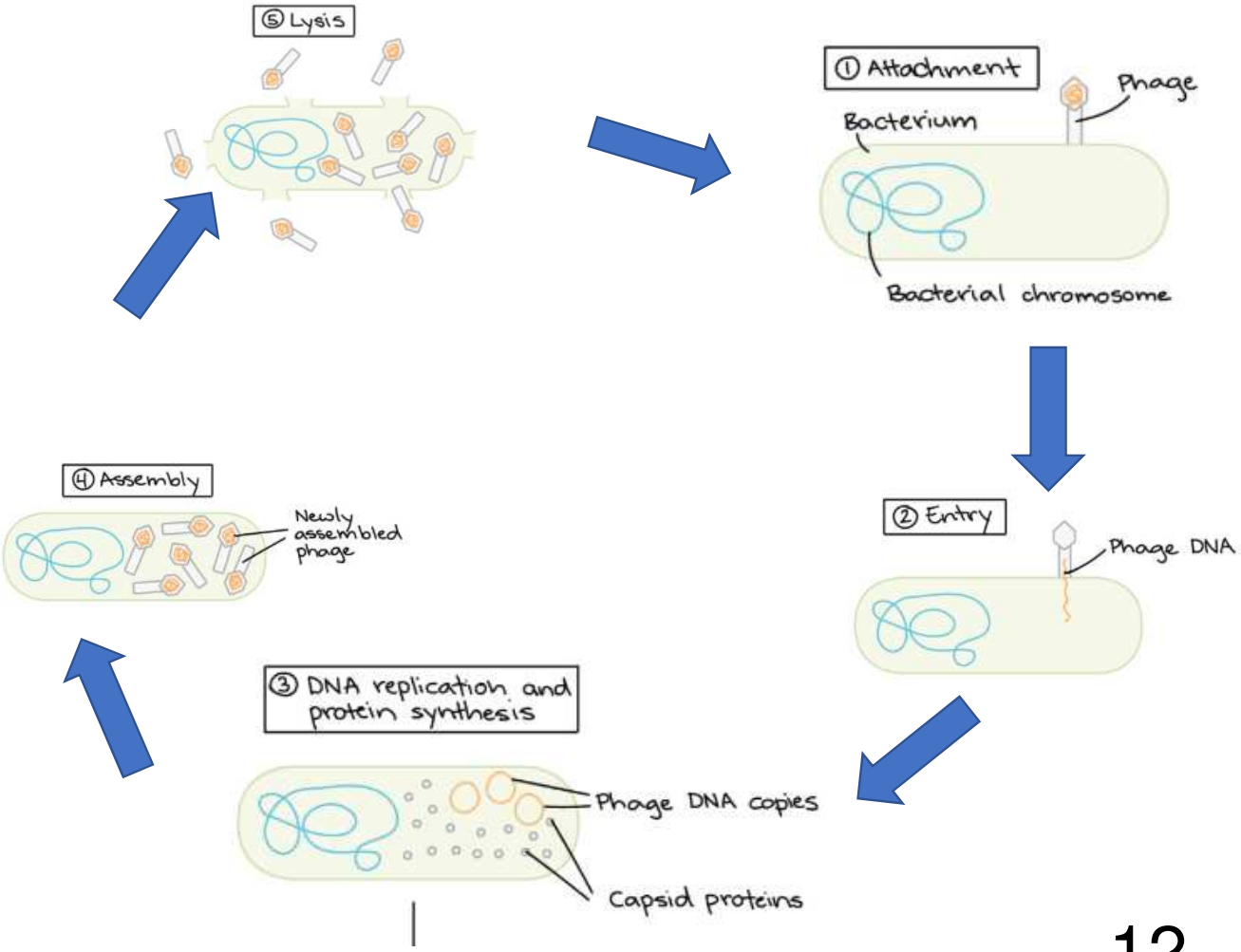
Cinco etapas de replicação:

1. Adsorção
2. Penetração
3. Biossíntese
4. Montagem
5. Liberação

Introdução

Replicação: Lítico

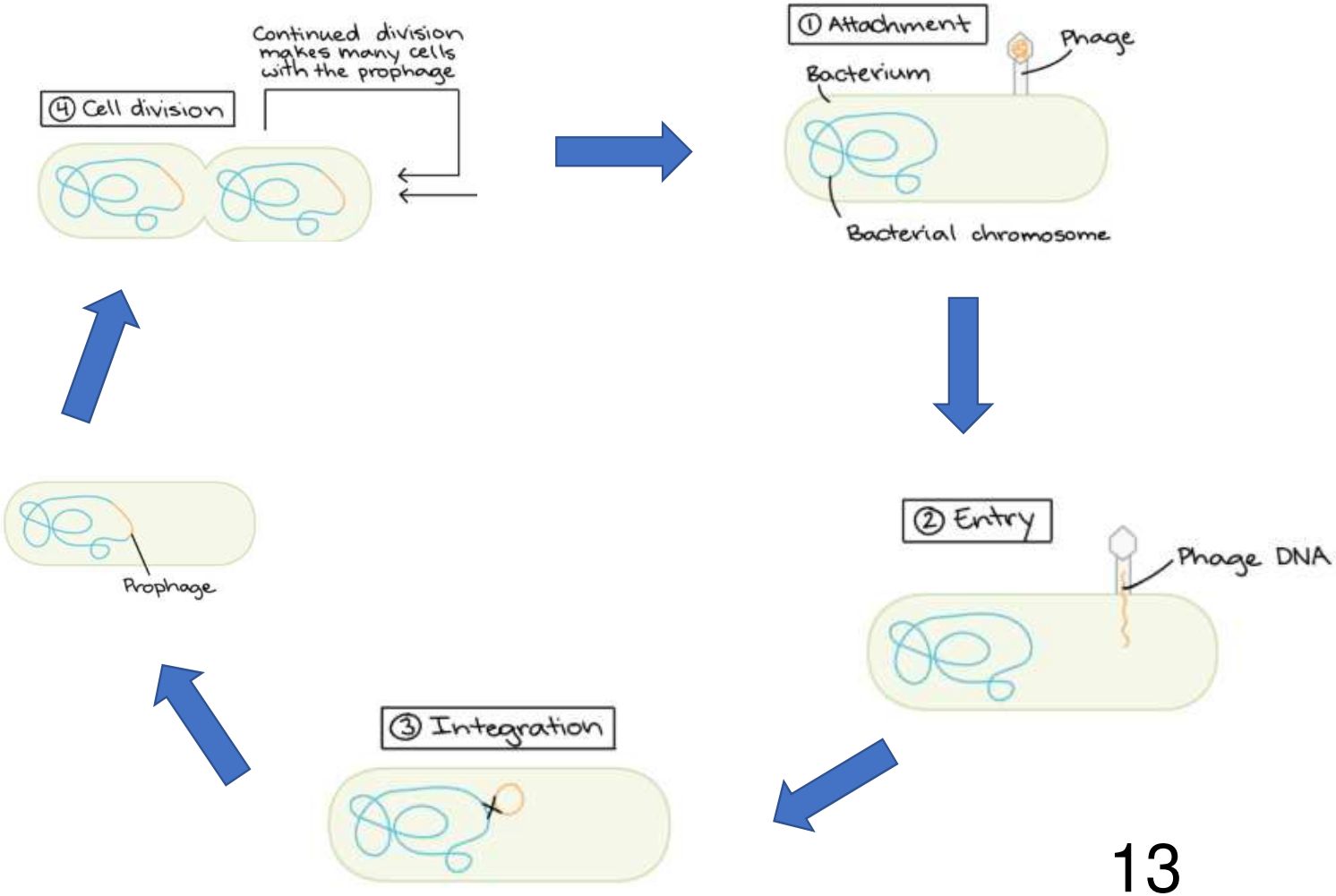
- ✓ Adsorção: ligante J, receptor lamB
- ✓ Penetração: entrada do acido nucleico
- ✓ Biossíntese: produção de DNA, RNA viral e proteínas para formação de capsídeos
- ✓ Montagem: formação de vírions
- ✓ Liberação: rompimento da membrana celular



Introdução

Replicação: lisogênico

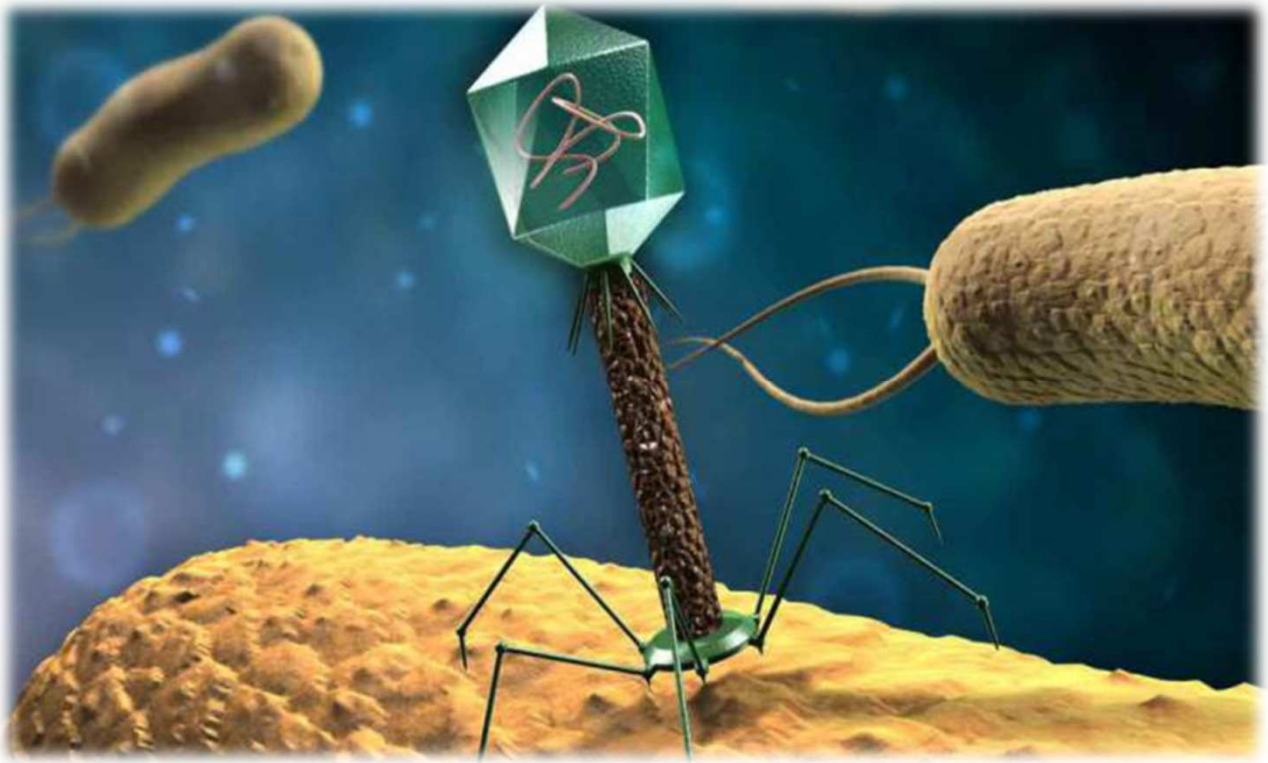
- ✓ Mesmo processo de até a penetração
- ✓ DNA circulatório
- ✓ Formação do pró-fago



Introdução

Interação fago bactéria

- ✓ Característica invasivo de predação
- ✓ Em resposta as bactérias desenvolveram meio de proteção
- ✓ Impedindo interação com fagos, mutação dos receptores
- ✓ Clivagem (corte de parte do DNA)



Introdução

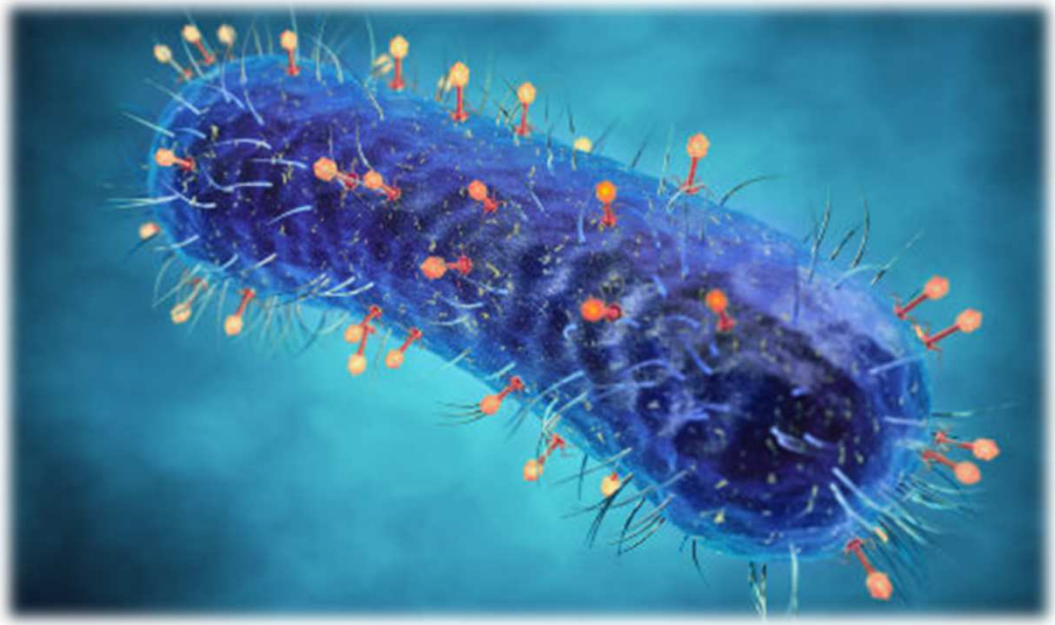
Interação fago bactéria

Modificações fenotípicas

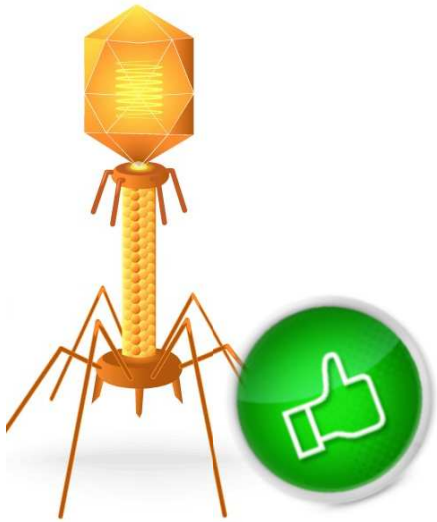
Enzimas de restrição

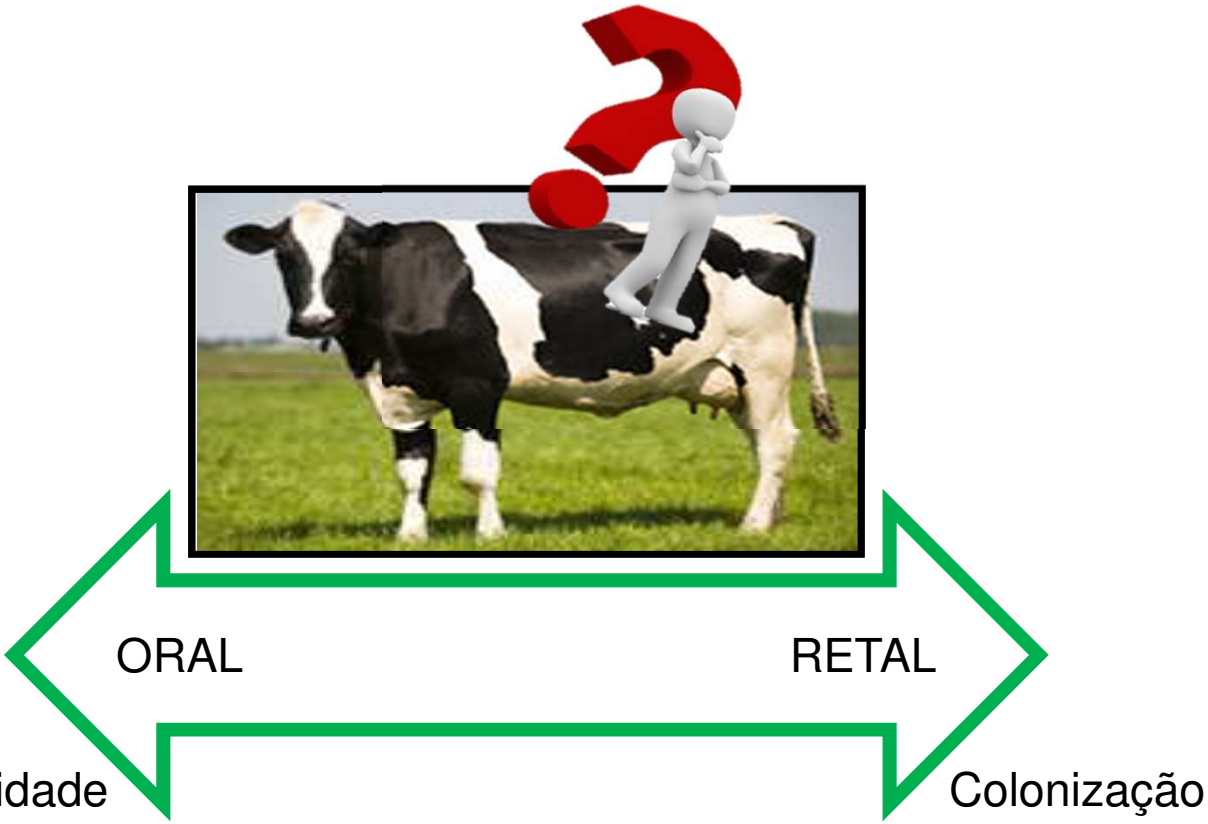
Adaptação do fago

Gene 0.3



Introdução





OBJETIVO

Comparar a **administração oral e/ou retal** de um coquetel de **bacteriófago** específico de quatro estirpes O157 a novilhos confinados com relação ao estabelecimento de **populações de fagos** dentro dos animais e consequente **mitigação de *E. coli O157:H7***

Metodologia

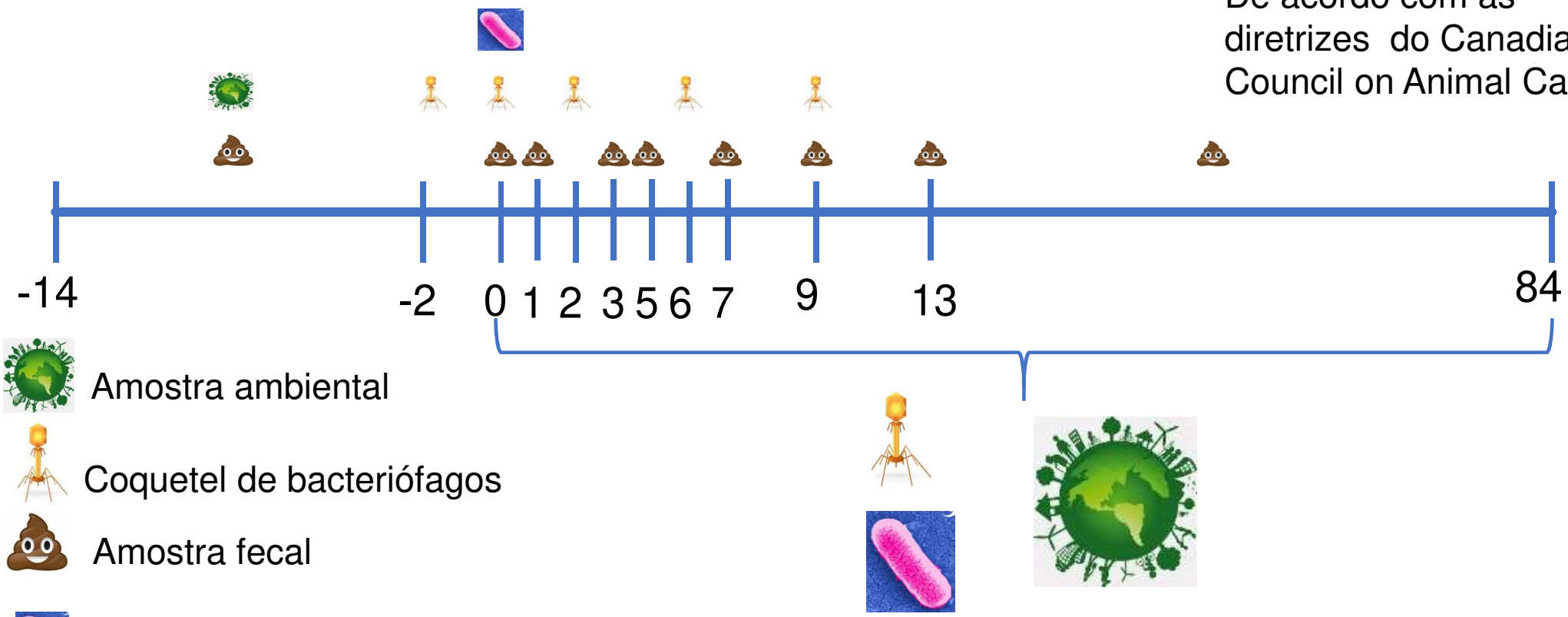
- Realizado em um confinamento de área aberta → Interação Animal-animal e Animal-ambiente

n= 32

Orl	8 animais →	2 Baias
Rec	8 animais →	2 Baias
O + R	8 animais →	2 Baias
Con	8 animais →	2 Baias

Metodologia

De acordo com as diretrizes do Canadian Council on Animal Care



Amostra ambiental

Coquetel de bacteriófagos

Amostra fecal

Inóculo bacteriano

Água e ambiente de manejo compartilhados

Metodologia

Inóculo Bacteriano

E318N
R508N
CO281-31N
E32511
H4420N

52,3mL

+150mL de PBS

Amostras de *E. coli* → Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) → Diferenciar as linhagens de *E. coli*

Metodologia

Coquetel Bacteriofágico

rV5
wV7
wV8
wV11

ORL: 3,3 x 10^{11} PFU em 35,2mL de PBS
REC: 1,5 x 10^{11} PFU suspensa em gel de metocel
O+R: 4,8 x 10^{11} PFU
CON: solução salina tamponada com fosfato (PBS)

Amostras Bacteriófagos → Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) → Diferenciar as linhagens de Fagos

Estatística

UFC
UFP → LOG

Amostras Positivas → 0 - 1

Frequência
Prevalência → $\frac{Positivos}{Total} x100$ → FREQ - SAS

Níveis
Eliminação → MIXED MODEL - SAS

Odds ratio → Con - referência → GLIMIMIX - SAS

Resultado

Todos os animais após o período de adaptação apresentaram-se negativos para *E.coli* e para bacteriófagos.

Resultados e discussão

TABELA 1. Medidas de capsídeo e cauda do fago experimental wV7 e fago endógeno que produziu grandes placas, conforme determinado por microscopia eletrônica de transmissão

Mensuração	wV7	Fago endógeno
Largura do capsideo (nm)	67.71	51.73
Comprimento do capsideo(nm)	95.05	53.13
Largura da cauda (nm)	92.64	158.67
Comprimento da cauda (nm)	16.36	10.90

Resultados e discussão

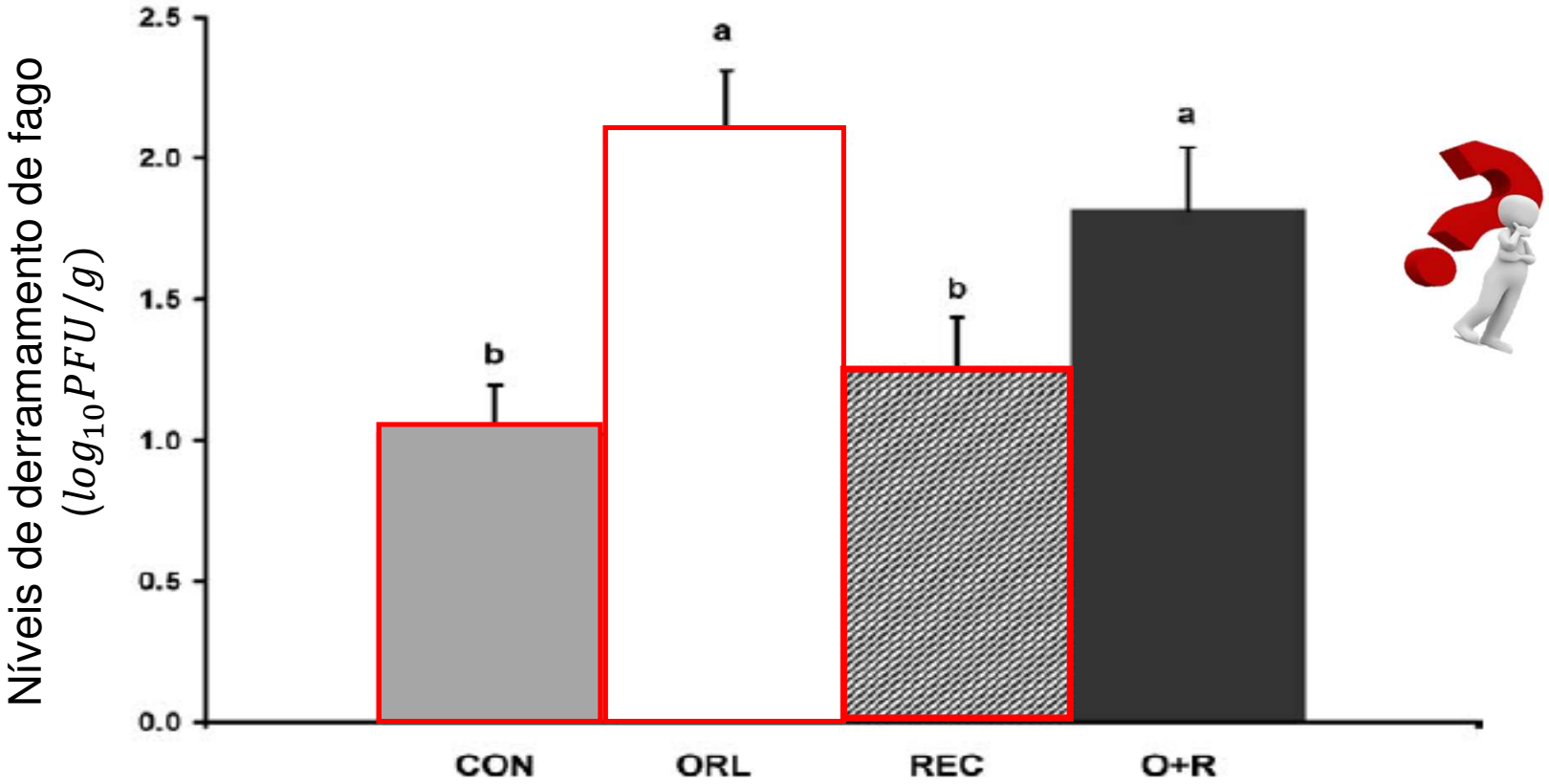


FIGURA 1. Níveis médios de eliminação do bacteriófago por tratamento em novilhos experimentalmente inoculados com Nal^R *E. coli O157:H7* no dia 0. Letras diferentes quando p<0,10.

Resultados e discussão

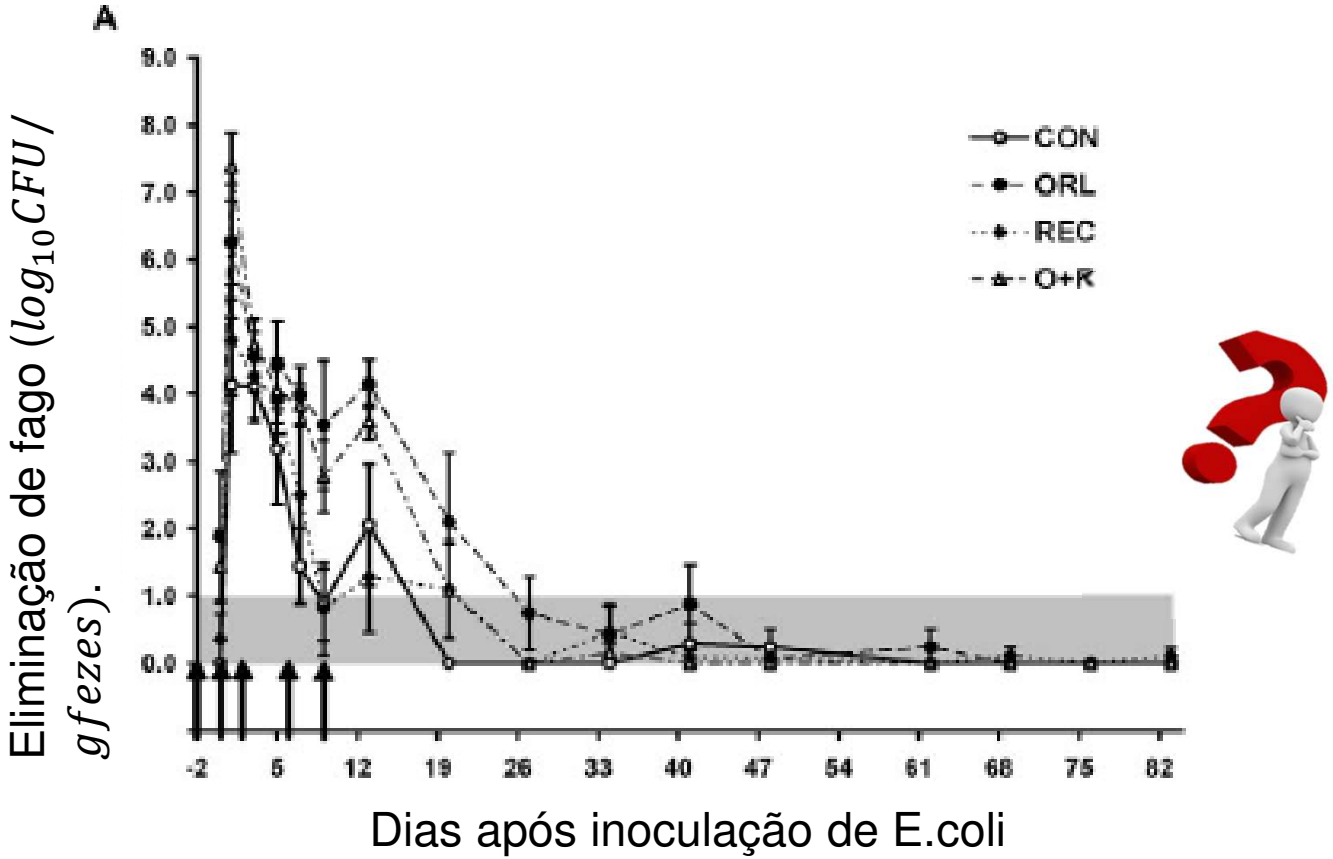


FIGURA 2. Níveis médios de eliminação do bacteriófago por dia em novilhos experimentalmente inoculados com Nal^R *E. coli O157:H7* no dia -2 (p=0,03)

Resultados e discussão

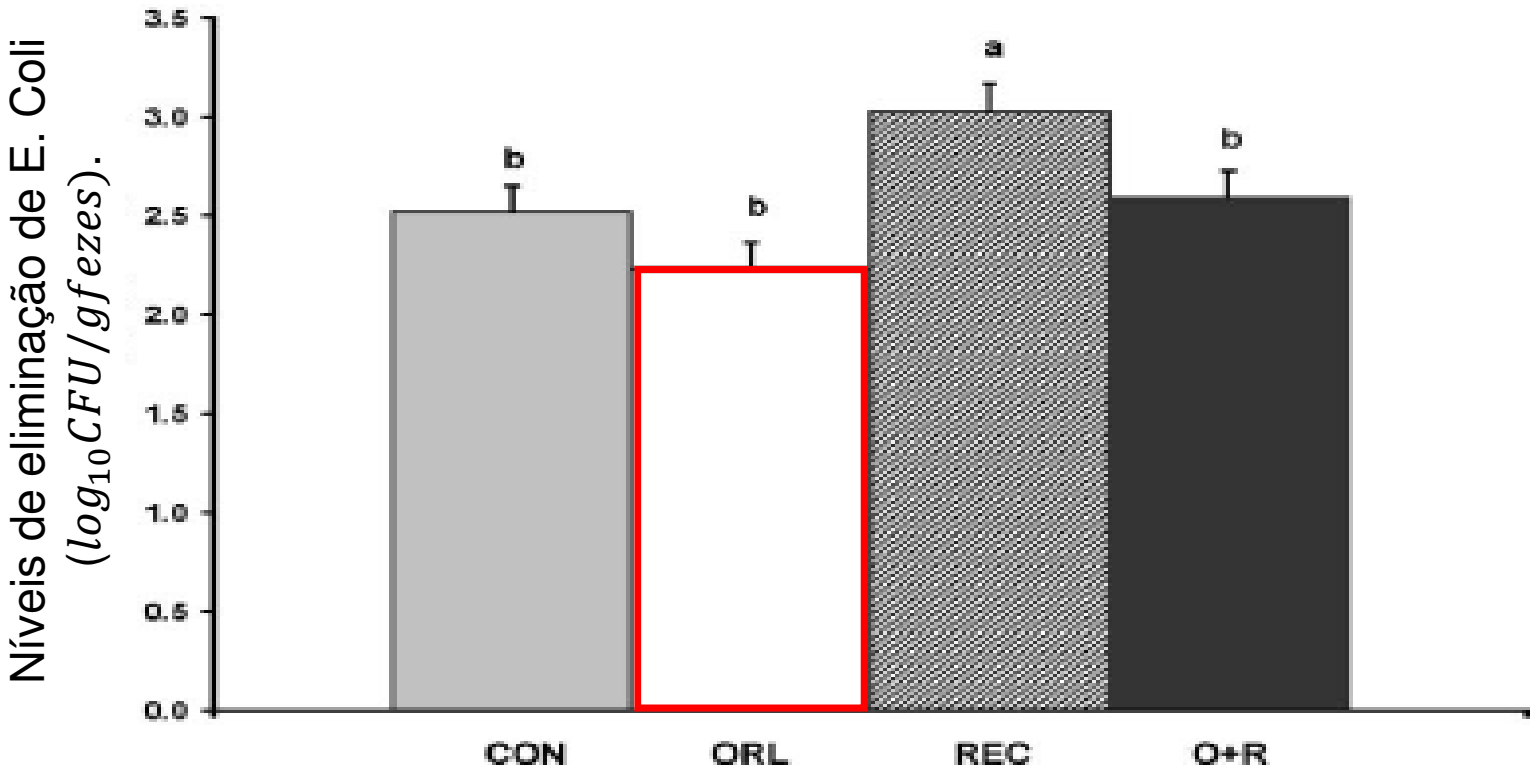


FIGURA 3. Níveis médios de eliminação de Nal^R *E. coli O157:H7* por novilhos experimentalmente inoculados no dia 0.(p<0,01)

Resultados e discussão

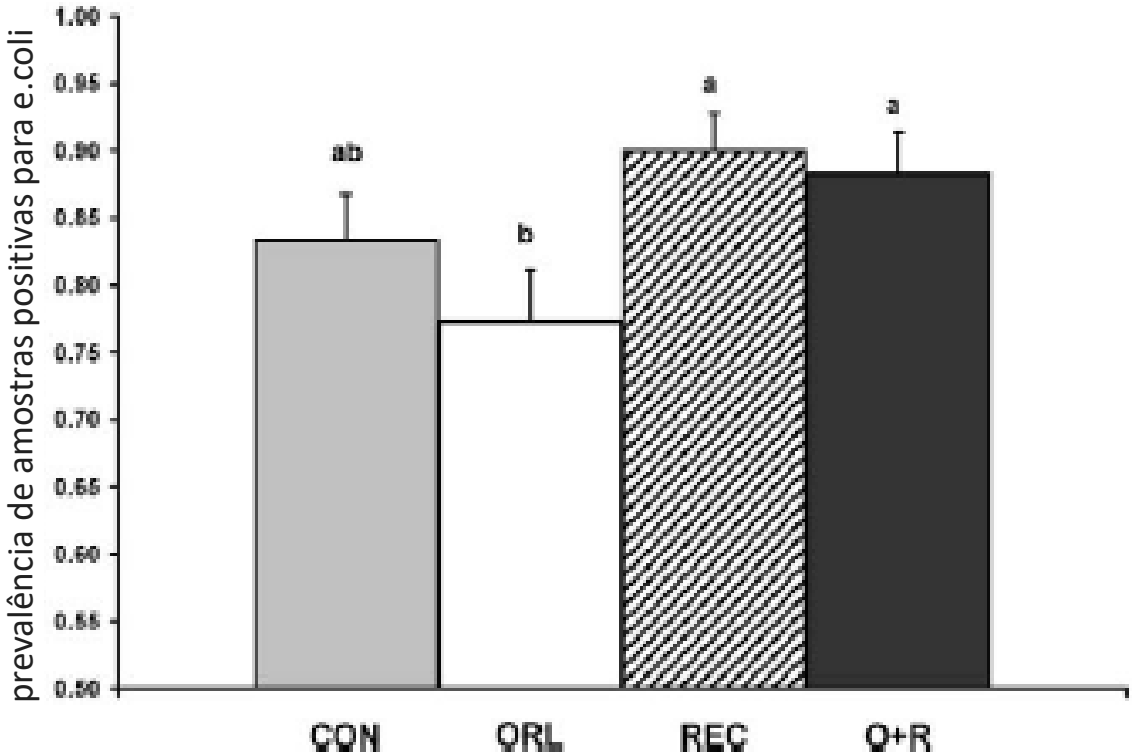


FIGURA 4. apresenta os padrões de eliminação fecal de NalR E. coli O157: H7 por animais individuais ao longo do ensaio.($p<0,01$)

Resultados e discussão

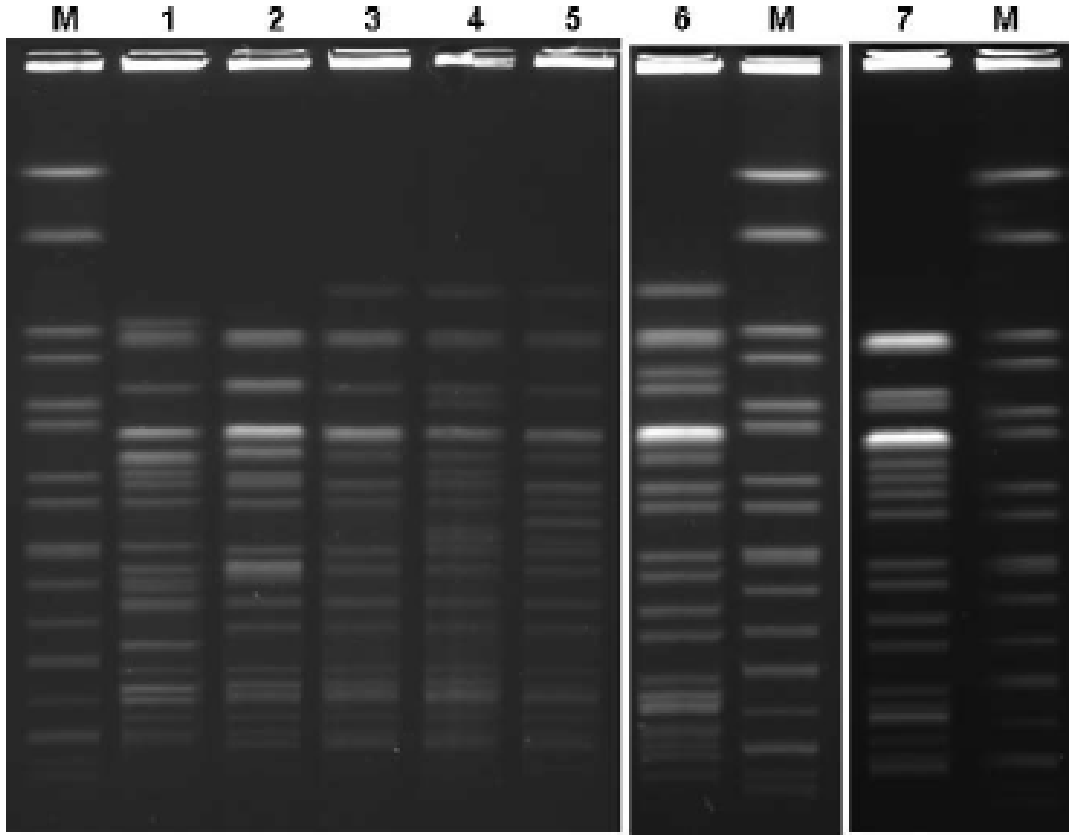


FIGURA 5. Analise de electroforética em gel de campo pulsado de DNA genômico diferido por Xbal das cincos estirpes laboratoriais de Echerichia Coli O157:H7.

Resultados e discussão

TABELA 2. Susceptibilidade relativa das cinco cepas conhecidas e doi novos isolados de *Escherichia coli O157:H7* para cada uma das quatro cepas de bacteriófagos incluídos no coquetel experimental.

Estirpe de E.coli isolada	Suscetibilidade relativa (log PFU / ml) a bacteriófagos [a]			
	rV5	wV7	wV8	wV11
R508N	6	6	9	7
E318N	8	5	8	7
H4420N	6	6	5	7
E32511	6	4	6	7
CO281-31N	5	4	8	6
492A	8	5	>10	7
535A	6	6	9	7

Resultados e discussão

TABELA 3. Odds ratio representando a probabilidade de isolar o bacteriófago ou NalR Escherchia coli O157:H7 de amostras fecais dentro de um grupo tratamento especifico quando comparado com o controle.

	Grupo de tratamento		
Organismo isolado	ORL	REC	O+R
Bacteriófago			
Odds ratio	2.31	1.33	1.91
95% CI	1.11–4.80	0.63–2.81	0.92–3.98
P value	0.03	0.34	0.07
Nal^R *E. coli* O157			
Odds ratio	0.72	1.51	0.92
95% CI	0.32–1.60	0.62–3.72	0.40–2.10
P value	0.31	0.27	0.78

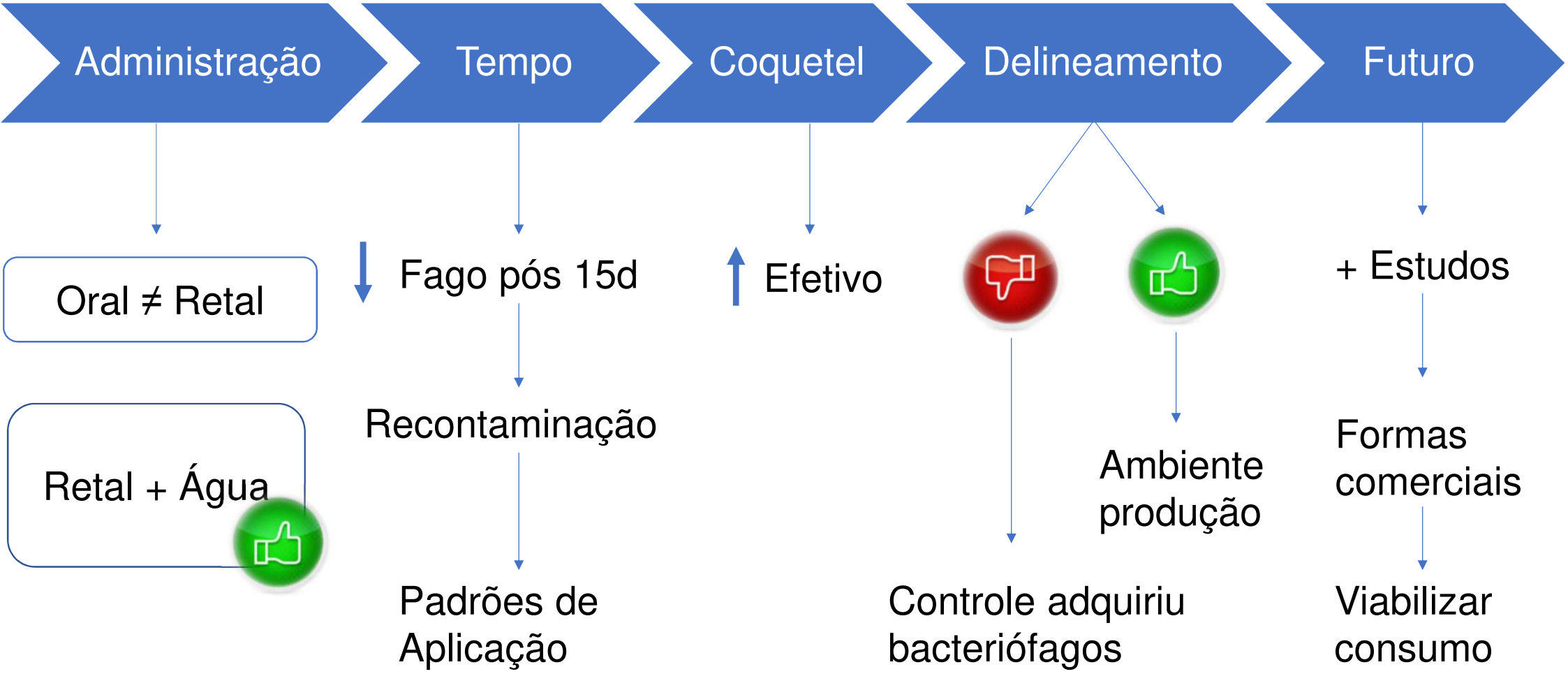
Resultados e discussão

TABELA 4. Presença do bacteriófago específico de Escherichia coli O157: H7 e E. coli O157 em amostras ambientais coletadas semanalmente durante o período experimental de 12 semanas

Amostras	CON	ORL	REC	O+R	Total
Agua (n=12[b])					
E. coli O157:H7	1 (8.3)	1 (8.3)	0 (0.0)	1 (8.3)	3 (6.3)
Bacteriófago	1 (8.3)	1 (8.3)	0 (0.0)	2 (16.7)	4 (8.3)
Alimento (n = 24)[c]					
E. coli O157:H7	2 (8.3)	1 (4.2)	2 (8.3)	2 (8.3)	7 (7.3)
Bacteriófago	0 (0.0)	3 (12.5)	0 (0.0)	1 (4.2)	4 (4.2)
Fezes (n = 24)[d]					
E. coli O157:H7	13 (54.2)	11 (45.8)	18 (75.0)	13 (54.2)	55 (57.3)
Bacteriófago	13 (54.2)	13 (54.2)	11 (45.8)	10 (41.7)	47 (49.0)

b- amostra de 100mL
c- subamostra de 10g
d- subamostra de 1g

Resultados e discussão



Conclusão

A utilização de um coquetel de **bacteriófagos** foi positivo para a **mitigação de *E. coli O157:H7***, sendo que a **administração oral** foi mais **efetiva** para essa mitigação quando comparada com a administração retal.

Muito Obrigado!

julianoprie@gmail.com
ludgero.l@hotmail.com