



ADRIANE CRISTINA SARTI SPROGIS

**Papel dos Bacteriófagos na Dinâmica
Populacional de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- e
de *S. enterica* Enteritidis**

**Campinas
2014**



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas

ADRIANE CRISTINA SARTI SPROGIS

**Papel dos Bacteriófagos na Dinâmica
Populacional de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- e de *S.
enterica* Enteritidis**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Bueno Gregoracci

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em Clínica Médica
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Mestra em Clínica Médica, área de
concentração Clínica Médica*

Este exemplar corresponde à versão
final da dissertação defendida por
Adriane Cristina Sarti Sprogis, e orientada
pelo Prof. Dr. Marcelo Brocchi.

Assinatura do Orientador

Campinas
2014

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

Sa77p Sarti Sprogis, Adriane Cristina, 1967-
Papel dos bacteriófagos na dinâmica populacional de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- e de *S. enterica* Enteritidis / Adriane Cristina Sarti Sprogis. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marcelo Brocchi.

Coorientador: Gustavo Bueno Gregoracci.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Salmonella enterica* Enteritidis. 2. *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:-. 3. Variação de fase flagelar. 4. Bacteriófagos. I. Brocchi, Marcelo, 1967-. II. Gregoracci, Gustavo Bueno. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: A possible role of bacteriophage in the *Salmonella enterica* populational dynamics : *S. enterica* I,4,[5],12:i:- and Enteritidis as models

Palavras-chave em inglês:

Salmonella enterica Enteritidis

Salmonella enterica I,4,[5],12:i:-

Flagellar phase variation

Bacteriophages

Área de concentração: Clínica Médica

Títuloção: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Marcelo Brocchi [Orientador]

Wanderley Dias da Silveira

Gerson Nakazato

Data de defesa: 07-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ADRIANE CRISTINA SARTI SPROGIS

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO BROCCHI

COORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO BUENO GREGORACCI

MEMBROS:

1. PROF. DR. MARCELO BROCCHI



2. PROF. DR. WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA



3. PROF. DR. GERSON NAKAZATO



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

Data: 07 de fevereiro de 2014

Dedicatória

Ao meu querido marido, companheiro, e, acima de tudo, amigo Roberto, pelo amor, paciência, compreensão, apoio, incentivo e por estar ao meu lado nesta fase de minha vida e às minhas filhas Isabel e Lídia, também pelo apoio, paciência, amor e alegria que os filhos proporcionam, e são essenciais para uma vida plena.
Ao meu pai Eraldo e à minha mãe Palmira (in memoriam), pelo amor, carinho e exemplo de vida que sempre me guiaram, e à minha mãezinha do coração, Célia, pelo amor e amizade.

Em primeiro lugar
A Deus em seu Filho, pois todas as coisas foram feitas por intermédio Dele e sem Ele nada
do que foi feito se fez... Jo 1:3.

Reconhecimento Especial
Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Brocchi, que, mais que me orientar, me acolheu e conduziu nestes anos, com carinho, paciência e amizade.

Agradecimentos

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Gustavo Bueno Gregoracci, que me introduziu no mundo da microbiologia, me ensinando com dedicação e carinho, e sempre me incentivando a continuar.

Ao Prof. Dr. Marcelo Lancelotti, pelas orientações quanto à técnica do RT-PCR e à utilização do equipamento.

À Prof. Dra. Liana, que foi meu primeiro incentivo ao começo dessa jornada.

À Prof. Dra. Clarice Weiss Arns, pelo uso do Laboratório e dos equipamentos com liberdade e confiança.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pela participação e pelos comentários e sugestões em minha qualificação; pelos incentivos, apoio, conselhos e, acima de tudo, por estar torcendo por mim há muito tempo.

Ao Prof. Dr. Alexandre de Oliveira, pela atenção dispensada em minha qualificação e apoio durante sua coordenação no LME.

Às amigas e companheiras de trabalho do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB; as atuais, Stella e Ana (pelo carinho, amizade e paciência) e as que se aposentaram, e continuam presentes no meu coração, Cidinha, Antonia e Maria Aurora.

Aos funcionários do LGBMol Evandro, Izildinha e Sandra, pela colaboração e presteza.

Aos alunos Guilherme e Diego, pelas várias ajudas no laboratório e na formatação da dissertação e do artigo.

À Fernanda, pela ajuda com meus fagos...

Aos amigos e companheiros de Pós do LGBMol, Marcos, Igor, Meire, Bruna Lima, Andréa, Luciana, Catierine, Tamires, Camila, Ana Carolina, Meirile, Jéssica, Luciana, Bruna, e a todos os demais, pelos auxílios, protocolos e momentos de descontração.

À secretária da Pós-Graduação Adriana e ao secretário Bruno, pela ajuda e colaboração.

Meus agradecimentos ao pesquisador Leandro Costa do Nascimento, do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE – UNICAMP), pela montagem do genoma das salmonelas e dos fagos.

À Prof. Dra. Laura Ward, pela confiança, apoio e incentivo na minha pós-graduação.

Ao Danilo Ferrucci, pela ajuda nos gráficos (ficaram ótimos).

Aos amigos que fiz durante esta jornada e que me ouviram, entenderam e apoiaram, especialmente ao Sílvio, que várias vezes me socorreu, e que sempre me fez acreditar que era possível...

E, finalmente, a todos que de alguma forma participaram e me apoiaram neste tempo de pesquisas, trabalhos e aprendizagem, que, mesmo não sendo nomeados, estão em um lugar especial em meu coração, e nas minhas lembranças...

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	CENTÍMETRO
DNA	ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO
DNAse	DESOXIRRIBONUCLEASE
dNTP	DESOXINUCLEOTÍDEO TRIFOSFATO
DO	DENSIDADE ÓTICA
EDTA	ÁCIDO ETILENODIAMINO TETRA-ACÉTICO
G	CONSTANTE GRAVITACIONAL (FORÇA CENTRÍFUGA)
h	HORA
H ₂ O ₂	PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
Kb	KILO BASE (MIL PARES DE BASES NUCLEICAS)
KV	KILOVOLTS
lag	CRESCIMENTO LENTO, ATRASO
LB	MEIO LÚRIA-BERTANI
log	LOGARÍTIMO NA BASE 10
LPS	LIPOPOLISSACARÍDIOS
min	MINUTOS
M	MOLAR
Mb	MEGA BASE (MIL PARES DE BASES NUCLEICAS)
MDI	MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO
mg	MILIGRAMA

mL	MILILITRO
mM	MILIMOLAR
ng	NANOGRAMA
nm	NANÔMETRO
nM	NANOMOLAR
pb	PARES DE BASE NUCLEOTÍDICAS
PA	GRAU DE PUREZA PARA ANÁLISE
PES	POLIETERSULFONA
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
pH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
RNAse	RIBONUCLEASE
RPM	ROTAÇÕES POR MINUTO
RT-PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL
SDS	DODECIL SULFATO DE SÓDIO
SM	TAMPÃO ESPECÍFICO PARA BACTERIÓFAGOS λ
SS	MEIO <i>Salmonella-Shigella</i>
SE	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis
ST	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium
STi	<i>Salmonella enterica</i> I,4,[5],12.:i:- (MONOFÁSICA)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	TAMPÃO TRIS-EDTA
T _m	TEMPERATURA DE ANELAMENTO
U	UNIDADE

UFC	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS
UFP	UNIDADE FORMADORA DE PLACAS
µg	MICROGRAMA
µL	MICROLITRO
µm	MICROMETRO
µM	MICROMOLAR
UV	RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA
V	VOLTS
°C	GRAUS CELSIUS

RESUMO

A salmonelose é uma zoonose que representa um sério problema de saúde pública mundial, devido: à sua alta prevalência, à dificuldade de seu controle, ao seu caráter endêmico, à morbidade e à mortalidade. O conhecimento da ocorrência das diferentes sorovariedades de *S. enterica* em diferentes regiões e países pode ajudar no rastreamento e reconhecimento de patógenos emergentes, e assim implementar políticas de tratamento e prevenção.

A grande maioria das sorovariedades expressa dois tipos diferentes de antígenos flagelares codificados pelos genes *fliC* (fase 1) e *fljB* (fase 2), sendo assim denominadas bifásicas. Contudo, algumas sorovariedades expressam apenas uma das fases, e são denominadas monofásicas. É possível que a variação de fase flagelar em *S. enterica* esteja associada a uma função de escape do sistema imunológico, por aumentar o repertório de antígenos expressos pela célula bacteriana, evitando temporariamente a resposta imune celular. Assim sendo, *S. enterica* bifásicas possuiriam uma vantagem seletiva sobre as monofásicas, porém isso não é totalmente verificado nos estudos epidemiológicos, pois no Estado de São Paulo, *S. enterica* I,4,[5],12:i:-, (monofásica) é uma das mais comumente associadas aos casos de diarreia e/ou infecções sistêmicas em pacientes humanos. De fato, a partir da década de 1990 houve um aumento significativo da *S. enterica* I,4,[5],12:i:- em muitos países.

Sequências de profagos são muito comuns em *S. enterica*, sendo de conhecimento que esses fagos codificam vários fatores que contribuem para

patogenicidade, diversidade genética e/ou características que aumentam o desempenho. Coculturas experimentais de linhagens de *S. enterica* podem induzir espontaneamente profagos, que matam bactérias sensíveis, e assim a indução espontânea de fagos em uma população lisogênica acentua a competitividade entre populações.

Neste estudo foram analisadas culturas puras de *S. enterica* Enteritidis (bifásica) adicionadas de fagos líticos induzidos de *S. enterica* I,4,[5],12:i:-, bem como coculturas entre as duas sorovariedades citadas, nas quais foram observadas induções espontâneas de fagos associados à alta densidade populacional e alterações das taxas de crescimento em ambos os estudos, corroborando a hipótese de que *S. enterica* monofásica pode alterar a dinâmica populacional a seu favor, pela liberação de fagos líticos à outra sorovariedade, interferindo no crescimento populacional de *S. enterica* Enteritidis, e que o sucesso evolutivo de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- pode estar associado a fagos líticos atuando como um regulador na ecologia bacteriana. Esses dados podem mudar nosso conhecimento sobre a interação bactéria-fago de uma simples relação parasita-hospedeiro para uma coevolução de duas vias entre seus genomas.

Palavras chave: *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* I,4,[5],12:i:-, variação de fase flagelar, fagos.

ABSTRACT

Salmonellosis is a zoonosis that is a serious public health problem worldwide, due to its high prevalence, difficulty controlling, their endemicity, morbidity and mortality. The knowledge of the occurrence of different serovars of *S. enterica* in different regions and countries can help in tracking and recognition of emerging pathogens and thus implement policies for treatment and prevention.

The majority of serovars express two different types of flagellar antigens encoded by genes: *fliC* (phase 1) and *fljB* (phase 2), so called biphasic. However, some serovars express only one of the phases and are termed monophasic. It is possible that flagellar phase variation of *S. enterica* is associated with an escape function of the immune system to increase the repertoire of antigens expressed by the bacterial cell temporarily preventing cellular immune response. Thus, *S. enterica* biphasic would have a selective advantage over monophasic, but this is not fully verified in epidemiologic studies, because in the State of São Paulo, *S. enterica* I,4,[5],12:i:-, (monophasic) is the one most commonly associated with cases of diarrhea and/or systemic infections in human patients, in fact, from the 1990s there was a significant increase of *S. enterica* I,4,[5],12:i:- in many countries.

Prophages sequences are very common in *S. enterica*, with the knowledge that these phages encode several factors that contribute to pathogenicity, genetic diversity and/or characteristics that increase fitness. Cocultures experimental strains of *S. enterica* prophages can induce spontaneous, killing susceptible bacteria, and thus the spontaneous induction in a population of lysogenic phage enhances the competitiveness between populations.

This study analyzed pure cultures of *S. enterica* Enteritidis (biphasic) added lytic phage induced from *S. enterica* I,4,[5],12:i:-, as well as cocultures between the two serovars cited where inductions were observed spontaneous phage associated with high population density and changes in growth rates in both studies, supporting the hypothesis that *S. enterica* monophasic can alter the population dynamics to their advantage by releasing lytic phage to another serovar, interfering with the population growth of *S. enterica* Enteritidis and the evolutionary success of *S. enterica* I,4,[5],12:i:- may be associated with lytic phages acting as a regulator in bacterial ecology. These data may change our understanding of bacteria- phage from a simple parasite-host coevolution for a two-way between their genomes.

Keywords: *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* I,4,[5],12:i:-, flagellar phase variation, phages.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12.i:- (STi) utilizadas neste estudo.	54
Tabela 2. Amostras de <i>S. enterica</i> Enteritidis (SE) utilizadas neste estudo	55
Tabela 3. Genes alvos utilizados nos experimento de RT-PCR.....	64
Tabela 4. Iniciadores avaliados para as reações de RT-PCR.....	65
Tabela 5. Teste de suscetibilidade de “fagos” induzidos por Mitomicina C (1%) de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12.i:- (STi) contra <i>S. enterica</i> Enteritidis (SE).....	77
Tabela 6. Teste de suscetibilidade de “fagos” induzidos por mitomicina C (2%) de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12.i:- contra <i>S. enterica</i> Enteritidis (SE).	78
Tabela 7. Teste de suscetibilidade de “fagos” induzidos por H ₂ O ₂ (2mM) de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12.i:- contra <i>S. enterica</i> Enteritidis (SE).....	79
Tabela 8. Teste de suscetibilidade de fagos induzidos por luz ultravioleta de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12.i:- contra <i>S. enterica</i> Enteritidis (SE).....	80
Tabela 9. Teste de suscetibilidade de fagos induzidos por meio pré-condicionado de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12.i:- (STi 633 e STi 691) contra <i>S. enterica</i> Enteritidis (SE 600 e SE 618).	81
Tabela 10. Multiplicidade de Infecção de fagos relativa ao número de células bacterianas determinado por UFC/mL.	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletroforese em gel (2,5%) de agarose demonstrando a amplificação por PCR do gene *fliC* (85 pb). DNA genômico de clones de *E. coli* DH5 α (2, 5, 7, 8, 10) contendo os respectivos fragmentos de DNA clonados no vetor pGEN-t easy Promega, (Madison, EUA). Controle positivo DNA extraído de STi 633 e controle negativo água deionizada, ultrafiltrada e autoclavada..... 69

Figura 2. Eletroforese em gel (2,5%) de agarose demonstrando a amplificação por PCR do gene *prot6E* (69 pb). DNA genômico de clones de *E. coli* DH5 α (2, 5, 7, 8, 10) contendo os respectivos fragmentos de DNA clonados no vetor pGEN-t easy Promega, (Madison, EUA). Controle positivo DNA extraído de STi 633 e controle negativo água deionizada, ultrafiltrada e autoclavada..... 70

Figura 3. Extração de DNA genômico de fagos (fig. 3A) e titulação de partículas virais. (fig. 3B). 3A. Eletroforese em gel de agarose (0,7%) demonstrando a extração de DNA genômico dos bacteriófagos induzidos de *S. enterica* I,4,[5],12.i:- (Saeni 633 e Saeni 691) por Mitomicina C (1%). Como marcador foi utilizado Bacteriófago P22 NCBI NC_002371.2 extraído por método de extração rápida. 3B. Titulação de bacteriófagos (UFP/mL) induzidos de *S. enterica* I,4,[5],12.i:- 633 e 691 por Mitomicina C (1%) contra SE 618 como alvo suscetível 82

Figura 4. Curva de crescimento de linhagens de *S. enterica* ao longo de 24 horas. Figura 4A. Crescimento avaliado por determinação da Unidade Formadora de

Colônias (UFC/mL). Figura 4B. Crescimento avaliado por determinação da densidade ótica (DO, λ 600 nm).....	84
Figura 5. Determinação da Unidade Formadora de Placas de Lise (UFP/mL) em culturas de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12.i:- 633 e 691 ao longo de 24 horas de crescimento.....	85
Figura 6. Curva de crescimento de linhagens de <i>S. enterica</i> ao longo de 107 horas. Figura 6A. Crescimento avaliado por determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL). Figura 6B. Crescimento avaliado por determinação da densidade ótica (DO, λ 600 nm).....	86
Figura 7. Fagos liberados espontaneamente durante o crescimento de linhagens STi 633 (Saeni 633) e STi 691 (Saeni 691) ao longo de 107 horas. Crescimento avaliado por determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL).....	87
Figura 8. Curva de crescimento das linhagens de <i>S. enterica</i> Enteritidis 600 e 618 na presença do fago Saeni 633 na proporção 140:1. Figura 8A. Crescimento avaliado por Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL). Figura 8B. Crescimento avaliado por Densidade Ótica (DO).....	90
Figura 9. Curva de crescimento das linhagens de <i>S. enterica</i> Enteritidis 600 e 618 na presença do fago Saeni 691 na proporção 250:1. Figura 9A. Crescimento avaliado por Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL). Figura 9B. Crescimento avaliado por Densidade Ótica (DO).....	90

Figura 10. Titulação de fagos em coculturas de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12:i:- e <i>S. enterica</i> Enteritidis. Figura 10A. Unidades formadoras de Placas (UFP/mL). Figura 10B. Densidade ótica de coculturas.	92
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose (2,5%) dos produtos de PCR amplificados por iniciadores a serem utilizados em RT-PCR. Figura 11A. Amplificação por PCR com os iniciadores InvA(1) (91 pb) utilizando DNA genômico de <i>S. enterica</i> . Figura 11B. Amplificação por PCR com os iniciadores FliC(1) (85 pb) utilizando DNA genômico de <i>S. enterica</i> . Notar especificidade para as linhagens STi. Figura 11C. Amplificação por PCR com os iniciadores prot6E(2) (69 pb) utilizando DNA genômico de <i>S. enterica</i>	94
Figura 12. Quantificação de DNA genômico de <i>S. enterica</i> por RT-PCR em cultura utilizando os iniciadores FliC(1) e ProtE6(2). A DNA genômico de linhagens de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12:i:-. B) DNA genômico de linhagens de <i>S. enterica</i> Enteritidis. C) DNA genômico extraído de cocultura das linhagens STi 633 com SE 600 ou SE 618. D) DNA genômico extraído de cocultura das linhagens STi 691 com SE 600 ou SE 618. Amostras para extração de DNA foram coletadas em três diferentes tempos (11, 59 e 107 horas).	96
Figura 13. Alinhamento do genoma de Saeni 633 com Saenh CFAN002069 (fig. A) e com Saent D23580 (fig.B). Os alinhamentos foram gerados pelo programa ACT, utilizando Blastn, ajustado para valor de E de 0,0001, 5 para <i>Cost to open</i> e 2 para <i>Cost to extend gap</i> , 11 para <i>word size</i> , -3 para <i>Penalty for Nucleotide Mismatch</i> e 1 para <i>Reward for Nucleotide Match</i>	98

Figura 14. Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a morfologia dos fagos Saeni 633 (Figura A) e Saeni 691 (Figura B). Os fagos foram parcialmente purificados por centrifugação em colchão de sacarose..... 100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	31
1.1 Salmonelose	31
1.1.1 Salmonela	31
1.1.2 Taxonomia	31
1.1.3 Variação de fase flagelar	32
1.1.4 Salmonelose	33
1.1.5 Epidemiologia.....	35
1.2 Bacteriófagos	38
1.2.1 Ciclos reprodutivos.....	39
1.2.2 Profagos.....	41
1.2.3 Ecologia	45
2 OBJETIVOS	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Linhagens bacterianas	53
3.2 Indução de bacteriófago de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12:i:- e <i>S. enterica</i> Enteritidis (SE)	55
3.2.1 Indução de fagos por mitomicina C.....	56
3.2.2 Indução de fagos por Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	56
3.2.3 Indução de fagos por raios ultravioleta (UV)	57
3.2.4 Indução de fagos por exposição a meio pré-condicionado	57
3.3 Extração do DNA dos bacteriófagos	58
3.3.1 Extração do DNA genômico (Extração rápida)	59
3.4 Suscetibilidades das bactérias SE aos fagos induzidos de STi	59
3.5 Titulação de bacteriófagos – Unidades Formadoras de Placas (UFP) .	60
3.6 Curvas de crescimento bacteriano	60
3.6.1 Curvas de crescimento bacteriano: Culturas puras.....	60
3.6.2 Curva de crescimento bacteriano em cocultura	61

3.7 Teste de queda do crescimento de <i>S. enterica</i> Enteritidis pela ação de fagos líticos de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12.:i:- Saeni 633 e Saeni 691	62
3.7.1 Padronização da curva de crescimento de <i>S. enterica</i> Enteritidis (SE)	62
3.7.2 Curvas de crescimento das SE 600 e 618 com os fagos líticos Saeni 633 e Saeni 691	62
3.8 Reações de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR)	63
3.8.1 Confeção dos Iniciadores (Primers)	63
3.8.2 Confirmação da especificidade dos iniciadores por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	65
3.8.3 Extração do DNA genômico bacteriano	66
3.8.4 Avaliação do kit de extração de DNA	67
3.8.5 Verificação de possíveis danos do congelamento das amostras para extração do DNA	67
3.8.6 Quantificação do DNA	68
3.8.7 Curva padrão de RT-PCR	68
3.9 Reações de RT-PCR	71
3.10 Sequenciamento e montagem dos genomas dos Bacteriófagos Saeni 633 e Saeni 691	71
3.11 Análise morfológica dos bacteriófagos	72
3.11.1 Purificação preliminar de bacteriófagos	72
3.11.2 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão	72
4 RESULTADOS	75
4.1 Testes de suscetibilidade das induções de fagos em <i>S. enterica</i> I,4,[5],12.:i:- (STi) e <i>S. enterica</i> Enteritidis (SE)	75
4.2 Curvas de crescimento e produção espontânea de fagos	83
4.3 Crescimento de <i>S. enterica</i> Enteritidis na presença de fagos líticos de <i>S. enterica</i> I,4,[5],12.:i:-	87
4.4. Titulação de Fagos em coculturas	91
4.5. Padronização dos Experimentos de RT-PCR	91

4.5.1 Curva padrão da RT-PCR.....	94
4.6 Sequenciamento e montagem dos genomas de Saeni 633 e Saeni 691	96
4.7 Morfologia.....	99
5. DISCUSSÃO	103
6. CONCLUSÕES.....	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
8. TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	131

1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Salmonelose

1.1.1 Salmonela

Salmonela é um bacilo gram-negativo, flagelado e anaeróbico facultativo, não formador de esporos, capaz de infectar o homem e muitos outros animais domésticos e selvagens, e é considerada uma das principais causas de mortes por ingestão de alimentos contaminados, além de provocar grandes encargos econômicos em todo o mundo (1-3).

1.1.2 Taxonomia

Este gênero é dividido taxonomicamente em duas espécies: *Salmonela enterica* e *Salmonela bongori* (4). *Salmonela enterica* consiste de seis subgrupos (ou subespécies), grupo I (*S. enterica* subespécie *enterica*), II, IIIa, IIIb, IV e VI. Somente *S. enterica* subespécie *enterica* é de relevância clínica, pois seus integrantes incluem os patógenos associados com enterites, infecções sistêmicas e febre tifoide. Outras subespécies e *S. bongori* são normalmente isoladas do meio ambiente ou de répteis, e geralmente não são clinicamente importantes (1).

Sorovariedades de *S. enterica* subespécie *enterica* são usualmente nomeadas geograficamente pelo lugar onde foram isoladas (Ex.: Saint Paul, New Port ou Derby) ou ao tipo de doença que estão associadas (Ex: Typhi, Enteritidis, Typhimurium). Esse nome é escrito em letras romanas, mas sem estarem em itálico e a primeira letra em maiúsculo (5).

Diferentes sorovariedades podem infectar diferentes hospedeiros e esta característica também pode ser utilizada na identificação das Salmonelas (6).

1.1.3 Variação de fase flagelar

O flagelo bacteriano tem por função principal a mobilidade, mas contribui também na patogenicidade e na formação de biofilme. Ele é composto por subunidade proteica chamada flagelina (7). Mais de 40 genes estão associados à sua função, montagem e estrutura (8). A flagelina é importante no processo de patogênese de várias bactérias que infectam o trato intestinal, rins e sistema respiratório (9).

A grande maioria dos isolados de *S. enterica* expressa dois tipos diferentes de antígenos flagelares, codificados pelos genes: *fliC* (fase 1) e *fljB* (fase 2), sendo assim denominadas bifásicas. Contudo, algumas sorovariedades expressam apenas uma das flagelinas, e são denominadas monofásicas. Outras ainda não possuem flagelos (10).

Em uma cultura de *S. enterica*, após algumas divisões celulares, podemos encontrar parte das bactérias expressando antígeno flagelar de fase 1 e outras expressando de fase 2, pois ao se proliferar elas podem produzir células que expressam um ou outro antígeno flagelar (3, 11).

Esse sistema de variação de fase flagelar é dependente do *operon fljBA* e da recombinase Hin. A função desta recombinase é inverter uma sequência de aproximadamente 1 Kb do cromossomo bacteriano que contém o promotor dos genes *fljB* e *fljA*. Quando o promotor está posicionado em orientação que dirige a

transcrição desses genes, esta posição é denominada *ON*. Neste caso, o antígeno flagelar de fase 2 (FljB) e a proteína regulatória FljA são expressos; FljA é um inibidor pós-transcricional de *fliC*, o gene regulador da flagelina de fase 1. Nessa situação, não ocorre a produção de FliC e portanto temos a expressão da flagelina de fase 2. Porém, na orientação invertida (denominada como *OFF*), *fljB* e *fljA* não são transcritos, pois o promotor está voltado para a direção contrária à do *operon fljBA*. A não produção de FljA leva à produção de FliC, que deixa de ser reprimido. Nesse caso, temos a produção do antígeno flagelar de fase 1. Esses genes estão em diferentes locais no cromossomo bacteriano (7, 12).

S. enterica 1,4,[5],12:i:- é um sorotipo antígenicamente semelhante a *S. enterica* Typhimurium, que tem a fórmula antigênica 4,5,12:i:1,2 (10, 13), porém não tem a capacidade de expressar o antígeno flagelar de fase 2 (sendo assim denominada monofásica), que em *Salmonelas* bifásicas é representado pela fórmula 1,2 (14).

A variação de fase flagelar pode estar relacionada ao escape do sistema imunológico, por aumentar o repertório de antígenos expressos pela célula bacteriana (15), porém o papel biológico desta variação ainda não foi completamente elucidado (12).

1.1.4 Salmonelose

A salmonelose é uma zoonose que representa um sério problema de saúde pública mundial, devido: à sua alta prevalência, à dificuldade de seu controle, ao

seu caráter endêmico, à morbidade e à mortalidade, decorrentes da infecção causada por esta bactéria (16).

Em humanos, a salmonelose é contraída geralmente através de alimentos contaminados, em sua maioria de origem animal (ovos, leite e carne), mas podendo ocorrer por contaminação em vegetais e alimentos manipulados. Os micro-organismos causadores podem estar em toda cadeia alimentar, desde a produção primária até nos alimentos encontrados em estabelecimentos de alimentação tais como lanchonetes e restaurantes (2, 17).

Outra forma de contaminação menos comum aos humanos se dá através do contato com animais de estimação, como iguanas, cobras, tartarugas e alguns tipos de aves, ou através de atividades profissionais onde o contato com esses animais é frequente (3).

Clinicamente, as Salmonelas são divididas em duas categorias, as tifoídes (*S. Typhi* e *S. Paratyphi*), que causam a febre tifoide ou paratifoide, e as não tifoídes (várias sorovariedades, como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*), que causam diarreia e até infecções sistêmicas (18).

O sistema imune dos hospedeiros possui receptores que tem a capacidade de detectar macromoléculas de micro-organismos patogênicos. Em bactérias gram-negativas esses elementos incluem os lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa. Após chegarem ao trato intestinal, salmonelas invadem as células epiteliais, como as células M localizadas nas placas de Payer, em um processo semelhante à endocitose. Outra barreira inata do sistema imunológico do hospedeiro é composta por macrófagos situados na submucosa do intestino.

Salmonelas que causam infecções sistêmicas conseguem invadir estas células de defesa, aparentemente por macropinocitose induzida. Uma vez dentro, elas conseguem sobreviver e se reproduzir dentro de um endossomo, produzindo e injetando proteínas no citosol do hospedeiro (3, 19).

Após a morte do macrófago, as bactérias podem se disseminar no sangue, atingindo outros órgãos, como o fígado, o baço, e a medula óssea. Os sinais e sintomas clínicos são decorrentes da multiplicação bacteriana no trato intestinal associada ao processo invasivo e inflamatório e a disseminação bacteriana pelo organismo hospedeiro (3).

Os sintomas da salmonelose aparecem entre 12 a 72 horas após o contato com a bactéria. Podem ocorrer febre, dor abdominal, náusea, vômitos e diarreia. A duração dos sintomas é de 4 a 7 dias e, geralmente, a remissão da doença é espontânea, porém em idosos, em crianças abaixo de 2 anos e imunossuprimidos pode haver complicações, sendo necessário o uso de antibióticos (20).

1.1.5 Epidemiologia

A sorotipagem de *S. enterica* é uma importante ferramenta que ajuda pesquisadores em saúde pública a melhor compreender e definir a epidemiologia das infecções em uma determinada área geográfica (21).

O conhecimento da ocorrência das diferentes sorovariedades de *S. enterica* em diferentes regiões e países pode ajudar no rastreamento e reconhecimento desse patógeno, permitindo o estabelecimento de estratégias de controle epidemiológico (22).

No Brasil existem iniciativas no sentido da elaboração de um sistema de informação sobre salmonelose. Dados epidemiológicos sobre doenças transmitidas por alimentos (DTA) são constantemente atualizados pela Unidade Técnica de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar (UHA) - Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis (CGDT) - Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), órgão ligado ao Ministério da Saúde (23).

Dados de 1999 até 2008 mostram que houve 6.602 surtos da doença no Brasil, principalmente devido à ingestão de alimentos, e desses, 43% dos agentes etiológicos foram identificados como *S. enterica* (24). Dados ainda mais recentes, envolvendo agentes etiológicos identificados em surtos alimentares de 2011, mostram que houve 356 casos relatados, dos quais aproximadamente 19% foram identificados, e destes, em 19 casos o agente era *S. enterica* (23).

Apesar da melhoria das condições sanitárias, principalmente incrementadas no Estado de São Paulo, a salmonelose ainda é a maior causa das infecções intestinais reportadas no sistema de saúde. Em estudos feitos entre os anos de 1996-2003 foram isoladas 68 sorovariedades diferentes de um total de 3.554 amostras de *S. enterica* de origem humana, que foram recebidas e analisadas no Laboratório de Enteropatógenos do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, vindo de diferentes localizações geográficas no Estado de São Paulo (21).

A caracterização das sorovariedades de *S. enterica* começou no Estado de São Paulo em 1950 no Instituto Adolfo Lutz e os dados obtidos são periodicamente publicados. Durante todo o período em que as pesquisas estão se

desenvolvendo, tem havido uma substancial mudança na epidemiologia da salmonelose no tocante as sorovariedades isoladas (21).

Nos Estados Unidos, *S. enterica* I,4,5,12:i:- ocupou o sexto lugar entre os casos relatados no ano de 2006 (14). A sorovariedade I,4,[5],12:i:-, foi isolada, pela primeira vez, em São Paulo na década de 70. Durante os anos de 1996-2000 dados mostraram que das sorovariedades de *S. enterica* isoladas houve predominância do sorotipo Enteritidis (67%); o segundo sorotipo mais frequentemente isolado foi o Typhimurium (5,2%). Em terceiro lugar aparece I,4,[5],12:i:- com 5,1%, sendo mais predominante em crianças com idade inferior a 1 a 4 anos, sendo esse dado semelhante em outros países (21).

Esse isolamento de *S. enterica* I,4,[5],12:i:-, no Brasil e também em diferentes países, e sua associação com várias infecções em humanos conflita com sugestões prévias sobre a importância da variação de fase flagelar na patogenicidade de *S. enterica*. Não foi observada diferença significativa entre patogenicidade nas linhagens com e sem variação de fase flagelar (21).

É difícil ter dados precisos a respeito da propagação da sorovariedade I,4,[5],12:i:-, pois muitos casos não são notificados corretamente, devido à falta de métodos adequados para fazer uma identificação e diferenciação precisa entre essa sorovariedade e a sorovariedade Typhimurium (25).

Dentre os vários fatores que contribuem para mudanças epidemiológicas em bactérias um deles está intrinsecamente ligado a bacteriófagos integrados ao genoma (profagos), que conferem ao hospedeiro vantagens seletivas, tais como a

codificação de fatores de patogenicidade, diversidade genética e/ou características que aumentam o desempenho (26-29).

1.2 Bacteriófagos

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias e arqueias e são as entidades biológicas mais abundantes em todo mundo, podendo ser encontrados em todos os ambientes permissíveis à vida (oceanos, solo, alimentos, trato gastrintestinais, esgotos, entre outros) (30). Por serem tão abundantes, desempenham um papel fundamental nos ecossistemas, influenciando a ecologia e a evolução bacterianas, mantendo e balanceando sua diversidade (31-33).

Os bacteriófagos, ou simplesmente fagos, foram descobertos independentemente por Frederick William Twort e Félix Hubert d'Herelle nos primórdios do século XX (34). Como outros vírus, fagos não são considerados formas de vida por definição, pois são destituídos de estruturas celulares, e são dependentes de uma célula para reprodução (34).

Eles ocupam uma posição única na biologia, pois só se tornam parte de um sistema vivo após infectar uma célula hospedeira e se integrar a ela, adquirindo autonomia, que é uma característica dos seres vivos, e por meio de um complexo mecanismo ativam suas propriedades metabólicas e sintéticas (35).

Quando um vírus se encontra no estado extracelular, ele é metabolicamente inerte, não realizando funções biossintéticas, e nesse formato de partícula viral é denominado vírion. Os vírions transportam todo o genoma viral, e eventualmente proteínas acessórias, e são capazes de infectar uma célula

hospedeira (36). Eles são parasitas intracelulares obrigatórios, carregando seu genoma para uma célula suscetível com a finalidade de produzir progênie. Cada partícula viral (vírion) é composta por ácido nucleico que pode ser DNA ou RNA, fita simples ou fita dupla, sendo ainda envolto por uma capa proteica ou lipoproteica chamada de capsídeo. A associação do ácido nucleico com a capsídeo leva o nome de nucleocapsídeo (30).

Na natureza, estima-se que a ordem de grandezas dos bacteriófagos seja em torno de 10^{30} a 10^{32} partículas virais. Muitos genomas já foram observados e desses, 96% correspondem ao vírus caudados, pertencentes à ordem *Caudovirales* (37). Essa se divide em três famílias: *Myoviridae*, com cauda contrátil (24,5%); *Siphoviridae*, ou vírus com cauda longa e não contrátil (61%), e, finalmente, *Podoviridae*, ou vírus com cauda curta (14%). Os demais fagos (3,7%) apresentam morfologias distintas (poliédricos, filamentosos ou pleomórficos). Eles pertencem a 12 famílias e 3 grupos com *status* de gênero. Algumas dessas famílias consistem de apenas um único membro (37).

1.2.1 Ciclos reprodutivos

A diversidade de fagos, tipos hospedeiros e diferentes meio ambientes implicam diretamente a existência de ciclos biológicos diferentes (34).

No ciclo lítico, também conhecido com virulento, o fago como um *vírion* injeta seu genoma na célula hospedeira, e após a infecção assume o controle do metabolismo do hospedeiro, fazendo com que a maquinaria molecular da bactéria produza outros fagos. O ciclo lítico é controlado por uma cascata de eventos, do

qual cada conjunto de genes contém um regulador necessário à expressão do próximo conjunto (30, 38). No ciclo lítico, a bactéria hospedeira é rompida (lisada), liberando uma progênie constituída de partículas virais, que por sua vez, perpetuam o ciclo replicativo invadindo novas bactérias (34).

Os fagos podem também apresentar uma forma alternativa de existência, o ciclo lisogênico, na qual seu genoma está presente na bactéria em uma forma latente, conhecida como profago. Essa forma de propagação é conhecida como lisogenia (38). No ciclo lisogênico, sendo os fagos denominados temperados, o genoma viral é inserido no genoma bacteriano, entrando em um estado latente por tempo indeterminado, e quando a bactéria se divide, ele é herdado da mesma forma que os genes bacterianos. Isso ocorre até algum evento de indução, quando o fago entra em ciclo lítico novamente (30, 39). Uma vez que a bactéria é infectada por um fago temperado, as condições fisiológicas da bactéria hospedeira determinam a entrada no ciclo lítico ou lisogênico (38). Se no início do processo de infecção o estado metabólico do hospedeiro permitir a expressão de proteínas repressoras (produtos dos genes *cl*, *cII* e *cIII*), os genes responsáveis pelo ciclo lítico são reprimidos e a lisogenia é estabelecida, com a integração do genoma do fago no genoma bacteriano. Níveis do produto do gene *cII* e da proteína Cro são determinantes para a escolha entre os dois ciclos, onde *cII* está relacionado à síntese do repressor e a manutenção da lisogenia, enquanto Cro inibe a síntese do repressor e conseqüentemente inicia-se o ciclo lítico (40, 41). Contudo, esse estado quiescente não é permanente; situações adversas ao DNA, como agentes químicos (antibióticos, sinalizadores biológicos e outros) e físicos (luz ultravioleta,

calor e outros) e outros fatores ambientais, podem desencadear alterações fisiológicas, onde os domínios C terminais da estrutura dimérica do repressor são clivados, dissociando-se do DNA, tendo-se início, assim, a expressão de genes essenciais ao ciclo lítico, que acabam por induzir o profago, que passa então de seu estado latente para a produção da progênie viral, lisando assim seu hospedeiro (34, 38, 42).

Acredita-se que a lisogenia é uma estratégia adaptativa que permite o vírus sobreviver a condições adversas, especialmente quando o número de hospedeiros é baixo (27, 43).

Temos ainda outros dois ciclos: a infecção crônica, caracterizada por bactérias infectadas que liberam uma progênie viral constante por extrusão ou brotamento, mas sem lise do hospedeiro, e a pseudolisogenia, em que os fagos infectam apenas uma parcela da população. Esses ciclos possuem um aspecto intermediário entre os ciclos lítico e lisogênico, pois, por um lado, o fago não se integra ao genoma bacteriano como no ciclo lisogênico, e, por outro, nem todas as células infectadas sofrem lise como no ciclo lítico (34, 44).

1.2.2 Profagos

O sequenciamento de genomas microbianos revelou que, em muitas bactérias, uma considerável proporção do genoma bacteriano corresponde a DNA de fagos temperados. O genoma de *S. enterica* é constituído em média por 4,5 a 5 Mb e desse montante, 500 a 600 Kb são inserções de elementos móveis, em sua maioria profagos (45, 46). Esses elementos, em alguns isolados, contabilizam

cerca de 10% a 20% do genoma e representam uma porção significativa na diversidade genômica, podendo chegar a até 60% de sequências reconhecidas como profagos ou como remanescentes deles (47).

Cada bactéria hospedeira é infectada por fagos específicos. Em alguns casos fagos podem infectar diferentes subespécies de bactérias. Uma bactéria pode ser infectada por vários tipos de fagos se eles ocuparem diferentes porções do DNA bacteriano. Porém, cada fago temperado reprime especificamente a infecção por outros fagos contendo o mesmo repressor, protegendo o hospedeiro contra superinfecção. Essa imunidade à superinfecção é consequência da manutenção do estado de lisogenia, e protege o hospedeiro contra lise por fagos similares (30, 39, 48).

Fagos e outros tipos de elementos genéticos (como plasmídios, transposons e ilhas de patogenicidade) mediam a transferência horizontal de genes (THG), muito importante na evolução bacteriana. Esses elementos podem carregar consigo genes que conferem vantagem seletiva para o hospedeiro, tais como fatores de patogenicidade e/ou características que aumentam a adaptação do hospedeiro (26, 27, 45).

Fagos temperados induzidos para o ciclo lítico podem carregar consigo partes do genoma bacteriano onde estavam inseridos. Quando esses fagos novamente se inserem em um novo genoma também inserem genes bacterianos, servindo como um veículo promotor de recombinação (30, 38).

Alterações fenotípicas do hospedeiro mediadas pela ação de um bacteriófago recebem o nome de conversão lisogênica, ou conversão fágica,

permitindo ganhos rápidos de função. Esse fluxo de informações genéticas entre micro-organismos é amplamente mediado por fagos, e facilita o aparecimento de novas variedades genéticas mediando à adaptação bacteriana ao ambiente (45, 46). Alguns fagos carregam partes de DNA que não são necessárias para seus ciclos vitais; esses fragmentos genéticos podem codificar fatores de virulência em bactérias patogênicas (48).

Essas descobertas tornaram claro que fagos de DNA desempenham um papel importante na evolução da patogenicidade de bactérias (49). Esses dados têm mudado nosso conhecimento sobre a interação bactéria-fago de uma simples relação parasita-hospedeiro para uma coevolução de duas vias entre genomas de bactérias e fagos (50, 51).

S. enterica é um exemplo de patógeno cujos fatores de virulência são codificados por profagos. Um estudo acurado de isolados de *S. enterica* Typhimurium revelou diferentes sequências de aproximadamente quatro ou cinco profagos completos (21, 46).

Em coculturas experimentais de sorovarietades diferentes de *S. enterica* desprovidas ou não de profagos específicos ocorrem rápidas mudanças na proporção celular, como resultado da indução de profagos que são liberados e lisam células bacterianas sensíveis ou se integram no genoma de outras, contribuindo assim para a variabilidade populacional. Assim, a indução espontânea de fagos em algumas células lisogênicas acentua a competição entre diferentes populações, regulando um regime de seleção, que força a manutenção e propagação do DNA viral. A julgar pela abundância e diversidade de sequências

de fagos nos genomas bacterianos, esses contribuem diretamente com o sucesso evolucionário e a manutenção da diversidade em comunidades bacterianas naturais (47, 52).

Estudos recentes demonstraram que diferentes grupos de bactérias ocupando um mesmo nicho apresentam comportamento de organismos multicelulares e monitorando-se a densidade populacional foram detectadas vias de sinalização entre elas, catalisadas por pequenos compostos sinalizadores, chamados de autoindutores, em um processo conhecido como *Quorum-Sensing* (QS). Com poucos indivíduos ocupando um determinado espaço limitado, poucos autoindutores são produzidos; porém, com o aumento da população ocorre aumento concomitante na concentração desses autoindutores. As bactérias detectam e respondem a esses sinais quando eles atingem um determinado limiar, modulando a expressão de vários genes (53).

Esses sinais químicos podem ativar o ciclo lítico de profagos em certas condições, especialmente quando a concentração de células é elevada. Tem sido observado que em culturas bacterianas crescidas até a fase estacionária pode haver indução espontânea de fagos associados à alta densidade populacional (27).

No sobrenadante de algumas culturas de *S. enterica* crescidas até a fase estacionária com a contagem de indivíduos por volta de 10^9 UFC/mL são encontrados fagos em uma titulação variando entre 10^4 e 10^5 UFP/mL, induzidos espontaneamente. Porém, esses parâmetros podem mudar drasticamente se a

população não for clonal ou contiver outras bactérias não lisogênicas àqueles fagos (47).

1.2.3 Ecologia

O ciclo lisogênico poderia ser assim uma adaptação a partir de fagos líticos, como uma forma de estabilizar as relações entre parasita e hospedeiro, pelas quais ambos sobrevivem e são beneficiados (44).

Podemos então considerar que as interações entre fagos e bactérias podem ser benéficas para ambos os lados, como visto na lisogenia. Nessa interação, o fago confere à bactéria imunidade à superinfecção por outros fagos relacionados, evitando a entrada desses no ciclo lítico, e pode conferir ao hospedeiro um melhor crescimento populacional; a bactéria, por sua vez, confere ao fago um ambiente estável e o replica junto com seu genoma (44).

Em sistemas onde coexistam duas ou mais populações bacterianas, com uma delas contendo profagos, esses podem colaborar na competição entre bactérias. Assim, a liberação espontânea de profagos age como um agente regulador na ecologia bacteriana (31).

A ocupação de nichos bacterianos é amplamente mediada por fagos; eles podem promover o equilíbrio entre populações mais fracas, aumentando a competitividade com as populações dominantes, mantendo, assim, a diversidade natural entre comunidades bacterianas (52). Para que esse processo ocorra, algumas bactérias precisam entrar em um ciclo lítico, ou seja, lisarem; isto pode ser considerado como um “suicídio altruísta”, muito característico de organismos

multicelulares; porém, a perda na população é baixa, e é compensada pelos ganhos competitivos entre as populações; portanto, fagos lisogênicos podem atuar similarmente a toxinas para matar linhagens suscetíveis e melhorar a competitividade de seus hospedeiros (44, 47, 50).

2 - OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é verificar a existência de fagos lisogênicos em *S. enterica* I,4,[5],12:i:- com atividade lítica sobre *S. enterica* Enteritidis, sugerindo uma possível vantagem evolutiva para *S. enterica* I,4,[5],12:i:- sobre outras sorovariedades.

Objetivos específicos:

- Verificar a presença de fagos induzíveis em linhagens selvagens de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- e *S. enterica* Enteritidis;
- Analisar a susceptibilidade de linhagens selvagens de *S. enterica* Enteritidis aos fagos lisogênicos induzidos de *S. enterica* I,4,[5],12:i:-;
- Analisar a morfologia dos fagos lisogênicos induzidos, por microscopia eletrônica de transmissão, e caracterizar o genoma deles;
- Inferir o possível papel dos fagos lisogênicos induzidos no sucesso evolutivo de *S. enterica* I,4,[5],12:i:-, através de cocultura com *S. enterica* Enteritidis.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas

As duas sorovariedades de *S. enterica* utilizadas neste estudo, *Salmonella enterica* I,4,[5],12:i:- (daqui por diante designada como STi) e *Salmonella enterica* Enteritidis (daqui por diante designada como SE) (Tabelas I e II), pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana do Instituto de Biologia, Unicamp, tendo sido isoladas de material biológico (hemocultura e coprocultura) entre 1998 e 2001 na Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (HCRP) e estocadas em biofreezer (-80°C). O uso de tais linhagens foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com humanos (HCRPn°2997/2005). Estoques de trabalho dessas bactérias foram feitos, sendo que uma alíquota do estoque permanente foi inoculada em meio líquido Lúria-Bertani (LB) (54) e incubada a 37°C por 18 horas, aproximadamente, sem agitação. Em seguida, as amostras foram semeadas em meio MacConkey (seletivo para enterobactérias e diferencial para fermentação de lactose) e *Salmonella-Shigella* (SS; seletivo e diferencial para estes gêneros) para uma rápida confirmação da identidade das colônias estocadas. Uma vez confirmada, as colônias isoladas do meio MacConkey foram novamente estocadas em biofreezer, utilizando meio LB, acrescido de glicerol (20%), como crioprotetor.

Tabela 1. Amostras de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- (STi) utilizadas neste estudo.

Amostra	Origem
STi 607	Coprocultura
STi 624	Coprocultura
STi 633	Coprocultura
STi 635	Hemocultura
STi 607	Coprocultura
STi 683	Coprocultura
STi 691	Hemocultura
STi 5697	Coprocultura
STi 6229	Coprocultura
STi 6234	Coprocultura
STi 6175	Coprocultura
STi 6195	Coprocultura

Tabela 2. Amostras de *S. enterica* Enteritidis (SE) utilizadas neste estudo

Amostra	Origem
SE 600	Coprocultura
SE 601	Coprocultura
SE 602	Coprocultura
SE 606	Coprocultura
SE 618	Coprocultura
SE 672	Coprocultura
SE 676	Coprocultura
SE 678	Coprocultura
SE 679	Coprocultura
SE 636	Coprocultura

3.2 Indução de bacteriófago de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- e *S. enterica* Enteritidis (SE)

As amostras bacterianas STi e SE selecionadas foram pré-cultivadas a 37°C durante à noite, em meio LB sem agitação. No dia seguinte 0,2mL de cada cultura foram inoculados novamente em 10mL de LB, constituindo um inóculo 1:50. Essa nova cultura foi incubada a 37°C, com aeração completa (200RPM) até

a fase exponencial de crescimento, estimada através da medição de densidade óptica (DO) a 600nm. Os fagos foram então induzidos por diferentes métodos.

3.2.1 Indução de fagos por mitomicina C

Foram testadas duas concentrações diferentes de mitomicina. Bactérias em fase exponencial de crescimento receberam mitomicina C (antibiótico da família das aziridinas) na concentração de 1 e 2%; foram homogeneizadas por agitação em *vórtex* e levadas novamente para aeração (200 RPM) a 37°C por 1 hora. Após esse tempo de exposição, a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 12850G e o precipitado ressuspendido em 10mL de meio LB novo, para remoção do antibiótico. As culturas induzidas foram, novamente, incubadas com agitação (200 RPM) à temperatura de 37°C por mais 3 horas para liberação das partículas virais. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12850G e o sobrenadante filtrado em membrana *Millipore* PES 0,22µm. O filtrado contendo fagos induzidos foi estocado em tubos esterilizados a uma temperatura de 4°C, protegido da luz (28).

3.2.2 Indução de fagos por Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Bactérias em fase exponencial de crescimento receberam peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 2mM; Merck PA); foram homogeneizadas em *vórtex* e levadas novamente para aeração (200 RPM) a 37°C por 1 hora. Após esse tempo a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 12850G e o precipitado ressuspendido em 10mL de meio LB novo, para remoção do peróxido de hidrogênio. As culturas induzidas

foram novamente incubadas com agitação (200 RPM) a 37°C por mais 3 horas, para liberação das partículas virais. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12850G e o sobrenadante filtrado em membrana *Millipore* PES 0,22µm. O filtrado contendo fagos induzidos foi estocado em tubos esterilizados a uma temperatura de 4°C, protegidos da luz (28).

3.2.3 Indução de fagos por raio ultravioleta (UV)

Bactérias em fase exponencial de crescimento foram colocadas em placa de Petri esterilizadas e levadas ao fluxo laminar com emissão de raios UV por um período de 2 minutos. As culturas foram, novamente, levadas à aeração (200 RPM) por um período de 3 horas à temperatura de 37°C. Após esse período foram centrifugadas por 10 minutos a 12850G e o sobrenadante filtrado em membrana *Millipore* PES 0,22µm. O filtrado contendo fagos induzidos foi estocado em tubos esterilizados a uma temperatura de 4°C(42).

3.2.4 Indução de fagos por exposição a meio pré-condicionado

A indução de fagos lisogênicos de STi capazes de lisar SE, via produção de auto-indutores por SE, foi também verificada. Para isso, duas linhagens SE (SE 600 e SE 618) foram cultivadas em 10mL meio LB por 24 horas a 37°C sem agitação até a DO em torno de 0,8 a 1,0 (λ 600nm), que corresponde ao início da fase estacionária. A cultura foi centrifugada por 10 minutos a 12850G e o sobrenadante filtrado em membrana *Millipore* PES 0,22µm. Esse sobrenadante

constituiu o meio pré-condicionado utilizado nos experimentos posteriores. O meio LB foi utilizado como controle negativo.

Culturas novas de STi 633 e STi 691 foram inoculadas no meio pré-condicionado e no controle (LB) e incubadas à temperatura de 37°C sem agitação. Após 8 horas de crescimento foi medida a DO e feita a contagem de fagos induzidos por plaqueamento.

3.3 Extração do DNA dos bacteriófagos

Uma alíquota de 3mL de fagos induzidos com título de aproximadamente $1,8 \times 10^6$ cada foi tratada com 5U de DNase a 37°C por 1 hora. Foi adicionada proteinase K na concentração final de 0,5µg/mL e aquecido a 56°C por 1 hora. Após a digestão foi adicionado SDS na concentração final de 0,5 % e igual volume de fenol/clorofórmio; a mistura foi feita por inversão cuidadosamente. As amostras foram centrifugadas à 5000G por 5 minutos a temperatura ambiente e a fase aquosa recuperada. O procedimento de adição de fenol/clorofórmio e centrifugação foi repetido 3 vezes. Ao sobrenadante foi adicionado etanol a 4°C em um volume 2,5 vezes ao da amostra e a preparação mantida a -20°C durante a noite. No dia seguinte as amostras foram centrifugadas à 14000G por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado cuidadosamente. Foram adicionados 500µL de etanol 70% gelado, sem agitar a amostra. Novamente, uma centrifugação a 14000G por 20 minutos a 4°C foi realizada. Os resíduos de álcool do tubo foram coletados e eles foram mantidos sobre papel absorvente por aproximadamente 30 minutos, para a completa secagem das amostras. Após a secagem as amostras

foram ressuspensas com 200µL de água deionizada, ultrafiltrada e autoclavada, sendo a preparação mantida durante à noite a 4°C e posteriormente conservada a -20°C.

Após a extração, as amostras foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,7% conduzida a 70V (5V/cm) por aproximadamente 2 horas. Como marcador de peso molecular e referência para o genoma de fagos foi utilizado o DNA do genoma do fago P22 (método de extração rápida).

3.3.1 Extração do DNA genômico (Extração rápida)

Alíquotas de 10 µL contendo DNA foram misturadas a 4µL de SDS-EDTA *Dye mix* (0,4% SDS, 30mM EDTA, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 20% sacarose) e incubadas a 65°C por 10 minutos. Após a extração as amostras foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,7% conduzida a 70V (5V/cm) por 2 horas (54).

3.4 Suscetibilidades das bactérias SE aos fagos induzidos de STI

Dez linhagens diferentes de *S. enterica* Enteritidis foram utilizadas como alvo para os testes de suscetibilidade a onze linhagens de *S. enterica* l,4,[5],12.:i:-, utilizando-se protocolo modificado de plaqueamento (54).

Uma alíquota de 500µL de cultura bacteriana crescida até fase exponencial foi misturada com 3mL de meio semissólido LB, fundido a 50°C. Após agitação manual a mistura foi despejada em placas de cultura contendo meio LB sólido. As placas foram mantidas à temperatura ambiente, para solidificação do meio

semissólido e receberam alíquotas de 5µL de suspensão de bacteriófagos (triplicata), cuidadosamente pingadas sobre a superfície do meio. As placas foram, em seguida, incubadas novamente à temperatura ambiente até secagem das gotas. Foram então incubadas durante à noite em estufa a 37°C. A observação de placas de lise nos pontos que receberam as gotas foi realizada no dia seguinte. O teste cruzado de suscetibilidade das onze linhagens de STi pelo filtrado induzido de SE também foi realizado com a mesma metodologia descrita.

3.5 Titulação de bacteriófagos – Unidades Formadoras de Placas (UFP)

Basicamente o mesmo protocolo de titulação de fagos descrito no item anterior (3.4) foi utilizado. Diluições seriadas (fator 10) dos fagos induzidos (5µL) foram colocadas sobre o meio semissólido em triplicata e após a secagem das gotas as placas foram levadas à estufa 37°C por 24 horas.

As placas de lise que se formaram sobre o “tapete” de bactérias foram contadas e o título de bacteriófagos expresso em unidades formadoras de placas (UFP) determinado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\frac{\text{Número de placas de lise}}{\text{Volume da diluição}(\mu\text{L}) \times \text{Fator de diluição}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{\text{mL}} = \text{PFU/mL}$$

3.6 Curvas de crescimento bacteriano

3.6.1 Curvas de crescimento bacteriano: Culturas puras

Duas linhagens de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- (STi 633 e STi 691) e duas linhagens de *S. enterica* Enteritidis (SE 600 e SE 618) foram escolhidas para os ensaios de cocultura. Curvas de crescimento de 24 horas e 107 horas foram inicialmente realizadas para cada linhagem em separado. As curvas empregaram meio LB e foram incubadas sem agitação a 37°C, partindo de um inóculo 1:100 da linhagem selecionada em fase exponencial (DO 0,6 com leituras λ 600nm).

Foram realizadas amostragens a cada 2 horas na curva de 24 horas e a cada 12 horas nas curvas de 107 horas. Em cada amostragem foram medidas a densidade ótica (DO), a titulação bacteriana (UFC) por plaqueamento de gota, na qual cada diluição seriada (fator 10) foi aplicada em triplicata sobre meio LB e incubadas durante à noite a 37°C, para determinação do número médio de unidades formadoras de colônias (UFC) no dia seguinte, e a titulação viral (UFP) por plaqueamento, empregando a linhagem SE 618 como indicadora.

Adicionalmente, alíquotas da cultura foram coletadas para extração de DNA e armazenadas a -20°C, após centrifugação e descarte do sobrenadante.

3.6.2 Curva de crescimento bacteriano em cocultura

Após a realização das curvas de crescimento das amostras STi (633 e 691) e SE (600 e 618) separadamente, curvas de crescimentos com as misturas (coculturas) de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- (STi) e *S. enterica* Enteritidis (SE) foram realizadas. Quatro curvas de crescimento, em triplicata, foram acompanhadas novamente com os mesmos parâmetros das curvas separadas.

As linhagens STi 633 e STi 691 foram cocultivadas com as linhagens SE 618 e SE 600, aos pares. As misturas envolveram proporções 1:1 de cada linhagem, confirmadas posteriormente por plaqueamento e determinação da UFC.

3.7 Teste de queda do crescimento de *S. enterica* Enteritidis pela ação de fagos líticos de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- Saeni 633 e Saeni 691

3.7.1 Padronização da curva de crescimento de *S. enterica* Enteritidis (SE)

A padronização do crescimento das amostras SE 600 e 618 foi realizada em triplicata. As amostras foram inoculadas em meio líquido Lúria-Bertani (LB) e incubadas a 37°C, sem agitação, durante à noite. Após, essa cultura foi diluída em 20mL de LB na proporção 1:50 com agitação (200 RPM) a 37°C. Após uma hora foram feitas a medição de DO (λ 600nm) e a determinação da CFU; essas medidas foram realizadas, novamente, nos tempos de 2 horas e 2,5 horas de crescimento da cultura.

3.7.2 Curvas de crescimento das SE 600 e 618 com os fagos líticos Saeni 633 e Saeni 691

As amostras bacterianas SE 600 e 618 selecionadas foram pré-cultivadas a 37°C durante aproximadamente 18-20 horas até a fase estacionária, em meio LB. Essa cultura foi diluída em 20mL de LB na proporção 1:50 e novamente levada ao crescimento com agitação (200 RPM) a 37°C até atingir a DO 0,5 (λ 600nm) que na curva de padronização, o número de UFC nessa DO, corresponde a aproximadamente 5×10^7 . Ao atingir essa DO foi feita a contagem de UFC para

que fosse feita a comparação com o número de fagos adicionados na cultura e que fosse estimada a proporção entre bactérias SE e fagos induzidos de STi (MDI). Após a adição dos fagos, foram medidas a DO e a UFC a cada hora.

3.8 Reações de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR)

Para quantificação da proporção de DNA genômico entre *S. enterica* I,4,[5],12:i:- (STi) e *S. enterica* Enteritidis (SE) nas coculturas foi utilizado a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR).

3.8.1 Confecção dos Iniciadores (Primers)

As sequências escolhidas para desenhar os iniciadores foram feitas a partir de genes preservados relacionados a diferenças antigênicas (Tabela 3).

Foram realizadas buscas de alinhamentos de nucleotídeos, utilizando o programa *on line BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), para confirmação de sequências únicas em cada um dos genomas das sorovariedades, menos *invA* (presente em ambas).

Os iniciadores utilizados para a Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR) foram desenhados a partir do programa *Primer Express 3.0*, Applied Biosystems (Foster City, EUA). Ao todo, 50 pares de iniciadores foram sugeridos pelo programa e dois pares de cada gene foram escolhidos, baseados em menor número de autoanelamento e maior temperatura de desnaturação (Tabela 4).

As reações foram realizadas em termociclador da marca Applied Biosystems (Foster City, EUA), modelo *Step One Plus*, do Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Unicamp. As regiões escolhidas foram baseadas em sequências já descritas e depositadas no *Gene Bank*: *S. enterica* Typhimurium LT2 (55) para STi e *S. enterica* Enteritidis PT4 isolado P125109 (56) para SE.

Tabela 3. Genes alvos utilizados nos experimento de RT-PCR.

Nome do gene	Descrição do gene	Presente na Sorovariedade	Referência
<i>invA</i>	Proteína de invasão	ambas	(2)
<i>fliC</i>	Proteína estrutural flagelar	STi	(57)
<i>rfbJ</i>	Biossíntese do antígeno O4	STi	(58)
<i>fliB</i>	Proteína estrutural flagelar	SE	(59)
<i>prot6E</i>	Biossíntese da fímbria	SE	(57)

Os iniciadores foram confeccionados pela empresa IDT *Integrated DNA Technologies* (Coralville, EUA). Como solução estoque, os iniciadores foram diluídos em uma concentração de 1nmol/ μ L em água deionizada, ultrafiltrada e autoclavada *Milli-Q® Integral Water Purification Systems*, (Billerica, EUA) e estocados a -20°C.

Tabela 4. Iniciadores avaliados para as reações de RT-PCR.

Gene	Sequência	Presente na sorovariedade	Temperatura de anelamento	Tamanho do Amplicom
<i>invA</i> (1)F	GAAGTTGAGGATGTTATTTCGCAAAG	Ambas	54.5°C	78 pb
<i>invA</i> (1)R	GGAGGCTTCCGGGTCAAG		58.3°C	
<i>invA</i> (2)F	TGTCCTCCGCCCTGTCTACT	Ambas	60.0°C	91 pb
<i>invA</i> (2)R	CCGGCACTAATCGCAATCA		55.5°C	
<i>fliC</i> (1)F	TTAGCCTCTGTCAAATCAGCATTT	STi	54.9°C	85 pb
<i>fliC</i> (1)R	CCCCGCTTACAGGTGGACTA		58.7°C	
<i>fliC</i> (9)F	CTTTAGCCTCTGTCAAATCAGCATTT	STi	55.6°C	87 pb
<i>fliC</i> (9)R	CCCCGCTTACAGGTGGACTA		58.7°C	
<i>rfbJ</i> (1)F	ACGCAACTCTGTTTTTATTTAAGCA	STi	54.3°C	103 pb
<i>rfbJ</i> (1)R	CATTTGTAAACATGCGATTAGAGCAT		54.4°C	
<i>rfbJ</i> (7)F	TACATTTACGCAACTCTGTTTTTT	STi	54.1°C	111pb
<i>rfbJ</i> (7)R	CATTTGTAAACATGCGATTAGAGCAT		54.4°C	
<i>fliB</i> (1)F	CACTGCGGTTGATCTCTTTAAGAC	SE	55.8°C	81 pb
<i>fliB</i> (1)R	CCTTTAATGGCACCAGCTATCG		56.0°C	
<i>fliB</i> (24)F	ATAACACTGCGGTTGATCTCTTTAAG	SE	55.2°C	85 pb
<i>fliB</i> (24)R	CCTTTAATGGCACCAGCTATCG		56.0°C	
<i>prot6E</i> (1)F	GGAATGACAGCCATGGGTAT	SE	57.1°C	60 pb
<i>prot6E</i> (1)R	CCCCGAACCCAACCA		58.0°C	
<i>prot6E</i> (2)F	GCCCGGCGTGGGTAA	SE	58.9°C	69 pb
<i>prot6E</i> (2)R	GTACAGTTTTGTCCGTTGTATCGA		55.3°C	

Legenda: Os números entre parênteses se referem à ordem de sugestão dos iniciadores no programa *primer 3.0*

3.8.2 Confirmação da especificidade dos iniciadores por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Os iniciadores foram avaliados quanto sua especificidade em uma reação de PCR. As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 50µL,

contendo 2,5pmol de cada iniciador, aproximadamente 40ng de DNA genômico, 200µmol de dNTP, 2,5 Unidades (U) de Taq polimerase, 2mmol de MgCl₂ e 5µL de Tampão de reação (concentração final de 1x).

O ciclo utilizado constitui-se de um passo de aquecimento inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação à temperatura do iniciador (Tabela 4) por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações foram realizadas no termociclador modelo *Peltier Thermal Cycler TTC200* da MJ *Research* (Watertown, EUA).

Cada reação foi feita com uma temperatura de hibridação otimizada para cada par de iniciadores, baseando-se a princípio na temperatura sugerida pelo programa *Primer 3.0* e posteriormente ajustada empiricamente. Vários gradientes de temperatura foram testados para cada par de iniciadores, a fim de otimizar as reações.

As reações de PCR foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 2,5% conduzida a 75V (5V/cm) por 45 minutos. As fotos dos géis foram obtidas no Fotodocumentador modelo *GEL LOGIC 212 PRO* (Fairbanks, EUA).

3.8.3 Extração do DNA genômico bacteriano

Para os experimentos de PCR e RT-PCR foram feitas extração de DNA genômico bacteriano. Durante a curva de 107 horas, uma alíquota de 2mL da cultura foi retirada a cada 12 horas. Esse material foi centrifugado por 5 minutos a

12600G. O sobrenadante foi desprezado, os tubos ficaram invertidos em papel absorvente por 2 minutos para secagem e o precipitado congelado a -20°C .

Como as análises de RT-PCR foram quantitativas, utilizamos um kit de extração para padronização. O kit utilizado foi o *Purelink Genomic DNA kit*, *Invitrogen* (Carlsbad, EUA).

3.8.4 Avaliação do kit de extração de DNA

Amostras de cada uma das bactérias *S. enterica* STi 633, STi 691, SE 600 e SE 618 foram crescidas, em duplicata, por um período de 24 horas em LB a 37°C sem agitação. Alíquotas de 4mL de cada cultura foram centrifugadas por 5 minutos a 12600G e após, a extração foi realizada como descrito no protocolo do kit.

Todas as amostras de DNA extraídas foram quantificadas no espectrofotômetro modelo *Nanodrop 2000C*, *Thermo Scientific* (Wilmington, EUA).

3.8.5 Verificação de possíveis danos do congelamento das amostras para extração do DNA

Foi inoculada a amostra STi 633 em três frascos com meio LB sem agitação a 37°C por períodos de 12 horas, 3 dias e 5 dias de crescimento. Também dois precipitados congelados por 6 meses e 2 meses originários de 107 horas de crescimento foram usados neste experimento.

Partes das culturas foram incubadas com 5 unidades de DNase a 37°C por uma hora. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12.600G e ressuspensas com Tampão Tris-EDTA (TE) 0,1 M, pH 7,4.

O outro tratamento consistiu em incubar as culturas em Tampão Tris-EDTA (TE) 0,1 M, pH 7,4 a 37°C por uma hora, depois centrifugadas por 5 minutos a 12.600G e posterior ressuspensão com mesmo Tampão.

Após o tratamento, o DNA das amostras foi extraído como descrito no protocolo do *kit Purelink Genomic*, Invitrogen (Carlsbad, EUA).

3.8.6 Quantificação do DNA

Para a quantificação absoluta das amostras de DNA, utilizamos o corante (fluoróforo) *SYBR Green Master mix*, *Applied Biosystems* (Warrington, Inglaterra).

3.8.7 Curva padrão de RT-PCR

Para a padronização da curva, DNA amplificado por PCR (fliC e prot6E) foram clonados no plasmídeo *pGEN-T Easy Promega* (Madison, EUA) que, por sua vez, foi transformado na linhagem de *E. coli DH5α*. Células competentes foram preparadas por tratamento com CaCl₂ (54). Os clones positivos foram selecionados em placas de LB-Ágar com ampicilina (100µg/mL), X-gal (1mg/mL) e IPTG (10mM) a 37°C.

Reações de PCR, para confirmação das clonagens, foram feitas com DNA extraído do crescimento de 5 colônias bacterianas positivas escolhidas aleatoriamente.

Foi realizada uma extração rápida, colocando-se um pouco da massa da colônia em 10 μ L de água deionizada, ultrafiltrada e autoclavada e posteriormente aquecida em banho seco a 95°C por 10 minutos. A suspensão contendo DNA desnaturado foi centrifugada a 700G por 4 minutos e o sobrenadante utilizado para a reação de PCR. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído de STi 633 e como controle negativo água deionizada, ultrafiltrada e autoclavada.

Após a extração, as amostras foram submetidas a PCR e avaliadas quanto ao perfil de amplificação por eletroforese em gel de agarose (2,5%) conduzida a 75V (5V/cm) por 45 minutos, aproximadamente. Os resultados para amplificação dos genes *fliC* e *prot6E* estão demonstrados nas Figuras 1 e 2 respectivamente.

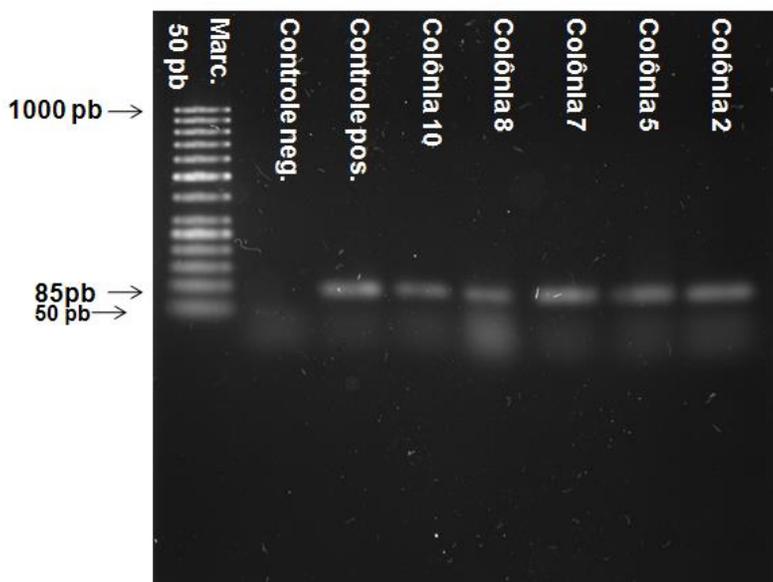


Figura 1: Eletroforese em gel (2,5%) de agarose demonstrando a amplificação por PCR do gene *fliC* (85 pb). DNA genômico de clones de *E. coli* DH5 α (2, 5, 7, 8, 10) contendo os respectivos fragmentos de DNA clonados no vetor pGEN-t easy Promega, (Madison, EUA). Controle positivo DNA extraído de STi 633 e controle negativo água deionizada, ultrafiltrada e autoclavada.

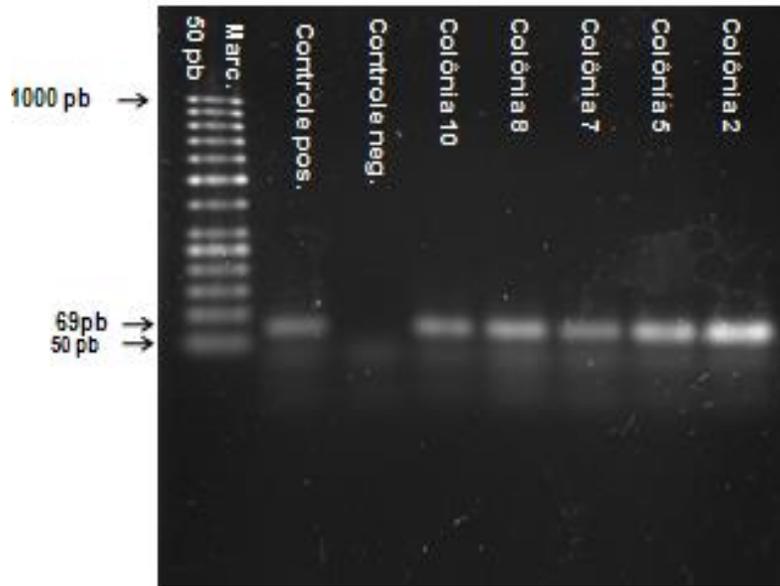


Figura 2: Eletroforese em gel (2,5%) de agarose demonstrando a amplificação por PCR do gene *prot6E* (69 pb). DNA genômico de clones de *E. coli* DH5 α (2, 5, 7, 8, 10) contendo os respectivos fragmentos de DNA clonados no vetor pGEN-t easy Promega, (Madison, EUA). Controle positivo DNA extraído de STi 633 e controle negativo água deionizada, ultrafiltrada e autoclavada.

Uma pequena quantidade da massa das bactérias contendo o inserto para *fliC* e *prot6E* de uma das colônias foi crescida em LB com ampicilina 100 μ L/mL com agitação (150 RPM) a 37°C por 18-20 horas aproximadamente. Dessa cultura foi extraído o DNA plasmidial que foi utilizado nas reações de RT-PCR.

Para construção da curva padrão, duas concentrações de iniciadores foram testadas, a saber, 400nM/ μ L e 200nM/ μ L. A concentração inicial de DNA plasmidial foi de 1 μ g/ μ L e foram feitas sete diluições desse DNA na proporção 1:5, obtendo-se as diluições 1 μ g/ μ L, 0,2 μ g/ μ L, 0,04 μ g/ μ L, 0,008 μ g/ μ L, 0,0016 μ g/ μ L, 0,00032 μ g/ μ L e 0,000064 μ g/ μ L.

3.9 Reações de RT-PCR

No programa do termociclador RT-PCR *step one software* 2.1 (Foster City, EUA) foi escolhida a reação: *step one plus quantification – curve standard*, fluoróforo *SYBR Green, include melt curve*. O volume da reação de RT-PCR em cada poço foi de 20 μ L, as concentrações de iniciadores 200nM/ μ L, *SYBR Green mix* 10 μ L por reação e alíquotas de 2 μ L dos DNAs de cada amostra estudada e a quantidade de ciclos realizados foram 25 ciclos.

As amostras de DNA utilizadas foram de três pontos da curva de crescimento das bactérias isoladas (11 horas, 59 horas e 107 horas), de três pontos (triplicata) das curvas de crescimento das bactérias em coculturas (11 horas, 59 horas e 107 horas).

3.10 Sequenciamento e montagem dos genomas dos Bacteriófagos Saeni 633 e Saeni 691

O DNA extraído dos fagos Saeni 633 e Saeni 691 foram sequenciados de acordo com metodologia padronizada para a plataforma HiSeq (Illumina, EUA) usando-se para isso o *kit TruSeq DNA Sample Prep Kits v2* - Illumina. As leituras (*reads*) foram montadas utilizando o programa Velvet (67). As sequências dos fagos foram então alinhadas com sequência parcial do genoma de *S. enterica* STi 633 e 691. As sequências dos fagos foram comparadas ao banco de dados usando *blastn* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os alinhamentos visualizados utilizando o programa *Artemis Comparison Tool* (60).

3.11 Análise morfológica dos bacteriófagos

3.11.1 Purificação preliminar de bacteriófagos

Foi realizada uma ultracentrifugação em colchão (*cushion*) de sacarose (61, 62) em ultracentrífuga *Beckman® Coulter* rotor TI 90 (Brea, EUA) a 85000G por 16 horas. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspenso com 1mL de Tampão SM (54).

3.11.2 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Uma alíquota de 5 μ L de cada bacteriófago, após purificação em colchão de sacarose, foi aplicada sobre uma tela de cobre de 300 *mesh*, previamente revestida com filme de *formvar* e carbono. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, o excesso foi retirado utilizando papel de filtro. Cada tela foi então flutuada separadamente sobre uma gota de um dos contrastantes testados, por 5 minutos. Foram utilizados: fosfotungstato de potássio (PTK) 2 %, pH 7,2, acetato de uranila (UA) 2% pH 4,5 (63), e molibdato de amônia 2% pH 7,0 (64). O excesso de contrastante foi também seco utilizando papel de filtro e procedeu-se uma secagem de 40 minutos à temperatura ambiente antes do armazenamento da tela no recipiente apropriado. As telas foram posteriormente submetidas à visualização por microscopia eletrônica de transmissão, no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, UNICAMP, ao Microscópio Eletrônico de Transmissão marca Zeiss, modelo LEO 906 (Oberkochen, Alemanha).

4 – RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Testes de suscetibilidade das induções de fagos em *S. enterica* I,4,[5],12.:i:- (STi) e *S. enterica* Enteritidis (SE)

A princípio, foram utilizados protocolos de indução (triplicata) por Mitomicina C 1% e 2% e peróxido de hidrogênio (28) em todas as amostras de *S. enterica* I,4,[5],12.:i:- (STi) e *S. enterica* Enteritidis (SE) da coleção do laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana do Instituto de Biologia, Unicamp, tendo sido isoladas de material biológico (hemocultura e coprocultura).

Após a indução, sobrenadantes contendo possíveis bacteriófagos líticos de *S. enterica* foram testados quanto à atividade lítica. Os resultados estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

É importante ressaltar que daqui em diante no texto será utilizada a norma de nomenclatura de fagos nos quais os dois primeiros caracteres do nome dos fagos são derivados do gênero da bactéria hospedeira, sendo seguidos pelos dois primeiros caracteres da espécie e em seguida de um número específico de cada linhagem bacteriana (65). Além disso, foi acrescentada a letra “i” após os quatro primeiros caracteres de possíveis fagos induzidos em culturas de *S. enterica* I,4,[5],12.:i:-. Dessa forma, por exemplo, os fagos induzidos de *S. enterica* I,4,[5],12.:i:- 633 e 691 foram denominados Saeni 633 e Saeni 691, respectivamente.

Quando amostras de *S. enterica* Enteritidis foram utilizadas como fonte de fagos, após a indução com mitomicina C 1% e 2% e peróxido de hidrogênio (triplicata), somente em dois casos (Saen 679 induzido por Mitomicina 1% e Saen 678 induzido por peróxido de hidrogênio contra STi 683) foram observadas atividades líticas sobre *S. enterica* I,4,[5],12:i:-. Por outro lado, atividades líticas/inibição foram observadas quando o sobrenadante de culturas de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- foram testados contra diferentes linhagens de *S. enterica* Enteritidis, seja por tratamento com Mitomicina C1% e 2% (Tabelas 5 e 6) ou com peróxido de hidrogênio (Tabela 7).

Tabela 5. Teste de suscetibilidade de “fagos” induzidos por Mitomicina C (1%) de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- (STi) contra *S. enterica* Enteritidis (SE).

	SE 600	SE 601	SE 602	SE 606	SE 618	SE 636	SE 672	SE 676	SE 678	SE 679
Saeni 607	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saeni 624	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Saeni 633	+	+	+	++	++	+	++	+++	+++	+
Saeni 635	++	+	+	++	-	++	+	++	++	++
Saeni 683	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saeni 691	+	+	++	+++	+	++	+	+	+	++
Saeni 6229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saeni 5679	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Saeni 6234	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Saeni 6175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saeni 6195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (-) ausência de placa de lise: (+) pequena quantidade de placas de lise: (++) muitas placas de lise; (+++) junção das placas de lise formando uma única grande placa. Este experimento foi feito em triplicata e essa tabela é a que melhor representa três experimentos.

O tratamento com Mitomicina C a 2% (Tabela 6) e com peróxido de hidrogênio (Tabela 7) foram os que mais resultaram em extratos com atividade lítica.

Tabela 6. Teste de suscetibilidade de “fagos” induzidos por mitomicina C (2%) de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- contra *S. enterica* Enteritidis (SE).

	SE 600	SE 601	SE 602	SE 606	SE 618	SE 636	SE 672	SE 676	SE 678	SE 679
Saeni 607	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saeni 624	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Saeni 633	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Saeni 635	++	++	++	-	++	++	++	++	+	+
Saeni 683	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Saeni 691	++	++	++	++	+++	++	++	++	+++	++
Saeni 6229	+	+	-	+	+	++	+	+	-	+
Saeni 5679	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saeni 6234	+	++	+	+	+	+	+	+	++	++
Saeni 6175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saeni 6195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (-) ausência de placa de lise: (+) pequena quantidade de placas de lise: (++) muitas placas de lise; (+++) junção das placas de lise formando uma única grande placa. Este experimento foi feito em triplicata e essa tabela é a que melhor representa três experimentos.

Após todos esses testes foram selecionadas cinco linhagens, sendo três STi (633, 683 e 691) e duas SE (600 e 618), para a continuidade dos demais experimentos. Essa seleção foi baseada nos resultados mais expressivos para a atividade lítica, no caso de extratos de STi, e na suscetibilidade a fagos, no caso das linhagens SE. Assim, foram testadas outras duas estratégias para indução de

fagos: exposição à luz ultravioleta (42) e exposição à meio pré-condicionado (53).

Os resultados estão apresentados nas tabelas 8 e 9.

Tabela 7. Teste de suscetibilidade de “fagos” induzidos por H₂O₂ (2mM) de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- contra *S. enterica* Enteritidis (SE).

	SE 600	SE 601	SE 602	SE 606	SE 618	SE 636	SE 672	SE 676	SE 678	SE 679
Saeni 607	+	+	+	+	++	+	-	++	+	+
Saeni 624	+	++	+	-	-	+	-	++	++	+
Saeni 633	++	++	++	+++	+++	++	++	++	+++	+
Saeni 635	+	++	+	+	+++	+	+++	+	++	+
Saeni 683	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Saeni 691	+	++	+	+	++	++	++	++	+++	+++
Saeni 6229	+	++	+	-	-	++	-	+	++	++
Saeni 5679	-	-	-	-	+	+	-	-	++	+
Saeni 6234	-	+	-	-	-	+	-	-	++	+
Saeni 6175	+	-	-	-	-	+	-	-	++	+
Saeni 6195	-	+	-	-	-	+	-	-	++	+

Legenda: (-) ausência de placa de lise: (+) pequena quantidade de placas de lise: (++) muitas placas de lise; (+++) junção das placas de lise formando uma única grande placa. Este experimento foi feito em triplicata e essa tabela é a que melhor representa três experimentos.

Inicialmente, foram realizados os testes de indução por exposição à luz UV.

Das três linhagens STi avaliadas duas (633 e 691) evidenciaram a presença de

atividade lítica no sobrenadante contra as duas linhagens SE avaliadas. A linhagem 683 STi não demonstrou a indução de “fagos” por tratamento com UV (Tabela 8). Baseados nesses resultados, as linhagens 633 STi e 691 STi foram selecionadas para a continuidade do trabalho.

Tabela 8. Teste de suscetibilidade de fagos induzidos por luz ultravioleta de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- contra *S. enterica* Enteritidis (SE).

	SE 600	SE 601	SE 602	SE 606	SE 618	SE 636	SE 672	SE 676	SE 678	SE 679
Saeni 633	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++
Saeni 683	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saeni 691	+	++	+	++	++	++	+	+	++	++

Legenda: (-) ausência de placa de lise: (+) pequena quantidade de placas de lise: (++) muitas placas de lise; (+++) junção das placas de lise formando uma única grande placa.

A indução de “fagos” de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- 633 e 691 com meio pré-condicionado provenientes de culturas de *S. enterica* Enteritidis também evidenciou a presença de atividade lítica sobre as linhagens SE 600 e SE 618 dessa última sorovariedade (Tabela 9).

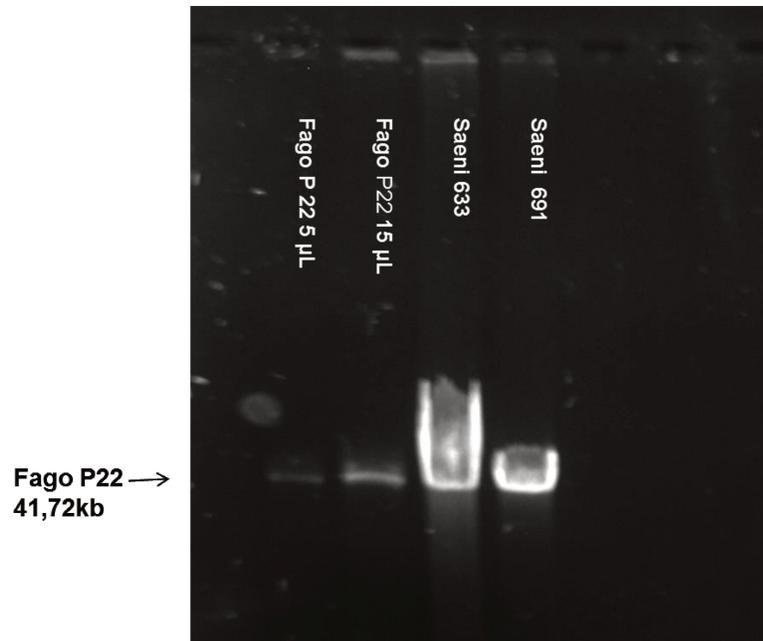
Tabela 9. Teste de suscetibilidade de fagos induzidos por meio pré-condicionado de *S. enterica* I,4,[5],12.:i:- (STi 633 e STi 691) contra *S. enterica* Enteritidis (SE 600 e SE 618).

	SE 600	SE 618
Saeni 633	++	++
Saeni 691	++	++

Legenda: (-) ausência de placa de lise; (+) pequena quantidade de placas de lise; (++) muitas placas de lise; (+++) junção das placas de lise formando uma única grande placa.

Para evidenciar a presença de DNA de fagos induzidos em culturas de 633 STi e 691 STi, o sobrenadante dessas foi submetido a protocolo de extração de DNA de fagos. Os resultados exibidos indicam a presença de DNA proveniente de fagos (Figura 3A). Em paralelo a esses experimentos, a titulação dos fagos induzidos pelos diferentes métodos em culturas de STi 633 e 691 foi testada contra SE 618. Os títulos médios observados, independente do método usado foram de 10^6 UFP/mL para Saeni 633 e 10^5 UFC/mL para Saeni 691. Como representativo desses experimentos, os títulos obtidos por tratamento com mitomicina C (1%) são demonstrados na Figura 3B.

3A



3B

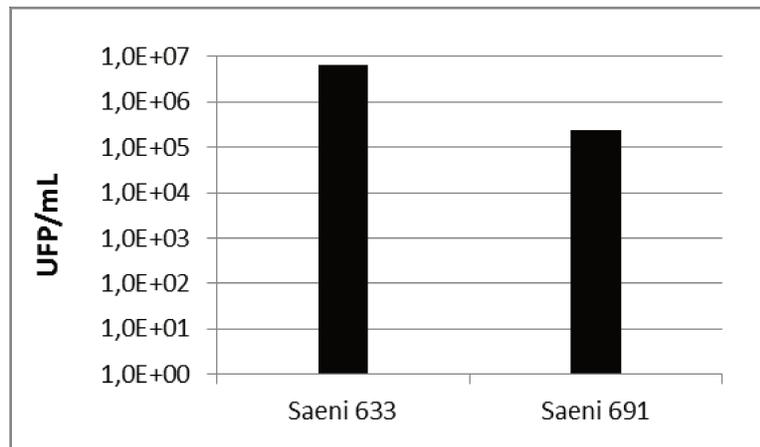


Figura 3: Extração de DNA genômico de fagos (fig. 3A) e titulação de partículas virais. (fig. 3B). 3A. Eletroforese em gel de agarose (0,7%) demonstrando a extração de DNA genômico dos bacteriófagos induzidos de *S. enterica* I,4,[5],12.:i:- (Saeni 633 e Saeni 691) por Mitomicina C (1%) Como marcador foi utilizado Bacteriófago P22NCBI NC_002371.2(66) extraído por método de extração rápida. 3B. Titulação de bacteriófagos (UFP/mL) induzidos de *S. enterica* I,4,[5],12.:i:- 633 e 691 por Mitomicina C (1%) contra SE 618 como alvo suscetível (triplicata)

Com base nos resultados obtidos nesta primeira etapa do projeto, os fagos Saeni 633 e Saeni 691 foram selecionados para uma melhor caracterização quanto ao efeito sobre culturas de *S. enterica* Enteritidis, quanto à morfologia e quanto à estrutura genômica.

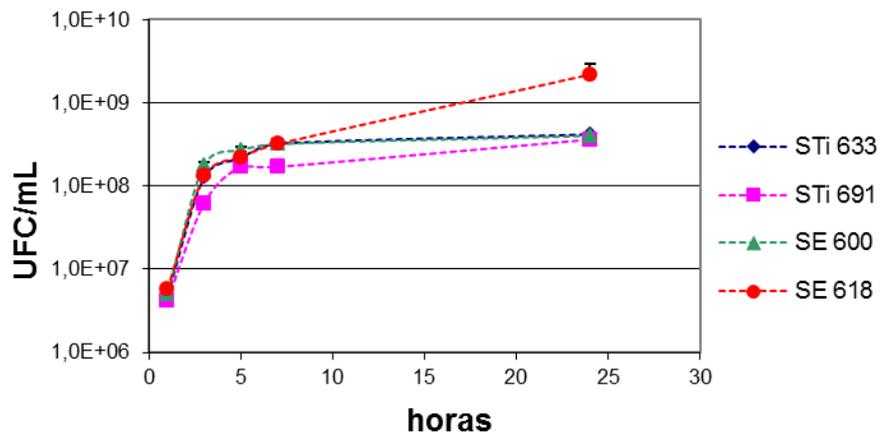
4.2 Curvas de crescimento e produção espontânea de fagos

A caracterização do crescimento das linhagens de *S. enterica* deste estudo, em culturas puras, foi essencial para comparação posterior com as coculturas. Assim, curvas padrões de crescimento foram avaliadas tendo por base a determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC) e da densidade ótica (DO) *versus* tempo. Os resultados estão apresentados na Figura 4 (24 horas) e Figura 6 (107 horas).

Foram observadas, na cultura de 24 horas, que as linhagens divergiram um pouco quanto ao crescimento, embora as curvas, como esperado, indicaram um mesmo padrão. A fase lag, relativamente curta, foi mais facilmente verificada nas leituras por DO. Todas as linhagens entraram em fase logarítmica logo após o início da cultura e entraram em fase estacionária entre 7 e 10 horas de crescimento. Ao longo de 24 horas não foram observados decréscimo no número de células, indicando que a fase estacionária persiste por mais de 24 horas.

Em paralelo a essas análises, a produção espontânea de fagos, em 24 horas, foi avaliada em culturas de *S. enterica* I,4,[5],12.i:- 633 e 691 nos tempos 1, 3, 5, 7 e 24 horas e os mesmos foram titulados. Os resultados estão demonstrados na Figura 5.

4A



4B

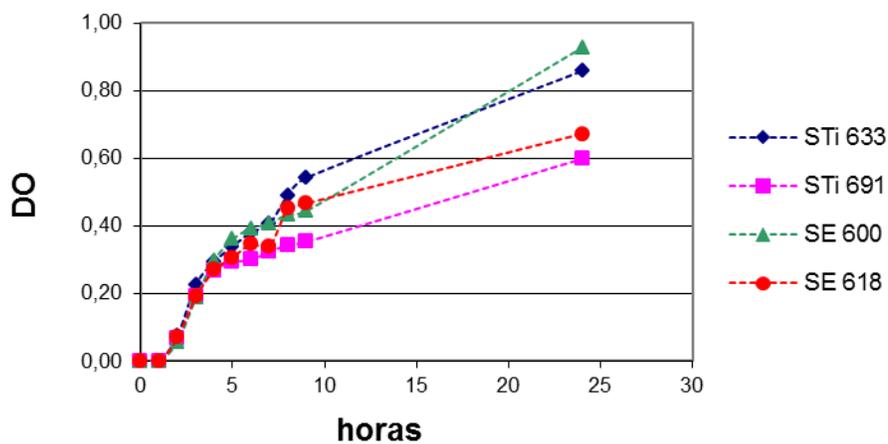


Figura 4: Curva de crescimento de linhagens de *S. enterica* ao longo de 24 horas. Figura 4A. Crescimento avaliado por determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL). Figura 4B. Crescimento avaliado por determinação da densidade ótica (DO, λ 600 nm). Este experimento foi feito em triplicata e essa tabela é a que melhor representa três experimentos

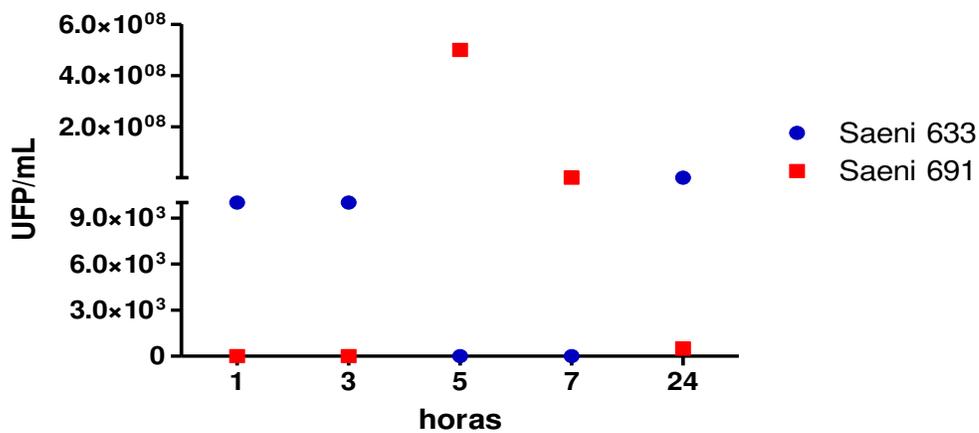
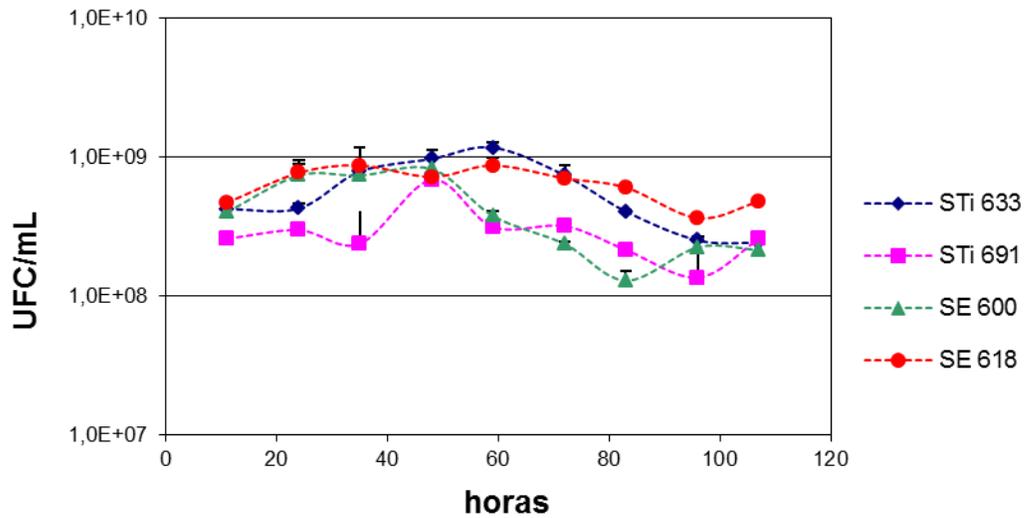


Figura 5: Determinação da Unidade Formadora de Placas de Lise (UFP/mL) em culturas de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- 633 e 691 ao longo de 24 horas de crescimento. Não foram utilizados indutores de ciclo lítico

Os dados indicam diferenças quanto aos títulos desses fagos ao longo da cultura. O fago Saeni 633 foi detectado logo no início do cultivo, mas altos títulos foram observados em tempos mais tardios. Por outro lado, o fago Saeni 691 foi detectado após 5 horas de cultivo (títulos mais elevados), sendo que os títulos decresceram ao longo da cultura.

Como em nosso projeto estavam previstas a realização de culturas de 5 dias, o comportamento das linhagens do estudo foi então avaliado em culturas de 107 horas. Os resultados estão descritos na Figura 6.

6A



6B

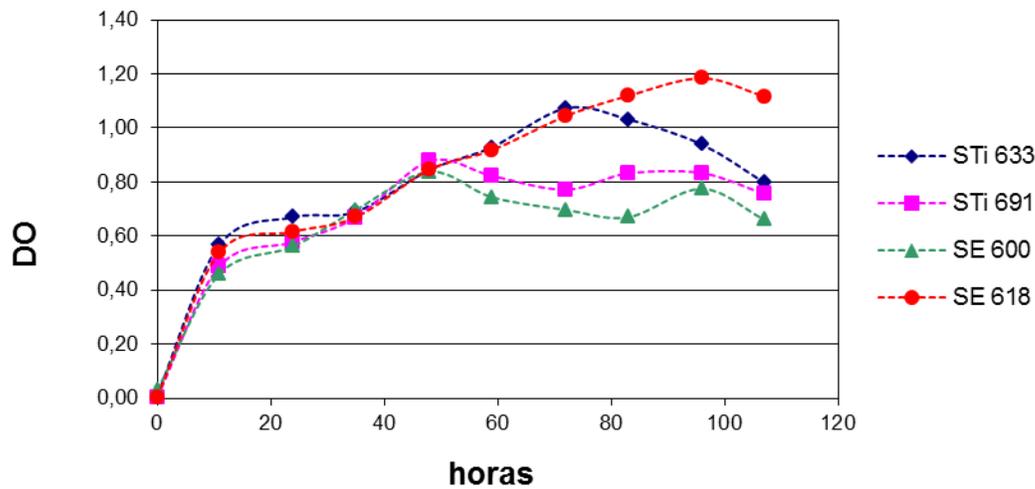


Figura 6: Curva de crescimento de linhagens de *S. enterica* ao longo de 107 horas. Figura 6A. Crescimento avaliado por determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL). Figura 6B. Crescimento avaliado por determinação da densidade ótica (DO, λ 600 nm). Este experimento foi feito em triplicata e essa tabela é a que melhor representa três experimentos

Um perfil semelhante de crescimento foi observado entre as diferentes linhagens, embora SE 618 tenha alcançado valores de UFC e DO relativamente maiores que as demais linhagens (mesma tendência encontrada na UFC de SE 618 nas curvas de 24 horas). O título de fagos produzido por *S. enterica* I,4,[5],12:i:- foi acompanhado em culturas longas, sendo os resultados demonstrados na Figura 7.

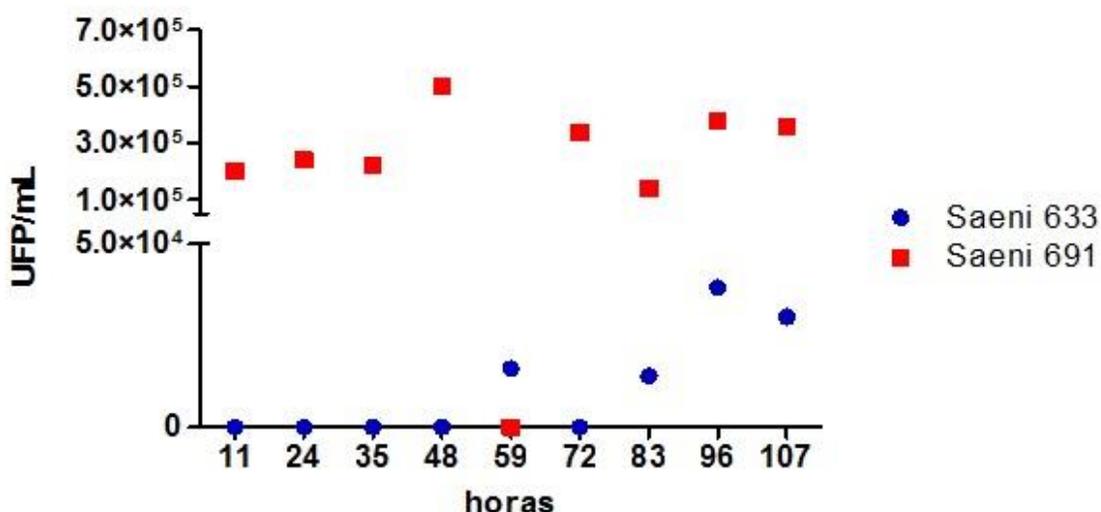


Figura 7: Fagos liberados espontaneamente durante o crescimento de linhagens STi 633 (Saeni 633) e STi 691 (Saeni 691) ao longo de 107 horas. Crescimento avaliado por determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL). Este experimento foi feito em triplicata e essa tabela é a que melhor representa três experimentos

4.3 Crescimento de *S. enterica* Enteritidis na presença de fagos líticos de *S. enterica* I,4,[5],12:i:-

Antes da realização das coculturas, foi verificada a influência dos fagos induzidos de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- Saeni 633 e Saeni 691 no crescimento de culturas de *S. enterica* Enteritidis. As curvas de crescimento de SE 600 e SE 618

foram padronizadas (dados não mostrados). Após a padronização, os fagos Saeni 633 e 691 foram acrescentados a culturas dessas linhagens, sendo que os valores de multiplicidade de infecção (MDI) alcançados estão descritos na Tabela 10.

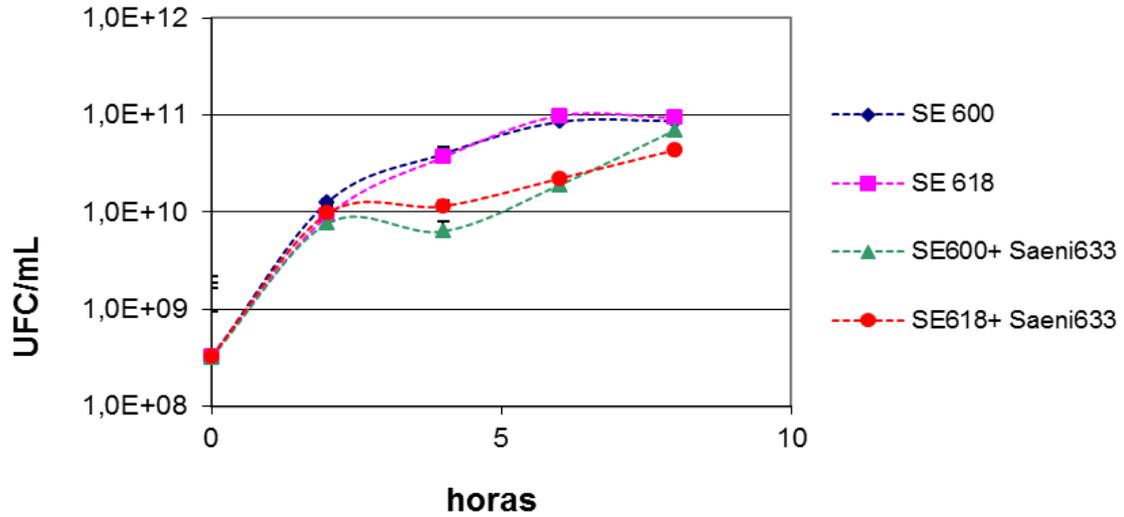
Tabela 10. Multiplicidade de Infecção de fagos relativa ao número de células bacterianas determinado por UFC/mL.

Fago	UFP/mL	Bactéria SE	UFC/mL	MDI*
Saeni 633	2,3X10 ⁶	SE 600	3,2x10 ⁸	1:140
Saeni 691	6,4x10 ⁵	SE 600	3,2x10 ⁸	1:250
Saeni 633	2,3X10 ⁶	SE 618	3,3x10 ⁸	1:140
Saeni 691	6,4x10 ⁵	SE 618	3,3x10 ⁸	1:250

* Valores aproximados

O comportamento das curvas de crescimento após a adição dos fagos está apresentado nas Figuras 08 e 09. É possível observar que ambos os fagos, nas condições utilizadas, conseguiram retardar o crescimento de *S. enterica* Enteritidis.

8A



8B

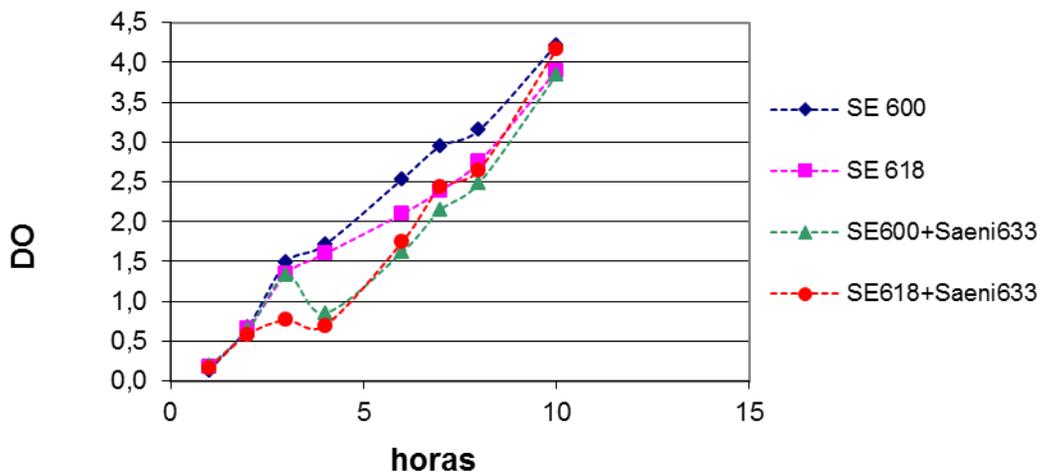
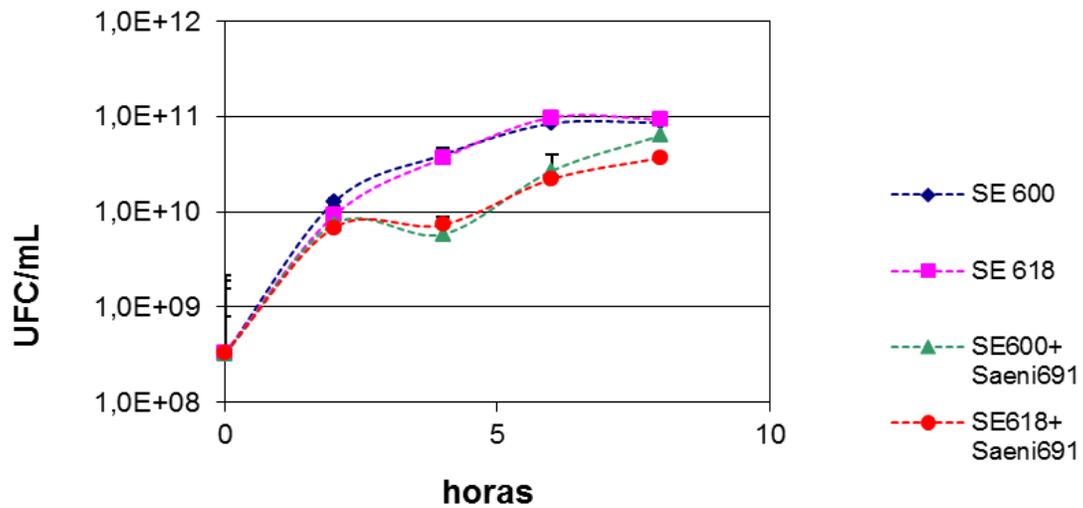


Figura 8: Curva de crescimento das linhagens de *S. enterica* Enteritidis 600 e 618 na presença do fago Saeni 633 na proporção 1:140. Figura 8A. Crescimento avaliado por Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL). Figura 8B. Crescimento avaliado por Densidade Ótica (DO). Este gráfico é o que melhor representa três experimentos

9A



9B

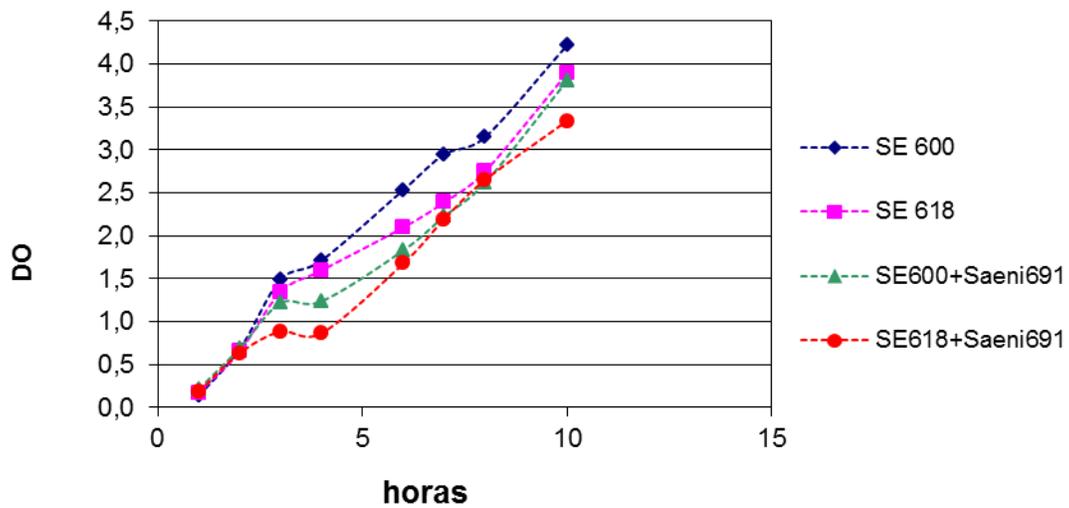


Figura 9: Curva de crescimento das linhagens de *S. enterica* Enteritidis 600 e 618 na presença do fago Saeni 691 na proporção 1:250. Figura 9A. Crescimento avaliado por Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL). Figura 9B. Crescimento avaliado por Densidade Ótica (DO). Este gráfico é o que melhor representa três experimentos

4.4 Titulação de Fagos em coculturas

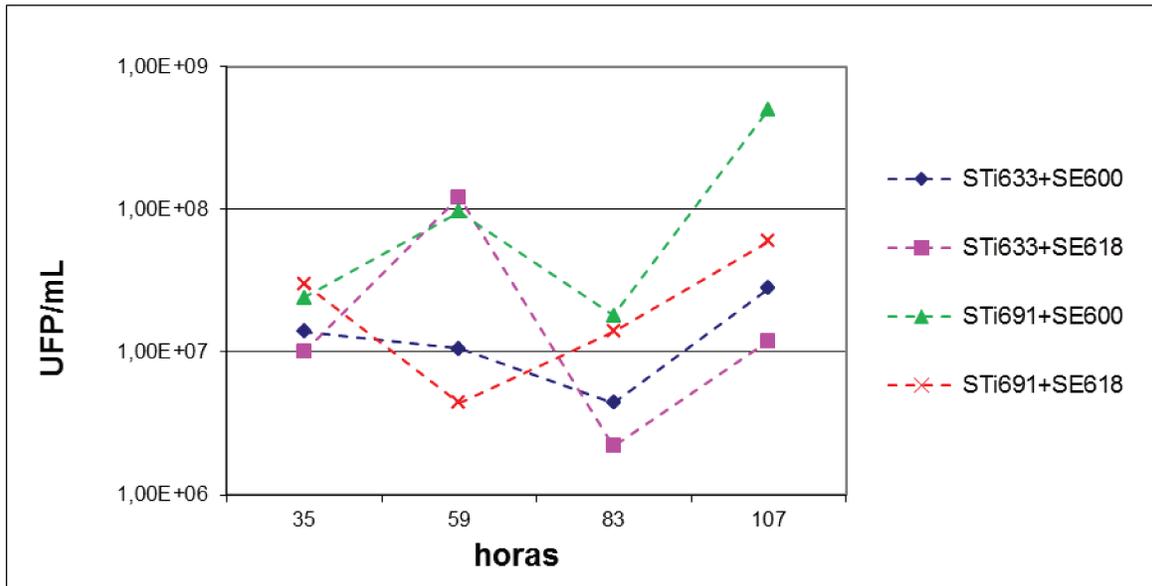
Os fagos Saeni 633 e 691 foram titulados em coculturas ao longo do tempo. Os resultados estão apresentados na Figura 10. Valores superiores a 10^6 UFP foram verificados ao longo de toda a cultura.

4.5 Padronização dos Experimentos de RT-PCR

A técnica de Reação de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (RT-PCR) foi utilizada para a quantificação do DNA genômico das diferentes linhagens de *S. enterica* em coculturas. Estes valores foram utilizados como demonstrativos indiretos da quantidade de células de cada sorovariedade nessas coculturas. Para isso foram utilizados iniciadores específicos para *S. enterica* I,4,[5],12:i:- e *S. enterica* Enteritidis desenhados a partir dos genes InvA, FliC e prot6E, RfbJ e FljB, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados de especificidade estão apresentados na Figura 10.

Os iniciadores InvA geraram produtos de amplificação para todas as amostras, embora dímeros de iniciadores tenham sido visualizados. De fato, em todas as reações, dímeros de iniciadores foram visualizados. Os iniciadores FliC foram específicos para as linhagens STi. No entanto, embora os iniciadores prot6E tenham demonstrado a amplificação de DNA de uma das linhagens STi, as bandas observadas, quando DNA genômico de *S. enterica* Enteritidis foi utilizado como molde, foram mais fortes, o que indica maior quantidade de produto amplificado.

10A



10B

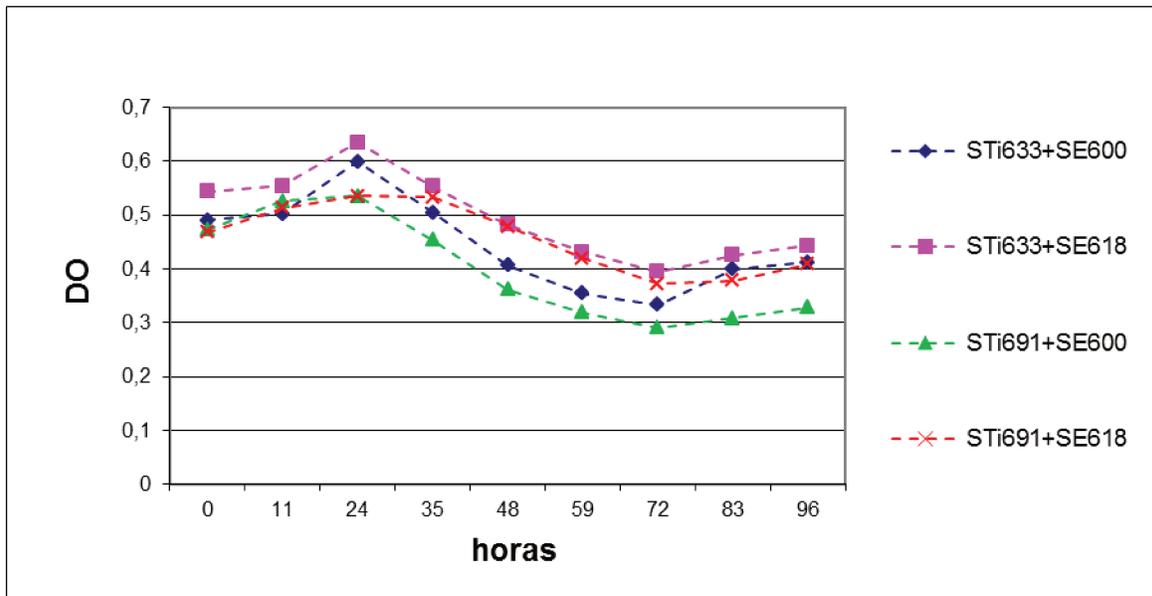
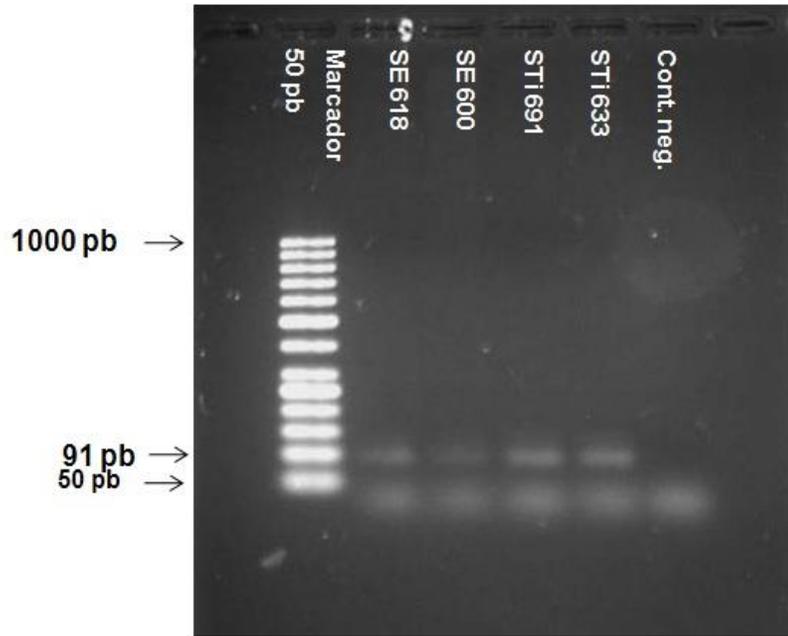
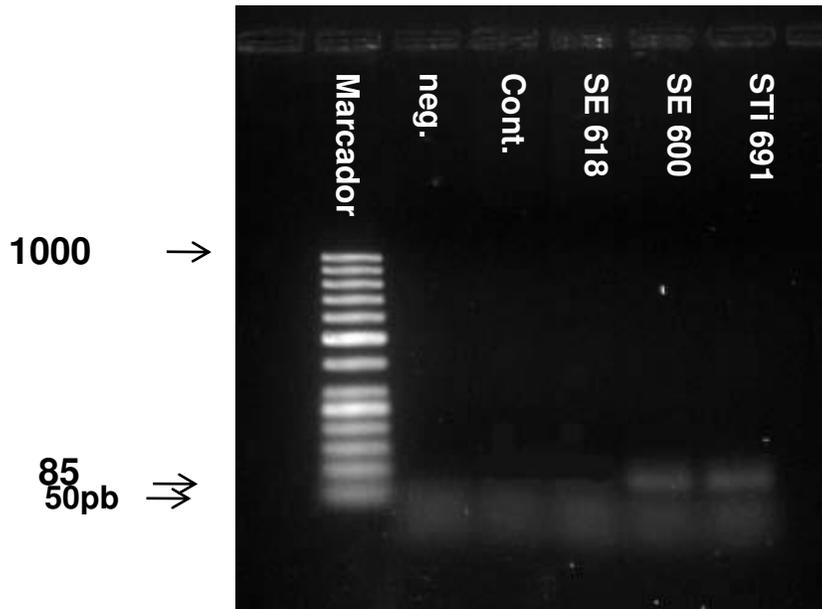


Figura 10: Titulação de fagos em coculturas de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- e *S. enterica* Enteritidis. Figura 10A. Unidades formadoras de Placas (UFP/mL). Figura 10B. Densidade óptica de coculturas. Este gráfico é o que melhor representa três experimentos

11A



11 B



11 C

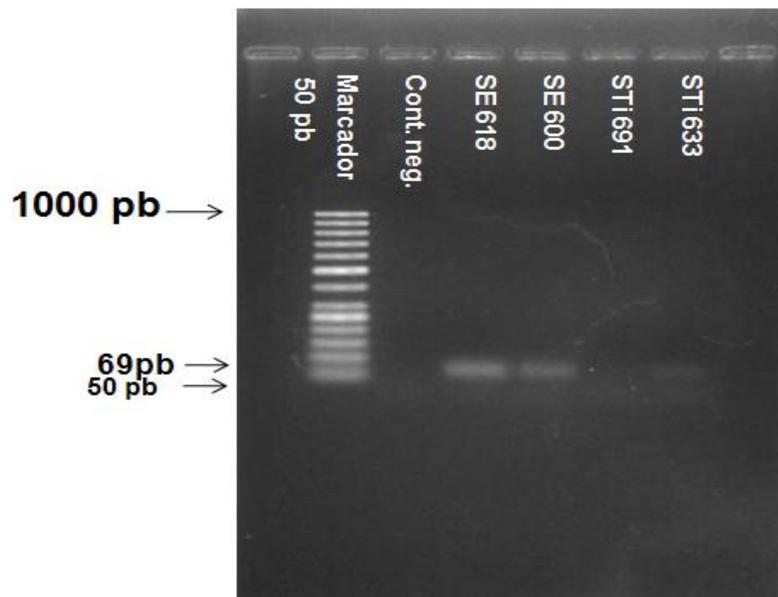


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose (2,5%) dos produtos de PCR amplificados por iniciadores a serem utilizados em RT-PCR. Figura 11A. Amplificação por PCR com os iniciadores InvA(1) (91 pb) utilizando DNA genômico de *S. enterica*. Figura 11B. Amplificação por PCR com os iniciadores FliC(1) (85 pb) utilizando DNA genômico de *S. enterica*. Notar especificidade para as linhagens STi. Figura 11C. Amplificação por PCR com os iniciadores prot6E(2) (69 pb) utilizando DNA genômico de *S. enterica*

4.5.1 Curva padrão da RT-PCR

O RT-PCR para detecção e quantificação de *S. enterica* foi inicialmente padronizado utilizando-se como DNA molde plasmídeo *pGEN-T Easy* (Promega) contendo os respectivos fragmentos de PCR clonados (dados não mostrados). Posteriormente, alíquotas bacterianas foram coletadas nos tempos 11, 59 e 107 horas de coculturas de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- e Enteritidis. O DNA genômico foi extraído e submetido a reações de RT-PCR com os diferentes iniciadores. Os resultados são apresentados na Figura 12. Não foram observadas amplificações

cruzadas quando culturas puras de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- ou *S. enterica* Enteritidis foram avaliadas para quantificação com os iniciadores específicos FliC(1) e ProtE(2). No entanto, a amplificação com FliC foi variável de acordo com a linhagem utilizada, se STi 633 ou STi 691 (Fig. 12A). A quantificação de DNA genômico de *S. enterica* Enteritidis com protE6 foi mais robusta para ambas as linhagens, sendo que produtos de amplificação foram observados em todas as amostragens (Fig. 12B). Quando DNA genômico de coculturas foram avaliados os resultados foram variáveis, de acordo com a combinação de bactérias utilizada. DNA genômico de *S. enterica* Enteritidis não foi detectado em culturas mistas com *S. enterica* STi 633, o que pode indicar total erradicação dessa sorovariedade nessas culturas (Fig. 12C). Os mesmos resultados não foram observados em culturas mistas das linhagens Enteritidis com STi 691 (Fig. 12D).

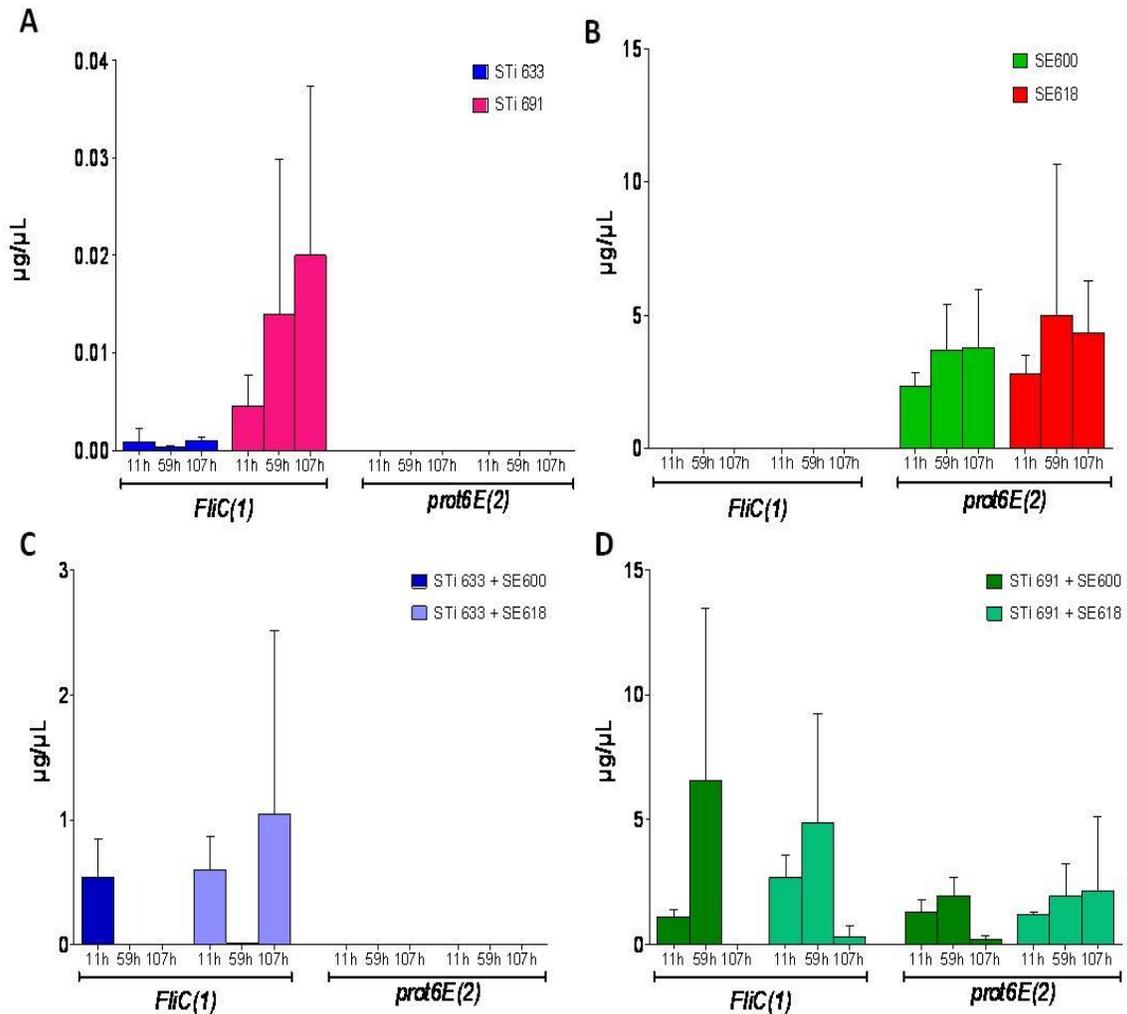


Figura 12: Quantificação de DNA genômico de *S. enterica* por RT-PCR em cultura utilizando os iniciadores FliC(1) e ProtE6(2). A) DNA genômico de linhagens de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- B) DNA genômico de linhagens de *S. enterica* Enteritidis. C) DNA genômico extraído de cocultura das linhagens STi 633 com SE 600 ou SE 618. D) DNA genômico extraído de cocultura das linhagens STi 691 com SE 600 ou SE 618. Amostras para extração de DNA foram coletadas em três diferentes tempos (11, 59 e 107 horas). Este gráfico é o que melhor representa três experimentos

4.6 Sequenciamento e montagem dos genomas de Saeni 633 e Saeni 691

DNA genômico dos fagos foram submetidos ao sequenciamento utilizando a plataforma *Illumina*. As leituras obtidas foram montadas com o programa *Velvet* (67) e comparadas com bancos de dados por *BLASTn*. Os genomas, quando possível, foram anotados utilizando o programa *Rast* (68).

O sequenciamento do fago Saeni 633 resultou em um *contig* de 39.892 pbs após a montagem. *Contigs* adicionais, provavelmente pertencentes a restos do genoma de *S. enterica*, também foram montados. O provável genoma do fago foi alinhado com a sequência genômica parcial da linhagem STi 633, identificando uma sequência com praticamente 100% de identidade que, muito provavelmente, corresponde ao profago Saeni 633. Parte da sequência de uma das extremidades do fago, aproximadamente de 9 Kbs, estava deslocada em relação à sequência genômica de *S. enterica* STi 633. Isso provavelmente ocorreu por um problema de montagem e/ou pela circularização do genoma do fago. Baseados nesses resultados, consideramos a sequência do genoma bacteriano para realizar as próximas análises. A comparação com o banco de dados por *Blastn* revelou grande identidade com genomas de linhagens de *S. enterica* Heidelberg (CFSAN002069, 41578, SL476, 93% cobertura e máxima identidade de 99%). A Figura 15, painel A, exibe o alinhamento do fago Saeni 633 com sequência homóloga de *S. enterica* Heidelberg. Pode-se notar que a maior parte desses genomas exibe alta identidade e são sintênicas. Foi também observada similaridade com o genoma de uma linhagem de *S. enterica* Typhimurium (D23580, 56% cobertura, 96% identidade máxima); no entanto, a identidade é menor (Figura 15B).

Não foi possível montar um único *contig* para o fago Saeni 691 devido à presença de DNA genômico contaminante de *S. enterica*.

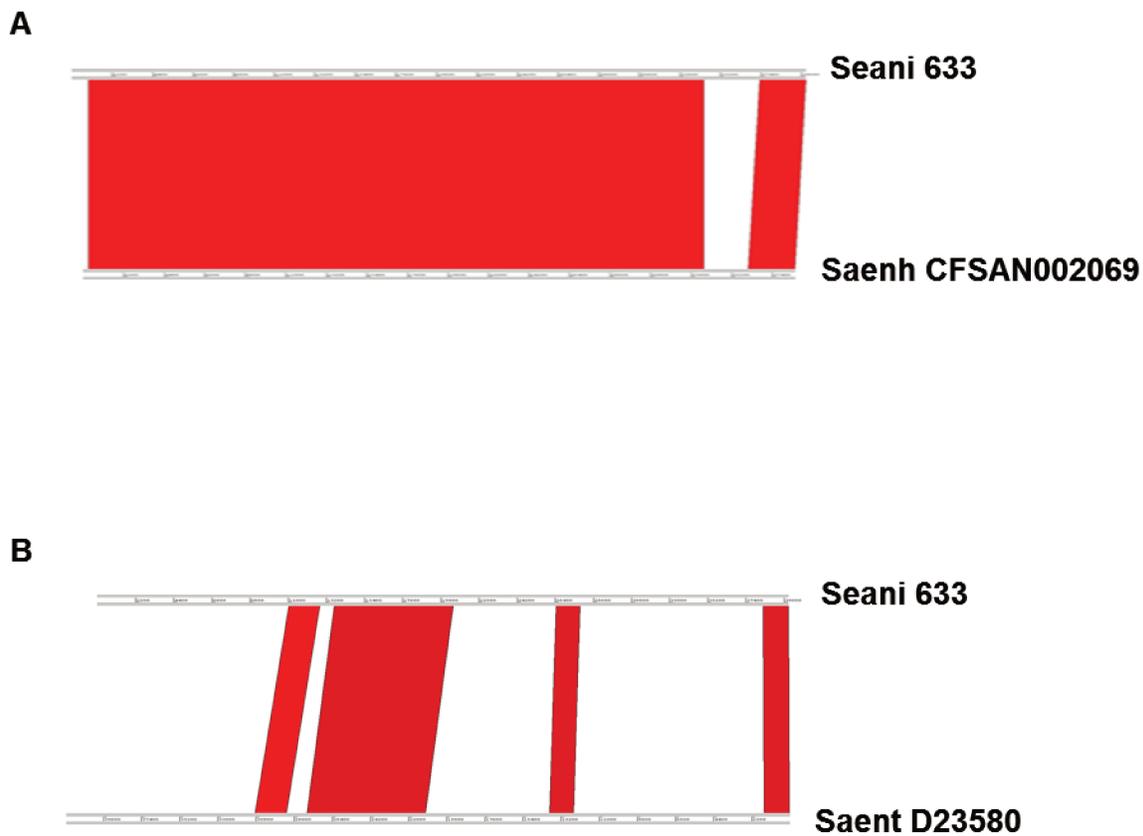


Figura 13: Alinhamento do genoma de Saeni 633 com Saenh CFAN002069 (fig. A) e com Saent D23580 (fig.B). Os alinhamentos foram gerados pelo programa ACT, utilizando Blastn, ajustado para valor de E de 0,0001, 5 para *Cost to open* e 2 para *Cost to extend gap*, 11 para *word size*, -3 para *Penalty for Nucleotide Mismatch* e 1 para *Reward for Nucleotide Match*.

4.7 Morfologia

Foi realizada uma etapa de purificação dos bacteriófagos previamente à análise morfológica ao Microscópio Eletrônico de Transmissão. Após a purificação o título detectado do bacteriófago Saeni 633 foi de $4,0 \times 10^6$ e do fago Saeni 691 foi de $2,3 \times 10^5$. Os fagos foram então processados para observação por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados estão apresentados na Figura 13. Ambos os fagos apresentam formato icosaédrico com cauda curta, morfologia compatível com a da família Podoviridae. Desta forma, os vírus caracterizados neste estudo podem ser classificados como pertencendo à ordem *Caudovirales*, família *Podoviridae* (34).

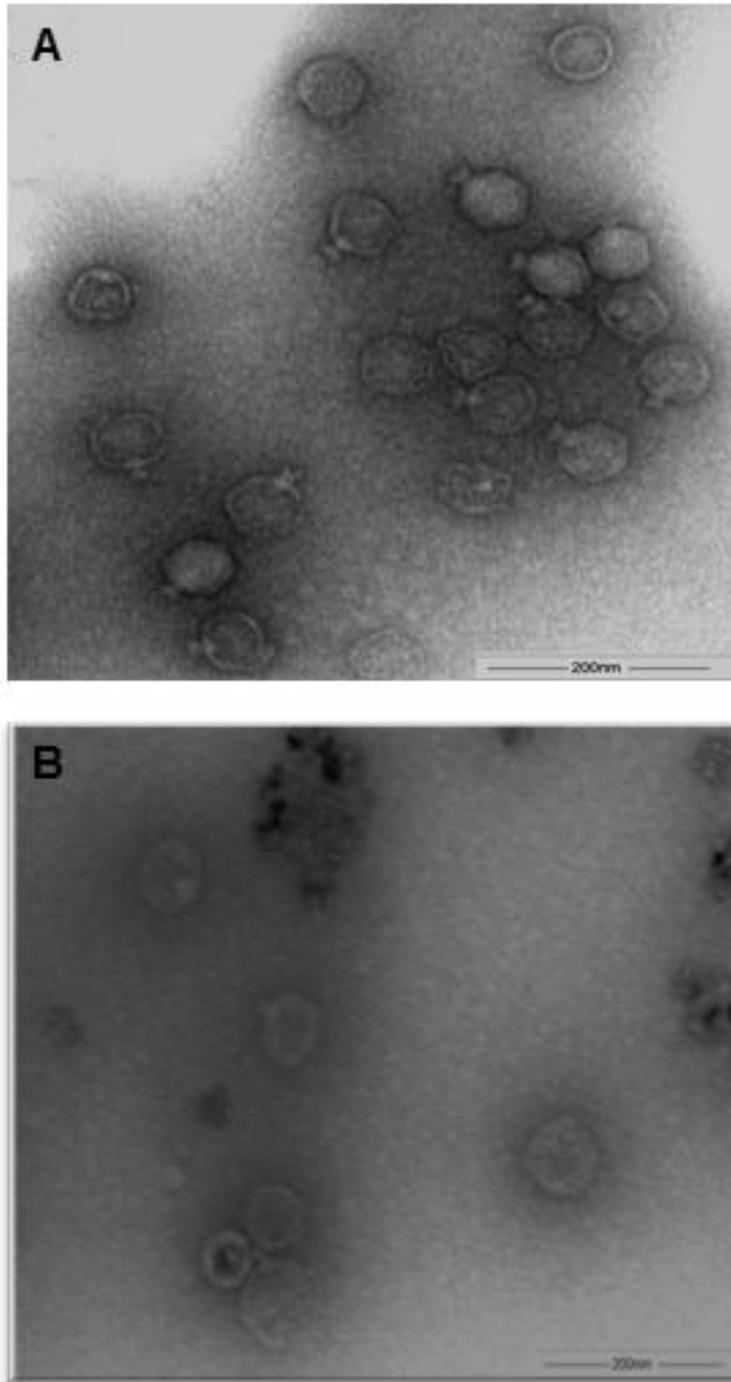


Figura 14: Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a morfologia dos fagos Saeni 633 aumento 100.000X (Figura A) e Saeni 691 aumento 100.000X (Figura B). Os fagos foram parcialmente purificados por centrifugação em colchão de sacarose

5 - DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos visam identificar os agentes etiológicos e suas flutuações sazonais e contribuem para um melhor entendimento das patologias relacionadas a eles (21, 22). O acompanhamento das classificações anuais de prevalência global e nacional de sorovariedades de *S. enterica* permite perceber mudanças significativas entre essas sorovariedades, que em determinadas épocas possuem maior ou menor prevalência (14, 21).

Neste estudo procuramos verificar o comportamento de bacteriófagos lisogênicos da *S. enterica* I,4,[5],12:i:- que atuam como um fator de mobilidade nesta prevalência, pois é sabido que profagos podem alterar drasticamente os níveis populacionais entre grupos não clonais (47). Esse fenômeno contribui para competitividade entre as populações e manutenção da diversidade natural entre comunidades bacterianas (52). Se *S. enterica* I,4,[5],12:i:- não tem a capacidade de expressar a segunda fase do antígeno flagelar (14) e estudos mostram a importância do flagelo bacteriano na mobilidade, na patogenicidade e na formação de biofilme, além do escape do sistema imunológico, por aumentar o repertório de antígenos expressos pela célula bacteriana (12, 15) pesquisou-se neste trabalho um possível fator que pudesse contribuir com seu sucesso evolutivo na competição com outras sorovariedades (13, 21).

Fagos são induzidos espontaneamente (47) ou por exposição a fatores físicos ou químicos, tais como luz UV e antibióticos (28, 42). Foram utilizados protocolos de indução de profagos em várias linhagens de *S. enterica* I,4,[5],12:i:-

(STi) e *S. enterica* Enteritidis (SE). Após essas induções, testes de suscetibilidades cruzada entre os sobrenadantes contendo possíveis fagos induzidos de STi e SE foram realizados. Fagos induzidos de STi demonstraram um alto padrão de lise quando testadas em SE como bactéria suscetível a infecção por fagos líticos (36).

Quando amostras de *S. enterica* Enteritidis foram utilizadas como fonte de fagos, após a indução com mitomicina C 1% e 2% e peróxido de hidrogênio, foram observadas raras atividades de lise e placas bem menos pronunciadas sobre *S. enterica* I,4,[5],12:i:- (dados não mostrados).

Desses testes de suscetibilidade, os fagos que apresentaram os melhores perfis, ou seja, limpidez e tamanho das placas de lise, e também bandas mais fortes no gel de eletroforese (Tabelas 5, 6, 7, e Figura 3), foram selecionados para testes em outros dois protocolos: raios ultravioletas (42) e exposição a meio pré-condicionado (53) (Tabelas 8 e 9).

Após, foram escolhidas quatro linhagens, sendo duas de STi (633 e 691) e duas SE (600 e 618) que dariam continuidade aos experimentos.

A nomenclatura para os fagos induzidos de *S. enterica* utilizados neste estudo utiliza os dois primeiros caracteres do gênero da bactéria hospedeira mais os dois primeiros caracteres da espécie da mesma, seguida de um número para diferenciá-las (65). Nesse caso, foram escolhidas as numerações de identificação de *S. enterica* provenientes das amostras identificadas no estoque do LGBmol. E ainda, como todos os bacteriófagos induzidos eram provenientes de *S. enterica*, foi acrescentada a letra “i” após os quatro primeiros caracteres de *S. enterica*

I,4,[5],12.i:- (monofásica) para diferenciar os bacteriófagos provenientes desta sorovariedade. É importante salientar que essa nomenclatura não necessariamente especifica um único tipo de fago, mas pode representar uma população de fagos diferentes induzidos de uma determinada bactéria.

Em culturas puras avaliadas por 24 horas, as linhagens SE e STi apresentaram padrão de crescimento característico onde as fases lag, logarítmica e estacionária foram observadas (Figuras 5 e 6). Na avaliação das curvas de 107 horas de crescimento (Figuras 8 e 9), além das fases características, uma diminuição na contagem UFC foi observada em tempos mais tardios, indicando que as culturas entraram em fase de decréscimo.

Em culturas de *S. enterica*, em fase estacionária, nas quais a UFC chega a 10^9 , a quantidade de partículas de fagos no sobrenadante pode chegar a valores entre 10^4 e 10^5 (47); ou seja, quando a quantidade de bactérias entra em uma grande densidade populacional fagos são liberados espontaneamente (27). Baseados nesse fato, durante as medições das taxas de crescimento (DO e UFC) das culturas de STi, também foram titulados as liberações espontâneas de fagos e os resultados nas curvas de 24 horas (Figura 7) e 107 horas (Figura 10) mostraram que fagos são liberados espontaneamente, sendo encontrado um log de grandeza maior em Saeni 691 do que Saeni 633.

No estudo do crescimento bacteriano na presença de fagos, as duas linhagens SE mostraram uma diminuição do crescimento após adição dos fagos de *S. enterica* I,4,[5],12.i:-. Nesses experimentos (triplicata) as curvas de crescimento medindo-se CFU e DO das linhagens SE 600 e SE 618 para

padronização delas. Após, com os mesmos padrões de temperatura, aeração e densidade populacional, foram adicionados os fagos Saeni 633 e Saeni 691 às culturas. Pode-se observar uma queda de um log na CFU das linhagens SE 600 e 618 entre 3 a 6 horas na presença desses fagos, se comparados com a mesma curva de crescimento sem a adição de fagos. Posteriormente, após 8 horas de crescimento a CFU entre as culturas convergem para valores similares (Figura 12 e 14). Também foi observada uma pequena queda na DO no mesmo tempo de experimento (Figura 11 e 15).

De fato, dados da literatura indicam que fagos podem funcionar como reguladores do equilíbrio populacional entre diferentes bactérias (52). Desta forma, esses dados sugerem que *S. enterica* I,4,[5],12:i:- produz fagos líticos para Enteritidis espontaneamente, podendo conferir uma vantagem adaptativa para a sorovariedade monofásica na competição com *S. enterica* Enteritidis e mesmo ainda para outras sorovariedades. Além disso, as linhagens STi testadas não são suscetíveis à infecção/replicação dos fagos aqui avaliados. Esses resultados corroboram outros trabalhos da literatura (47, 50).

Baseados nesses resultados, procedemos a realização de culturas mistas contendo uma linhagem STi e uma linhagem SE, com o intuito de verificar a dinâmica populacional de *S. enterica* nessas culturas. A hipótese levantada foi a de que os fagos produzidos de forma espontânea de *S. enterica* I,4,[5],12:i:- poderiam conferir alguma vantagem seletiva para essa sorovariedade, em detrimento de linhagens *S. enterica* Enteritidis. Uma estratégia utilizada foi o uso de RT-PCR para quantificar a quantidade de DNA específico de cada uma dessas

sorovariedades ao longo da cultura mista. O RT-PCR possibilita essa estimativa e é amplamente utilizado para detectar vários tipos de patógenos, dentre eles *S. enterica* (69).

Foram escolhidas sequências de genes de manutenção (*housekeeping*) para o desenho dos iniciadores. O gene *InvA* é amplamente utilizado como gene alvo em experimentos de RT-PCR, pois está presente na maioria dos isolados de *S. enterica* (4), porém, durante a técnica de clonagem para construção de bibliotecas genômicas, não foram obtidos clones positivos e optou-se por seguir os estudos sem esse gene.

A identificação tradicional por PCR não é capaz de estimar quantitativamente os indivíduos de um estudo, mas foi utilizado neste trabalho para confirmar a especificidade dos iniciadores escolhidos. Os iniciadores da Tabela 4 (Material e Métodos) foram testados e, de acordo com os resultados obtidos pelo PCR, foram escolhidos três pares de iniciadores, considerando os que tinham maior T_m (próximos a 60°C) e que apresentaram melhores perfis eletroforéticos. Os iniciadores escolhidos foram FliC(1) e Prot6E(2). Os genes *fliC* e *prot6E* são utilizados para identificação de *S. enterica* Typhimurium (a que mais se aproximava geneticamente de *S. enterica* I,4,[5],12:i:-) e *S. enterica* Enteritidis, respectivamente (57).

O RT-PCR oferece a possibilidade de se estimar o número de bactérias em uma determinada alíquota, pois utiliza iniciadores específicos para cada sorovariedade, além de ser preciso e rápido (4). Essa quantificação não é apenas baseada em um único sinal luminoso, mas em um aumento exponencial da

quantidade de DNA, diluída em concentrações conhecidas e amplificada em vários ciclos, criando-se assim uma curva padrão que é utilizada para determinar uma quantidade de DNA desconhecida em uma amostra quando comparada com essa curva (quantificação absoluta) (2).

Para essa quantificação absoluta das amostras, foi utilizado o fluoróforo *SYBR Green* amplamente utilizado em cadeias duplas de DNA (69), pois esse corante supera a necessidade de construção de sondas fluorescentes e, assim, simples protocolos de PCR modificados puderam ser utilizados nas reações (70).

Foi realizada uma série de reações de RT-PCR para se estimar a quantidade de DNA de STi e SE em várias alíquotas, primeiro em culturas puras e posteriormente em culturas mistas dessas bactérias. Foram escolhidos três tempos das curvas de crescimento de 107 horas, a saber, 11 horas, 59 horas e 107 horas. Com base na curva de 24 horas, com 11 horas de crescimento, a cultura estaria entrando na fase estacionária. Por sua vez, na curva de 107 horas, em 59 horas foi verificada uma queda no crescimento da cultura. Finalmente, com 107 horas de crescimento a cultura estava em declínio. Nesse último tempo (107 horas) é possível que os fagos líticos para SE se tornaram lisogênicos, deixando assim de influenciar na competição (50).

Durante o crescimento bacteriano a partir de uma mesma CFU de *S. enterica* I,4,[5],12.i:- (STi) e *S. enterica* Enteritidis (SE), nossa hipótese, como salientado anteriormente, era de que haveria um aumento significativo na população de *S. enterica* I,4,[5],12.i:- (STi) e um decréscimo na população de *S. enterica* Enteritidis (SE).

Foi observado que nas culturas puras os iniciadores foram bastante específicos (figura 21 e 22), demonstrando que cada par de iniciadores só amplificava o DNA de cada sorovariedade específica. Porém, nas culturas mistas, os dados obtidos variaram bastante. Uma possível explicação para esses resultados poderia ser devido ao estado de empacotamento do DNA que em culturas sob estresse nutricional encontra-se ligado a várias proteínas do nucleóide, dificultando a amplificação gênica. Outras estratégias estão em estudo para poder resolver esta limitação do método.

As análises das suspensões dos fagos Saeni 633 e Saeni 691 por microscopia eletrônica evidenciaram a presença de partículas virais (vírions) com nucleocapsídeo de formato icosaédrico e cauda curta. Esses resultados sugerem que esses fagos pertencem a Ordem *Caudovirales*, Família *Podoviridae*. De fato, a grande maioria dos fagos descritos (mais de 90%) pertence a esta Ordem (37).

Os dados de sequenciamento genômico indicaram que o fago Saeni 633 apresenta grande similaridade a profagos de *S. enterica* Heidelberg (71). Esses dados indicam a mobilidade de fagos entre diferentes sorovarietades de *S. enterica*.

6 – CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1 – Profagos de *S. enterica* I,4,[5],12.i:- (STi) podem ser induzidos por vários métodos, como Mitomicina 1%, 2%, UV, Peróxido de hidrogênio e por aumento da densidade populacional;

2 – Fagos induzidos de *S. enterica* I,4,[5],12.i:- (STi) são altamente líticos para *S. enterica* Enteritidis (SE);

3 – Fagos induzidos de *S. enterica* I,4,[5],12.i:- (STi) interferem no crescimento populacional de *S. enterica* Enteritidis (SE);

4 – O sucesso evolutivo de *S. enterica* I,4,[5],12.i:- (STi) pode estar associado a profagos líticos para *S. enterica* Enteritidis (SE);

5 - Fagos têm um importante papel na dinâmica populacional de *S. enterica*, beneficiando seu hospedeiro e atuando como um regulador na ecologia bacteriana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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 Disease*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review]. 2009 May;6(4):407-15.
2. Malorny B, Lofstrom C, Wagner M, Kramer N, Hoorfar J. Enumeration of salmonella bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2008 Mar;74(5):1299-304.
3. Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 5 ed. São Paulo, SP: Atheneu; 2008.
4. Tatavarthy A, Cannons A. Real-time PCR detection of *Salmonella* species using a novel target: the outer membrane porin F gene (*ompF*). *Letters in Applied Microbiology*. [Evaluation Studies]. 2010 Jun 1;50(6):645-52.
5. Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*. 2004 Sep;155(7):568-70.
6. Park SH, Kim HJ, Cho WH, Kim JH, Oh MH, Kim SH, et al. Identification of *Salmonella enterica* subspecies I, *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis and Typhi using multiplex PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 2009 Nov;301(1):137-46.
7. Liu B, Hu B, Zhou Z, Guo D, Guo X, Ding P, et al. A novel non-homologous recombination-mediated mechanism for *Escherichia coli* unilateral flagellar phase

variation. *Nucleic Acids Research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 May;40(10):4530-8.

8. Schmitt CK, Ikeda JS, Darnell SC, Watson PR, Bispham J, Wallis TS, et al. Absence of All Components of the Flagellar Export and Synthesis Machinery Differentially Alters Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Models of Typhoid Fever, Survival in Macrophages, Tissue Culture Invasiveness, and Calf Enterocolitis. *Infection and Immunity*. 2001;69(9):5619-25.

9. Subramanian N, Qadri A. Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic salmonella. *Nat Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Jun;7(6):583-9.

10. Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, Granier SA, Lucarelli C, Porrero MC, et al. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010;15(22):19580.

11. Herrera-Leon S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita MA. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella spp*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004 Jun;42(6):2581-6.

12. Ikeda JS, Schmitt CK, Darnell SC, Watson PR, Bispham J, Wallis TS, et al. Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. *Infection and Immunity*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2001 May;69(5):3021-30.

13. Tavechio AT, Ghilardi AC, Fernandes SA. "Multiplex PCR" identification of the atypical and monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- in Sao Paulo State, Brazil: frequency and antibiotic resistance patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2004 Mar-Apr;46(2):115-7.
14. Soyer Y, Moreno Switt A, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, et al. *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *Journal of Clinical Microbiology*. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2009 Nov;47(11):3546-56.
15. Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *The Journal of Clinical Investigation*. [Review]. 2001 Apr;107(7):775-80.
16. Hofer E, dos Reis EM. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1994 Jan-Feb;36(1):7-9.
17. WHO. *Salmonella* (non-typhoidal); Fact sheet 139. Geneva2013 [updated 2013 August]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>.
18. Levinson W. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 10 ed.: McGraw Hill Brasil; 2010.
19. Ohl ME, Miller SI. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med*. [Review]. 2001;52:259-74.

20. WHO. Health Topics: Salmonella. 2013; Available from:
<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>.
21. Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi AC, Dias AM, Almeida IA, Melo LC. *Salmonella* serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2006 Jul-Aug; 48(4):179-84.
22. Petrov P, Hendriksen RS, Kantardjiev T, Asseva G, Sorensen G, Fields P, et al. Occurrence and characterization of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar 9,12:l,v:- strains from Bulgaria, Denmark, and the United States. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 May;28(5):473-9.
23. SVS. Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. 2011 [cited 2013 22 mai]; Available from:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf.
24. Medeiros MA, Oliveira DC, Rodrigues Ddos P, Freitas DR. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev Panam Salud Publica*. [Comparative Study]. 2011 Dec;30(6):555-60.
25. Barco L, Lettini AA, Ramon E, Longo A, Saccardin C, Pozza MC, et al. A rapid and sensitive method to identify and differentiate *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- by combining

traditional serotyping and multiplex polymerase chain reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*. [Evaluation Studies]. 2011 Jun;8(6):741-3.

26. Gaidelyte A, Vaara M, Bamford DH. Bacteria, phages and septicemia. *PLoS One*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007;2(11):e1145.

27. Ghosh D, Roy K, Williamson KE, Srinivasiah S, Wommack KE, Radosevich M. Acyl-homoserine lactones can induce virus production in lysogenic bacteria: an alternative paradigm for prophage induction. *Applied and Environmental Microbiology*. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2009 Nov;75(22):7142-52.

28. Frye JG, Porwollik S, Blackmer F, Cheng P, McClelland M. Host gene expression changes and DNA amplification during temperate phage induction. *Journal of Bacteriology*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2005 Feb;187(4):1485-92.

29. Coombes BK, Wickham ME, Brown NF, Lemire S, Bossi L, Hsiao WW, et al. Genetic and molecular analysis of GogB, a phage-encoded type III-secreted substrate in *Salmonella enterica* serovar typhimurium with autonomous expression from its associated phage. *Journal of Molecular Biology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 May 13;348(4):817-30.

30. Kutter E, Sulakvelidze A. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Kutter E, Sulakvelidze A, editors: Taylor & Francis; 2004.

31. Brabban AD, Hite E, Callaway TR. Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathogens and*

- Disease. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2005 Winter;2(4):287-303.
32. Ashelford KE, Day MJ, Bailey MJ, Lilley AK, Fry JC. In situ population dynamics of bacterial viruses in a terrestrial environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999 Jan;65(1):169-74.
33. Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado AB, Rodriguez-Brito B, Pasic L, Thingstad TF, Rohwer F, et al. Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nat Rev Microbiol*. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2009 Nov;7(11):828-36.
34. Gregoracci GB, Silveira WD, Brocchi M. The biology of bacteriophages. *Research Signpost*. 2006;37/661(2):1-36.
35. van Regenmortel MH, Mahy BW. Emerging issues in virus taxonomy. *Emerging Infectious Diseases*. [Review]. 2004 Jan;10(1):8-13.
36. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Microbiologia de Brock*. 12nd ed ed. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP, editors: Artmed Editora; 2010.
37. Ackermann HW, Kropinski AM. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. *Research in Microbiology*. [Review]. 2007 Sep;158(7):555-66.
38. Lewin B. *Genes 9*: Jones & Bartlett Learning; 2008.
39. Refardt D. Within-host competition determines reproductive success of temperate bacteriophages. *Isme J*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Sep;5(9):1451-60.

40. Datta AB, Roy S, Parrack P. Role of C-terminal residues in oligomerization and stability of lambda CII: implications for lysis-lysogeny decision of the phage. *Journal of Molecular Biology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Jan 14;345(2):315-24.
41. Matsuo H, Sugeta H, Shirakawa M, Kyogoku Y. Backbone dynamics of the lambda-Cro repressor protein determined by N relaxation measurements. Application of an efficient method for calculation of dynamics parameters. *Journal of Molecular Structure*. 1996;379:143-50.
42. Osterhout RE, Figueroa IA, Keasling JD, Arkin AP. Global analysis of host response to induction of a latent bacteriophage. *BMC Microbiology*. 2007;7:82.
43. Dodd IB, Shearwin KE, Egan JB. Revisited gene regulation in bacteriophage lambda. *Curr Opin Genet Dev*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2005 Apr;15(2):145-52.
44. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2004 May;28(2):127-81.
45. Hanna LF, Matthews TD, Dinsdale EA, Hasty D, Edwards RA. Characterization of the ELPhiS prophage from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strain LK5. *Applied and Environmental Microbiology*. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2012 Mar;78(6):1785-93.
46. Canchaya C, Fournous G, Brussow H. The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Molecular Microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2004 Jul;53(1):9-18.

47. Bossi L, Fuentes JA, Mora G, Figueroa-Bossi N. Prophage contribution to bacterial population dynamics. *Journal of Bacteriology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Nov;185(21):6467-71.
48. Brussow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2004 Sep;68(3):560-602, table of contents.
49. Lemire S, Figueroa-Bossi N, Bossi L. Bacteriophage crosstalk: coordination of prophage induction by trans-acting antirepressors. *PLoS Genet*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jun;7(6):e1002149.
50. Gama JA, Reis AM, Domingues I, Mendes-Soares H, Matos AM, Dionisio F. Temperate bacterial viruses as double-edged swords in bacterial warfare. *PLoS One*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2013;8(3):e59043.
51. Boyd EF, Brussow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol*. 2002 Nov;10(11):521-9.
52. Brockhurst MA, Fenton A, Roulston B, Rainey PB. The impact of phages on interspecific competition in experimental populations of bacteria. *BMC Ecol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006;6:19.
53. Venturi V, Subramoni S. Future research trends in the major chemical language of bacteria. *Hfsp J*. 2009;3(2):105-16.
54. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

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*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2001 Oct 25;413(6858):852-6.
56. Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, et al. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Oct;18(10):1624-37.
57. Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Emmanuel MA, Kakoyiannis CK, Kostrikis LG. Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples. *BMC Microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009;9:97.
58. Liu D, Verma NK, Romana LK, Reeves PR. Relationships among the rfb regions of *Salmonella* serovars A, B, and D. *Journal of Bacteriology*. [Comparative Study]. 1991 Aug;173(15):4814-9.
59. Hong Y, Liu T, Lee MD, Hofacre CL, Maier M, White DG, et al. Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BMC microbiology*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2008;8:178.

60. Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG, Parkhill J. ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics*. 2005 Aug 15;21(16):3422-3.
61. Bachrach U, Friedmann A. Practical procedures for the purification of bacterial viruses. *Applied Microbiology*. 1971 Oct;22(4):706-15.
62. Minamishima Y, Takeya K, Ohnishi Y, Amako K. Physicochemical and biological properties of fibrous *Pseudomonas* bacteriophages. *Journal of Virology*. 1968 Mar;2(3):208-13.
63. Tiekotter KL, Ackermann HW. High-quality virus images obtained by transmission electron microscopy and charge coupled device digital camera technology. *Journal of Virological Methods*. 2009 Jul;159(1):87-92.
64. Maunsbach AB, Afzelius BA. *Biomedical Electron Microscopy: Illustrated Methods and Interpretations*. Maunsbach AB, Afzelius BA, editors: Elsevier Science; 1998.
65. Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch Virol. [Comparative Study Review]*. 2001;146(5):843-57.
66. Pedulla ML, Ford ME, Karthikeyan T, Houtz JM, Hendrix RW, Hatfull GF, et al. Corrected Sequence of the Bacteriophage P22 Genome. *Journal of Bacteriology*. 2003;185(4):1475-7.
67. Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res. [Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 2008 May;18(5):821-9.

68. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2008;9:75.
69. De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti L. Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real-Time PCR To Detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Poultry. Applied and Environmental Microbiology. 2003;69(6):3456-61.
70. Nam HM, Srinivasan V, Gillespie BE, Murinda SE, Oliver SP. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella spp.* in dairy farm environmental samples. International Journal of Food Microbiology. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Jul 15;102(2):161-71.
71. Hoffmann M, Luo Y, Lafon PC, Timme R, Allard MW, McDermott PF, et al. Genome Sequences of *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates Isolated in the United States from a Multistate Outbreak of Human Salmonella Infections. Genome Announc. 2013 Jan;1(1).

8 - Anexo



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

43
2997/05
A

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

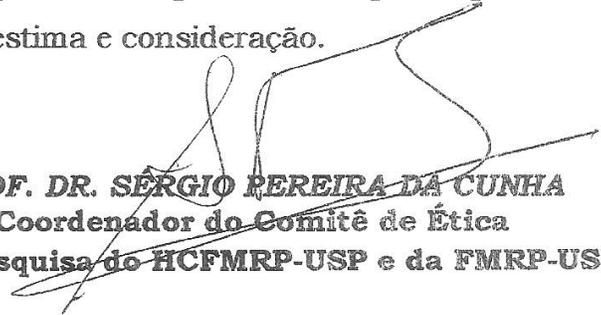
Ribeirão Preto, 06 de julho de 2005

Ofício nº 1844/2005
CEP/SPC

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado "**CARACTERIZAÇÕES FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DE AMOSTRAS MONOFÁSICAS DE Salmonella enterica I 4, [5]12:i:-**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 205ª Reunião Ordinária realizada em 04/07/2005, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 2997/2005.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.



PROF. DR. SÉRGIO REREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
ANA ISABELA LOPES SALES
PROF. DR. MARCELO BROCCHI (Orientador)
Depto. de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos
Em mãos