

BIANCA GIANOLA BELLINE SILVA

“PhageVet - Isolamento, caracterização e aplicação terapêutica de bacteriófagos líticos para *Escherichia coli* em medicina veterinária”

RESUMO

Escherichia coli (*E. coli*) é uma das bactérias mais prevalentes nas infecções que acometem animais domésticos, sendo amplamente relacionada à redução da eficiência reprodutiva. Na clínica de cães e gatos, a infecção uterina é chamada de piometra, sua evolução pode cursar com sepse e óbito, sendo o tratamento de eleição a ovariectomia, em razão da resposta ineficaz a antibioticoterapia. O aumento da pressão de seleção e resistência bacteriana, associado a escassez de novos antibióticos, torna urgente a busca de alternativas terapêuticas, como a fagoterapia que se baseia na ação de bacteriófagos. Objetivou-se neste trabalho isolar e caracterizar por análises físicas, biológicas e moleculares, dois novos fagos vB_EcoM_Uniso11 (ph0011) e vB_EcoM_Uniso21 (ph0021), usando *Escherichia coli* Cefar CCCD-E003 como hospedeira. Após ampla caracterização, procedeu-se a estabilização estrutural e funcional dos fagos num coquetel, integrado num sistema de *delivery* do tipo óvulo vaginal, para aplicações terapêuticas em gatas e cadelas. Ambos os fagos isolados pertencem à ordem *Caudovirales*, sendo classificados como *Myoviridae*; fago ph0011 do gênero *Asterivirus* e fago ph0021 do gênero *Tequatrovirus*. Seus genomas de 348.288 pb (fago ph0011) e 165.222 pb (fago ph0021) não codificam toxinas, despolimerases, genes de integrases ou genes de resistência. Fagos ph0011 e ph0021 apresentaram boa replicação em *E. coli* e foram eficazes em ensaios de atividade antibacteriana *in vitro* e *ex vivo*, não infectando cepas de outras espécies bacterianas, denotando especificidade. O aumento da multiplicidade de infecção (MOI) de 1 para 1000 promoveu significativa eficiência *in vitro* e retardou o recrescimento de bactérias, enquanto nos ensaios *ex vivo* o aumento do MOI de 10 para 100 resultou em redução significativa da carga bacteriana. Embora ambos os fagos denotem potencial para controlar infecções por *E. coli*, fago ph0011 (redução de 4.24log UFC/mL) foi mais eficaz que fago ph0021 (redução de 1,90log UFC/mL) após 12h de incubação em MOI de 1000. Utilizados em forma de coquetel, foram altamente eficazes no controle da bactéria (redução de 5,57 log UFC/mL) em MOI de 100, após 12h de tratamento. Este estudo evidencia que os fagos isolados são potencialmente promissores contra infecções por *E. coli*, destacando sua estabilização estrutural e funcional em formulações do tipo óvulos vaginais.

Palavras-chave: bacteriófago. *Escherichia coli*. estabilização. piometra. resistência.

ABSTRACT

Escherichia coli is one of the most prevalent bacteria in infections that affect domestic animals, being largely related to the reduction of reproductive efficiency in different species. In the dog and cat clinic, the uterine infection is called pyometra, its evolution can lead to sepsis and death, and the treatment of choice is ovariectomy, due to the ineffective response to antibiotic therapy. The increase in selection pressure and bacterial resistance, associated with the shortage of new antibiotics, makes it urgent to search for therapeutic alternatives, such as phage therapy that is based on the action of bacteriophages. The objective of this work was to isolate and characterize by physical, biological and molecular analyses, two new phages

vB_EcoM_Uniso11 (ph0011) and vB_EcoM_Uniso21 (ph0021), using *Escherichia coli* Cefar CCCD-E003 as hostess. After extensive characterization, the structural and functional stabilization of the phages was carried out in a cocktail, integrated in a delivery system of the vaginal egg type, for therapeutic applications in cats and. Both isolated phages belong to the order *Caudovirales*, being classified as *Myoviridae*; phage ph0011 of the genus *Asteriusvirus* and phage ph0021 of the genus *Tequatrovirus*. Their genomes of 348,288 bp (phage ph0011) and 165,222 bp (phage ph0021) do not encode toxins, depolymerases, integrase genes or resistance genes. Phages ph0011 and ph0021 showed good replication in *E. coli* and were effective in in vitro and ex vivo antibacterial activity assays, not infecting strains of other bacterial species, denoting specificity. The increase in the multiplicity of infection (MOI) from 1 to 1000 promoted a significant increase in in vitro efficiency and delayed bacterial regrowth, while in ex vivo assays, increasing the MOI from 10 to 100 resulted in a significant reduction of bacterial load. Although both phages have the potential to control pyometra caused by *E. coli.*, phage ph0011 (reduction of 4.24 log CFU/mL) was more effective than phage ph0021 (reduction of 4.24 log CFU/mL). 1.90 log CFU/mL) after 12h of incubation at a MOI of 1000. Used in cocktail form, they were highly effective in controlling the bacteria (5.57 log CFU/mL reduction) at a MOI of 100, after 12h of treatment. This study shows that the isolated phages are potentially promising against *E. coli* infections, highlighting their structural and functional stabilization in vaginal egg-type formulations.

Keywords: bacteriophage. *Escherichia coli.* pyometra. resistance. stabilization.