



MEIRE PRISCILLA OTA

*“Salmonella enterica 4,[5],12:i:-: Estabilidade do operon
fljBA e discriminação por PCR Duplex”*

Campinas
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

MEIRE PRISCILLA OTA

“*Salmonella enterica* 4,[5],12:i:-: Estabilidade do operon
fljBA e discriminação por PCR Duplex”

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestra em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
MEIRE PRISCILLA OTA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCELO BROCCHI.

Assinatura do Orientador

Campinas
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Ota, Meire Priscilla, 1984-
Ot1s *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- estabilidade do *operon fljBA* e discriminação por PCR duplex / Meire Priscilla Ota. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Brocchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Salmonella enterica*. 2. Mutagênese. 3. Deleção de genes. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Proteína FljA, *Salmonella*. I. Brocchi, Marcelo, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- *operon fljBA* stability and duplex PCR discrimination

Palavras-chave em inglês:

Salmonella enterica

Mutagenesis

Gene deletion

Polymerase chain reaction

FljA protein, *Salmonella*

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Marcelo Brocchi [Orientador]

Cláudio Chrysostomo Werneck

Gerson Nakazato

Data de defesa: 26-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MEIRE PRISCILLA OTA

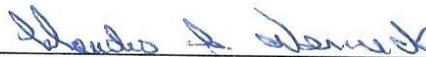
ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO BROCCHI

MEMBROS:

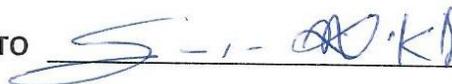
1. PROF(A). DR(A). MARCELO BROCCHI



2. PROF(A). DR(A). CLÁUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK



3. PROF(A). DR(A). GERSON NAKAZATO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 26 de agosto de 2013

“Aos meus queridos pais Keiti e Tina e ao meu amado noivo Kento”.

Agradecimentos

Agradeço a Deus primeiramente por todas as oportunidades e pessoas especiais que colocou em meu caminho.

Aos meus pais pela vida, pelo apoio incondicional e pelo exemplo de felicidade.

Ao meu orientador Marcelo Brocchi pela compreensão com meus horários e pelo exemplo de inteligência e amor à ciência.

Ao grupo LGBMol por compartilhar bons momentos dentro e fora do laboratório. Em especial a Catierine, Tamires, Adriana, Marcos, Igor, Bruna, Diego, Guilherme, Sandra e Evandro por toda ajuda durante esta jornada.

Ao grupo EMS, em especial a equipe P&D e ao pessoal do 2º turno por me tornarem uma profissional melhor e pela amizade.

As minhas queridas amigas Éllen e Jane pela compreensão com minhas angústias e por celebrar minhas conquistas como se fossem suas.

A minha grande amiga Rafaela pelos bons momentos compartilhados mesmo que menos frequentes do que gostaria.

Aos meus sogros Francisca e Hideo por me receberem tão bem em sua família que agora considero como minha. Um agradecimento especial ao Sr. Hideo pela ajuda com as figuras deste trabalho.

Aos meus cunhados Lissa e Fernando pelos agradáveis momentos em família. E minha querida sobrinha Susana por trazer paz e alegria na vida de toda a família.

A minha irmã Stella e meu cunhado Marcel pelos bons momentos juntos e pelos inestimáveis conselhos e apoio.

Ao meu amado noivo Kento por ser meu exemplo de vida, pela ajuda imensurável, pelo incentivo a ser sempre melhor e por todos os momentos que passamos e passaremos juntos.

A Capes pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Resumo

S. enterica provoca desde enterocolítes até infecções sistêmicas sendo *S. enterica* I 4,5,12:i:- (flagelar monofásica) responsável por diversos surtos de salmonelose em diversas partes do mundo. Sua incidência tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas e ela é caracterizada pela ausência da variação de fase flagelar, processo no qual dois tipos de flagelinas são expressos. Este trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade do operon *fljBA*, responsável pela variação de fase flagelar, sob diferentes condições de cultivo. Para isso, o gene *cat* (resistência ao cloranfenicol) foi inserido próximo ao operon *fljBA* em linhagens de *S. enterica* Typhimurium uma vez que este sorovar deu origem a *S. enterica* I 4,5,12:i:- por deleção de *fljBA*. A estabilidade do operon foi verificada *in vitro* e *in vivo* e após tratamento da cultura com mitomicina C, antibiótico indutor de profagos. Este último tratamento foi utilizado em virtude da presença do fago Fels-2 próximo ao operon *fljBA*, uma vez que dados da literatura sugerem que a deleção do operon foi em decorrência da excisão/recombinação imprecisa de profagos. Os resultados obtidos sugerem que a deleção do operon parece ser um evento raro, dado que em nenhuma condição testada houve a reversão da resistência frente ao cloranfenicol. Essas observações abrem discussões sobre a essencialidade da variação de fase flagelar na patogenicidade de *S. enterica*. É possível que os clones que deram origem a *S. enterica* I 4,5,12:i:- apresentem características genotípicas e fenotípicas compensatórias a perda de variação de fase. Ainda neste trabalho a ausência dos genes *fljA* e *fljB* foram confirmadas em amostras clínicas de *S. enterica* I 4,5,12:i:- isoladas no Brasil, mas a análise de isolados provenientes de granjas sugerem a existência de um novo padrão de deleção do operon *fljBA*, dados estes que precisam ser melhor investigados. Além disso, foi desenvolvida uma reação de PCR-Duplex para detecção de *S. enterica* I 4,5,12:i:- (Clone Americano) e diferenciação deste de outros sorovares, particularmente Typhimurium. Este PCR se mostrou eficiente na identificação e diferenciação de *S. enterica* I 4,5,12:i:- (clone Americano) podendo ser utilizado como técnica complementar as técnicas tradicionais de sorotipagem, visto ser um método rápido, preciso e acurado. Os testes sorológicos são laboriosos e devido ao fato do flagelo de fase II nem sempre ser expresso, amostras do sorovar Typhimurium podem ser erroneamente identificadas como *S. enterica* I 4,5,12:i:-.

Abstract

S. enterica causes from enterocolitis to systemic infections with *S. enterica* serovar I 4,5,12:i:- (monophasic flagellar) responsible for multiple salmonellosis outbreaks worldwide. Its incidence increased considerable in recent years and it is characterized by absence of flagellar phase variation, a process in which normally two flagellins are expressed. This work aimed to study the instability of *fljBA* operon, responsible for flagellar phase variation under different conditions growth. For this goal, *cat* gene (resistant for chloramphenicol) was inserted next to *fljBA* operon in *S. enterica* Typhimurium strains once this serovar originated *S. enterica* I 4,5,12:i:- by *fljBA* deletion. Stability of operon was verified “*in vitro*”, “*in vivo*” and culture treatment with Mitomycin C, prophages antibiotic inductor. This last treatment was used due the presence of Fels-2 prophage next to *fljBA* operon since previous works suggest that the deletion of operon is a result of imprecise excision/recombination of prophages. Results from this work suggest that the deletion of operon appear to be a rare event, since in none of condition tested were observed reversion of resistance mark to chloramphenicol. This observation leads to discussions about the essentiality of flagellar phase variation in pathogenicity of *S. enterica*. It is possible that clones whom originated *S. enterica* I 4,5,12:i:- presented compensatory genotypic and phenotypic features to the loss of phase variation. Absence of *fljA* and *fljB* genes was confirmed in clinic samples of *S. enterica* serovar I 4,5,12:i:- isolated in Brazil, but poultry samples suggest the presence of a new deletion pattern of *fljBA* operon, data that needs to be better investigated. Furthermore a Duplex-PCR were designed aiming *S. enterica* I 4,5,12:i:- (American Clone) and differentiation of it along others serovars, specially Typhimurium. This PCR showed efficient to identification and differentiation of *S. enterica* I 4,5,12:i:- (American Clone) technique that can be used as a complementary assay to traditional serotyping, since it is a fast, precise and accurate test. Serological tests are laborious and due phase flagellar II not always be expressed, samples of serovar Typhimurium can be misidentified as *S. enterica* I 4,5,12:i:-.

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração do mecanismo de variação de fase flagelar dado pela inversão do fragmento *H* mediada pela invertase codificada pelo gene *hin*. (A) Posição “off” de *hin* na qual *fljB* e *fljA* não são transcritos permitindo a expressão de *fliC* e a produção da flagelina de fase 1. (B) Posição “on” de *hin* em que *fljB* e *fljA* são transcritos produzindo um regulador negativo de expressão de *fliC* por *fljA* e a flagelina de fase 2 por *fljB*.

Figura 2. Ilustração do plasmídeo de expressão de recombinases pKD 46. Destaque dos gene γ , β e *exo* originados do fago λ e utilizados para a recombinação homologa de fragmentos lineares. Os genes γ , β e *exo* estão sob controle transcricional de ParaB. A inserção do plasmídeo pKD46 é confirmada pela aquisição de resistência a Ampicilina, proporcionada pela expressão do gene *bla* (β -lactamase)

Figura 3. Ilustração da reação de PCR com os *primers* anelando-se ao gene de resistência a cloranfenicol (*cat*) obtendo-se o cassete de resistência flanqueado pelas regiões de homologia ao gene de interesse. Destaque das regiões P1 / P2 e H1 / H2. Detalhe das sequencias FRT presentes nas regiões laterais ao gene de resistência.

Figura 4. Ilustração da fase de recombinação do cassete de resistência ao genoma bacteriano.

Figura 5. Formação da cicatriz pela ação da recombinase FLP.

Figura 6. Desenho ilustrativo da inserção do gene *cat* entre os genes *fljA* e STM 2769. H1 e H2 correspondem as regiões de homologia ao cassete de resistência contendo o gene *cat*. É possível verificar a diferença no tamanho das regiões antes (400 bp) e depois (1500bp) da inserção do cassete de resistência.

Figura 7. Meio Mint Green com colônias de *S. enterica* com fago P22HT. (A) colônias líticas; (B) colônias lisogênicas e (C) colônias livre de fagos. Risco central refere-se à estria com suspensão de fago P22HT.

Figura 8. Replicador de colônias com 98 alças.

Figura 9. Ilustração do procedimento de indução de fagos com Mitomicina.

Figura 10. Ilustração do ensaio para inoculação dos animais e respectivos tempos de sacrifício.

Figura 11. Ilustração do procedimento de extração e plaqueamento dos órgãos em meios de cultura LB e LB acrescido com cloranfenicol a 25 μ g/mL (LB+Cm) para camundongos tratados (A) via gavagem e (B) via intraperitoneal. Foi utilizado Macconkey agar com e sem cloranfenicol para o plaqueamento das suspensões bacterianas provenientes de Placas de Peyer com o objetivo de selecionar/diferenciar *S.*

enterica de outras bactérias da microbiota normal do intestino. O mesmo procedimento foi realizado em todos os grupos e individualmente.

Figura 12. Esquema de amplificação dos *primers* listados na Tabela 5 ilustrando os tamanhos dos genes e os tamanhos esperados dos fragmentos gerados pelos *primers*.

Figura 13. Desenho ilustrativo da comparação dos *contigs* contendo o *operon fljBA* em LT2 e 607STi. Destaque da região onde se verifica a perda dos genes de variação de fase flagelar (seta verde). As regiões em azul mostram identidade de bases, mas com sequência invertida. Regiões em vermelho mostram identidade de bases.

Figura 14. Ilustração esquemática do *operon fljBA* em *S. enterica* Typhimurium e da região genômica correspondente em *S. enterica* I 4,[5],12:i:- demonstrando a sequência inserida nas amostras correspondentes ao clone americano (U.S). A posição dos *primers* desenhados para amplificação da região STM1053-1997 (34).

Figura 15. Ilustração esquemática das duas possíveis orientações do fragmento *hin* em linhagens monofásicas STi. O esquema demonstra a posição dos *primers* que foram desenhados para a determinação da orientação de *hin* com base nas sequências genômicas de 607STi e 691STi. O tamanho dos fragmentos esperados pela amplificação por PCR estão indicados.

Figura 16. Produto de PCR amplificado a partir de pKD3 mostrado na 3ª coluna. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1ª coluna seguida do Controle Negativo, o qual corresponde à reação de PCR sem a presença de DNA.

Figura 17. Produtos de PCR amplificados a partir de colônias LT2:*cat* com *primers* de detecção STM_FljA_10n. Foram selecionadas duas colônias dos recombinantes obtidos para confirmação em gel mostrados na 4ª e 5ª coluna. DNA genômico da linhagem LT2 selvagem foi usado como referência para a *amplificação* do gene selvagem. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1ª coluna seguida do Controle Negativo, na qual corresponde a reação de PCR sem a presença de DNA. Recombinantes 662ST:*cat* e 14028:*cat* apresentaram mesmo padrão de amplificação.

Figura 18. Curva de crescimento das linhagens de *S. enterica* Typhimurium 662ST:*cat* e 14028:*cat* medida em UFC/mL durante 9 dias de incubação. As contagens foram realizadas em meio LB com cloranfenicol (25 µg/mL) e sem antibiótico.

Figura 19. Esquema de transferência de colônias obtidas da placa de LB-Agar com contagem entre 10-100 UFC/placa para placas de LB-Agar e LB-Agar + Cloranfenicol (25µg/mL) a fim de verificar colônias sensíveis ao antibiótico, fato que indicaria a perda da resistência por recombinação. O mesmo esquema de transferência foi utilizado para todos os experimentos “in vivo” e “in vitro”.

Figura 20. Placa de Lise com *S. enterica* Enteritidis.

Figura 21. Comparação da recuperação da linhagem de *S. enterica* Typhimurium LT2:cat em (A) Placas de Peyer, (B) baço e (C) sangue de camundongos BALB/c inoculados por gavagem. A extração obtida das placas de Peyer foi plaqueada em meio MacConkey (MC) e MacConkey + Cloranfenicol (25 µg/mL). Já para os outros foram plaqueados em LB e LB + Cloranfenicol (25 µg/mL). Foram inoculados 108 UFC por camundongo. As colunas representam a contagem média de cada camundongo e as barras representam o desvio padrão entre as contagens. Não houve recuperação do microrganismo nos camundongos 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14 e 15 nas amostras de sangue.

Figura 22. Comparação da recuperação da linhagem de *S. enterica* Typhimurium LT2:cat em (A) baço e (B) sangue de camundongos BALB/c inoculados via intraperitoneal. Os órgãos extraídos foram plaqueados em LB-Agar e LB + Cloranfenicol (25 µg/mL). Foram inoculados 106 UFC por camundongo. As colunas representam a contagem média de cada camundongo e as barras representam o desvio padrão entre as contagens. Os camundongos 10, 13, 14 e 15 vieram a óbito antes do dia do sacrifício. Não houve recuperação do microrganismo nos camundongos 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11 e 12 nas amostras de sangue.

Figura 23. Detecção do gene *fljA* por PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi), utilizando o par de *primers* FljA_280. As linhagens de *S. enterica* Typhimurium LT2 e 14028 foram utilizadas como controle positivo. O tamanho esperado do *amplicon* é de 280 bp. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1ª coluna.

Figura 24. Detecção do gene *fljB* por PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi), utilizando o par de *primers* FljB2. As linhagens de *S. enterica* Typhimurium LT2 e 14028 foram utilizadas como controle positivo. O tamanho esperado do *amplicon* é de 920 bp. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1ª coluna.

Figura 25. Detecção do gene *hin* por PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi), utilizando o par de *primers* Hin_ST. Tamanho do *amplicon* é de 540 bp. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1ª coluna.

Figura 26. Detecção dos genes (A) *fljA* e (B) *fljB* por PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- obtidas do laboratório AVIPA, utilizando o par de *primers* FljA_280 e FljB2. Tamanho dos *amplicons* são de 280 bp e 920 bp, respectivamente. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de

DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1º coluna de cada gel.

Figura 27. Duplex PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- , utilizando dois pares de *primers* FljA_280 e ST_STi. Tamanho do *amplicon* é de 280 bp para amostras bifásicas 719 bp para monofásicas. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1º coluna de cada gel.

Figura 28. Detecção da região de deleção do operon *fljBA* em amostras obtidas do laboratório AVIPA, utilizando o par de *primers* ST_STi. 607STi foi utilizado como controle positivo e LT2 como controle negativo. Tamanho do *amplicon* é de 719 bp. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1º coluna.

Figura 29. Duplex PCR em amostras de *S. enterica* (diferentes sorovariedade), utilizando dois pares de *primers* FljA_280 e ST_STi. Tamanho do *amplicon* é de 280 bp para amostras bifásicas 719 bp para monofásicas. STi 607 foi utilizado como controle dos *primers* ST_STi. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1º coluna de cada gel.

Figura 30. Detecção da posição do gene *hin* por PCR em amostras de *Salmonella* monofásicas STi 607 e STi 691, utilizando o três *primers* Hin_DF. Tamanho do *amplicon* é de 424 bp para posição “off” e 718 bp para posição “on”. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1º coluna.

Figura 31. Detecção da posição do gene *hin* por PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi), utilizando o três *primers* Hin_DF. Tamanho do *amplicon* é de 424 bp para posição “off” e 718 bp para posição “on”. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1º coluna.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação em subespécie de *Salmonella enterica*

Tabela 2. Relação de amostras de *S. enterica* monofásicas isoladas do setor de Emergência do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e do laboratório AVIPA (Laboratório de Avicultura e Patologia).

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para amplificação do gene *cat* usando pKD3 como molde e detecção deste mesmo gene após integração no genoma de *S. enterica*.

Tabela 4. Quantidade de reagentes utilizados para amplificação do cassete de resistência ao cloranfenicol com os *primers* STM_FljA e utilizando o plasmídeo pKD3 como molde.

Tabela 5. Sequência dos *primers* utilizados no estudo da deleção do operon *fljBA* em amostras STi.

Tabela 6. Sequência de *primers* para identificação de STi.

Tabela 7. Sequência dos *primers* utilizados na diferenciação da posição de *hin*.

Tabela 8. Número de UFC presente em suspensões de 662ST:*cat* e 14028:*cat* em um período de 9 dias.

Tabela 9. Resumo da quantidade de colônias transferidas para placas de LB-Agar e LB-Agar com cloranfenicol (25 µg/mL) para os ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*” com os recombinantes 662STm:*cat*, 14028:*cat* e LT2:*cat*. Os testes “*in vitro*” foram realizados com os 3 recombinantes citados. Os demais foram realizados apenas com LT2:*cat*.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATCC	AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION
ATP	ADENOSINA TRIFOSFATO
cm	CENTÍMETRO
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
dNTP	DESOXINUCLEOTÍDEO TRIFOSFATO
DO	DENSIDADE ÓPTICA
FRT	“FLP RECOGNITION SITE”
H1	“HOMOLOGY EXTENSIONS 1”
H2	“HOMOLOGY EXTENSIONS 2”
IgA	IMUNOGLOBULINA A
IgG	IMUNOGLOBULINA G
kb	KILO BASE (1000 PARES DE BASES NUCLEOTÍDICAS)
kV	KILO VOLTS
KW	KAUFFMAN-WHITE
LB	MEIO LURIA BERTANI
log	LOGARITMO NA BASE 10
LPS	LIPOPOLISSACARÍDEOS
M	MOLAR
mg	MILIGRAMA
mL	MILILITRO
MLVA	MULTIPLE LOCI VNTR ANALYSIS
mm	MILÍMETRO
mM	MILIMOLAR
NCBI	NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION
ng	NANOGRAMA
nm	NANÔMETRO
NF-kB	FATOR NUCLEAR KAPPA B
NTS	“ <i>non-typhoidal salmonella</i> ”
P1	“PRIMING SITE 1”
P2	“PRIMING SITE 2”
pb	PARES DE BASES NUCLEOTÍDICAS
PFGE	“PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS”
PBS	TAMPÃO FOSFATO SALINA
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
pH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
q.s.p.	QUANTIDADE SUFICIENTE PARA
SNP	“SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM”
SOC	MEIO “SUPER OPTIMAL CATABOLITE REPRESSION”
SS	MEIO <i>Salmonella-Shigella</i>
ST	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium
STi	<i>Salmonella enterica</i> I 4, [5], 12:i:-
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TLR	Receptores do tipo Toll
UFC	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA
UFP	UNIDADE FORMADORA DE PLACA
W	WATTS
µg	MICROGRAMA
µL	MICROLITRO
µM	MICROMOLAR
~	APROXIMADAMENTE
®	MARCA REGISTRADA
°C	GRAUS CELSIUS

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1.	SALMONELLA: ASPECTOS GERAIS E PATOGENICIDADE	18
1.1.1.	Classificação do gênero	18
1.1.2.	Processo inflamatório e resposta imune induzidos por <i>S. enterica</i>	20
1.2.	FLAGELO E FLAGELINAS.....	22
1.2.1.	Formação do flagelo	22
1.2.2.	Variação de fase flagelar	23
1.3.	<i>S. ENTERICA</i> I 4,5,12:I:-	25
1.4.	MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE <i>S. ENTERICA</i>	27
1.4.1.	Principais métodos de identificação disponíveis.....	27
1.4.2.	Sorotipagem molecular para diferenciação de <i>S. enterica</i> I 4,5,12:i:-.....	28
1.5.	SISTEMA λ RED	30
2.	OBJETIVOS	34
3.	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1.	LINHAGENS BACTERIANAS	35
3.2.	MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES TAMPÃO.....	37
3.3.	CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS RECOMBINANTES.....	37
3.3.1.	Obtenção dos plasmídeos do sistema λ Red	37
3.3.2.	Construção do cassete de resistência.....	37
3.3.3.	Inserção do cassete de resistência no genoma de <i>S. enterica</i>	38
3.3.4.	Transdução com fago P22HT.....	40
3.3.5.	Confirmação da inserção do gene <i>cat</i> no genoma de <i>S. enterica</i> por PCR utilizando os primers de detecção.....	42
3.4.	ANÁLISE DE REVERSÃO DA RESISTÊNCIA AO CLORANFENICOL “IN VITRO”	43
3.4.1.	Análise de reversão em culturas prolongadas	43
3.4.2.	Análise de reversão em culturas prolongadas – Replicador de colônias	44
3.4.3.	Indução de fagos.....	45
3.5.	ANÁLISE DE REVERSÃO DOS RECOMBINANTES “IN VIVO”	46
3.5.1.	Animais	46
3.5.2.	Análises “in vivo”	46
3.6.	PRIMERS ESPECÍFICOS PARA DETECÇÃO DE GENES DO OPERON <i>FLJBA</i> E PCR-DUPLEX PARA DETECÇÃO DE <i>S. ENTERICA</i> I 4,[5],12:I:-.....	49
3.6.1.	Primers para detecção genes do operon <i>fljBA</i>	49
3.6.2.	PCR-Duplex para identificação de <i>S. enterica</i> I 4,[5],12:i:-.....	50
3.6.3.	Diferenciação da orientação do fragmento <i>H</i>	52
4.	RESULTADOS.....	55
4.1.	OBTENÇÃO DE RECOMBINANTES DE <i>S. ENTERICA</i>	55
4.2.	ANÁLISE DA REVERSÃO POR CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i>	56

4.3.	INDUÇÃO DE FAGOS	60
4.4.	VERIFICAÇÃO DE REVERTENTES DE MUTANTES LT2:CAT EM MODELO MURINO	61
4.5.	IDENTIFICAÇÃO DE <i>S. ENTERICA</i> 4,[5],12:I:- POR PCR	65
4.5.1.	<i>operon fljBA</i>	65
4.5.2.	<i>Duplex PCR</i>	69
4.5.3.	<i>Inversão do fragmento hin em amostras monofásicas</i>	73
5.	DISCUSSÃO	75
6.	CONCLUSÕES	80
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
	<u>ADENDO 1</u>	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Salmonella*: aspectos gerais e patogenicidade

1.1.1. Classificação do gênero

O gênero *Salmonella* é composto por bactérias conhecidas até mesmo por aqueles que não trabalham com Microbiologia. Constantemente associada a infecções alimentares, ela apresenta um espectro patológico amplo, podendo causar desde enterocolites até infecções sistêmicas, dependendo da sorovariedade. É responsável por aproximadamente 15% das gastroenterites agudas ao redor do mundo (1), além de causar cerca de 200.000 mortes por ano por febre tifoide (2).

Pertencente à família Enterobacteriaceae apresenta-se como bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e fermentadores (3). De acordo com a classificação contemporânea, o gênero *Salmonella* contém apenas 2 espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo a última subdividida em 6 subespécies, designadas por nome ou números romanos como mostra a Tabela 1 (1).

Tabela 1. Classificação em subespécie de *Salmonella enterica*

<i>Salmonella enterica</i> subespécie	
I	<i>enterica</i>
II	<i>salamae</i>
IIIa	<i>arizonae</i>
IIIb	<i>diarizonae</i>
IV	<i>houtenae</i>
VI	<i>indica</i>

As sorovariedades são classificadas baseadas no polimorfismo dos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) através de reações de aglutinação com soros específicos, constituindo um esquema de classificação conhecido como Kauffman-White. Este esquema foi apresentado nos anos 80 e ainda é muito utilizado mundialmente (4).

A diferenciação pelas reações de aglutinação é dada pela ampla variação nos antígenos, como mostrado no trabalho de Grimont e Weill (5), na qual foram apresentados

variantes de 64 antígenos O e 114 antígenos H nas amostras identificadas. Uma análise molecular mostra que os genes que codificam as enzimas que sintetizam os açúcares e os organizam nas cadeias polissacarídeas de LPS são agrupados no locus *rfb* (6). Apesar do constituinte lipídico do LPS (lipídeo A) ser altamente conservado em todas as salmonelas, as cadeias polissacarídeas são altamente polimórficas já que a região *rfb* é polimórfica (6), o que permite a variação de antígenos. Já em relação aos antígenos flagelares, Fierer e Guiney (7) mostram uma grande variação na porção central dos genes flagelares (possibilitando a variação de antígenos), enquanto as porções terminais são altamente conservadas.

Essa enorme gama de sorovariedades possibilita diferentes padrões de virulência que variam de acordo com o sorovar bacteriano e o tipo de hospedeiro envolvido (7). Como exemplo, a sorovariedade *S. enterica* Typhi causa em humanos, a febre tifoide, uma infecção sistêmica grave (8), já *S. enterica* Typhimurium e Enteritidis são sorovariedades frequentes em gastroenterites e infecções extra-intestinais. Em suínos e bovinos os principais agentes etiológicos responsáveis por septicemia são respectivamente, *S. enterica* Choleraesuis e *S. enterica* Dublin. Embora essas sorovariedades acometam esses animais, elas também podem causar infecções graves no homem (9).

Comparado com os primeiros dados apresentados no “*Pan American Health Organization*” em 1984, o número de óbitos por febre tifoide reduziu consideravelmente: de 600 mil para 200 mil mortes por ano (10). No entanto, essa redução não é resultado de um programa específico de controle da febre tifoide, mas sim uma consequência do desenvolvimento econômico e da melhoria das condições sanitárias (2). Um desafio para erradicação da febre tifoide é o desenvolvimento e implementação de um diagnóstico rápido, acurado e acessível para áreas em que a doença é endêmica (10).

Nos Estados Unidos estima-se que anualmente sejam notificados 1,4 milhões de infecções, com 500 mortes causadas pelas sorovariedades de *S. enterica* não Typhi (NTS) (11). Na Espanha, em um estudo de 10 anos realizado por Galofre et al. (12) mostram que casos de bacteremia causada por salmonela foi responsável pela mortalidade de 12,2% dos casos de internação.

Durante o período de 1996-2003, em diferentes localizações geográficas de todo o Estado de São Paulo, foram isoladas de humanos, 3554 amostras de *Salmonella*

classificadas em 68 sorovares diferentes. Durante os oito anos de estudo, os sorovares mais encontrados, em ordem de classificação foram Enteritides, Typhimurium, 4,[5],12:i:-, Typhi e Dublin, perfazendo um total de 84.1% de todas as amostras isoladas. Durante os anos de 1996, 1997 e 1999, o sorotipo 4,[5],12:i:- foi o mais isolado em todo o Estado de São Paulo. Este sorotipo é frequentemente isolado em hemoculturas, mostrando sua capacidade de causar infecção sistêmica (13).

S. enterica pode ainda ser dividida conforme a doença é expressa em: salmonela tifoide e salmonela não-tifoide (comumente conhecidas como NTS – “*non-typhoidal salmonella*”). Em países de alta renda as NTS causam forte diarreia, náusea e dores abdominais em indivíduos saudáveis; infecções locais ou sistêmicas são raras. No entanto, na África subsaariana as bactérias mais frequentemente isoladas de sangue de pacientes adultos e crianças são salmonelas não-tifoides, conhecidas como iNTS (“*invasive non-typhoidal salmonella*”), sendo associada a uma fatalidade de 20-25% (14).

As iNTS foram notificadas pela primeira vez em 1987 em uma criança com malária e em 1990 confirmada como doença altamente relacionada com o vírus HIV em pacientes adultos subsaarianos (10). Grande parte dos casos de iNTS são dados pela *S. enterica* Enteritidis e *S. enterica* Typhimurium podendo causar complicações em indivíduos imunodeficientes (14).

Fierer e Guiney (7) apresentam um estudo sobre a diversidade de virulência entre os sorotipos de *S. enterica*, na qual mostram que variações genéticas ou polimórficas são particularmente proeminentes em 2 classes gerais de *loci*: (a) genes que codificam estruturas de superfície como LPS, flagelo e fimbrias; e (b) genes específicos de virulência codificando fatores que modificam a fisiologia da célula hospedeira ou medeiam o escape do sistema imunológico. Tais variações norteiam o estudo da diversidade de virulência entre sorotipos de *S. enterica*.

1.1.2. Processo inflamatório e resposta imune induzidos por *S. enterica*

A resistência contra infecções em vertebrados é dada pelos sistemas e respostas imunes: adquirida e inata. A resposta imune adquirida refere-se ao reconhecimento de epítomos moleculares específicos pelos linfócitos T e B resultando em uma forte resposta contra um alvo específico. Já o sistema inato está envolvido com uma grande variedade de

células no reconhecimento de padrões moleculares, em particular, específicos para os microrganismos (15).

Normalmente, *S. enterica* infecta o hospedeiro pela ingestão de água ou alimentos contaminados sendo posteriormente transportada via gastrointestinal até atingir o íleo. *S. enterica* Typhimurium produz uma variedade de adesinas (fimbrias) que proporcionam a ligação da bactéria às microvilosidades dos enterócitos (células epiteliais do intestino delgado), a fixação das bactérias nas placas de Peyer e a adesão de uma bactéria a outra (16).

O contato entre a bactéria e a superfície apical do epitélio celular intestinal (enterócitos) seguido de invasão e danos ao epitélio induzem um processo inflamatório, associado à indução de respostas de linfócitos T tipo Th1 e também à produção de anticorpos IgA e IgG (17). Estas inflamações agudas são manifestadas pela translocação de neutrófilos migrando através de gradientes de quimiocinas secretadas pelo epitélio e por consequência rompendo a integridade da barreira epitelial resultando em um fluxo transepitelial de íons e água. Estes eventos correlacionam-se clinicamente com diarreia e com a ocorrência de inflamações agudas. Tais infecções se não sanadas podem evoluir para infecções sistêmicas (17).

Grande parte do processo de inflamação induzido por salmonela envolve receptores do tipo Toll (TLR), mais especificamente o TLR5 que se mostra específico para a estrutura flagelar bacteriana, a flagelina, e o TLR4 específico para membrana lipopolissacarídea de bactérias gram-negativas (18). Receptores do tipo Toll pertencem a uma família de proteínas transmembrânicas do tipo I que ativam a via de NF- κ B (Fator Nuclear Kappa B) regulando a expressão de citocinas. Após células que expressam TLR5 serem ativadas pela presença das flagelinas ocorre uma cascata de reações envolvendo a fosforilação do receptor-associado de interleucina-1 levando a ativação de quinases que ativam a produção de proteínas inflamatórias. TLR5 é responsável pela resposta de células epiteliais, células endoteliais, macrófagos, células dendríticas e células T. No caso das células dendríticas e células T, a resposta a flagelinas forma uma importante relação entre o sistema imune inato e o adquirido o que explica a propriedade única das flagelinas de agirem tanto como fatores de patogenicidade como imunogênicos (15).

Na maioria dos sorovares a camada lipopolissacarídica (LPS) age como uma capa protetora em volta da bactéria protegendo-a contra o ambiente. A estrutura da superfície bacteriana não afeta a virulência, mas é peça central para seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (TLR4), resultando em uma pressão seletiva para gerar polimorfismos genéticos que atuam na diversidade antigênica (7).

Determinantes específicos de virulência podem estar unidos em ilhas de patogenicidade localizadas no cromossomo ou em elementos genéticos móveis como plasmídeos ou fagos (7). Desta forma, a intensidade da resposta inflamatória assim como a virulência bacteriana são fatores de ampla variação entre os sorovares de *S. enterica*.

1.2. Flagelo e flagelinas

1.2.1. Formação do flagelo

O flagelo é uma estrutura fibrilar oca composta por proteínas chamadas flagelinas. Tem como principal função a locomoção, que é dada por um “motor rotativo” localizado na membrana interna onde o flagelo tem a sua origem. Em *Escherichia coli* e *S. enterica*, a estrutura do “motor” do flagelo chamado de base flagelar cruza ambas as membranas citoplasmática e externa e continua como uma estrutura extracelular chamada de base e filamento.

O processo de formação começa com a estruturação de um anel proteico composto por FliF na membrana citoplasmática (19). Um aparato de exportação parece ser integrado ao anel de FliF, por onde são exportadas seletivamente uma gama de proteínas flagelares, usando a energia da hidrólise do ATP e formando uma estrutura de crescimento flagelar (20). As unidades de flagelina passam através do canal e caminha ao longo do filamento flagelar em direção a porção final distal sendo organizadas pelo complexo FliD (proteína associada a base do filamento flagelar) (20). O filamento flagelar mede cerca de 200Å de diâmetro, mas chega a crescer até 15 mm em comprimento por polimerização de mais de 30.000 subunidades de flagelina (21). O canal central através do qual as subunidades de flagelina são transportadas é de apenas 30 Å (20). A capa mantém-se aderida ao terminal distal do flagelo à medida que este cresce, prevenindo que a flagelina extravase por esta terminação (17). Para a inserção das subunidades de flagelina, a capa é movida por etapas para permitir a inserção do próximo monômero de flagelina (22).

1.2.2. Variação de fase flagelar

S. enterica apresenta uma característica única entre as bactérias entéricas, pois é capaz de expressar dois tipos diferentes de flagelinas (fase 1 e fase 2). Tipicamente, ela coordena seu mecanismo de expressão para que uma flagelina seja expressa de cada vez. Tal mecanismo é chamado de variação de fase flagelar (23). Como já foi apresentada, a flagelina tem papel importante na resposta inflamatória, logo a capacidade de expressar tipos diferentes de flagelina parece agir como uma forma de escape ao sistema imune do hospedeiro.

O processo de formação das flagelinas de *S. enterica* é dado por dois genes estruturais não-alelicos, *fliC* e *fljB*, responsáveis pela formação e expressão dos dois antígenos flagelares. Células que expressam *fliC* são chamadas de fase flagelar 1, e as que expressam *fljB*, de fase flagelar 2 (22).

Proteínas que compõem as flagelinas FliC e FljB são idênticas nos 71 aminoácidos iniciais e nos 46 finais, mas apresentam divergência na região central, resultando em respostas antigênicas distintas (24). A variação de fase flagelar é controlado pela inversão recorrente de um segmento de DNA de 996 pb, chamado de segmento H, o qual contém o promotor para os genes *fljB* e *fljA* (23). O segmento H é flanqueado por sequências invertidas repetidas de 26 bp, *hixL* e *hixR*, entre as quais a recombinação sitio específica ocorre, levando a inversão do segmento H. Essa recombinação é mediada pela DNA invertase, cujo gene *hin* está localizado dentro do segmento H (25). O gene *fljB* constitui um operon junto com *fljA*, o qual codifica um regulador negativo para expressão de *fliC*. O gene *fljA* inibe a expressão de *fliC* por um mecanismo de controle pós-transcricional (24). Quando o segmento H está orientado na posição “on”, ambos os genes *fljB* e *fljA* são transcritos, resultando na síntese da flagelina de fase 2 (26). Em contrapartida, quando o segmento H encontra-se na posição “off”, os genes *fljB* e *fljA* não são expressos e o inibidor não é produzido, permitindo assim, a expressão de *fliC* e o antígeno flagelar de fase 1 é produzido (26). A frequência da variação de fase reflete diretamente na inversão do segmento H. *S. enterica* alterna a expressão dessas proteínas em uma razão de 10^{-3} a 10^{-5} por geração (23). A Figura 1 ilustra o mecanismo de variação de fase flagelar.

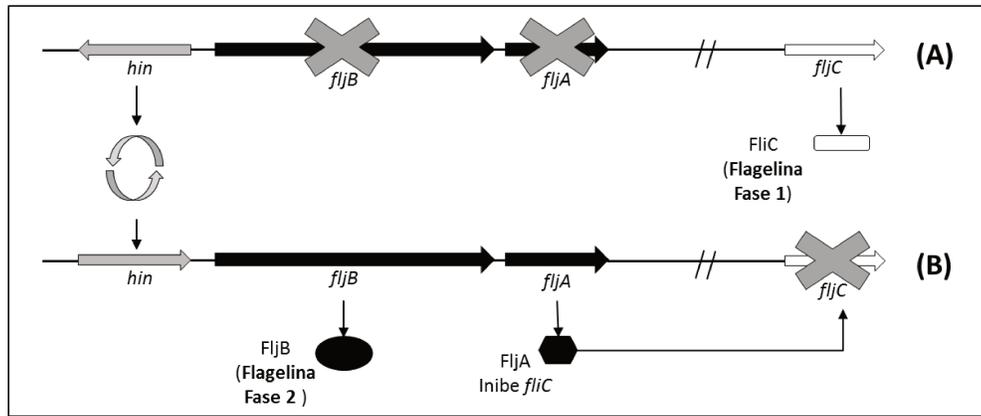


Figura 1. Ilustração do mecanismo de variação de fase flagelar dado pela inversão do fragmento H mediada pela invertase codificada pelo gene *hin*. (A) Posição “off” de *hin* na qual *fljB* e *fljA* não são transcritos permitindo a expressão de *fliC* e a produção da flagelina de fase 1. (B) Posição “on” de *hin* em que *fljB* e *fljA* são transcritos produzindo um regulador negativo de expressão de *fliC* por *fljA* e a flagelina de fase 2 por *fljB*.

O mecanismo molecular da inversão mediada por *hin* do segmento H tem sido amplamente estudado tanto *in vivo* quanto *in vitro* (25, 22). Além da proteína Hin e os 2 sítios *hix* é necessário um terceiro sítio (o qual contém 65 pares de bases) que é reconhecido pela proteína denominada Fis (*Factor for Inversion Stimulation*), para que haja uma recombinação eficiente (25). Esse sítio potencializador (*enhancer*) somado aos dois sítios de recombinação *hix* permitem a formação de um complexo nucleoproteico chamado invertosoma. Fis ativa *hin* para catalisar a quebra do DNA seguida pela recombinação entre os dois sítios *hix*.

O segmento H não é único na variação de fase flagelar. Desde sua descoberta em 1961, acreditava-se que *hin* era a única DNA invertase responsável pela variação de fase flagelar em LT2 (uma linhagem tipo difásica de *Typhimurium*). No entanto, Kutsukake *et al.* (22) provaram que esta sorovariedade contém gene que codifica outra DNA invertase, o *fin*. O gene *fin* está localizado ao lado de um segmento de DNA invertido, denominado segmento F, a cerca de 34,5 Kb de distância do operon *fljBA* e apresenta alta similaridade com *hin*. Ainda neste estudo, os autores construíram mutantes sem a presença de *hin* e *fin* e examinaram a habilidade de variação de fase. Eles descobriram que as culturas que possuíam qualquer uma das mutações podiam manifestar a variação de fase, enquanto

culturas possuindo ambas as mutações não podiam. Tal resultado indica claramente que ambas DNA invertases estão envolvidas na variação de fase flagelar.

A inversão de segmentos de DNA não ocorre apenas para a variação de fase flagelar. Os bacteriófagos Mu e P1, por exemplo, contem segmentos G e C, respectivamente, os quais regulam a expressão entre dois conjuntos de genes, alterando a especificidade do hospedeiro (27). Essas invertases compartilham sequencias homologas com cada uma e com a invertase Hin. Junto a essas homologias, a DNA invertase mostrou-se variável entre os três sistemas de inversão. Tal fato sugere que esses sistemas evoluíram de um ancestral comum (22).

1.3. *S. enterica* I 4,5,12:i:-

Mesmo parecendo vantajoso possuir a capacidade de expressar dois tipos de flagelina, amostras atípicas monofásicas (que expressam apenas um tipo de flagelina), denominadas *S. enterica* I 4,5,12:i:-, apresentam uma alta incidência em casos de salmonelose pelo mundo (1).

A nomenclatura da *S. enterica* sorotipo 4,5,12:i:- só foi oficialmente estabelecida em 2002, pelo “*National Salmonella Surveillance System*”, na qual foi adotado o esquema sorológico de identificação Kauffman-White (KW) (1).

Desde os anos 70, amostras atípicas de *S. enterica* monofásicas são isoladas no Estado de São Paulo (28, 29), além de também haver relatos de amostras monofásicas em outros países como Tailândia (30), Espanha (31, 32), Estados Unidos (33, 34) e Luxemburgo (35), sendo atualmente considerado um sorotipo emergente (36). Estas amostras expressam a flagelina de fase I, mas são incapazes de expressar o antígeno flagelar de fase II.

Dados dos Estados Unidos revelam que em 2002, o sorotipo 4,5,12:i:- representava o 18º sorotipo mais comum, passando para o 7º em 2004 (1). De acordo com Echeita *et al.* (32) a sorovariedade 4,5,12:i pode ter sido originada de *S. enterica* Typhimurium (sorovar 4,5,12:i:1,2) ou sorovar Lagos (4,5,12:i:1,5), na qual perderam o mecanismo de troca, com a deleção de genes flagelares como *fljB*, ou ainda, perderam a capacidade de expressar esses genes. Pela constituição sorológica, o sorotipo 4,5,12:i:-

pode estar relacionado aos sorovares Lagos 4,5,12:i:1,5, Agama 4,5,12:i:1,6, Farsta 4,12:i:e,n,x, Tsvie 4,12:i:e,n,z₁₅, Cloucester 1,5,12,27:i:l,w e Tumodi 1,4,5,12:i:z₆ (34).

Echeita *et al.* (32) mostraram que uma sequência específica de *S. enterica* Typhimurium, pertencente aos fagotipos DT104 e DT302, e uma sequência de inserção específica (IS200), localizada entre os genes *fliA* e *fliB*, também específica de Typhimurium, estavam presentes em amostra monofásicas 4,5,12:i:-, corroborando com a hipótese do surgimento deste sorovar de Typhimurium.

Segundo Soyer *et al.* (34), análises filogenéticas e de MLST (*Multilocus sequencing typing*) suportam a hipótese de que *S. enterica* 4,5,12:i:- e Typhimurium são geneticamente próximas pelo fato de que todas as amostras dessas duas soroviedades formarem uma única ramificação com forte relação filogenética.

Através de técnicas de microarranjo DNA-DNA, Garaizar *et al.* (37) analisaram 4 linhagens de *S. enterica* monofásicas isoladas na Espanha, e compararam com *S. enterica* Typhimurium LT2. As variedades monofásicas apresentaram diferenças significativas em 5 agrupamentos de genes (*clusters*): *Cluster 1*, deleção ou ausência de 13 genes, sendo parte deles responsáveis pela regulação da assimilação de alantoina como fonte de nitrogênio por via anaeróbica; *Cluster 2*, ausência do profago Fels-1 e dois genes adjacentes; *Cluster 3*, definido como um pequeno grupo de genes relacionados ao profago Gifsy-1 também ausentes nas variedades monofásicas; *Cluster 4*, deleção completa do profago Fels-2 e, finalmente, *Cluster 5* com a deleção de 16 genes incluindo o *operon fljBA* (*fljA*, *fljB* e *hin*). Além desses *clusters*, o gene STM2773 localizado ao lado do *operon* flagelar de fase-2 e o gene codificador de glicosil transferase relacionado a UDP-glicoronosiltransferase (*iroB*) também estavam deletados.

Baseado em resultados obtidos por PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*), MLVA (*Multiple Loci VNTR Analysis*), PCR e sequenciamento, Laorden *et al.* (38) mostraram que as variantes monofásicas espanholas mantiveram uma homogeneidade durante os anos. No entanto, esse padrão de deleção parece não ser homogêneo para todas as variedades de *S. enterica* 4,5,12:i:-. Análises de amostras espanholas e americanas sugerem que as variantes monofásicas representam clones múltiplos com distribuição geográfica distintas e que emergiram através de deleções independentes (38). Soyer *et al.* (34) através de análises por PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*) mostraram que

amostras espanholas monofásicas apresentaram um padrão diferente das amostras americanas. Através de análises por BLAST do genoma de CVM23701 (amostra americana monofásica) comparando com 4 linhagens espanholas, esses autores avaliaram os padrões de deleção, mostrando que os *cluster 1* e o *cluster 3*, ausentes nas amostras espanholas estavam presentes nas americanas. Além dos genes *hin* e *iroB* também presentes nas amostras americanas. A sequencia genômica de CVM23701 ainda mostra uma região de aproximadamente 7 kb inserida na região de deleção do operon *fljBA* (*cluster 5*). Essa inserção inclui sequencias de genes com similaridade ao genoma de Fels-2 (STM2704 e STM2706) e três genes homólogos a genes do profago Gifsy-2 e um componente da DNA polimerase V (*umuC*). Essa inserção não está presente no genoma de *S. enterica* LT2. A presença dessa região sugere que a deleção em amostras americanas podem ter sido causada pela excisão imprecisa de um profago, fato que explicaria o surgimento do clone americano de *S. enterica* I 4,5,12:i:-.

1.4. Métodos de Identificação de *S. enterica*.

1.4.1. Principais métodos de identificação disponíveis

Apesar do método oficial de identificação do gênero *Salmonella* ser o sorológico conhecido como esquema de Kauffman-White (KW), há muitos estudos sobre novas formas de identificação do gênero, principalmente ligado a métodos moleculares.

O método sorológico KW surgiu das técnicas disponíveis na época de seu desenvolvimento, a mais de 80 anos atrás e há certas desvantagens que justificam o uso de métodos complementares, como: não possibilita o estudo de relações filogenéticas, não garante uma identificação acurada (falso-positivo pode ocorrer por aglutinação não específica) e necessita de mais de 150 soros específicos para conclusão do ensaio, demandando tempo e pessoal altamente treinado (4).

Nos anos 90 o método de eletroforese em campo-pulsado foi apresentado para tipagem de *Salmonella*, tornando-se rapidamente popular e sendo considerado atualmente o método ouro (“*gold-standard*”) para subtipagem molecular (39). Esta técnica é usualmente empregada em surtos e é relativamente barata. No entanto, demanda tempo e não exibe uma sensibilidade igual dentro das diferentes sorovariedade (40)

Muitos outros métodos também foram e estão sendo avaliados podendo citar como exemplos:

- ✓ **Serotipagem molecular:** através da amplificação de DNA por técnicas como PCR (“*Polimerase Chain Reaction*”) de regiões específicas presentes em alguns sorotipos e ausentes em outras, é possível fazer uma inferência da classificação clássica pela molecular (29, 41);
- ✓ **MLST** (“*Multilocus Sequencing Typing*”): utiliza-se de um grupo de genes conhecidos como “*housekeeping*” ou genes constitutivos, que operam as funções vitais da célula, na qual a identificação é possível pela diferença alélica entre os sorotipos (42, 43).
- ✓ **Tipagem por SNP** (“*Single Nucleotide Polymorphism*”): utilizando sequências polimórficas (pela comparação de sequências entre sorovares) ou ainda, por HPLC (“*High Performance Liquid Chromatography*”) é possível identificar SNPs críticos podendo ser usados para diferenciar os sorovares (44);
- ✓ **Tipagem por microarranjo:** utilizando sondas de oligonucleotídeos organizadas em microarranjos (membranas de alta densidade) é possível avaliar um grande número de genes ao mesmo tempo e, conseqüentemente, as especificidades de cada sorovar como mostra o trabalho realizado por Malorny et al. (45).

1.4.2. *Serotipagem molecular para diferenciação de S. enterica I 4,5,12:i:-*

Dentro dos métodos citados, a tipagem molecular se mostra como alternativa promissora nos sistemas de identificação devida sua rapidez, custo relativamente baixo e fácil manuseio. Esta técnica teve um enorme ganho após o sequenciamento genômico de diversos sorotipos de *S. enterica*. Utilizando-se os genes que codificam os antígenos flagelares H foi possível amplificar sequências desses genes através de reações de PCR-Multiplex, como mostra o trabalho de Echeita *et al.* (31, 32) na qual por um PCR-Triplex conseguiram distinguir os segmentos referentes aos antígenos de fase flagelar 1 e 2 sendo possível diferenciar *S. enterica* sorotipo I 4,5,12:i:- das sorovariedades *S. enterica* Enteritidis e *S. enterica* Typhimurium.

Kim et al. (46) desenvolveram um PCR-Multiplex baseado na amplificação de 12 *loci* gênicos presentes em sorotipos específicos e ausentes em outros. Dessa forma as regiões utilizadas em seu trabalho são derivadas de sequências genômicas completas e não apenas nos genes referentes a sorotipagem pelos antígenos O e H, fato que garantiu uma maior reprodutibilidade entre laboratórios.

O grupo de Garaizar et al. (37) desenvolveu um PCR-Multiplex baseado na análise genômica de quatro cepas monofásicas por hibridização em microarranjo DNA-DNA usando cerca de 4600 regiões codificadoras (CDS) do genoma da *S. enterica* Typhimurium LT2, sendo possível avaliar as regiões de deleção e amplificação.

No estado de São Paulo, Tavechio et al. (29) analisou 517 amostras de *Salmonella*, identificadas previamente pelo método sorológico KW como monofásicas, utilizando a técnica PCR-Multiplex. O estudo mostrou que 28,6 % das amostras testadas não são cepas monofásicas, mas sim *S. enterica* Typhimurium, indicando que a baixa expressão do antígeno de fase 2 pode levar a conclusões errôneas de identificação.

Recentemente, Achtman et al. (47) sugeriram a substituição da sorotipagem por MLST dado que a técnica permite um melhor reconhecimento de grupos evolutivos, pois a sorotipagem pode refletir uma relação genética nem sempre verdadeira. Por exemplo, genes que codificam epítomos antigênicos podem ser importados por troca gênica horizontal e recombinação homóloga de outras linhagens. Como resultado, sorovariedades geneticamente relacionadas como Heidelberg e Typhimurium possuem alelos para o gene *fliC* muito diferentes enquanto sorovariedades diferentes podem possuir alelos quase idênticos. Dessa forma, substituindo-se a determinação sorológica por técnicas moleculares como o MLST seria possível uma melhor avaliação das relações genéticas (47).

Em geral, os estudos acima se mostram como técnicas promissoras para complementação das metodologias correntes para identificação de *S. enterica*, mas há certas desvantagens que impossibilitam sua total substituição ao sistema clássico: a identificação molecular não cobre todos os sorotipos em uma mesma reação; percebe-se uma dificuldade na reprodutibilidade dos resultados entre laboratórios, especialmente para identificação de amostras monofásicas e há diferenças intrínsecas quanto ao conceito de aglutinação de antígenos e o uso de genes específicos em reação de PCR (4).

No caso da identificação de *S. enterica* monofásica, diferenças no padrão de deleção dos genes do *operon* FljBA e genes próximos a ele dificultam a padronização de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sendo necessário o uso específico desses *primers* para cada tipo de região.

1.5. Sistema λ red

A recombinação de genes específicos é uma ferramenta importante na biologia molecular, podendo ser usado para estudos funcionais, melhoramento genético, criação de vacinas recombinantes, estudos de patogenicidade, entre outros. Há diversos sistemas de recombinação como a recombinação por transposição, o uso de plasmídeos suicidas e o sistema λ red (utilizado neste trabalho).

No caso das bactérias, a grande maioria possui um sistema protetor eficiente de exonucleases que degradam fitas simples de DNA, fato que dificulta a inserção de genes de interesse e, conseqüentemente, a recombinação.

Utilizando-se da via lisogênica do bacteriófago λ e o fato deles apresentarem um mecanismo próprio de recombinação, o sistema λ red foi desenvolvido através da inserção de genes do bacteriófago em plasmídeos bacterianos, chamados pKD20 e pKD46 (Figura 2), com o objetivo de driblar a ação da exonuclease e promover a recombinação de genes no genoma bacteriano. Os genes inseridos nesses plasmídeos foram γ , β e *exo*, responsáveis pela viabilidade da recombinação na bactéria. Estes genes produzem os produtos: Gam, Bet e Exo, respectivamente. Gam inibe a ação de exonuclease bacteriano fazendo com que Bet e Exo tenham acesso ao DNA. Exo é uma exonuclease 5'-3' que degrada o terminal 5' de fragmentos lineares de DNA e Bet é proteína que se liga a moléculas fita simples de DNA promovendo o anelamento de DNA complementar (48).

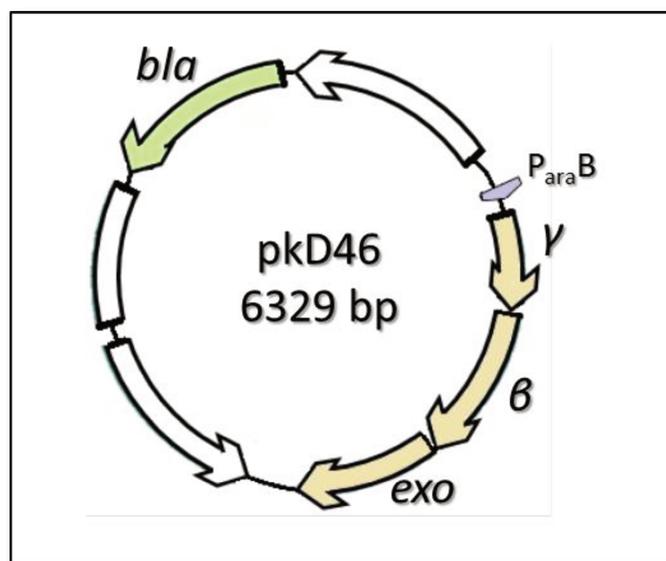


Figura 2. Ilustração do plasmídeo de expressão de recombinases pKD 46. Destaque dos gene γ , β e *exo* originados do fago λ e utilizados para a recombinação homóloga de fragmentos lineares. Os genes γ , β e *exo* estão sob controle transcricional de P_{araB} . A inserção do plasmídeo pKD46 é confirmada pela aquisição de resistência a Ampicilina, proporcionada pela expressão do gene *bla* (β -lactamase)

Duas características importantes desses plasmídeos (pKD20 e pKD46) são: a presença de um gene de resistência ao antibiótico Ampicilina *bla* e apresentar replicação termosensível. O primeiro é essencial para seleção das bactérias contendo o plasmídeo e o segundo facilita sua eliminação após a recombinação. Os genes γ , β e *exo* estão sob controle transcricional de P_{araB} , na qual necessita do açúcar L-arabinose para sua ativação.

Desta forma, o primeiro passo para o início da recombinação é a inserção do plasmídeo pKD46 ou pKD20 na bactéria selvagem, crescida em meio de cultura contendo L-arabinose.

O passo seguinte consiste na obtenção de um cassete de resistência contendo um marcador (no caso, um gene de resistência a antibiótico) e as regiões de homologia ao gene de interesse. Os genes de resistência são obtidos pela reação de PCR utilizando os plasmídeos complementares pKD3, pKD4 ou pKD13 como molde, na qual possuem genes de resistência a cloranfenicol (*cat*) e canamicina (*kan*). Neste trabalho, utilizou-se o plasmídeo pKD3, na qual o gene *cat* expressa a proteína cloranfenicol acetil transferase,

que transfere grupos acetil ao cloranfenicol, impedindo sua ligação ao ribossomo e consequente interferência no processo de tradução.

Os primers utilizados para amplificação desses genes devem conter as regiões H1 e H2 (“*homology extensions*”), ou seja, as regiões de homologia ao gene de interesse, além das regiões P1 e P2 denominadas “*priming sites*”, na qual se ligarão ao gene de resistência. O gene de resistência poderá ser eliminado posteriormente pela expressão da recombinase FLP (*Flippase*) pelas regiões FRT (*Flippase Recognition Target*) que são amplificadas juntamente com o gene de resistência (Figura 3).

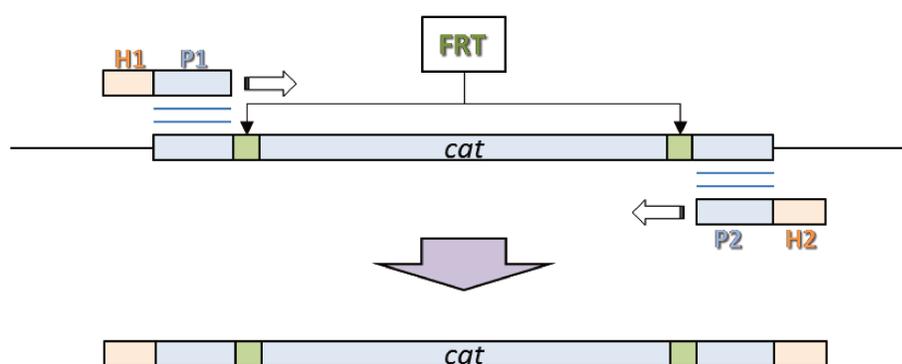


Figura 3. Ilustração da reação de PCR com os *primers* anelando-se ao gene de resistência a cloranfenicol (*cat*) obtendo-se o cassete de resistência flanqueado pelas regiões de homologia ao gene de interesse. Destaque das regiões P1 / P2 e H1 / H2. Detalhe das sequências FRT presentes nas regiões laterais ao gene de resistência.

Após a formação do cassete de resistência, o produto de PCR deve ser tratado com DpnI, enzima isolada do microrganismo *Diplococcus pneumoniae*. Ela cliva a sequência GA↓TC (representada pela seta para baixo), mas apenas quando a adenina está metilada. Como o produto de PCR não sofre metilação é possível mantê-lo intacto, digerindo apenas sequências metiladas. Este passo é importante para evitar o anelamento de fragmentos inespecíficos. No exemplo das ilustrações, o plasmídeo pKD3 utilizado na reação de PCR tem risco diminuído de ser inserido na bactéria (como é o caso de pKD46) pois ele é um plasmídeo suicida, ou seja, ele precisa de genes específicos para sua expressão, caso contrário, ele é eliminado.

Dessa forma, o cassete de resistência é inserido na bactéria por eletroporação permitindo a recombinação (Figura 4).

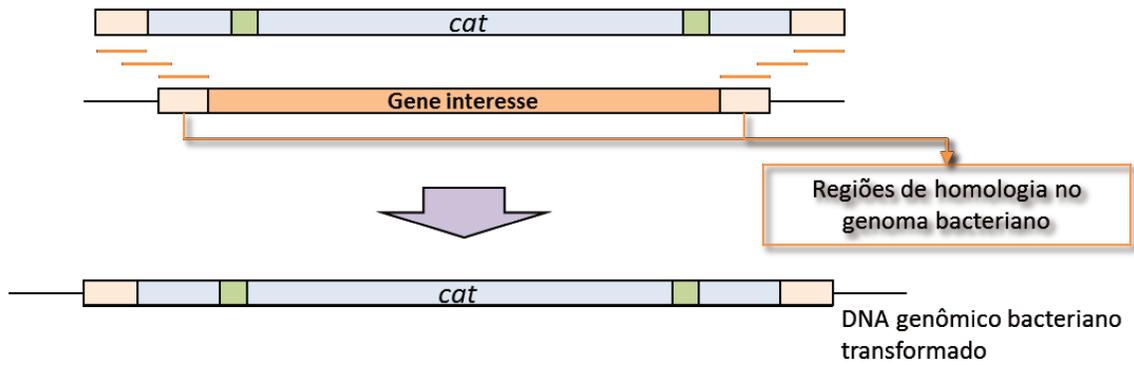


Figura 4. Ilustração da fase de recombinação do cassete de resistência ao genoma bacteriano.

As células que sofreram recombinação podem assim ser selecionadas utilizando-se meio de cultura contendo o antibiótico específico, no caso do pKD3 o Cloranfenicol.

Se a intenção é a eliminação do gene de resistência, utiliza-se o plasmídeo pCP20, na qual expressa o gene *flp* responsável pela expressão da recombinase FLP. Esta recombinase se liga aos segmentos FRT eliminando o gene de resistência, formando uma “cicatriz” (Figura 5).

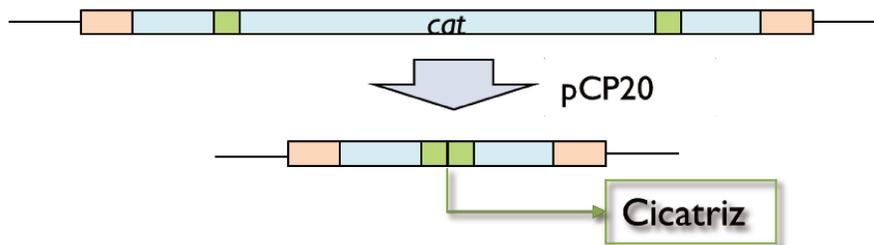


Figura 5. Formação da cicatriz pela ação da recombinase FLP.

Dessa forma, tendo exposta a introdução acima, o entendimento da origem da *S. enterica* I,4,[5],12:i:- e o estudo molecular entre as suas variedades são essenciais para um melhor manejo da doença, seja no diagnóstico de pacientes, como no abastecimento de dados da Vigilância Epidemiológica.

Com os dados desse estudo molecular é possível criar alternativas aos métodos tradicionais de identificação, na qual se apresentam laboriosos e em muitos casos com resultados duvidosos. Técnicas moleculares tem se mostrado como uma alternativa rápida, precisa e de custo relativamente baixo para diagnóstico de doenças.

2. OBJETIVOS

Verificar a estabilidade da região genômica envolvendo o *operon fljBA*, reforçando ou refutando a hipótese de que esta região de *S. enterica* Typhimurium é instável (sujeita a deleções), o que explicaria a origem de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- em eventos independentes ao longo do processo evolutivo dessa bactéria;

Verificar a funcionalidade da recombinase *hin* e da inversão do fragmento H em amostras *S. enterica* I 4,[5],12:i:-;

Desenvolver um PCR-Duplex para a identificação rápida de isolados de *S. enterica* sorotipo 4,[5],12:i:- pertencentes ao clone americano (U.S.).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas

As amostras de *S. enterica* I 4,5,12:i:- utilizadas no presente trabalho foram isoladas no período de 1998 a 2001, de diferentes pacientes atendidos no setor de Emergência do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). As amostras variam de isolados de hemoculturas e coproculturas, sendo 19 amostras referentes a *S. enterica* I 4,5,12:i:- (como mostra a Tabela 2) e 3 amostras referentes a *S. enterica* Typhimurium (666STm, 662STm e 616STm). Além desses isolados clínicos foram utilizadas linhagens ATCCs (*American Type Culture Collection*) (Tabela 2) e a linhagem LT2, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Roy Curtiss III (Universidade do Estado do Arizona, Arizona, USA).

Oito amostras identificadas como *S. enterica* I 4,5,12:i:- isoladas do laboratório AVIPA (Laboratório de Avicultura e Patologia), gentilmente cedidas pela pesquisadora Dra. Fernanda Flores também foram utilizadas. As amostras são isolados obtidos de granja e identificados sorologicamente como *S. enterica* I 4,5,12:i:-. Estas amostras foram utilizadas para testar os *primers* desenhados para este trabalho.

Também foram selecionadas quatorze amostras de diversas sorovariedades de *S. enterica*.

Tabela 2. Relação de amostras de *S. enterica* monofásicas isoladas do setor de Emergência do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e do laboratório AVIPA (Laboratório de Avicultura e Patologia).

Relação de amostras <i>S. enterica</i> sorotipo I 4,5,12:i:- (STi)	Origem
607STi	Coprocultura
5697STi	Coprocultura
6175STi	Coprocultura
6234STi	Coprocultura
683STi	Coprocultura
385STi	Esgoto
386STi	Esgoto
699STi	--
635STi	Hemocultura
6195STi	Coprocultura
686STi	Hemocultura
633STi	Coprocultura
691STi	Hemocultura
6190STi	Coprocultura
5729STi	Coprocultura
6197STi	Coprocultura
624STi	Hemocultura
927STi	Hemocultura
6229STi	Coprocultura
914-1C	Ceco de galinha - AVIPA
914-4C	Ceco de galinha – AVIPA
914-3C	Ceco de galinha – AVIPA
914-10	Granja – AVIPA
914-30	Granja – AVIPA
914-20	Granja – AVIPA
914-40	Granja – AVIPA
914-2C	Ceco de galinha - AVIPA
<i>S. enterica</i> Schwarzengrund	--
<i>S. enterica</i> Heidelberg	--
<i>S. enterica</i> Anatum	--
<i>S. enterica</i> Newport	--
<i>S. enterica</i> Albany	--
<i>S. enterica</i> Infantis	--
<i>S. enterica</i> Lagos	(Pasteur Institute, Paris, França) ¹
<i>S. enterica</i> Typhi	ATCC10749
<i>S. enterica</i> Enteritidis	ATCC13076
<i>S. enterica</i> Typhimurium	ATCC13311
<i>S. enterica</i> Newport	02/05 – AVIPA
<i>S. enterica</i> Newport	152/05 – AVIPA
<i>S. enterica</i> Newport	429/05 – AVIPA
<i>S. enterica</i> Newport	19/06 – AVIPA

Legenda:

¹ Gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Michel Y. Popoff - Pasteur Institute, Paris, França.

3.2. Meios de Cultura e Soluções Tampão

Os meios de cultura utilizados foram LB, LB Agar (49), MacConkey (Oxoid® do Brasil Ltda, São Paulo, SP), SS (Difco™®, BD), SOC (Sambrook e Russel, 2001) e Mint-Green.

Para a seleção de linhagens recombinantes resistentes a antibióticos foi utilizado meio de cultura acrescido de ampicilina ou cloranfenicol, nas concentrações finais de 100 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente.

Solução fisiológica (0,85% NaCl) e solução tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS) também foram utilizadas.

A formulação dos meios e soluções encontram-se no Adendo 1.

3.3. Construção das linhagens recombinantes

3.3.1. Obtenção dos plasmídeos do sistema λ Red

Os plasmídeos pKD3 e pKD46 utilizados foram extraídos com kit “Illustra Plasmid Prep Minispin” (GE Healthcare) a partir de culturas de *Escherichia coli* contendo os plasmídeos.

3.3.2. Construção do cassete de resistência

Para a formação do cassete de resistência ao cloranfenicol, desenhou-se *primers* contendo regiões homólogas ao plasmídeos pKD3 e a região intergênica dos genes STM 2769 e *fljA*. Foi também desenhado um par de *primers* de detecção para a mesma região, utilizados posteriormente para confirmação de recombinantes (Tabela 3). Para desenhar os *primers*, as sequências do projeto genoma de *S. enterica* Typhimurium LT2 (NC_003197.1) (Washington University, St. Louis, USA) e do plasmídeo pKD3 (AY048742) foram acessadas a partir do banco de dados NCBI (“National Center for Biotechnology Information”).

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para amplificação do gene *cat* usando pKD3 como molde e detecção deste mesmo gene após integração no genoma de *S. enterica*.

Primers	Sequência
STM_FljA_F	5'-GCAAATTGAGAACTTCAGCAAATCGACAAACCAGTTCGAAAGTGAGTTGGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'
STM_FljA_R	5'-TACCAGGCCTTTTATGAAGGCTCAAATTTGGCTCAATGGGTACGCCAACGATGGGAATTAGCCATGGTCC-3'
STM_FljA_10nF	5'-GGGGTACTAACACGACCAA-3'
STM_FljA_10nR	5'-CGGAACAGTCCAGGAAAGAG-3'

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se kit “*One Taq Polymerase*” (LCG Biotechnology), nas concentrações descritas na Tabela 4, seguindo a seguinte programação no termociclador (Veriti® - Applied Biosystem): aquecimento inicial a 94° C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 65° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto. A extensão final foi concluída a 72° C por 4 minutos.

Tabela 4. Quantidade de reagentes utilizados para amplificação do cassete de resistência ao cloranfenicol com os *primers* STM_FljA e utilizando o plasmídeo pKD3 como molde.

	Proporção para 40 µL	Concentração Final
Água	30,0 µL	-
Buffer (10X)	4,0 µL	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1,6 µL	2 mM
dNTP (10 mM)	1,0 µL	0,2 mM
Primer 1 (10 pcmol)	1,0 µL	0,25 pcmol/µL
Primer 2(10 pcmol)	1,0 µL	0,25 pcmol/µL
Taq (5U/µL)	0,4 µL	5U/ µL
DNA (pKD3) (10-16 ng/ µL)	1,0 µL	0,25-0,4 ng/µL

3.3.3. Inserção do cassete de resistência no genoma de *S. enterica*

Cerca de 30 µL do produto de PCR (20 a 25 ng/µL) obtido foi digerido com DpnI (Fermentas®) e incubado em estufa bacteriológica (Fanem) 37° C por 1 hora e meia. Após a digestão, o mesmo produto foi colocado sobre membrana de celulose para diálise (Millipore, 0,025 µm – 25 mm de diâmetro) posta na superfície de água (grau Milli-Q) para diálise. Para isso, cerca de 20 mL de água deionizada foram colocados em uma placa de

Petri e a membrana colocada cuidadosamente sobre a água. A suspensão de DNA foi pipetada cuidadosamente sobre a membrana que foi deixada em repouso por aproximadamente 30 minutos. Após este procedimento, a solução de DNA foi recuperada e armazenada (-20°C) para ser utilizado na eletroporação de células competentes.

As culturas de *S. enterica* utilizadas nesta etapa foram: *S. enterica* sorovar Typhimurium 662STm e a ATCC 14028. As culturas foram isoladas em meio LB ágar e confirmadas fenotipicamente após crescimento em meios MacConkey Agar e SS.

As culturas acima foram crescidas por 24 horas a 37° C em 5 mL de meio LB líquido (pré-inoculo). Após este período de incubação, 0,5 mL do pré-inoculo foi transferido para 50 mL de LB líquido e esta nova cultura crescida sob agitação (150 rpm) por aproximadamente 3 horas até atingir DO igual a 0,6 (λ 600 nm). As culturas foram resfriadas em gelo e submetidas à centrifugação por 10 minutos, 5000g e 4°C (Rotor F-34-6-38, Centrifuga 5804R Eppendorf®). O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram ressuspensas pela adição de 50 mL de água MilliQ esterilizada. Essa etapa foi repetida mais 2 vezes, sendo a segunda vez utilizando 25 mL de água e glicerol (10%) esterilizada e a última vez utilizando 10 mL da mesma solução. Após a última centrifugação, o sedimento de células foi resuspendido em 250 μ L de água e glicerol (10%) esterilizada e distribuído em alíquotas de 40 μ L em tubos cônicos de 1 mL.

O plasmídeo pKD46 extraído foi adicionado a alíquota de 40 μ L de suspensão de células e submetida a eletroporação sendo o eletroporador (Gene Pulser Xcell™) ajustado para 1,8 kV, 25 mF e 200 W, utilizando cubetas de 0,1 cm (Bio-Rad, Hercules, USA). Após eletroporação, foram rapidamente adicionados 1 mL de meio SOC (pré-aquecido a 30° C) e a alíquota retornada para o microtubo, sendo posteriormente incubado a 30° C por 1 hora. Transcorrida a incubação, a cultura foi plaqueada por espalhamento em superfície de meio LB ágar acrescido de Ampicilina 100 μ g/mL e incubadas a 30° C por 24 horas. As colônias obtidas foram novamente confirmadas fenotipicamente em meio MacConkey Ágar e SS, ambos acrescidos com 100 μ g/mL de Ampicilina.

Após esta etapa de inserção do plasmídeo foi novamente realizado o procedimento de obtenção de células competentes descrito acima, utilizando a cultura agora contendo o plasmídeo pKD46, e com a diferença do pré-inoculo crescido a 30° C e o meio contendo

Arabinose a 2 mM para ativação dos genes de recombinação do plasmídeo pDK46 (γ , β e *exo*).

A mesma etapa de eletroporação descrita previamente foi realizada com as culturas obtidas utilizando o produto de PCR obtido (cassete de resistência ao cloranfenicol digerido e dialisado). As culturas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 25 μ g/mL de cloranfenicol, selecionando dessa forma as colônias que tiveram a recombinação específica efetiva. As culturas foram confirmadas fenotipicamente em meio MacConkey Ágar e SS, ambos acrescidos com 25 μ g/mL de Cloranfenicol.

O plasmídeo pKD46 foi eliminado crescendo a cultura em 37°C por 24 horas e plaqueadas em LB agar. As colônias isoladas foram transferidas para meio LB e LB acrescido de Ampicilina. As colônias que apresentaram sensíveis ao antibiótico foram transferidas para meio novo para dar sequência as outras etapas de recombinação. A reversão da sensibilidade indica que houve a eliminação do plasmídeo.

Desta forma, foram obtidas as linhagens denominadas 662STm:*cat* e 14028:*cat*, que contêm a inserção do gene *cat* entre os genes *fljA* e STM2769.

As culturas obtidas foram estocadas em glicerol (20%) e armazenadas em ultra-freezer a -80° C. A região alvo para a recombinação é mostrada na Figura 6.

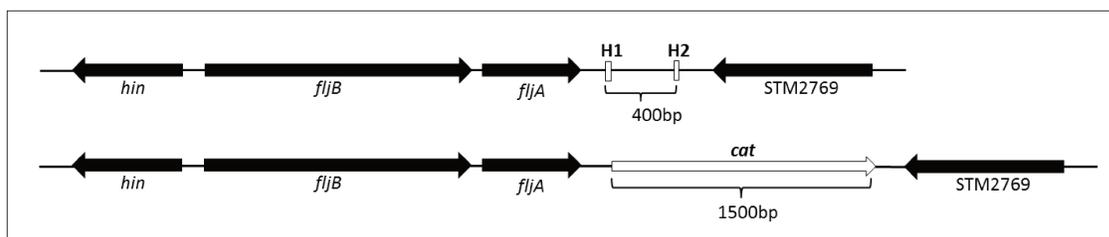


Figura 6. Desenho ilustrativo da inserção do gene *cat* entre os genes *fljA* e STM 2769. H1 e H2 correspondem as regiões de homologia ao cassete de resistência contendo o gene *cat*. É possível verificar a diferença no tamanho das regiões antes (400 bp) e depois (1500bp) da inserção do cassete de resistência. A orientação do fragmento H foi escolhida aleatoriamente para ilustrar este esquema.

3.3.4. Transdução com fago P22HT

A etapa de recombinação pelo sistema λ Red pode gerar recombinações em outras regiões do genoma pela atividade da recombinase do fago λ . Assim, a transferência do

cassete de resistência por transdução permite que apenas a região genômica contendo o cassete de resistência seja transferida para uma nova célula bacteriana, não submetida ao processo de recombinação com pKD46.

O fago P22 foi descoberto em 1952 por Zinder e Lederberg mostrando ser o primeiro fago capaz de realizar transduções generalizadas. Ou seja, no momento da encapsidação do DNA viral, o DNA do hospedeiro pode incorretamente ser encapsidado. O fago P22HT (“*High Transducing Frequency*”) tem a capacidade de encapsidar o DNA do hospedeiro com uma frequência muito mais alta que o fago “selvagem”, fato que proporciona a viabilidade do teste.

A transdução foi realizada cultivando as culturas de 662STm:*cat* e 14028:*cat* em 3 mL de LB líquido acrescido de 25 µg/mL de cloranfenicol a 37° C por 24 horas. Deste pré-inoculo fez-se uma diluição na proporção de 1:100 em 5 mL de LB contendo 25 µg/mL de cloranfenicol, crescido sob agitação a 37° C por 3 horas. Após o período de incubação, para cada 1 mL dessa suspensão de células foi acrescido 100 µL de suspensão de fago P22HT com concentração de 10¹⁰ UFP (Unidades Formadoras de Placa). Essa cultura foi incubada sob agitação a 37° C por 24 horas. Neste mesmo dia foram inoculados as linhagens de *S. enterica* Typhimurium 662STm, ATCC 14028 e LT2 em 3 mL de LB também crescidas sob agitação a 37° C por 24 horas.

As culturas contendo o fago foram submetidas à centrifugação a 5000g por 10 minutos a 4 °C para sedimentação das células bacterianas. O sobrenadante foi separado e filtrado em membrana de 0,22 µm esterilizada (Millipore) a fim de eliminar as células bacterianas remanescentes. Esse sobrenadante foi adicionado às culturas bacterianas selvagens (662STm, ATCC 14028 e LT2) nas seguintes proporções de sobrenadante (suspensão de vírus) e cultura bacteriana, ambos em µL: 50:50, 66:34, 90:10, 95:5 e 99:1.

As misturas acima foram incubadas a 37° C por 15 minutos e plaqueadas por espalhamento em placas com meio LB contendo 25 µg/mL de cloranfenicol. As colônias obtidas foram confirmadas fenotipicamente em meio MacConkey Ágar e SS, ambos acrescidos com 25 µg/mL de Cloranfenicol.

Das colônias obtidas foi testada a presença de fago P22 remanescente do processo de transdução através de crescimento no meio Mint Green, na qual pela característica fenotípica das colônias é possível diferenciar colônias com fago em fase lisogênica, com

fago em fase lítica e livres de fago. O princípio do método baseia-se em uma estria central com suspensão de P22, e estrias transversais à estria central com colônias que se deseja testar. O meio apresenta alta concentração de glicose. Quando a célula encontra-se em fase lítica o ácido é liberado tornando as colônias verde-escuras (Figura 7A). Colônias lisogênicas são imunes ao fago, logo mesmo com o contato com o fago a colônia permanece com a mesma característica ao longo de toda estria (Figura 7B). Colônias livres de fago se apresentarão não-líticas antes do contato com o fago e líticas após contato (Figura 7C).

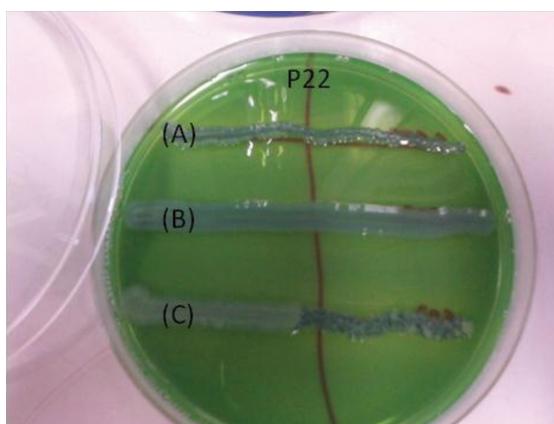


Figura 7. Meio Mint Green com colônias de *S. enterica* com fago P22HT. (A) colônias líticas; (B) colônias lisogênicas e (C) colônias livre de fagos. Risco central refere-se à estria com suspensão de fago P22HT.

3.3.5. *Confirmação da inserção do gene cat no genoma de S. enterica por PCR utilizando os primers de detecção*

Para confirmar se houve a inserção do cassete de resistência na posição desejada foi realizado um PCR com os *primers* de detecção (Tabela 3), com as culturas transduzidas. O DNA genômico foi extraído com o kit “Illustra Bacterial Genomic MiniSpin” (GE Healthcare). A reação de PCR consistiu das seguintes etapas utilizando o termociclador Veriti® (Applied Biosystem): aquecimento inicial a 94° C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 58° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto. A extensão final foi concluída a 72° C por 4 minutos. O kit utilizado foi o “One Taq Polymerase” (LCG Biotechnology), nas concentrações descritas na Tabela 4.

3.4. Análise de reversão da resistência ao cloranfenicol “*in vitro*”

3.4.1. Análise de reversão em culturas prolongadas

Uma hipótese levantada em relação à perda do *operon fljBA* de *S. enterica* Typhimurium foi que esta região seria propensa a sofrer deleções o que levaria a perda do *operon fljBA*. Dessa forma, a presença do gene *cat* foi avaliada em cultura prolongada *in vitro*, no meio LB, onde as células enfrentaria condições de crescimento sob estresse nutricional.

Os recombinantes obtidos (662STm:*cat*, 14028:*cat* e LT2:*cat*) foram inoculados em 50 mL de meio LB sem adição de cloranfenicol. As culturas foram incubadas a 37°C durante nove dias. Neste período, fez-se a contagem da UFC (Unidade Formadora de colônia) a cada dois dias, aproximadamente, diluindo-se uma alíquota da suspensão até 10^{-8} e transferindo-se as diluições finais para placas contendo LB com e sem cloranfenicol. Das placas de LB sem antibiótico transferiu-se novamente as colônias obtidas em placas de LB com e sem cloranfenicol. Cerca de 100 colônias foram transferidas a cada dia, totalizando cerca de 600 colônias ao longo dos 9 dias. A transferência foi realizada utilizando-se de uma mesma alça de inoculação estriando-se primeiramente a placa sem o antibiótico e posteriormente na placa com cloranfenicol.

Após o resultado obtido com contagem em nove dias, o teste foi modificado utilizando nova cultura e mantendo-a por até 30 dias de incubação. Não foi realizada a contagem total de células nesta etapa, apenas a transferência das colônias isoladas para os meios com e sem antibiótico. Alíquotas foram retiradas a cada cinco dias, aproximadamente, realizando diluição seriada e plaqueando as diluições que apresentavam contagem com cerca de 10-100 UFC por placa, em meio LB sem antibiótico. As colônias isoladas foram transferidas novamente em placas de LB com e sem cloranfenicol. Nesta etapa, cerca de 100 colônias foram transferidas a cada dia, totalizando cerca de 500 colônias ao longo dos 30 dias para cada recombinante. Esta etapa foi repetida 5 vezes em dias diferentes com cada recombinante. Desta forma, foram ensaiadas aproximadamente 2500 colônias de cada linhagem recombinante.

3.4.2. Análise de reversão em culturas prolongadas – Replicador de colônias

Foi utilizado o replicador de colônias (Figura 8) em uma segunda etapa com o objetivo de aumentar o número de colônias testadas. Sabe-se que taxa de recombinação de um gene é em torno de 0,0001% a 0,00001%. Se a região onde foi inserido o cassete de resistência não for um ponto quente de recombinação, logo sua taxa de recombinação variará como qualquer outro gene. Dessa forma, foram testadas 10000 colônias em culturas de até 10 dias a fim atingir a quantidade necessária para abranger a taxa de recombinação mínima para um gene.

O uso de replicador também proporciona melhor isolamento das colônias e mais rapidez ao ensaio. Repetiu-se o mesmo procedimento descrito no item 3.4.1 para o isolamento de colônias, na qual se fez a contagem da UFC (Unidade Formadora de colônia) a cada dois dias, aproximadamente, diluindo-se uma alíquota da suspensão até 10^{-5} e 10^{-6} e transferindo-se as diluições finais para placas de LB. As colônias isoladas foram transferidas para uma placa de 98 poços com auxílio de um palito de madeira estéril, contendo 200 μ L de LB caldo em cada poço. A placa foi mantida em estufa a 37°C por 15 minutos para reativação das células. Utilizou-se o replicador para transferir as suspensões para placas de LB, LB acrescido de Cloranfenicol e SS. Nesta etapa utilizou-se apenas o mutante *LT2:cat*.



Figura 8. Replicador de colônias com 98 alças.

3.4.3. Indução de fagos

Garaizar et al. (37) demonstraram que amostra monofásicas *S. enterica* I 4,[5],12:i:- apresentam deleções em regiões do genoma que compreendem o fago Fels-2 (cluster IV) e *fljBA* (cluster V), quando comparadas ao genoma de *S. enterica* LT2. Dado que Fels-2 está inserido próximo ao operon *fljBA* (aproximadamente 33 Kb de distância), sugere-se que quando houvesse uma excisão errônea do fago, este carregaria parte da região do operon *fljBA*, eliminando a expressão da flagelina tipo 2 em decorrência da perda do gene *fljB*.

Dessa forma, testou-se a hipótese utilizando culturas de LT2:*cat* (por ser a única das linhagens recombinantes positiva para Fels-2), na qual foi aplicado um indutor de fagos.

Em 50 mL LB líquido adicionou-se 500 µL de uma suspensão de células de LT2:*cat* crescida por 24 horas. A cultura foi mantida sob agitação a 37° C por aproximadamente 2 horas até atingir DO de 0,4 ($\lambda=600\text{mm}$) na qual foram adicionados 200 µL de Mitomicina a 0,5 mg/mL, proporcionando uma concentração final de 2,0 µg/mL. A suspensão foi mantida sob agitação durante 5 horas. As células foram separadas por centrifugação (5000g por 10 minutos, temperatura ambiente) e lavadas com solução salina (0,9%). Repetiu-se o procedimento com o objetivo de remover qualquer resíduo de antibiótico. O precipitado foi resuspendido em 10 mL de LB líquido e incubado a 37° C por 2 horas para recuperação das células. Após período de incubação, as células foram diluídas e plaqueadas em LB-Agar. As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C e transferidas para meio LB e LB com cloranfenicol. O procedimento está ilustrado na Figura 9. Aproximadamente 200 colônias foram transferidas por ensaio. O mesmo ensaio foi realizado 5 vezes em dias diferentes a fim de confirmar a perda ou não da região referente ao operon *fljBA*. No total, foram ensaiadas aproximadamente 1000 colônias para a perda da resistência ao cloranfenicol.

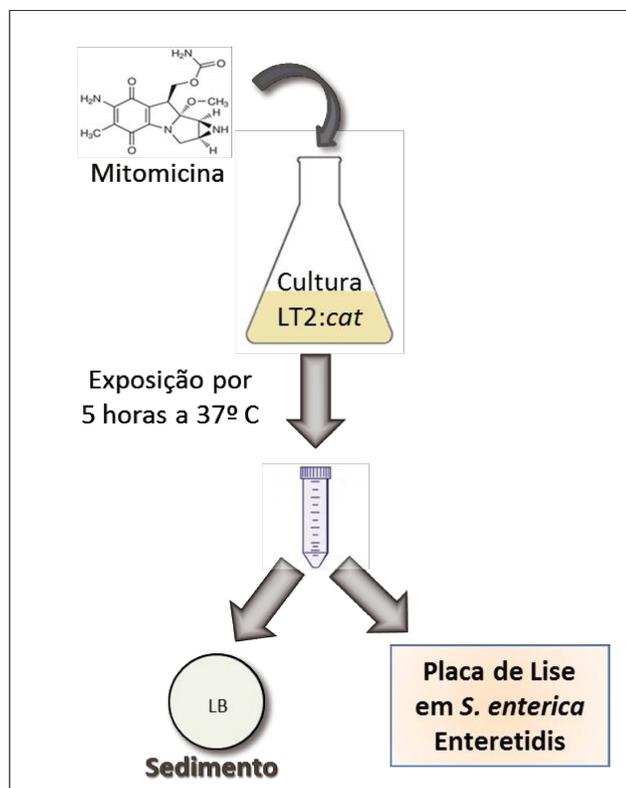


Figura 9. Ilustração do procedimento de indução de fagos com Mitomicina.

3.5. Análise de reversão dos recombinantes “*in vivo*”

3.5.1. Animais

Os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos fêmeas BALB/c, com 6 a 8 semanas de idade, fornecidas pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Biologia da Unicamp (Protocolo 2873-1 – Adendo 2).

3.5.2. Análises “*in vivo*”

S. enterica Typhimurium e Enteritidis além de infectarem humanos, também causam em camundongos, um tipo de infecção muito semelhante à febre tifóide humana. Desta maneira, camundongos BALB/c são utilizados como o modelo murino de infecção sistêmica por *S. enterica* (9).

Testou-se a perda da resistência ao cloranfenicol por parte de LT2:cat em modelo murino utilizando-se 30 camundongos fêmeas BALB/c de 6 semanas, o qual foram divididos em 2 grupos de 15 camundongos. O primeiro grupo foi inoculado via gavagem,

com aproximadamente 10^8 UFC de LT2:cat em PBS (Tampão fosfato Salina pH 7,4) por camundongo e o segundo grupo via intraperitoneal com aproximadamente 10^6 UFC de LT2:cat em PBS por camundongo.

No grupo 1 (via gavagem) realizou-se o sacrifício de 5 camundongos após 3, 7 e 14 dias após a inoculação, extraíndo-se sangue via retro-orbital, baço e placas de Peyer (Figura 10 e Figura 11A). No grupo 2 (via intraperitoneal), 5 camundongos foram sacrificados 1, 3 e 7 dias após a inoculação, extraíndo-se sangue via retro-orbital e baço (Figura 10 e Figura 11B).

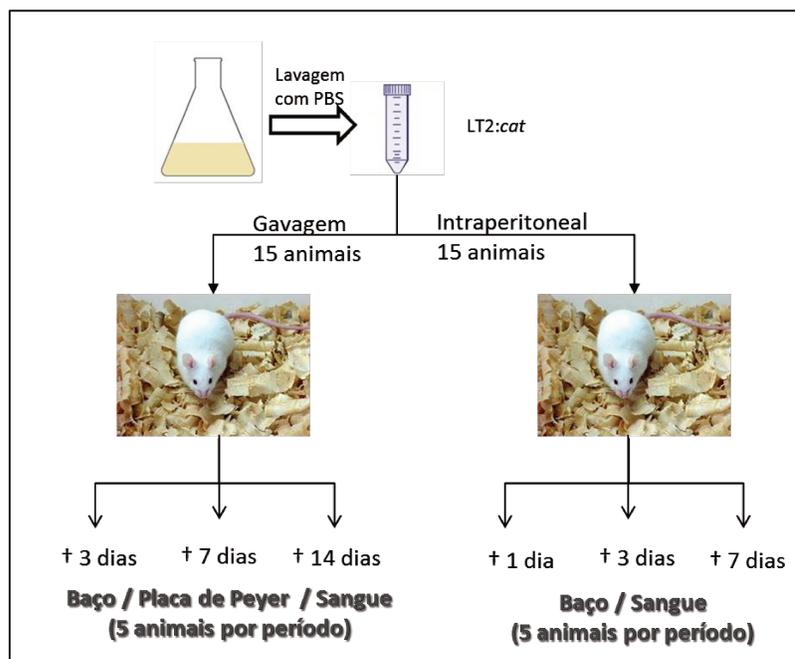


Figura 10. Ilustração do ensaio para inoculação dos animais e respectivos tempos de sacrifício.

Os órgãos foram homogeneizados em PBS utilizando homogeneizador de tecidos (Omni International - Tissue Master 125), e as suspensões diluídas até 10^{-4} em PBS e plaqueadas em placas de LB Agar com e sem cloranfenicol. Para as placas de Peyer, dada a contaminação por bactérias da microbiota normal, plaqueou-se as diluições em Ágar Macconkey com e sem cloranfenicol (pelas características fenotípicas da colônia é possível diferenciar colônias de *S. enterica* de outras bactérias).

As colônias isoladas obtidas após 24 horas de incubação a 37°C foram transferidas para meio LB e LB com cloranfenicol. Uma média de 50 colônias foi transferida de cada órgão, dando um total de aproximadamente 1500 colônias testadas nesta etapa.

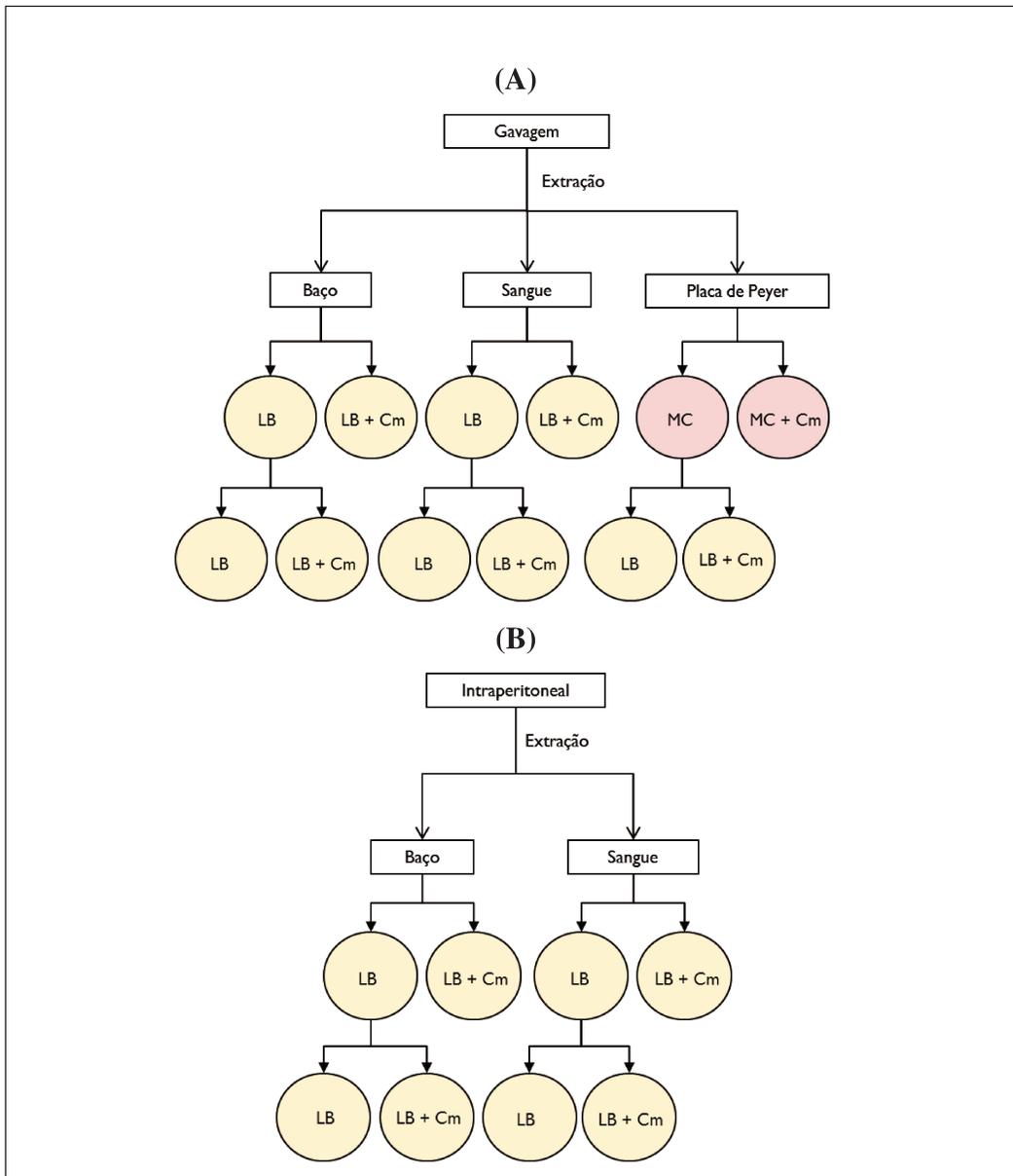


Figura 11. Ilustração do procedimento de extração e plaqueamento dos órgãos em meios de cultura LB e LB acrescido com cloranfenicol a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LB+Cm) para camundongos tratados (A) via gavagem e (B) via intraperitoneal. Foi utilizado Macconkey agar com e sem cloranfenicol para o plaqueamento das suspensões bacterianas provenientes de Placas de Peyer com o objetivo de selecionar/diferenciar *S. enterica* de outras bactérias da microbiota normal do intestino. O mesmo procedimento foi realizado em todos os grupos e individualmente.

3.6. Primers específicos para detecção de genes do operon *fljBA* e PCR-Duplex para detecção de *S. enterica* I 4,[5],12:i:-.

3.6.1. Primers para detecção genes do operon *fljBA*

Foram desenhados *primers* específicos com alvo nos genes do operon *fljBA* a fim de confirmar dados prévios de nosso Laboratório quanto as deleções desses genes no banco de cultura listado na Tabela 2. A listagem dos *primers* utilizados encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5. Sequencia dos *primers* utilizados no estudo da deleção do operon *fljBA* em amostras STi.

Primers	Sequencia	Tamanho esperado do fragmento	Referência
FljA_280-F	5'-TGAACCTCGACGAGCAAGCAT-3'	280 bp	Este estudo
FljA_280-R	5'-CGAAGATTCCGACTACGCGA-3'		
FljB2-R	5'-TGACACCCGAATATAACCAATAG-3'	920 bp	Este estudo
FljB2-F	5'-AGCCGCAAGGGTTACTGTAC-3'		
HIN+ST-F	5'-TTGGGTATATTCGGGTGT-3'	540 bp	Este estudo
HIN+ST-R	5'-TATGCGGCTTGCCGAAA-3'		

A Figura 12 ilustra o anelamento dos *primers* (listados na Tabela 5) ao operon *fljBA*. Os *primers* foram desenhados a partir da sequencia genômica de *S. enterica* Typhimurium LT2 (NC_003197.1), logo a amplificação com os *primers* para *fljA* e *fljB* só devem ocorrer para amostras com variação de fase flagelar.

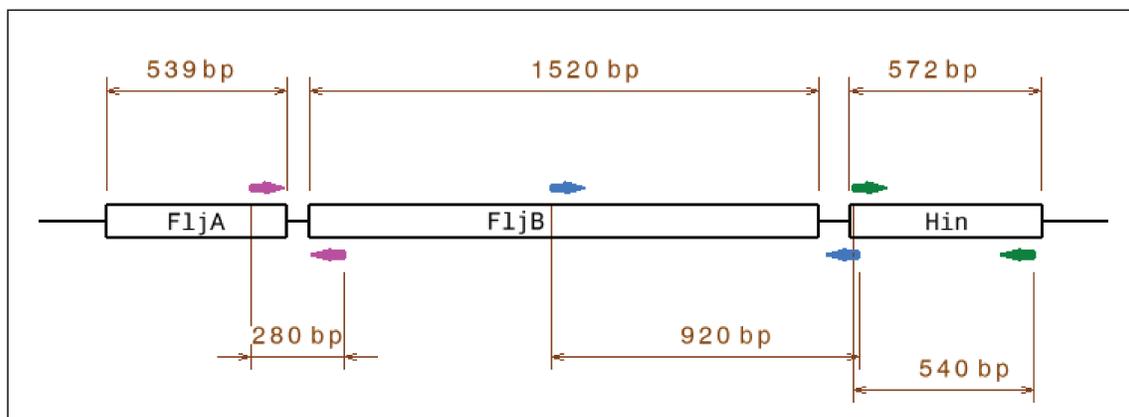


Figura 12. Esquema de amplificação dos *primers* listados na Tabela 5 ilustrando os tamanhos dos genes e os tamanhos esperados dos fragmentos gerados pelos *primers*.

As condições de reação foram as seguintes: termociclador (Veriti® - Applied Biosystem) com aquecimento inicial a 94° C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 58°C (para FljA-280 e FljB2) e 60° C (para Hin+ST) por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto. A extensão final foi concluída a 72° C por 4 minutos. O kit utilizado foi o “*One Taq Polymerase*” (LCG Biotechnology), nas concentrações descritas na Tabela 4.

3.6.2. PCR-Duplex para identificação de *S. enterica* 14,[5],12:i:-

Nosso Laboratório vem trabalhando na caracterização molecular de amostras de *S. enterica* 4,[5],12:i:-. Como parte desse projeto, as linhagens 607STi, 691STi e 633STi foram submetidas a sequenciamento parcial do genoma (dados não publicados). A montagem e anotação parcial dos genomas foram realizadas pelo pesquisador Leandro Costa do Nascimento do Laboratório de Genômica e Expressão da UNICAMP (LGE – UNICAMP). Com os dados obtidos, foi possível comparar a sequência do *operon fljBA* de LT2 com a mesma região das linhagens sequenciadas. Para a seleção do *contig* que supostamente contem a região de deleção fez-se o BLAST da região genômica do *operon fljBA*, incluindo genes laterais a este *operon*, *iroB* e genes pertencentes ao fago Fels-2, com sequências de 607STi, 691STi e 633STi presentes em nossos bancos de dados. Como exemplo, são demonstrados os resultados obtidos com 607STi. O *contig* selecionado foi alinhado com a sequência da região genômica contendo o *operon fljBA* de LT2, obtendo-se

o esquema ilustrado na Figura 13. Para a comparação das sequencias foi utilizado o programa WebAct desenvolvido por pesquisadores do *Imperial College of London* e do “*Sanger Centre Pathogen Sequencing Unit*” e disponível *on-line* (<http://www.webact.org/WebACT/home>) (50).

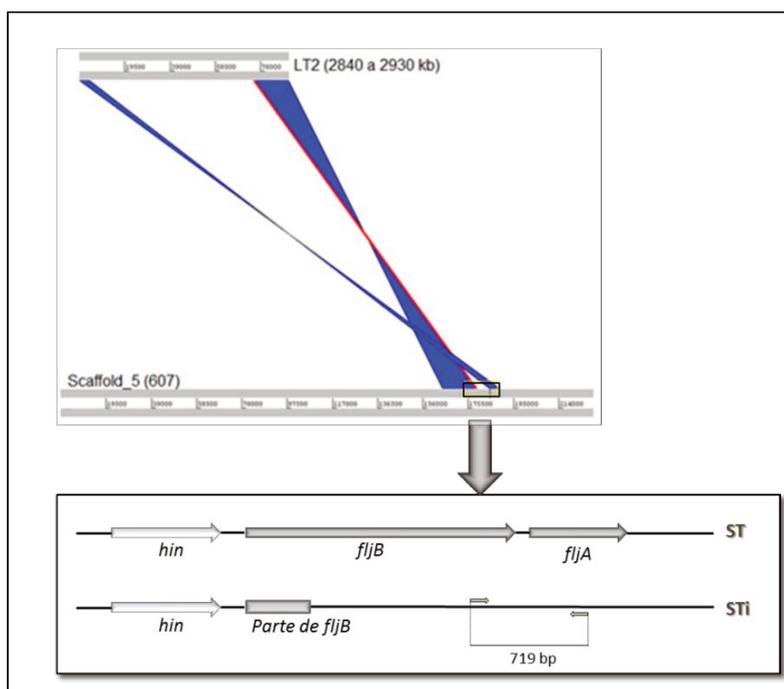


Figura 13. Desenho ilustrativo da comparação dos *contigs* contendo o operon *fljBA* em LT2 e 607STi. Destaque da região onde se verifica a perda dos genes de variação de fase flagelar (seta verde). As regiões em azul mostram identidade de bases, mas com sequência invertida. Regiões em vermelho mostram identidade de bases.

Através do alinhamento foi possível, portanto, determinar a região de deleção e selecionar *primers* específicos para identificação de STi. Para isso, foi utilizado o algoritmo *on-line* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), “*Primer-Blast*” para seleção dos *primers*. Da região destacada da Figura 13 foram selecionados o seguinte par de *primers*, com tamanho esperado de amplificação de aproximadamente 720 bp.

Tabela 6. Sequencia de *primers* para identificação de STi.

Nome	Sequencias
ST_STi_719-F	AGGTTTCCGATCTGCTGGT
ST_STi_719-R	TCAGTCTGACGACTGGAGGT

A Figura 14 ilustra a posição de anelamento dos *primers* (Tabela 6) tendo-se como base a representação esquemática da região genômica de *S. enterica* I,4,[5],12:i:-.

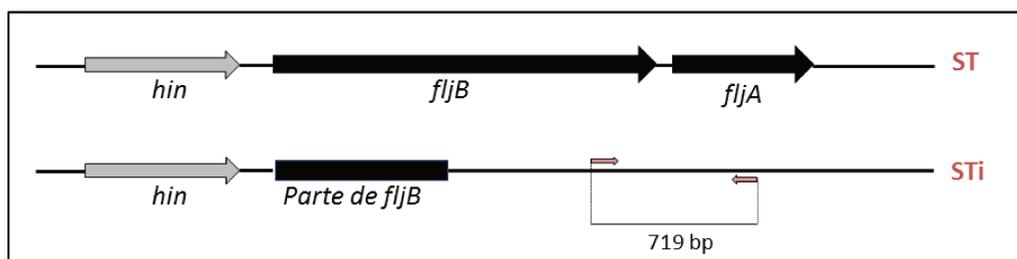


Figura 14. Ilustração esquemática do operon *fljBA* em *S. enterica* Typhimurium e da região genômica correspondente em *S. enterica* I 4,[5],12:i:- demonstrando a sequencia inserida nas amostras correspondentes ao clone americano (U.S). A posição dos *primers* desenhados para amplificação da região STM1053-1997 (34).

Esses *primers* foram testados em nossa coleção de amostras STi e ST listados na Tabela 6. As condições de reação foram as seguintes: termociclador (Veriti® - Applied Biosystem) com aquecimento inicial a 94° C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto. A extensão final foi concluída a 72° C por 4 minutos. O kit utilizado foi o “*One Taq Polymerase*” (LCG Biotechnology), nas concentrações descritas na Tabela 4.

Foram testados quatorze diferentes sorovariedades de *S. enterica* a fim de comprovar a especificidade da reação (Tabela 2).

3.6.3. Diferenciação da orientação do fragmento H

O gene *hin* como já foi visto anteriormente é um dos genes responsáveis pela variação de fase. O sequenciamento dos genomas das amostras 607STi, 633STi e 691STi mostram que o gene *hin* continua presente nas amostras monofásicas analisadas.

Visto que a posição do fragmento H e consequentemente, de *hin* no genoma de *S. enterica* é responsável pela expressão do gene *fljB* e pela inibição de *fliC*, a perda dessa propriedade de inversão poderia gerar a perda da característica de variação de fase já que na posição “off” de *hin*, o gene *fljB* não seria mais expresso. Dessa forma, uma hipótese levantada sobre a origem de *S. enterica* monofásica foi baseada na perda da capacidade de *hin* em sofrer inversão. Se isso ocorresse na posição “off” os genes *fljB* e *fljA* não seriam mais expressos e mutações/deleções nesses genes poderiam se acumular ao longo do tempo, explicando o surgimento de linhagens *S. enterica* 4,[5],12:i:-. Se este fosse o caso, a sequência *hin* teria perdido a capacidade de inversão nesse sorovar.

Para verificar esta hipótese, utilizando sequências franqueadoras do gene *hin* em *S. enterica* I 4,[5],12:i:-, *primers* foram desenhados para determinar a orientação de *hin*; um par de *primers* para amplificar quando *hin* estiver na posição “on” e outro quando *hin* estiver na posição “off”. A Figura 11 e a Tabela 7 mostram as regiões de anelamento e as sequências dos *primers* utilizados, respectivamente.

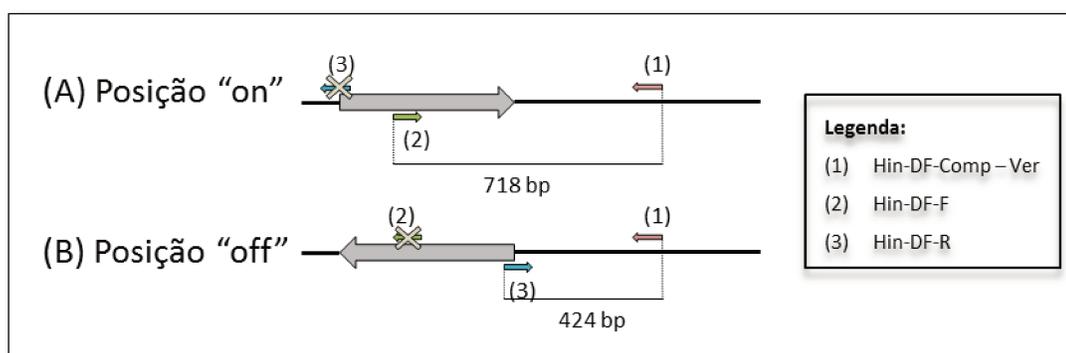


Figura 15. Ilustração esquemática das duas possíveis orientações do fragmento *hin* em linhagens monofásicas STi. O esquema demonstra a posição dos *primers* que foram desenhados para a determinação da orientação de *hin* com base nas sequências genômicas de 607STi e 691STi. O tamanho dos fragmentos esperados pela amplificação por PCR estão indicados.

Tabela 7. Sequencia dos *primers* utilizados na diferenciação da posição de *hin*.

<i>Primers</i>	<i>Sequencia</i>
Hin-DF-Comp - Ver	5'-TTAGTCGCTTTTCTCATGGAGGA-3'
Hin-DF-F	5'-TTGTAATACAGGCGTGTGGCA-3
Hin-DF-R	5'-TAAACCGTAGGCATACCGCC-3'

As condições de reação foram as seguintes: termociclador (Veriti® - Applied Biosystem) com aquecimento inicial a 94° C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de: desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto. A extensão final foi concluída a 72° C por 4 minutos. O kit utilizado foi o “*One Taq Polymerase*” (LCG Biotechnology), nas concentrações descritas na Tabela 4.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de recombinantes de *S. enterica*.

A amplificação do cassete de resistência a partir do plasmídeo pKD3 é mostrado na Figura 16.

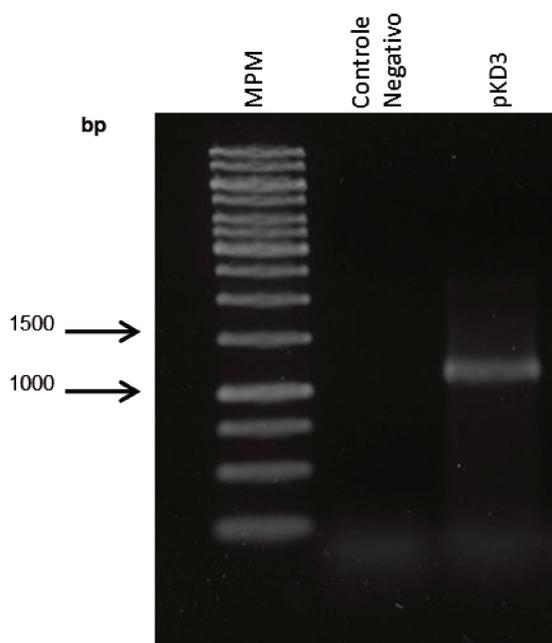


Figura 16. Produto de PCR amplificado a partir de pKD3 mostrado na 3ª coluna. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1ª coluna seguida do Controle Negativo, o qual corresponde à reação de PCR sem a presença de DNA.

Após inserção do cassete de resistência (*cat*) fez-se a confirmação das colônias recombinantes obtidas por transdução através da amplificação do cassete de resistência utilizando *primers* externos a integração, ou seja, os *primers* de detecção STM_FljA_10n (Tabela 3). Como controle, utilizou-se o DNA genômico da linhagem selvagem, obtendo-se um fragmento amplificado de aproximadamente 400 pb para a linhagem selvagem e 1500 bp para os recombinantes (Figura 17). Os tamanhos obtidos confirmam a inserção do cassete de resistência. Os dados demonstrados são referentes a linhagem LT2 e são similares aos obtidos com as linhagens 14028 e 662ST.

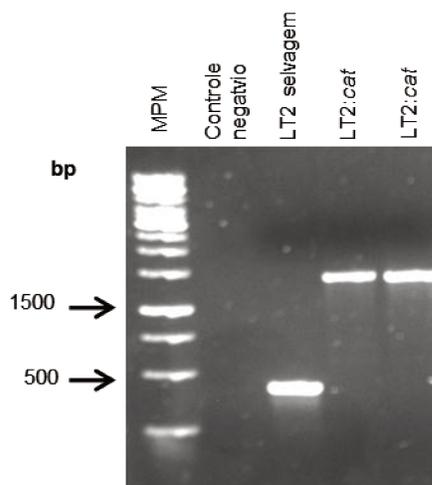


Figura 17. Produtos de PCR amplificados a partir de colônias LT2:*cat* com *primers* de detecção STM_FljA_10n. Foram selecionadas duas colônias dos recombinantes obtidos para confirmação em gel mostrados na 4º e 5º coluna. DNA genômico da linhagem LT2 selvagem foi usado como referência para a amplificação do gene selvagem. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1º coluna seguida do Controle Negativo, na qual corresponde a reação de PCR sem a presença de DNA. Recombinantes 662ST:*cat* e 14028:*cat* apresentaram mesmo padrão de amplificação.

O cassete de resistência foi inserido na região intergênica entre *fljA* e STM 2769 (baseado na anotação do genoma de *S. enterica* Typhimurium LT2) com o objetivo de manter o *operon fljBA* intacto e sem prejuízo de sua função. Com a presença do gene de resistência ao cloranfenicol próximo ao *operon* é possível verificar a instabilidade dessa região genômica. Ou melhor, se houver deleção do *operon fljBA* como ocorreu nas linhagens monofásicas, o cassete de resistência inserido é deletado juntamente com o *operon* e as culturas se tornam novamente sensíveis ao cloranfenicol.

4.2. Análise da reversão por crescimento *in vitro*

Para testar a hipótese sobre a ocorrência de elevadas taxas de recombinação envolvendo o *operon fljBA*, culturas por um tempo mais prolongado das linhagens aqui construídas foram realizadas e alíquotas foram coletadas ao longo do tempo, compreendendo tempos de cultivo onde a cultura encontrava-se sob estresse nutricional, de tal forma a avaliar a ocorrência de recombinação em diferentes condições de crescimento.

Dessa forma, um longo tempo de incubação foi utilizado, permitindo o consumo de nutrientes e o acúmulo de subprodutos do metabolismo. Foram utilizadas linhagens contendo ou não o fago Fels-2 de tal forma a avaliar a participação deste fago no possível processo de recombinação.

Os ensaios de reversão “*in vitro*” foram iniciados com culturas de 662ST:*cat* e 14028:*cat*. As culturas foram quantificadas e o número de UFC (Unidade Formadoras de Colônias) presente na suspensão original encontra-se na Tabela 8. As curvas de crescimento são apresentadas nas Figura 18A e B.

Tabela 8. Número de UFC presente em suspensões de 662ST:*cat* e 14028:*cat* em um período de 9 dias. Estes resultados são referentes a experimento que foi repetido outras duas vezes resultando em dados semelhantes.

Período de incubação (dias)	662: <i>cat</i>		14028: <i>cat</i>	
	LB sem Cm (UFC/mL)	LB com Cm (UFC/mL)	LB sem Cm (UFC/mL)	LB com Cm (UFC/mL)
1	$2,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
2	$4,6 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$
3	$3,5 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
5	$3,9 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$
7	$2,1 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$
9	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$

Legenda: Cm = Cloranfenicol

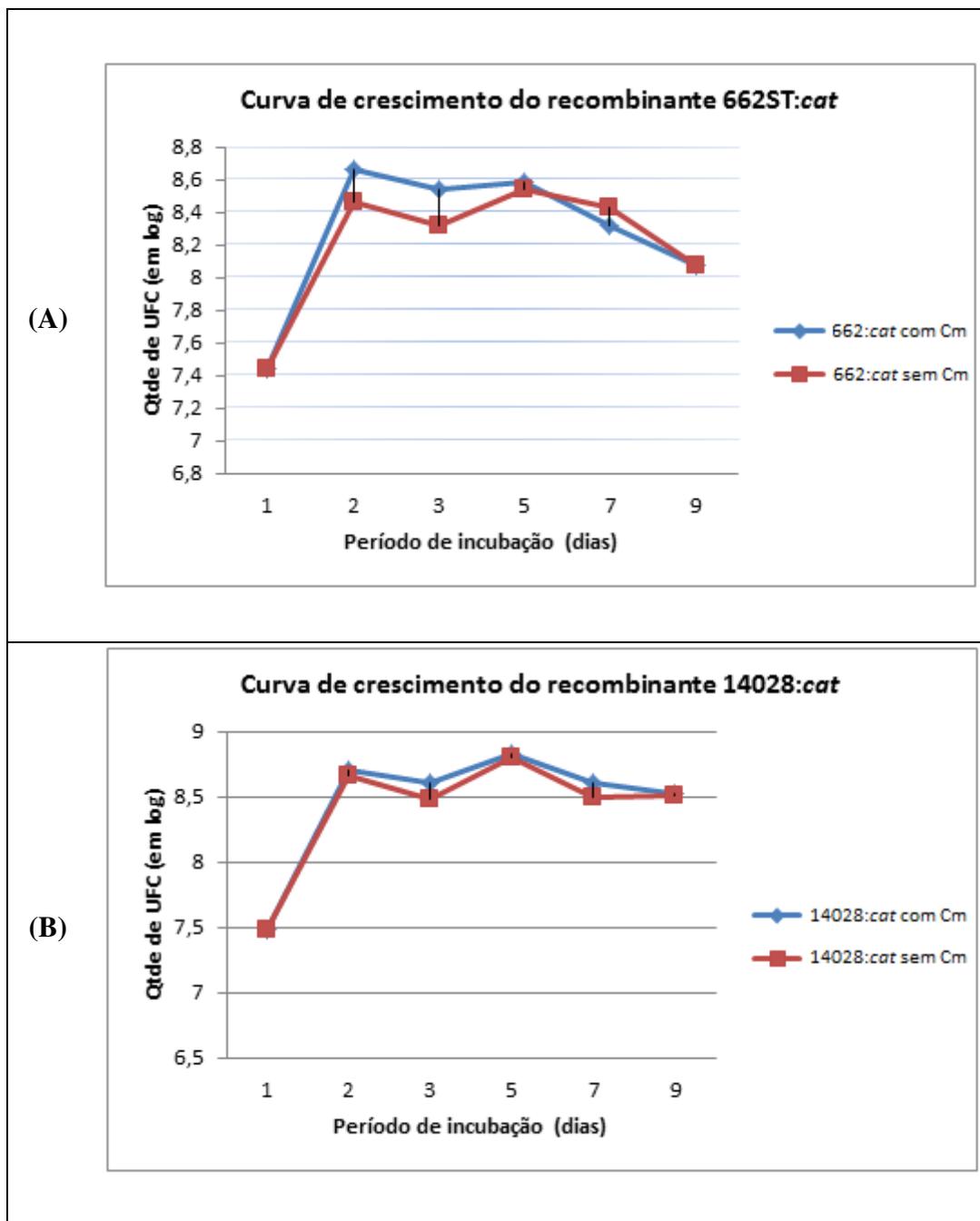


Figura 18. Curva de crescimento das linhagens de *S. enterica* Typhimurium 662ST:cat e 14028:cat medida em UFC/mL durante 9 dias de incubação. As contagens foram realizadas em meio LB com cloranfenicol (25 µg/mL) e sem antibiótico. Estes resultados são referentes a experimento que foi repetido outras duas vezes resultando em dados semelhantes.

Para cada contagem, comparou-se o número obtido entre as placas com e sem cloranfenicol. Esperava-se encontrar uma diferença significativa entre as contagens com e

sem antibiótico se a taxa de recombinação envolvendo a região de inserção de *cat* fosse relativamente elevada, fato que indicaria a perda do gene de resistência e, conseqüentemente, a perda do *operon fljBA*. No entanto, os valores foram semelhantes e as colônias obtidas nas placas de LB sem antibiótico foram transferidas para novas placas com e sem cloranfenicol, como mostra a Figura 19, a fim de confirmar a sensibilidade ao antibiótico.

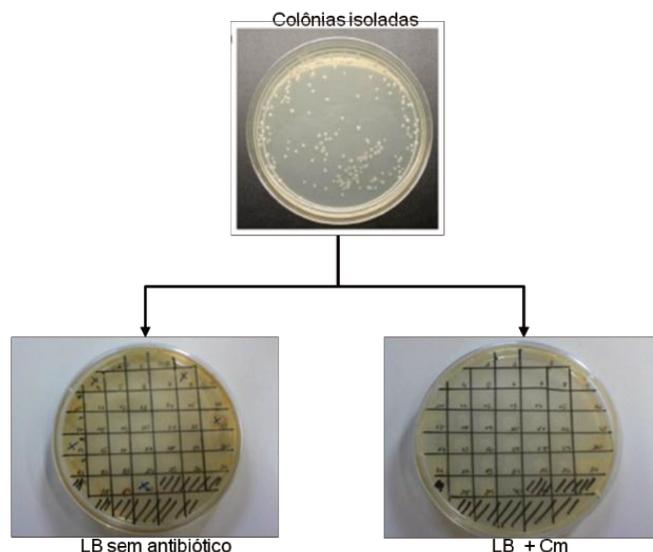


Figura 19. Esquema de transferência de colônias obtidas da placa de LB-Agar com contagem entre 10-100 UFC/placa para placas de LB-Agar e LB-Agar + Cloranfenicol (25µg/mL) a fim de verificar colônias sensíveis ao antibiótico, fato que indicaria a perda da resistência por recombinação. O mesmo esquema de transferência foi utilizado para todos os experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*”.

Nesta etapa todas as colônias transferidas (cerca de 100 colônias) não apresentaram sensibilidade ao cloranfenicol.

O ensaio acima foi modificado, não realizando a contagem total de células e mantendo a cultura por um tempo de incubação mais longo (30 dias). Nesta etapa, além das culturas de 662ST:*cat* e 14028:*cat* também foi realizado com cultura de LT2:*cat*. As culturas foram diluídas a fim de obter colônias isoladas e plaqueadas em LB ágar sem antibiótico. As colônias obtidas foram transferidas para novas placas com e sem cloranfenicol, conforme demonstrado anteriormente (Figura 19). Das colônias obtidas e transferidas não foi verificado nenhuma colônia sensível ao cloranfenicol o que mostra

que o gene *cat* continua presente e, conseqüentemente, o operon *fljBA*. Cerca de 100 colônias foram transferidas a cada dia, totalizando aproximadamente 500 colônias ao longo dos 30 dias para cada recombinante. Esta etapa foi repetida 5 vezes em dias diferentes com cada recombinante.

4.3. Indução de fagos

As células da linhagem LT2:*cat* expostas ao tratamento com Mitomicina C foram lavadas com solução salina (0,9%) a fim de eliminar restos do antibiótico. As suspensões foram diluídas e plaqueadas e as colônias isoladas foram transferidas para novas placas com e sem cloranfenicol, como mostra a Figura 19. Das colônias obtidas e transferidas não foi verificado nenhuma colônia sensível ao cloranfenicol o que mostra que o gene *cat* continua inserido no genoma e, conseqüentemente, o operon *fljBA*. O ensaio foi realizado em quintuplicata totalizando cerca de 1000 colônias testadas nesta etapa.

O protocolo utilizado foi proposto por Frye et al. (51) na qual os pesquisadores demonstraram a extração dos quatro fagos presentes em culturas de LT2. Embora neste estudo não realizamos testes visando comprovar a indução de Fels-2, utilizamos uma condição descrita na literatura como indutora do ciclo lítico do mesmo e realizamos um teste de lise bacteriana. A Figura 20 ilustra o resultado obtido com o sobrenadante do tratamento de indução em placa de *S. enterica* Enteretidis 678. O mesmo resultado foi obtido para 679 SE.



Figura 20. Placa de Lise com *S. enterica* Enteretidis.

4.4. Verificação de revertentes de mutantes LT2:*cat* em modelo murino

Para o ensaio de inoculação por gavagem nenhum camundongo veio a óbito antes do dia do sacrifício. As contagens de células isoladas dos órgãos nos meios LB com e sem antibiótico e MacConkey com e sem antibiótico foram comparadas e, apesar de parecer haver uma diferença entre os tratamentos, ou seja, a quantidade recuperada nas placas sem antibiótico ser maior que nas placas com antibiótico, não houve presença de colônias sensíveis ao cloranfenicol. As colônias isoladas nas placas sem antibiótico foram transferidas para novas placas com e sem cloranfenicol, como mostra a Figura 19. Das colônias obtidas e transferidas não foi verificado nenhuma colônia resistente ao cloranfenicol o que mostra que o gene *cat* continua inserido e, conseqüentemente, o operon *fljBA*.

Essa diferença de contagem na recuperação inicial com e sem antibiótico pode ter sido devido às condições “*in vivo*” serem menos favoráveis ao crescimento do microrganismo quando comparado ao crescimento “*in vitro*”. O estresse imposto às células bacterianas pelo organismo hospedeiro provavelmente dificulta a sua recuperação em meio de cultura.

A Figura 21 ilustra a diferença de contagem entre os 15 indivíduos inoculados via gavagem e separados por órgão extraído. Na recuperação de células a partir do sangue, alguns indivíduos não apresentaram nenhuma célula bacteriana. Dos 15 camundongos, um total de aproximadamente 400 colônias foram transferidas das Placas de Peyer, 400 do baço e 40 do sangue.

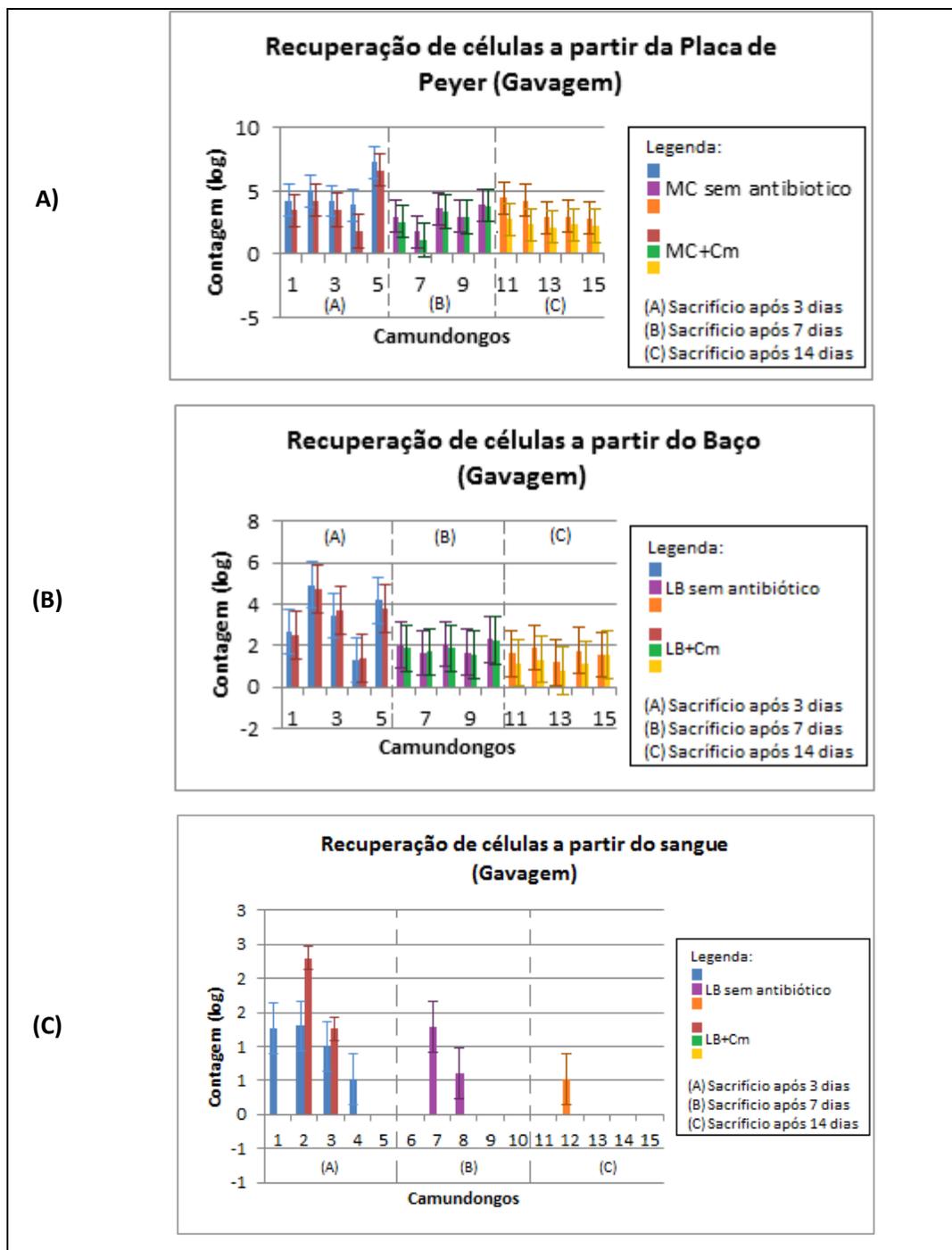


Figura 21. Comparação da recuperação da linhagem de *S. enterica* Typhimurium LT2:cat em (A) Placas de Peyer, (B) baço e (C) sangue de camundongos BALB/c inoculados por gavagem. A extração obtida das placas de Peyer foi plaqueada em meio MacConkey (MC) e MacConkey + Cloranfenicol (25 µg/mL). Já para os outros foram plaqueados em LB e LB + Cloranfenicol (25 µg/mL). Foram inoculados 10^8 UFC por camundongo. As colunas representam a contagem média de cada camundongo e as barras representam o desvio padrão entre as contagens. Não houve recuperação do microrganismo nos camundongos 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14 e 15 nas amostras de sangue.

Já para o ensaio de inoculação por via intraperitoneal, 4 camundongos vieram a óbito antes do dia do sacrifício, sendo 1 do segundo grupo e 3 do terceiro grupo. A contagem de células isoladas dos órgãos nos meios LB-Agar com e sem antibiótico foram comparadas e, para este tratamento, a recuperação de células foi mais homogênea do que por gavagem. As colônias isoladas nas placas sem antibiótico foram transferidas para novas placas com e sem cloranfenicol, como mostra a Figura 19. Das colônias obtidas e transferidas não foi verificado nenhuma colônia sensível ao cloranfenicol o que demonstra a presença do gene *cat*.

A Figura 22 ilustra a diferença de contagem entre os 15 indivíduos inoculados via intraperitoneal e separados por órgão extraído. Na recuperação de células a partir do sangue, alguns indivíduos não apresentaram nenhuma célula bacteriana e quatro camundongos vieram a óbito antes do dia do sacrifício (um do grupo de 3 dias após inoculação e três do grupo de 7 dias). Dos 11 camundongos, um total de aproximadamente 500 colônias foram transferidas do baço e 250 do sangue.

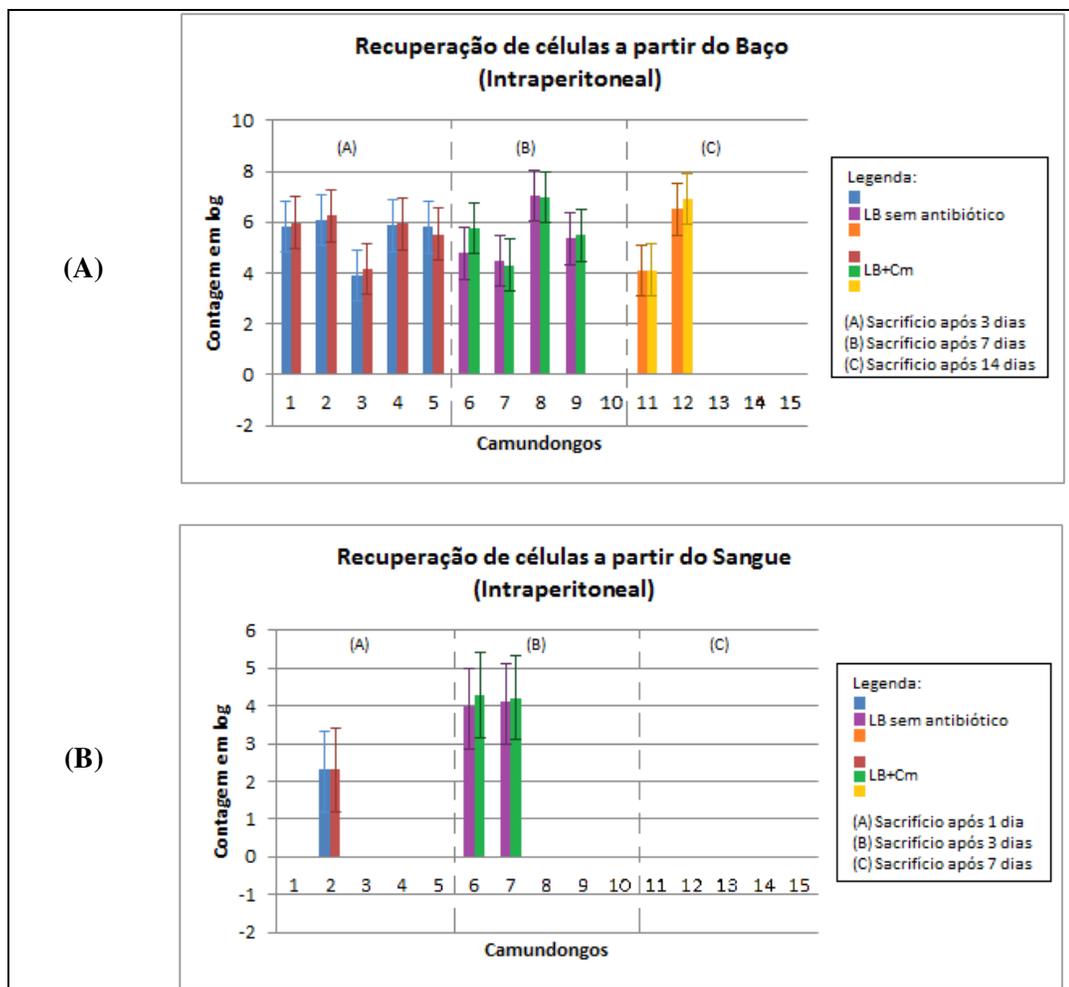


Figura 22. Comparação da recuperação da linhagem de *S. enterica* Typhimurium LT2:cat em (A) baço e (B) sangue de camundongos BALB/c inoculados via intraperitoneal. Os órgãos extraídos foram plaqueados em LB-Agar e LB + Cloranfenicol (25 µg/mL). Foram inoculados 10⁶ UFC por camundongo. As colunas representam a contagem média de cada camundongo e as barras representam o desvio padrão entre as contagens. Os camundongos 10, 13, 14 e 15 vieram a óbito antes do dia do sacrifício. Não houve recuperação do microrganismo nos camundongos 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11 e 12 nas amostras de sangue.

A Tabela 9 exemplifica as colônias de *S. enterica* Typhimurium ensaiadas quanto a reversão da resistência ao cloranfenicol e os resultados obtidos.

Tabela 9. Resumo da quantidade de colônias transferidas para placas de LB-Agar e LB-Agar com cloranfenicol (25 µg/mL) para os ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*” com os recombinantes 662STm:*cat*, 14028:*cat* e LT2:*cat*. Os testes “*in vitro*” 9 e 30 dias foram realizados com os 3 recombinantes citados. Os demais foram realizados apenas com LT2:*cat*.

Ensaio	Quantidade aproximada de colônias transferidas para LB e LB+Cm	Número de replicatas	Total avaliado para cada recombinante
Teste “ <i>in vitro</i> ” (estresse) – 9 dias	600	1	600
Teste “ <i>in vitro</i> ” (estresse) – 30 dias	500	3	1500
Teste “ <i>in vitro</i> ” (replicador)	2500	4	10000
Teste “ <i>in vitro</i> ” Indução de fago	200	5	1000
Teste “ <i>in vivo</i> ”	400 (Placa de Peyer)	1	400
Inoculação via gavagem	400 (Baço)	1	400
	40 (Sangue)	1	40
Teste “ <i>in vivo</i> ”	500 (Baço)	1	500
Inoculação via intraperitoneal	250 (Sangue)	1	250

Legenda: Cm = cloranfenicol

4.5. Identificação de *S. enterica* 4,[5],12:i:- por PCR

4.5.1. operon *fljBA*

As Figura 23, Figura 24 e Figura 25 mostram a amplificação com os *primers* FljA_280, FljB2 e Hin+ST, respectivamente. Os genes *fljA* e *fljB*, como esperado, não sofreram amplificação na maioria das amostras monofásicas. Esses resultados confirmaram nossos dados anteriores (Sales et al., manuscrito em preparo). Houve amplificação nas amostras 635STi e 686STi para o gene *fljA* e 6195STi para *fljB*. Dado que para os três casos há presença de um gene, mas ausência de outro, a variação de fase não se expressaria o que justifica sua identificação sorológica como monofásica. No entanto, estudos adicionais são necessários para verificar se esses resultados são devido a ausência dos genes ou uma mutação na região de anelamento dos *primers*.

Dessa forma, as amplificações obtidas com os *primers* no banco de cultura do laboratório corroboram com os dados prévios de que as amostras testadas são pertencentes ao sorotipo I 4,[5],12:i:-.

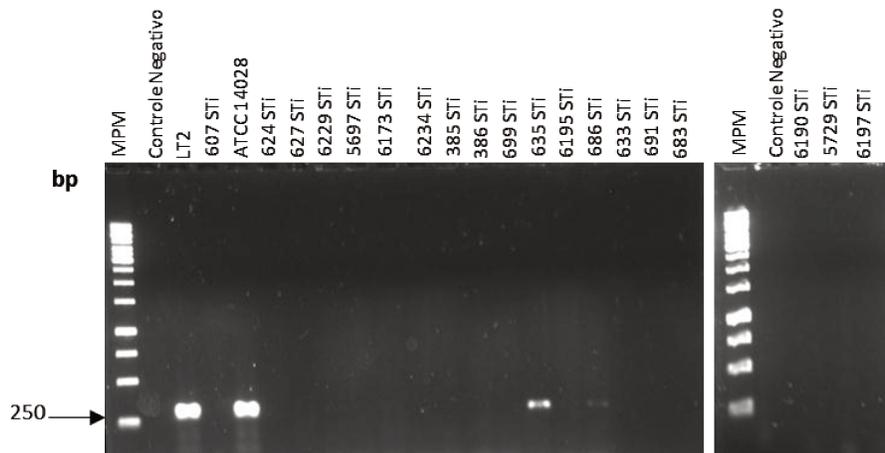


Figura 23. Detecção do gene *fljA* por PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi), utilizando o par de *primers* FljA_280. As linhagens de *S. enterica* Typhimurium LT2 e 14028 foram utilizadas como controle positivo. O tamanho esperado do *amplicon* é de 280 bp. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1º coluna.

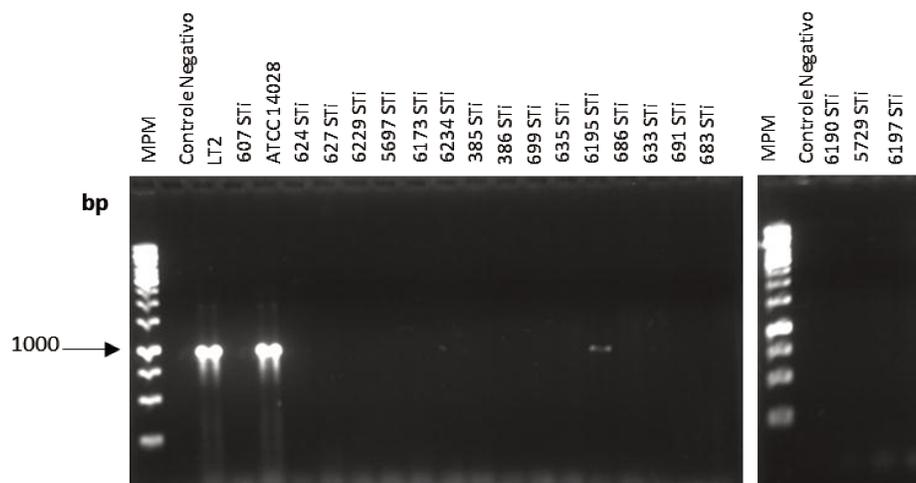


Figura 24. Detecção do gene *fljB* por PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi), utilizando o par de *primers* FljB2. As linhagens de *S. enterica* Typhimurium LT2 e 14028 foram utilizadas como controle positivo. O tamanho esperado do *amplicon* é de 920 bp. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1º coluna.

Dados prévios de nosso laboratório e corroborados pelo sequenciamento parcial do genoma das amostras monofásicas 607STi, 691STi e 633STi indicaram que o gene *hin* está

presente nas amostras STi. A amplificação com os *primers* Hin+ST confirmaram esses resultados, como mostra a Figura 25.

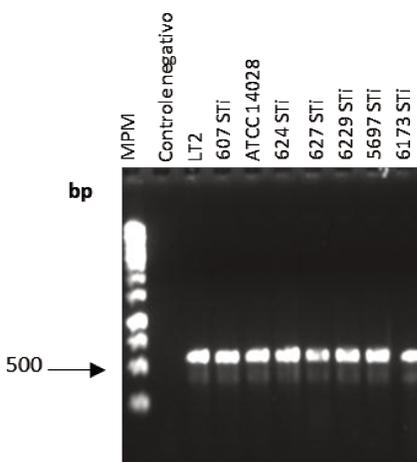


Figura 25. Detecção do gene *hin* por PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi), utilizando o par de *primers* Hin_ST. Tamanho do *amplicon* é de 540 bp. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1ª coluna.

Além do banco de amostras de STi obtidas de isolados clínicos, os *primers* foram testados em amostras isoladas de frangos, cedidas pelo laboratório AVIPA. As amostras mostraram um padrão de amplificação diferente dos isolados clínicos como mostra a Figura 26.

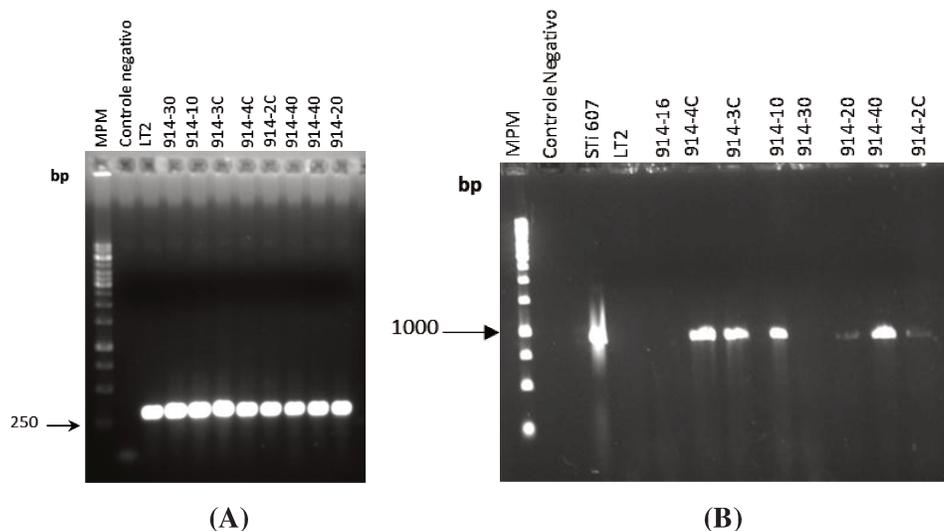


Figura 26. Detecção dos genes (A) *fljA* e (B) *fljB* por PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- obtidas do laboratório AVIPA, utilizando o par de *primers* FljA_280 e FljB2. Tamanho dos *amplicons* são de 280 bp e 920 bp, respectivamente. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1ª coluna de cada gel.

Os resultados sorológicos das amostras aviárias mostraram-se como variantes monofásicas de *S. enterica* Typhimurium. No entanto, a amplificação do gene *fljA* para todas amostras e algumas para o gene *fljB* sugerem um padrão de deleção diferente aos isolados humanos. Trabalhos prévios citam a presença de amostras ditas como “inconsistentes”. Soyer et al. (34) cita a presença de amostras inconsistentes em seu banco de culturas, na qual encontrou amostras classificadas como monofásicas em uma etapa de identificação, mas que se mostraram como Typhimurium na fase subsequente. Outros trabalhos também já citam a presença de amostras “inconsistentes” como Bugarel et al. (52) e Hopkins et al. (53). Tais amostras apresentam-se nos testes sorológicos como monofásicas, mas estudos moleculares mostram que elas possuem um padrão atípico de deleção.

Dessa forma, estas amostras podem ser tidas como “inconsistentes”. Uma nova rodada de identificação sorológica para confirmar a não inversão de fase e estudos moleculares adicionais são necessários para uma melhor caracterização desses isolados.

4.5.2. Duplex PCR

Os *primers* utilizados para amplificação dos genes pertencentes ao *operon fljBA* nas amostras monofásicas apesar de se mostrarem eficazes quanto na discriminação de amostras monofásicas, ainda podem gerar dúvidas uma vez que a ausência de amplificação pode ser decorrente de uma má qualidade do DNA genômico utilizado como molde na reação de PCR. A integridade do DNA genômico extraído e a presença de contaminantes podem agir como interferentes na reação de PCR, obtendo-se resultados falso-negativos em decorrência desses fatores e não pela ausência do *operon fljBA*.

Para diferenciar amostras de *S. enterica* monofásicas de amostras pertencentes ao sorovar Typhimurium, os *primers* para *fljA* foram acrescentados a reação com os *primers* ST_STi obtendo-se um PCR duplex. Logo, para amostras monofásicas houve amplificação de um fragmento de aproximadamente 719 bp e sem amplificação para o gene *fljA*, já as amostras Typhimurium, não houve a amplificação da região específica de inserção (STM1053-1997), mas houve a amplificação de aproximadamente 280 bp referente ao gene *fljA*. A Figura 27 mostra os resultados obtidos confirmando a especificidade dos *primers* testados.

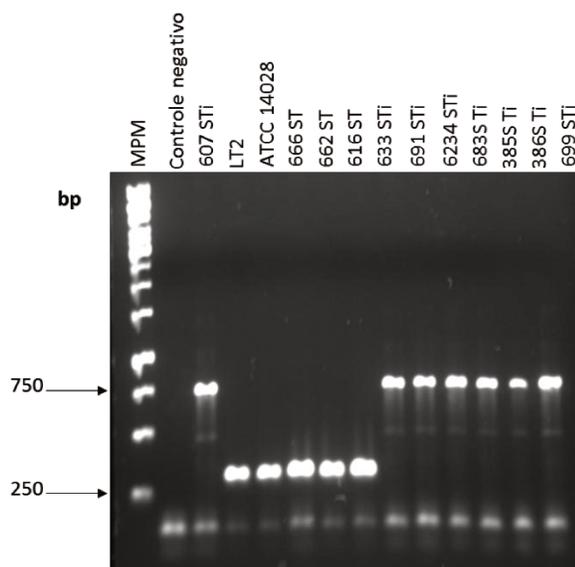


Figura 27. Duplex PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:-, utilizando dois pares de *primers* FljA_280 e ST_STi. Tamanho do *amplicon* é de 280 bp para amostras bifásicas 719 bp para monofásicas. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1ª coluna de cada gel.

A região STM1053-1997 foi descrita por Soyer et al. (34) e refere-se a região próxima ao gene *hin*, presente apenas no genoma do clone americano de *S. enterica* I 4,[5],12:i:-, substituindo uma sequência de aproximadamente 70 kb (incluindo o genoma de Fels-2 e o operon *fljBA*). Neste mesmo trabalho os autores mostraram as diferenças de deleção entre o clone americano e quatro amostras espanholas, sugerindo que as variantes monofásicas representam clones múltiplos com distribuição geográfica distinta. Como exemplo, nas amostras americanas, os genes *hin* e *iroB* estão presentes, mas encontram-se ausentes nas amostras espanholas.

O surgimento desses dois clones também parece ter ocorrido por eventos distintos. No clone americano, a sequência STM1053-1997 (aproximadamente 7 kb) inclui sequências codificadoras de genes com similaridade ao genoma de Fels-2 (STM2704 e STM2706) e três genes homólogos a genes do profago Gifsy-2 e a um componente da DNA polimerase V (*umuC*). A presença dessa região sugere que a deleção em amostras americanas pode ter sido causada pela excisão imprecisa de um profago, fato que explicaria o surgimento do clone americano de *S. enterica* I 4,5,12:i:-.

Em contrapartida a hipótese do surgimento pela excisão de um profago no clone americano, o clone espanhol parece ter sido devido a um elemento transponível chamado IS26. Elementos transponíveis são associados com rearranjos cromossômicos como deleções, duplicações, inversões e outros eventos genéticos e IS26 provavelmente possui um papel importante na geração de variedades monofásicas espanholas (37).

Dessa forma, pelos resultados obtidos, as amostras brasileiras parecem seguir o padrão de deleção americano dado que a região alvo dos *primers* ST_STi correspondem a região STM1053-1997 e os genes *hin* e *iroB* encontram-se presentes. O surgimento do sorotipo monofásico parece ser um evento raro e sua distribuição em diferentes países é provavelmente devido a características adaptativas aos diferentes ambiente e/ou hospedeiros.

As amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- antes caracterizadas como “inconsistentes” neste estudo também foram amplificadas com os *primers* ST_STi. O resultado apresentado é mostrado na Figura 28.

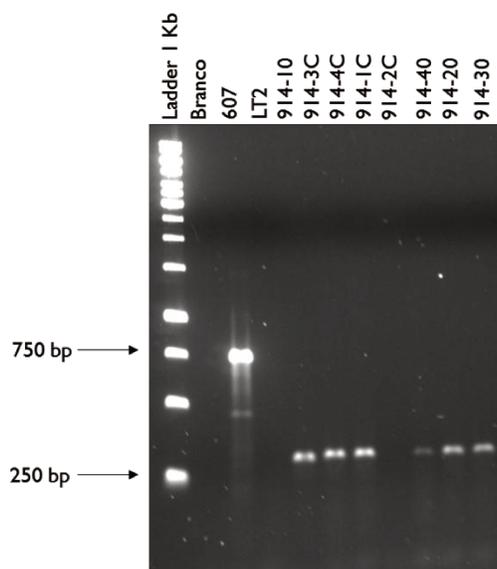


Figura 28. Detecção da região de deleção do operon *fljBA* em amostras obtidas do laboratório AVIPA, utilizando o par de *primers* ST_STi. 607STi foi utilizado como controle positivo e LT2 como controle negativo. Tamanho do *amplicon* é de 719 bp. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas®) mostrado na 1ª coluna.

Os resultados obtidos mostraram uma amplificação de tamanho não esperado, cerca de 250 bp. Desta forma, estudos adicionais são necessários para melhor caracterizar essas amostras do ponto de vista do operon *fljBA*.

O Duplex-PCR também foi testado com vários sorotipos como mostram os resultados da Figura 29.

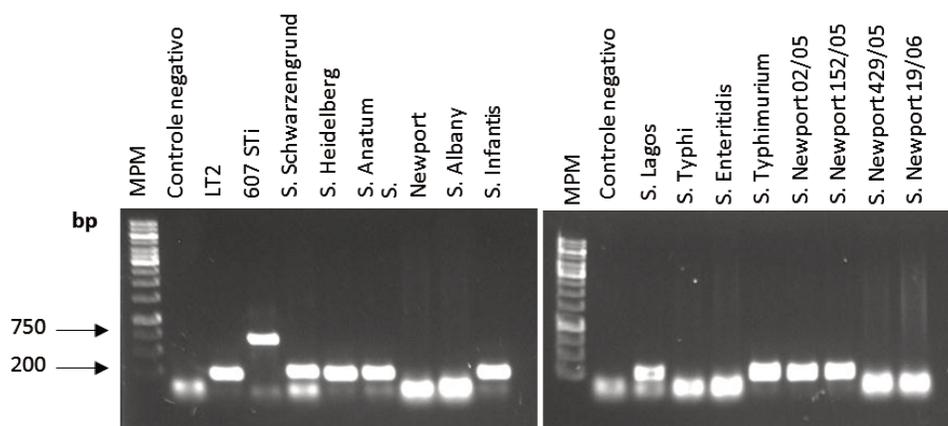


Figura 29. Duplex PCR em amostras de *S. enterica* (diferentes sorovariedade), utilizando dois pares de *primers* FljA_280 e ST_STi. Tamanho do *amplicon* é de 280 bp para amostras bifásicas 719 bp para monofásicas. STi 607 foi utilizado como controle dos *primers* ST_STi. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1ª coluna de cada gel.

Apesar do PCR Multiplex ter sido desenhado com o intuito de discriminar variantes monofásicas de Typhimurium, o PCR Duplex foi testado com diferentes sorovares a fim de verificar possíveis amplificações inespecíficas pelos *primers* ST_STi. O alinhamento do gene *fljA* da *S. enterica* Typhimurium LT2 (utilizado para o desenho dos *primers*) foi comparado por BLAST com o banco de dados genômico do NCBI, mostrando identidade de 100% para as amostras *S. enterica* Heidelberg, *S. enterica* Schwarzengrund, *S. enterica* Newport e *S. enterica* Typhimurium (dados não mostrados). Os resultados mostram que houve amplificação em *S. enterica* Anatum, *S. enterica* Lagos e *S. enterica* Infantis, sorotipos que ainda não possuem sequencia genômica no NCBI. Duas amostras de Newport, no entanto, não tiveram amplificação de *fljA*. Por se tratar de isolados de aves, novos testes devem ser realizados para confirmação dos sorotipos. Os resultados, portanto, corroboram com os alinhamentos feitos com o gene *fljA* e como não houve amplificação na região para STi, os *primers* testados se mostraram específicos para *S. enterica* I 4,[5],12:i:- sendo possível discriminá-la entre vários sorovares.

4.5.3. Inversão do fragmento *hin* em amostras monofásicas

Considerando que o fragmento H e o gene *hin* permanecem intactos no chamado clone Americano/Brasileiro de *S. enterica* I 4,[5],12:i:-, uma pergunta que fizemos foi se este fragmento mantém a capacidade de inversão nessas amostras, uma vez que com a deleção de *fljB* e *fljA*, ao menos em teoria, o gene *hin* não tem mais função biológica. Assim, *primers* foram desenhados de tal forma a determinar esta orientação (Figura 12).

Os *primers* desenhados para a determinação da orientação de *hin* por PCR nas amostras monofásicas foram inicialmente testados usando DNA genômico das linhagens 607STi e 691STi (dados não mostrados). De fato, análises das sequências genômicas indicaram que o fragmento *hin* estava em direções opostas nessas duas linhagens. Esses dados foram confirmados por PCR para estas duas linhagens (Figura 30) e foram testados para outras linhagens de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (Figura 31).

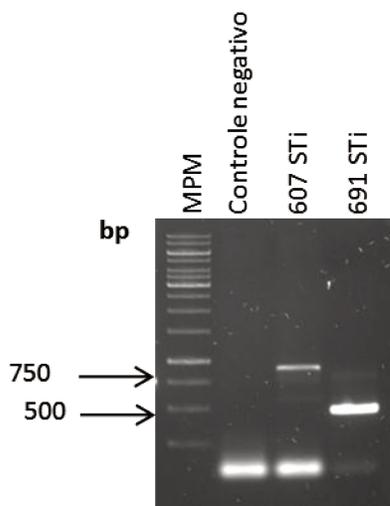


Figura 30. Detecção da posição do gene *hin* por PCR em amostras de *Salmonella* monofásicas STi 607 e STi 691, utilizando o três *primers* Hin_DF. Tamanho do *amplicon* é de 424 bp para posição “off” e 718 bp para posição “on”. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1^o coluna.

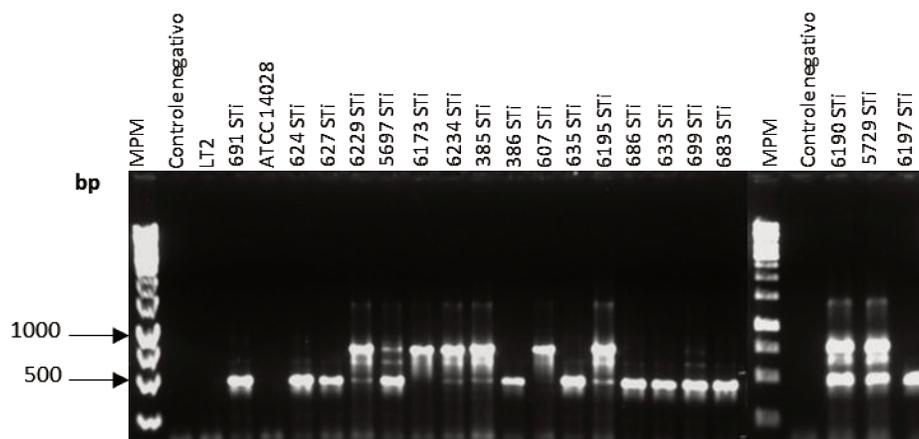


Figura 31. Detecção da posição do gene *hin* por PCR em amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (STi), utilizando o três *primers* Hin_DF. Tamanho do *amplicon* é de 424 bp para posição “off” e 718 bp para posição “on”. Como controle negativo, a reação ocorreu sem a adição de DNA genômico. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb (Fermentas ®) mostrado na 1º coluna.

Nota-se uma variação na posição do fragmento *hin*, sendo que em algumas linhagens, *hin* parece se apresentar nas 2 posições, o que sugere que mesmo sem a presença de *fljA* e *fljB*, *hin* continua funcional.

5. DISCUSSÃO

Salmonella enterica I 4,[5],12:i:- é considerado um patógeno emergente, associado a casos de infecção em humanos, outros mamíferos e aves em diferentes países e continentes, alcançando índices de prevalência elevados em todo o mundo (29, 30, 32, 33, 36). Ao menos dois eventos moleculares distintos e independentes parecem ter originado este novo sorovar, ambos envolvendo deleção do *operon fljBA*. Desta forma, dois clones bacterianos de origem provavelmente distinta foram reconhecidos neste sorovar, o clone Americano (US) e o clone Espanhol (34, 37). De um modo geral, a identificação deste sorovar é baseada em estudos sorológicos (ausência da expressão do flagelo de fase II) e por PCR, onde a presença dos genes *fljB* e *fljA* são pesquisadas (29, 31, 46). No entanto, para muitas amostras, não existem estudos mais profundos sobre os eventos moleculares que levaram a não variação de fase. Em alguns casos, amostras “inconsistentes”, positivas para *fljB* e *fljA*, mas incapazes de expressar o antígeno flagelar de fase II foram descritas (52, 53), o que abre a possibilidade de eventos moleculares distintos aos descritos até o momento, estarem associados ao surgimento desse sorovar (34). O aparecimento e as altas prevalências alcançadas por *Salmonella enterica* I 4,[5],12:i:- em diferentes países e continentes levou-nos a levantar a hipótese de que a região genômica onde se localiza o *operon fljBA* seria instável e apresentaria uma alta frequência de recombinação. Reforçando esta hipótese alia-se o fato deste *operon* estar próximo a genes de fagos e transposases (como os genes STM2769, STM2768 e STM2765). STM 2769 e STM2768 codificam o elemento IS3, na qual contribui nos eventos de deleção (54). Já STM2765 contém o sítio *Helix-turn-helix* (HTH_Hin_like) auxiliar na inversão da proteína Hin e outras proteínas relacionadas (55). DNA móveis que podem contribuir no processo de recombinação e, consequentemente, deleção de *fljBA*. A ocorrência de mutações mediadas por fagos e transposons já é bem conhecido na literatura, como os casos de resistência a antibióticos por inserção de elementos transponíveis como o Tn10, na qual possui o gene de resistência a Tetraciclina (56) ou o transposon Tn554 na qual confere resistência a eritromicina e espectinomicina em *Staphylococcus aureus* (57). Podemos citar ainda os genes que codificam toxinas, adesinas ou outros fatores de virulência na qual foram transmitidos por elementos de transposição ou bacteriófagos. Tais genes são normalmente encontrados em regiões particulares do cromossomo bacteriano, denominado ilhas de patogenicidade (IP)

(9). Em *S. enterica* foram identificados grandes agrupamentos de genes de virulência, denominadas SPI (“*Salmonella Pathogenicity Island*”). Essas regiões contêm sequências de inserção (IS) e, dependendo da bactéria, apresentam elevada frequência de deleção. Possuem muitos sítios para bacteriófagos e genes crípticos indicando que eram capazes de se espalhar por transferência horizontal entre populações bacterianas, fato que contribuiu com a evolução microbiana (58).

As descrições realizadas por Soyer et al. (34) sugerem que a deleção de *fljBA* e que deu origem a *S. enterica* I 4,[5],12:i:- (clone US) é decorrente da excisão errônea de profagos. A deleção nessas amostras envolve uma sequência de aproximadamente 70 kb. Em seu lugar existe uma inserção de aproximadamente 7 kbs denominada STM1053-1997. A análise da sequência desta inserção indica a presença de genes com similaridade ao genoma dos fagos Fels-2 e Gifsy-2, razão pela qual neste estudo foram realizados os ensaios de indução de fagos seguido de avaliação da integridade do *operon fljBA*. Garaizar et al. (37) mostram a inserção de um elemento transponível IS26, importante na transferência horizontal entre microrganismos (38), ao lado da região de deleção do *operon fljBA* em clones Espanhóis, sugerindo que esse transposon esteja fortemente relacionado ao evento de deleção.

Desta forma, em nosso estudo, construímos linhagens de *S. enterica* Typhimurium contendo gene de resistência ao cloranfenicol ao lado de *fljA*. O intuito desta construção foi possibilitar o acompanhamento de recombinações nesta região associados à deleção do *operon fljBA*. Neste caso, linhagens com deleções nessa região perderiam a resistência ao cloranfenicol. Para isso, as linhagens recombinantes de *S. enterica* Typhimurium foram crescidas sob diferentes condições de cultivo, a fim de verificar esses eventos. No entanto, a perda desta região genômica não foi observada nos ensaios realizados mesmo com mais de 4500 colônias testadas nos diferentes testes, evidenciando que a região compreendendo o *operon fljBA*, ao contrário de nossa hipótese inicial, não parece estar em um “ponto quente” de recombinação.

Estudos moleculares prévios baseados em análises por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Multiple Loci Vntr Analysis* (MLVA) e PCR (34, 38) mostraram certo grau de similaridade entre isolados de *S. enterica* I 4,[5],12:i:-, o que sugere que estas amostras descendem de poucos clones distintos, fato este que advoga contrariamente ao

surgimento deste sorovar em diferentes ocasiões, em diferentes regiões e de diferentes clones. A deleção do *operon fljBA* parece ser portanto um evento raro, não diferindo muito de outras regiões do genoma. Estas observações levam a outras perguntas não menos importantes para o entendimento da biologia deste novo sorovar. A variação de fase flagelar é considerada uma característica de valor adaptativo, particularmente na relação de *S. enterica* com o hospedeiro, uma vez que estando envolvida com a expressão de um importante antígeno, confere um mecanismo de escape do sistema imunológico. No entanto, o surgimento e a disseminação deste sorovar em diferentes regiões do globo, associado a infecções em humanos e outros animais, indica que a variação de fase flagelar não é uma característica essencial para a virulência e/ou disseminação dessa bactéria. Existe a possibilidade de que os clones de *S. enterica* que deram origem a este sorovar apresentem características biológicas compensatórias à ausência da variação antigênica flagelar. Estas questões, no entanto, precisam ser investigadas em maior profundidade. O fato é que muito provavelmente as linhagens de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- que circulam hoje no mundo parecem ser todas originárias de dois clones distintos e com alto sucesso evolutivo.

O segundo objetivo de nosso estudo foi o desenvolvimento de um PCR-Duplex para identificação e diferenciação de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- de outros sorovares, particularmente *S. enterica* Typhimurium. Os *primers* propostos em outros trabalhos baseiam-se na identificação de variantes monofásicas pela não amplificação das regiões alvo, ou seja, a ausência de *amplicons* para os genes *fljA* e *fljB*. No entanto, casos de amplificação negativa podem ser em decorrência da má qualidade do DNA ou pela presença de substâncias inibitórias na mistura de reação, ao invés da ausência do(s) gene(s) propriamente dita, o que pode levar a resultados falsos negativos. Dados de nosso Laboratório indicam que amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- que circulam em nosso meio apresentam em sua grande maioria padrão de deleção idêntico ao “clone Americano”. A ausência do *operon fljBA* foi confirmada por PCR nessas amostras. Com base no exposto, o PCR-Duplex aqui proposto foi baseado na detecção da inserção STM1053-1997 (específica de clones Americanos) e o gene *fljA*. Os *primers* assim desenhados mostraram-se eficientes na diferenciação entre amostras monofásicas e Typhimurium. Considerando que os testes sorológicos usados na identificação de um sorovar são laboriosos e muitas vezes a

expressão do antígeno flagelar de fase II é ineficiente, o que pode levar a resultados imprecisos na identificação de sorovares bivalentes (expressão de dois tipos de antígenos flagelares), o PCR-Duplex aqui proposta pode ser muito útil na identificação de amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- e diferenciação deste sorovar de outros sorovares também isolados com frequência, como Typhimurium.

Tendo em vista que a incidência de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- tem aumentado consideravelmente nos últimos anos sendo responsável por diversos surtos ao redor do mundo, a obtenção de uma técnica rápida e acurada para a diferenciação entre sorovariedades de *S. enterica* é de extrema importância para um melhor manejo da doença.

Durante as reações de PCRs, foi verificado pela primeira vez em nosso meio a existência de amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- isoladas no Brasil com padrão de deleção diferente daquele descrito na literatura, ou seja, positivas para *fljA* e negativas para *fljB* ou vice-versa. Esses resultados podem ser devido a ausência do gene ou a existência de *mismatch* na sequência de anelamento dos *primers*. Dessa forma, mais estudos são necessários para melhor caracterizar tais amostras.

A terceira característica biológica de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- avaliada neste presente estudo foi a funcionalidade do gene *hin* nessas amostras. Como o gene *hin* é o responsável pela variação de fase flagelar, a perda de função poderia explicar o surgimento de amostras monofásicas. Se este fragmento eventualmente se estabilizasse na posição “off”, os genes *fljB* e *fljA* não seriam mais expressos, aliviando as pressões seletivas no sentido de mantê-los. Assim, a deleção de *fljBA* seria precedida de mutações em *hin* que impediriam a variação de fase. Por outro lado, uma questão por nós levantada é que, dada a perda dos genes *fljA* e *fljB*, *hin* perderia sua principal função biológica e, neste caso, é esperado que mutações subsequentes ocorreriam de tal forma a levar a não inversão do fragmento H. Nossos dados, no entanto, indicam que *hin* continua funcional. De fato, o sequenciamento genômico recente de 3 amostras de *S. enterica* I 4,[5],12:i:- por nosso grupo indicaram que em ao menos uma delas, o fragmento H estava invertido. Considerando-se que as amostras monofásicas surgiram em tempo recente, se considerada a escala evolutiva, é possível que ainda não decorreu tempo hábil suficiente para o aparecimento de mutações secundárias na recombinase *hin* associadas a perda de função, uma vez que não é mais necessária para o controle da variação de fase flagelar. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de

hin apresentar outras funções além da variação de fase flagelar. Neste caso, pressões seletivas seriam favoráveis a manutenção de sua função, mesmo na ausência de *fljA* e *fljB*. Estudos adicionais são necessários para melhor elucidar esta questão.

6. CONCLUSÕES

Os resultados “in vitro” e “in vivo” com as linhagens de *S. enterica* Typhimurium recombinantes (Cm^r) aqui construídas indicam que a perda do *operon fljBA* é um evento raro, mesmo sob condições de indução de profagos;

Nossos dados sugerem que poucos clones de *S. enterica* Typhimurium deram origem a *S. enterica* I 4,[5],12:i:-. Desta forma, nossa hipótese para uma origem policlonal deste sorovar não se confirma. O surgimento e a disseminação desse novo sorovar devem estar relacionados a outras características desses clones, que conferem um alto valor adaptativo. Se tais características estão relacionadas à ausência da variação de fase flagelar, esta é uma questão que está ainda em aberto.

Este estudo descreve, pela primeira vez, a caracterização de amostras *S. enterica* I 4,[5],12:i:- positivas para um dos genes do *operon fljBA*, mas negativa para o outro, ao menos quando avaliadas por PCR. Essas amostras podem apresentar eventos moleculares diversos que explicam a deleção parcial do *operon fljBA* ou mesmo mudanças em sequências alvo dos *primers* aqui utilizados. Um estudo mais amplo dessas amostras é necessário.

Descrevemos um PCR-Duplex que foi eficiente na identificação de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- e na diferenciação desta de *S. enterica* Typhimurium, podendo ser usado como um complemento ao sistema de identificação sorológica clássico.

Os dados que indicam a manutenção funcional da recombinase na inversão do fragmento *hin* indicam que a hipótese da deleção dos genes *fljBA* ser precedida da perda funcional de *hin* deve ser refutada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CDC. National *Salmonella* Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
2. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. **Bulletin of the World Health Organization**. 2004. 82(5):346-354.
3. Giannella RA. **Medical Microbiology**. 4ed. Galveston TX: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
4. Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. **Applied and Environmental Microbiology** 2011 77(22):7877-85.
5. Grimont PAD, Weill FX. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**. 9ed. Institute Pasteur. 2007 p.166
6. Liu D, Verma NK, Romana LK, Reeves PR. Relationships among the rfb regions of *Salmonella* serovars A, B, and D. **Journal of Bacteriology**. 1991. 173(15):4814-19.
7. Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. **The Journal of Clinical Investigation**. 2001. 107(7):775-781.
8. Guzman CA, Borsutzky S, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Pearman J, Collioud A, Favre D, Dietrich G. Vaccines against typhoid fever. **Vaccine**. 2006. 24(18):3804-1.
9. Mastroeni P, Maskell D. *Salmonella* infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects. Advances in Molecular and Cellular Microbiology. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2006.
10. Andrews-Polymenis HL, Bäumlér AJ, McCormick BA, Fang FC. Taming the Elephant: *Salmonella* Biology, Pathogenesis, and Prevention. **Infection and Immunity**. 2010. 78(6):2356–69.
11. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infection Diseases**. 1999. 5(5):607-25.
12. Galofré J, Moreno A, Mensa J. Analysis of factors influencing the outcome and development of septic metastasis or relapse in *Salmonella* bacteremia. **Clinical Infections Disease**. 1994 18:873–8.

13. Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi ACR, Dias AMG, De Almeida AZCD, De Melo LCV. *Salmonella* Serovars Isolated From Humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2006. 48(4):179-184.
14. Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Heyderman RS, Gordon MA. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. **Lancet**. 2012. 379:2489-99.
15. Steiner TS. How flagellin and Toll-Like Receptor 5 Contributes to Enteric Infection. **Infection and Immunity**. 2007. 75(2):545-552.
16. Salyers AA, DD Whitt. 2ed. Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach. Washington, DC: ASM Press, 2002.
17. Zeng H, Carlson AQ, Guo Y, Yu Y, Collier-Hyams LS, Madara JL, Gewirtz AT, Neish AS. Flagellin Is the Major Proinflammatory Determinant of Enteropathogenic *Salmonella*. **Journal of Immunology**. 2003 171:3668-74.
18. Tallant T, Deb A, Kar N, Lupica J, Veer M, DiDonato JA. Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF- κ B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. **BMC Microbiology**. 2004. 4(33):1-24.
19. Suzuki T, Lino T, Horiguchi T, Yamaguchi S. Incomplete Flagellar Structures in Nonflagellate Mutants of *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. 1978. 33(2):904-915.
20. Yonekura K, Maki S, Morgan DE, DeRosier DJ, Vonderviszt F, Imada K, Namba K. The Bacterial Flagellar Cap as the Rotary Promoter of Flagellin Self-Assembly. **Science** 2000. 290:2148-52.
21. Gewirtz AT, Simon P, Schmitt CK, Taylor LJ, Hagedorn CH, O'Brien AD, Neish AS, Madara JL. *Salmonella Typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. **Journal of Clinical Investigation**. 2001. 107:99-109.
22. Kutsukake K, Nakashima H, Tominaga A, Abo T. Two DNA Invertases Contribute to Flagellar Phase Variation in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain LT2. **Journal of Bacteriology**. 2006. 188(3):950-957.
23. Yamamoto S, Kutsukake K. FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**. 2006. 188:958-967.
24. Bonifield HR, Hughes KT. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. **Journal of Bacteriology**. 2003. 185:3567-74.

25. Heichman KA, Johnson RC. The Hin invertasome: protein mediated joining of distant recombination sites at the enhancer. **Science**. 1990 249:511–7.
26. Silverman M, Zieg J, Simon M. Flagellar phase variation: isolation of the *rhl* gene. **Journal of Bacteriology**. 1979. 137:517–523.
27. Symonds N, Coelho A. Role of the G segment in the growth of phage Mu. **Nature**. 1978. 271:573–4.
28. Tavechio AT, Fernandes SA. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 1996. 38(5):315-322.
29. Tavechio AT, Ghilardi ACR, Fernandes SA. “Multiplex PCR” Identification of the Atypical and Monophasic *Salmonella* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- in São Paulo State, Brazil: Frequency and Antibiotic Resistance Patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2004. 46(2):115-117.
30. Amavisit P, Boonyawiwat W, Bangtrakulnont A. Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Monophasic *Salmonella* Serovar 1,4,[5],12:i:- Isolates in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**. 2005 43(6):2736–40.
31. Echeita MA, Usera MA. Rapid identification of the *Salmonella* spp. phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using “Multiplex PCR.” **Research Microbiology**. 1998. 149(10):757–761.
32. Echeita EA, Herrera S, Sera MS. Atypical, *fljB*-Negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Strain of Serovar 4,5,12:i:2 Appears To Be a Monophasic Variant of Serovar Typhimurium. **Journal of Clinical Microbiology**. 2001. 39(8):2981–3.
33. Agasan A, Kornblum J, Williams G, Pratt C, Fleckenstein P, Wong M, Ramon L. Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) serotype 4,5,12:i:- strains causing food-borne infections in New York City. **Journal of Clinical Microbiology**. 2002. 40(6):1924-9.
34. Soyer Y, Switt AM, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, Dumas NB, Root T, Warnick LD, Gröhn YT, Wiedmann M. *Salmonella enterica* Serotype 4,5,12:i:-, an Emerging *Salmonella* Serotype that Represents Multiple Distinct Clones. **Journal of Clinical Microbiology**. 2009. 47(11):3546-3556.
35. Mossong J, Marques P, Ragimbeau C, Huberty-Krau P, Losch S, Meyer G, Moris G, Strottner C, Rabsch W, Schneider F. Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg. **European Surveillance**. 2006 12(6):E11-12.

36. Moreno-Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. Emergence, Distribution, and Molecular and Phenotypic Characteristics of *Salmonella enterica* Serotype 4,5,12:i:-. **Foodborne Pathogens and Diseases**. 2009. 6(4):407-15.
37. Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Mei-Yi R, Frye J, Usera MA, Garaizar MM. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. **Journal of Clinical Microbiology**. 2002. 40(6):2074-8.
38. Laorden L, Herrera-León S, Martínez I, Sanchez A, Kromidas L, Bikandi J, Rementeria A, Echeita A, Garaizar J. Genetic Evolution of the Spanish Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- Monophasic Variant. **Journal of Clinical Microbiology**. 2010. 48(12):4563-4566.
39. Dionisi AM, Carattoli A, Luzzi I, Magistrali C, Pezzotti G. Molecular genotyping of *Salmonella enterica* Abortusovis by pulsed field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**. 2006. 116:217-223.
40. Kérouanton A, Marault M, Lailier R, Weill FX, Feurer C, Espié E, Brisabois A. Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella enterica* serotype discrimination. **Foodborne Pathogens Diseases**. 2007. 4(3):293-303.
41. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, Garaizar J. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of *Salmonella* in Human Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**. 2004. 42(4):1734-8.
42. Sukhnanand S, Alcaine S, Wan-Lin Su LDW, Hof J, Craver MPT, McDonough P, Boor KJ, Wiedmann M. DNA Sequence-Based Subtyping and Evolutionary Analysis of Selected *Salmonella enterica* Serotypes **Journal of Clinical Microbiology**. 2005. 43(8):3688-98.
43. Harbottle H, White DG, McDermott PF, Walker RD, Zhao S. Comparison of Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Antimicrobial Susceptibility Typing for Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. 2006. 44(7):2449-2457.
44. Octavia S, Lan R. Single-nucleotide-polymorphism typing and genetic relationships of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. 2007. 45(11):3795-3801.
45. Malorny B, Junker E, Helmuth H. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **BMC Microbiology**. 2008. 8:84-92.
46. Kim S, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ. Multiplex PCR-Based Method for Identification of Common Clinical Serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. **Journal of Clinical Microbiology**. 2006. 44(10):3608-3615.

47. Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH, Brisse S. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. **PLoS Pathogens**. 2012 8(6):1-19.
48. Datsenko K, Warner L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 2000. 97(12):6640-5.
49. Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning*. 3 ed. 3 vol. Cold Spring: Harbor Laboratory Press, New York.
50. Abbott JC, Aanensen DM, Bentley SD. WebACT: an online genome comparison suite. **Methods of Molecular Biology**. 2007. 395:57-74.
51. Frye JG, Porwollik S, Blackmer F, Cheng P, McClelland M. Host Gene Expression Changes and DNA Amplification during Temperate Phage Induction. **Journal of Bacteriology**. 2005. 187(4):1485-92.
52. Bugarel M, Granier SA, Bonin E, Vignaud ML, Roussel S, Fach P, Brisabois A. Genetic diversity in monophasic (1,4,[5],12:i:- and 1,4,[5],12:-:1,2) and in non-motile (1,4,[5],12:-:) variants of *Salmonella enterica* S. Typhimurium. **Food Research International**. 2012. 45(2):1016–24.
53. Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, Granier SA, Lucarelli C, Porrero MC, Jakubczak A, Threlfall EJ, Mevius DJ. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? **Eurosurveillance**. 2010. 15(22):19580-19589.
54. Sekine Y, Eisaki N, Ohtsubo E. Translational control in production of transposase and in transposition of insertion sequence IS3. **Journal of Clinical Microbiology**. 1994. 235(5):1406-20.
55. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L *et al*. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**. 2001. 413:852-6.
56. Gray YHM. It takes two transposons to tango. **Trends Genetic**. 2000. 16:461–468.
57. Murphy E, Huwyler L, Bastos MCF. Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. **EMBO Journal**. 1985. 4(12): 3357–3365.
58. Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**. 1997. 23(6):1089–97.

ADENDO 1

Ágar MacConkey

20 g de Peptona

10g de Lactose

5 g de Sais Biliares

5 g de Cloreto de Sódio

0,075 g de Vermelho Neutro

12 g de Ágar

1000 mL de água destilada q.s.p.

pH = 7,4± 0,2

O meio de cultura acima já possui formulação pronta. Utilizou-se o meio da marca Oxoid, pesando-se 5,2 g para cada 100 mL de água. Autoclavou-se o meio a 121° C por 20 minutos.

Meio Luria Bertani (LB)– Caldo

Componentes da fórmula

10 g de Peptona

5 g de Cloreto de Sódio

5 g de Extrato de Levedura

1000 mL de água destilada q.s.p.

Autoclavou-se o meio a 121° C por 20 minutos.

Meio Luria Bertani (LB) – Ágar

Utilizaram-se os mesmos componentes e procedimento do meio LB Caldo acrescentando-se mais 1,5% de ágar bacteriológico.

Meio SOC

Componentes da fórmula

2 g de Triptona

0,5 g de Extrato de levedura

0,05 g de Cloreto de Sódio

Dissolveram-se os componentes acima em 90 mL de água e adicionou-se 1 mL de Cloreto de Potássio (250 mM). Ajustou-se o pH para 7,0 com Hidróxido de Sódio (5 N). Completou-se o volume para 100 mL. Autoclavou-se o meio a 121° C por 20 minutos. Pouco antes do uso adicionou-se 2 mL de glicose (1 M).

Meio SS (*Salmonella-Shigella*)

Componentes da fórmula

5,0 g de `Lab-Lemco` powder

5,0 g de Peptona

10,0 g de Lactose

8,5 g de Sais biliares

10,0 de Citrato de sódio

8,5 g de Tiosulfato de Sódio

1,0 g de Citrato férrico

0,33 mg de Verde Brilhante

25 mg de Vermelho Neutro

15 g de Agar

1000 mL de água destilada q.s.p.

pH = 7,0 ± 0.2

O meio de cultura acima já possui formulação pronta. Utilizou-se o meio da marca Oxoid, pesando-se 6,0 g para cada 100 mL de água. Aqueceu-se a solução em micro-ondas até a completa dissolução do ágar. Verteu-se o meio em placas de petri. O meio SS não pode ser autoclavado, pois possui componentes em sua formulação que degradam com o aquecimento.

Mint Green Agar

Componentes – Preparo A

10 g de Triptona

5 g de Extrato de Levedura

5 g de Cloreto de Sódio

2,5 g de Glicose

15 g de Ágar

500 mL de água destilada q.s.p.

Dissolveram-se os componentes acima em água e autoclavou-se a solução a 121 °C por 20 minutos.

Componentes – Preparo B

0,5 g de Fosfato de Potássio Tribásico

500 mL de água destilada q.s.p.

Dissolveu-se o componente acima em água e autoclavou-se a solução a 121 °C por 20 minutos.

Aguardou-se os meios resfriarem até aproximadamente 60° C e adicionou-se o preparo B ao preparo A. Adicionou-se 1,25 mL de Solução estoque Evans Blue 1% (p/v) e 2,5 mL de Solução estoque de uranina 1% (p/v).

Solução de Ampicilina

Preparou-se uma solução estoque de 50 mg/mL em água destilada q.s.p. utilizando-a para concentrações finais de meio a 0,1 mg/mL.

Solução de Cloranfenicol

Preparou-se uma solução estoque de 50 mg/mL em etanol p.a. utilizando-a para concentrações finais de meio a 25 µg/mL.

Solução de Mitomicina

Preparou-se uma solução estoque de 0,5 mg/mL em água destilada q.s.p. utilizando-a para concentrações finais de meio a 2 µg/mL.

Solução Salina

Componentes

0,9 g de Cloreto de Sódio

100 mL de água destilada q.s.p.

Dissolveu-se o componente acima em água e autoclavou-se a 121 °C por 20 minutos.

Tampão PBS

Componentes

8g de Cloreto de Sódio

0,2 g de Cloreto de Potássio

0,24 g de Fosfato de Potássio

1,44 g de Fosfato de Sódio

Ácido Clorídrico para acerto de pH

800 mL de água destilada q.s.p.

Dissolveram-se os componentes acima em água e o pH foi ajustado para 7,4 pela adição de Ácido Clorídrico. Completou-se o volume para 1000 mL. Autoclavou-se a 121 °C durante 20 minutos.

Tampão TAE (50 x)

Componentes

121 g de Tris base

26,55 mL de Ácido Acético Glacial

50 mL de EDTA (0,5 M)

500 mL Água destilada q.s.p 500 mL

Dissolveram-se os componentes acima em água e armazenou-se a 4 °C. Para solução de trabalho e corrida fez-se diluição da solução estoque em 50X (Por exemplo: para 20 mL de solução estoque, completou-se o volume para 1000 mL com água destilada).

EDTA 0,5M

Componentes

186,1 g de EDTA.2.H₂O

800 mL de água destilada q.s.p.

20 g de Hidróxido de sódio

Dissolveu-se o EDTA em água e acertou-se o pH acrescentando-se uma pastilha de Hidróxido de sódio até atingir o pH = 8,0.

ADENDO 2



CEUA/Unicamp

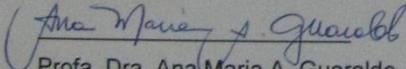
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

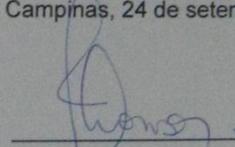
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "A origem da Salmonella enterica sorotipo 4,[5],12:i:- no Brasil" (protocolo nº 2873-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcelo Brocchi / Meire Priscilla Ota, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 24 de setembro de 2012.

Campinas, 24 de setembro de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>