

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUSTAVO BUENO GREGORACCI

“TERAPIA EXPERIMENTAL COM BACTERIÓFAGOS”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GUSTAVO BUENO GREGORACCI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Sa47b

Gregoracci, Gustavo Bueno
Terapia experimental com bacteriófagos / Gustavo
Bueno Gregoracci. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Marcelo Brocchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Salmonella*. 2. *Shigella*. 3. Células Hela. 4.
Camundongo. 5. Genômica. I. Brocchi, Marcelo, 1967-.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Experimental phage therapy.

Palavras-chave em inglês: *Salmonella*; *Shigella*; Hela cells; Mice; Genomics.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Marcelo Brocchi, Clarice Weis Arns, Gerson Nakazato, Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Elsa Masae Mamizuka.

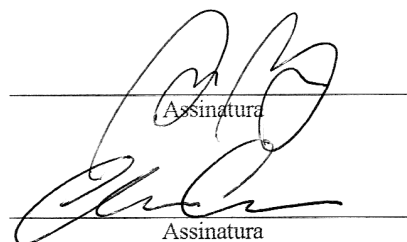
Data da defesa: 30/08/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 30 de agosto de 2010

BANCA EXAMINADORA

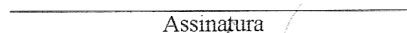
Prof. Dr. **Marcelo Brocchi** (Orientador)


Assinatura

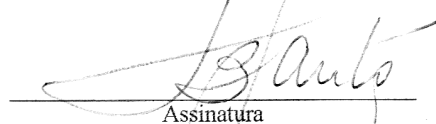
Profª. Dra. **Clarice Weis Arns**


Assinatura

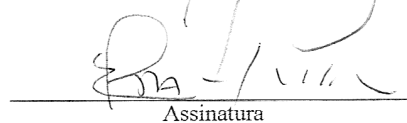
Prof. Dr. **Marcos Jose Pereira Gomes**


Assinatura

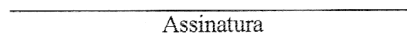
Profª. Dra. **Leonilda Maria Barbosa dos Santos**


Assinatura

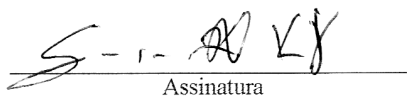
Profª. Dra. **Elsa Masae Mamizuka**


Assinatura

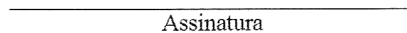
Profª. Dra. **Maria Sílvia Viccari Gatti**


Assinatura

Prof. Dr. **Gerson Nakazato**


Assinatura

Profª. Dra. **Irma Nelly Gutierrez Rivera**


Assinatura

Epígrafes

"Anyone who has never made a mistake has never tried anything new."

- Albert Einstein

Dad: "The world isn't fair, Calvin."

Calvin: "I know, but why isn't it ever unfair in my favor?"

- William Boyd "Bill" Watterson II, *The Essential Calvin and Hobbes*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Marcelo, pela oportunidade de estudar um tema tão interessante, apoio, amizade e ensinamentos;

À minha família, Francisco, Therezinha, Roberta, Rogério e Letícia pelo apoio incondicional e paciência com esse estilo de vida errante que escolhi;

Às minhas avós e todos os demais familiares pela torcida mesmo sem entender direito o que eu faço;

Aos membros da banca, profas. Clarice, Leonilda, Elsa e prof. Gérson, pela presença e pelos conselhos proveitosos;

Aos amigos do laboratório de longa data e mais recentes, Gérson, André, Bela, Lu Chimetto, Tati, Aline, Gui e Fer, Doriva, Lu Hollanda, Bruna, Lu Pivetta, Dri, Igor, Marcos e Guilherme pela convivência e amizade, dentro (e principalmente fora) do laboratório;

Aos amigos da república e agregados, Pablo, Lí (e Aline), Maya, Van, Carla, Lúcia, Willy, Fábio e Teca, Marcelo, Aline, Evandro, Bruno e Madla, Carol e Heilordt, Maria, Grace, Graci, Fá (e Reinaldo), Ewerton, Marcelo (e Luciana), Everton e Juliane, Júnior, Marcos, Kelly, Kurau, Bombril, e outros, pela amizade e pela casa longe de casa;

Aos amigos de longa data de São Carlos, Toyama, Márcio, Maurício, Júnior, Carlos e Daniel pela amizade por todos esses anos;

Aos amigos irmãos de faculdade Merla, Peki, Frauda, Gyra e Smurf pela amizade e cervejas compartilhadas;

Aos amigos de não tão longa data de São Carlos, JP e Mariana, Augusto, Fodra, Gabs, Rafa e todos os outros pelo escapismo tão necessário para a sanidade, tanto nos fins de semana de jogo quanto por email;

Aos amigos da pós, Camila Xerys e Eliana, Luzinha, Dani Dani, Dani Domingues, Fer Niemann pelas oportunidades de discutir outros assuntos interessantes;

Aos alunos que passaram pelo lab Carol, Bruna, Deb, Diego, Du, Ana, Fana, Flávia, Samantha e Giseli, pela ajuda e oportunidade de contribuir em algo para a formação de VCs;

Aos colaboradores e professores que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, profa. Sílvia, prof. Lancelotti, Marcelo Falsarelli, Alessandro, Ramon e Piotr;

A todos os que passaram pela minha vida durante esse período, mesmo que não estejam supramencionados, pela contribuição à minha experiência de vida que passou por um dos períodos de maior crescimento durante a realização desta tese;

ÍNDICE GERAL

Epígrafes	iv
Agradecimentos	v
Índice geral	vii
Índice de figuras e tabelas	x
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvii
1. Introdução geral	1
1.1 Terapias antibacterianas	1
1.2 Resistência microbiana a antibióticos	5
1.3 Alternativas terapêuticas.....	9
1.4 Terapia com bacteriófagos.....	12
2. Objetivos	40
3. Caracterização e potencial terapêutico de fagos de <i>Shigella</i>	41
3.1 Dados gerais.....	41
3.2 Abstract	42
3.3 Introduction.....	44
3.4 Materials & Methods.....	47
3.4.1 Bacterial samples.....	47
3.4.2 Phage isolation	48
3.4.3 Phage phenotypic characterization	49
3.4.4 Phage genomic sequencing	50
3.4.5 Time-kill curves	51
3.4.6 Invasion assay	52
3.5 Results	54

3.6 Discussion.....	66
3.6.1 Phage genomic sequencing	66
3.6.2 Biological activity of phages in time-kill curves and in cell culture assay	69
3.7 Conclusions.....	71
3.8 References	72
3.9 Financial Disclosure/Acknowledgements.....	76
4. Terapia com fagos contra infecção experimental de <i>Salmonella</i>	
um fago, dois modelos murinos, dois resultados	77
4.1 Dados Gerais.....	77
4.2 Abstract	78
4.3 Author summary	80
4.4 Introduction.....	81
4.5 Methods	83
4.5.1 Ethics statement.....	83
4.5.2 Bacterial strains	83
4.5.3 Phage isolation and propagation.....	83
4.5.4 Phage characterization	84
4.5.4.1 Morphology	84
4.5.4.2 Host range	84
4.5.4.3 Nucleic acid analysis.....	84
4.5.5 Animal models	84
4.5.6 Serial passages and Phage therapy	85
4.6 Results	86
4.7 Discussion.....	94
4.8 References	98
5. Discussão.....	101

6. Conclusões.....	111
7. Referências	113
8. Anexo 1 – Dados preliminares sobre fago Encl1.....	129
9. Anexo 2 – Declaração de Bioética e Biossegurança.....	143

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo 3 – Table 1 – Bacterial strains used in this study.....	47
Table 2 – Phenotypic characteristics of the bacteriophages.....	53
Figure 1 – Digitalized images of TEM negatives. Bacteriophages were negatively stained with uranyl acetate 2% (pH 4,5). The bars represent approximately 50nm respectively in each picture. A) Shfl1 B) Shdy 1 C) Shfl2 D) Shfl3 E) Shdy2 F) Shdy3.....	53
Table 3 – Range of hosts infected by the phages.....	54
Figure 2 – Alignment of the <i>Shigella flexneri</i> phage genomes and close relatives using the Mauve software. A) Alignment among phages Shfl1, T1 and TLS; reference genome belongs to phage Shfl1. B) Alignment between phages Shfl2, RB14, RB32, RB51 and T4; reference genome belongs to phage Shfl2. C) Alignment between phages Shfl3, N4 and LIT1; reference genome belongs to phage Shfl3.....	56
Figure 3 - Alignment of the <i>Shigella dysenteriae</i> phage genomes and close relatives using the Mauve software. A) Alignment among phages Shdy1, Sodalis phage S-O1 and Enterobacteria phage SSI-2009a; reference genome belongs to phage Shdy1. B) Alignment among phages Shdy3, Enterobacteria phage K1F and Enterobacteria phage EcoDs1; reference genome belongs to phage Shdy3. Note the lack of total synteny among Shdy1, S-O1 and SSI-2009a.....	58
Figure 4 – Overall similarity determined by the BLASTatlas program among phages Shfl3, LIT1 and LUZ7 using N4 as reference genome. From up to down: bacteriophage Shfl3; bacteriophage LIT1; bacteriophage LUZ7; annotation; GC skew; percent AT. The intensity of the colors indicates high similarity. Note that phage Shfl1 is the more similar to N4 than LIT1 and LUZ7.....	59
Figure 5 – Time-kill curves caused by lytic activity of phages on different <i>Shigella spp</i> strains. A) <i>S. flexneri</i> 2457T and 17 time-kill curves after addition of phage Shfl1 (MOI 10 and 0.7,	

respectively); B) *S. flexneri* 2457T and 67 time-kill curves after addition of phage Shfl2 (MOI 0.3 in both tests); C) *S. flexneri* 37 time-kill curve after addition of phage Shfl3 (MOI 0.3); D) *S. dysenteriae* 8135 time-kill curve after addition of phage Shdy1 (MOI 0.2); E) *S. dysenteriae* 7172 time-kill curve after addition of phage Shdy3 (MOI 0.2). The bacterial growth without phage was used as control. Note that phage Shdy1 inhibit the growth of *S. dysenteriae* 8135 only marginally.....60

Figure 6 - The *S. flexneri* HeLa invasion assay. **A)** The amount of intracellular bacteria (17 or 2457T in colony forming units, CFU), recovered after phage addition. **B)** PHK-26 labeled *Shigella* and the recovery after lysis: control, T0, T30 and T60 phage treatment. **C)** Quantification of *Shigella* after HeLa lysis based on flow cytometry analysis. Visualization of *Shigella* invasion under light microscopy **(D)** and Fluorescence microscopy **(E)** (40x). Single cell (100x) after invasion of *Shigella* under light microscopy **(F)** and Fluorescence microscopy **(G)**. Control HeLa cells without bacterial invasion under light microscopy (20x) **(H)** and Fluorescence microscopy **(I)**. HeLa cells after invasion of PHK-26 labeled *Shigella* without phage incubation **(J)** and after phage incubation: T0 **(K)**, T30 **(L)**.62

Capítulo 4 – Figure 1 – Morphological characteristics of the Saen1 bacteriophages. Digitalized images of TEM negatives. Phages Saen1v1, Saen1v2, Saen1v3, and Saen1v4 (77500x) were negatively stained with uranyl acetate 2% (pH 4,5).....82

Figure 2 – Distribution of Saen1v4 phage in blood, spleen and liver of mice after intraperitoneal inoculation. The values represent the mean of PFU recovered from three mice. The standard deviation of the data is indicated.....84

Figure 3. Therapeutic and prophylactic properties of phage Saen1v4 in mice infected with *S. enterica* Typhi ATCC19430. Percentage of survival of mice inoculated intraperitoneally with a lethal dose of *S. enterica* Typhi and treated as specified in the legend. A) Treatment was administered post inoculum, 1 or 2 hours after the bacteria; B) Treatment was administered

previously to the inoculum, 1 or 2 hours before the bacteria. At least three mice were used for each treatment. MOI indicates phage to bacterium ratios.....86

Figure 4 – Bacterial counts in blood (CFU.ml⁻¹) or in spleen and liver (CFU.g⁻¹) from *Salmonella* Typhi infected animals, sacrificed 12-14h p.i. Organs were collected aseptically and homogenized in sterile saline. Counts were made after overnight incubation at 37°C.....87

Figure 5. Therapeutic properties of phage Saen1v2 in mice infected with *S. enterica* Typhimurium. Percentage of survival of mice inoculated intragastrically with a lethal dose of *S. enterica* Typhimurium and treated with Saen1v2. Three mice were used for each treatment. The MOI values are indicated.....88

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius;

ATCC – *American Type Culture Collection*;

bp – *base pair*; pares de base;

CFU – *colony forming unit*; unidade formadora de colônia;

cm – centímetro;

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat;

DNA – ácido desoxiribonucleico;

Dr. – doutor;

ds – *double strand*; fita dupla;

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético;

EIBMV – Instituto Eliava de Bacteriófagos, Microbiologia e Virologia;

FDA – Food and Drug Administration; Administração de Drogas e Alimentos dos EUA;

g – força centrífuga relativa (rcf);

h – hora;

HIET – Instituto Hirsfeld de Imunologia e Terapia Experimental;

HIV – *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana);

ICTV – *International Committee of Taxonomy of Viruses*; Comitê Internacional de Taxonomia Viral;

i.g. – *intra gastric*; intragástrico;

i.p. – *intra peritoneal*; intraperitoneal;

kb – *kilo base pair*; mil pares de base;

LB – Luria Broth; Caldo Luria;

LPS – lipopolissacarídeo;

M – molar;

MBL – Metallo β lactamase;

ml – mililitro;

MOI – *multiplicity of infection*; multiplicidade de infecção;

MPS – *mononuclear phagocytic system*; sistema mononuclear fagocitário;

NaCl – cloreto de sódio;

ORF – *open reading frame*; quadro de leitura aberta;

PEG – polietileno glicol;

PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis; Eletroforese em gel de campo pulsado;

PFU – *plate forming unit*; unidade formadora de placa;

pH – potencial hidrogeniônico;

p.i. – *post inoculum*; pós-inóculo;

prof. – professor;

rpm – rotações por minuto;

s – segundo;

SPL – *Staph phage lysate*;

T – *time*; tempo de tratamento;

TE – tampão Tris-EDTA;

TEM – *transmission electron microscopy*; microscopia eletrônica de transmissão;

US – *United States*; Estados Unidos

USA – *United States of America*; Estados Unidos da América

V – volt;

RESUMO

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias e arqueias, representando as entidades biológicas mais abundantes do mundo e influenciando de maneira marcante populações naturais de seus hospedeiros. A terapia com bacteriófagos, que representa uma das primeiras formas modernas de combate a infecções bacterianas, foi recentemente redescoberta e vem sendo reavaliada seguindo metodologias atuais quanto à sua viabilidade terapêutica.

Para completar a caracterização dos fagos de nossa coleção, sequenciamos completamente o genoma da maior parte destes, através da metodologia multiplex pair-ended utilizando a plataforma Illumina. Visando contribuir para verificação da viabilidade terapêutica de bacteriófagos testamos os efeitos protetor e terapêutico dos fagos Shf11, Saen1v2 e Saen1v4, pertencentes à coleção de nosso laboratório, em modelos biológicos relevantes. O fago Shf11, lítico contra *Shigella flexneri*, foi testado em ensaio de invasão em células HeLa. A redução de bactérias intracelulares foi mensurada independentemente através de plaqueamento e citometria de fluxo, além da observação direta por microscopia de fluorescência. O fago Saen1v2, lítico contra *Salmonella* Typhimurium, foi estudado quanto à biodistribuição e meia-vida em modelo murino, e uma variante viral com maior persistência *in vivo* foi selecionada. Essa variante, denominada Saen1v2p5, e o fago Saen1v4, lítico contra *Salmonella* Typhi, foram testados em modelo murino de infecção tifoide, contra seus respectivos hospedeiros.

Encontramos similaridade genômica a fagos conhecidos, como T4, T7, T1 entre outros, em maior ou menor grau. Obtivemos um efeito protetor e terapêutico contra *Shigella flexneri* utilizando o fago Shf11 em ensaio de invasão em cultura de células HeLa,

verificado por todas as metodologias empregadas. Não verificamos efeito antimicrobiano *in vivo* do fago Saen1v2p5 em modelo murino de infecção por *Salmonella* Typhimurium. Por outro lado, observamos efeito terapêutico e protetor dose dependente utilizando o fago Saen1v4 em modelo murino de infecção por *Salmonella* Typhi. O sucesso obtido com baixas multiplicidades de infecção sugere um possível efeito indireto ou estimulação imune inespecífica.

ABSTRACT

Bacteriophages are viruses that infect Bacteria and Achaea, representing the most abundant biological entities in the world and markedly influencing natural host populations. Phage therapy, which represents one of the first modern ways to fight bacterial infections, was recently rediscovered and is being re-evaluated according to current methodologies regarding its therapeutic viability.

In order to complete phage characterization in our collection, we sequenced completely the genomes of most of these, through the multiplex pair-ended methodology using the Illumina platform. Aiming to contribute to the therapeutic viability verification of bacteriophages we tested phage protective and therapeutic effects of Shfl1, Saen1v2 and Saen1v4, which belong to our collection, in biologically relevant models. Phage Shfl1, lytic against *Shigella flexneri*, was tested in a HeLa invasion assay. Intracellular bacteria reduction was measured independently through plating and flow cytometry, besides direct observation through fluorescent microscopy. Phage Saen1v2, lytic against *Salmonella* Typhimurium, was studied about its bio-distribution and half-life in murine model, and a viral variant with longer *in vivo* persistence was selected. This variant, denominated Saen1v2p5, and phage Saen1v4, lytic against *Salmonella* Typhi, were tested in murine typhoid model, against their respective hosts.

Genomic similarity to known phages such as T4, T7, T1 among others, was found, in various degrees. We obtained both protective and therapeutic effect against *Shigella flexneri* using phage Shfl1 in the HeLa invasion assay, through all methodologies utilized. We could not verify *in vivo* antimicrobial effect of phage Saen1v2p5 in the murine model of *Salmonella* Typhimurium infection. On the other hand, we observed both therapeutic and protective dose dependent effect

using phage Saen1v4 in *Salmonella* Typhi murine infection model. The success obtained with low multiplicities of infection may suggest a possible indirect effect or unspecific immune stimulation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Terapias antibacterianas

Nós vivemos em um mundo de micro-organismos. Micróbios precedem nossa existência no espaço, visto que ocupam todos os nichos habitáveis, incluindo locais como o fundo dos oceanos e as profundezas da crosta terrestre, anteriormente tidos como não passíveis de suportar organismos vivos (SORUM;SUNDE, 2001; FERNANDEZ, 2005; KIMURA Et al., 2008; ULVESTAD, 2009; QIU, 2010). Precedem nossa existência também no tempo, de maneira ainda mais definitiva. Nosso gênero (*Homo*) surgiu por volta de 2,3 milhões de anos e nossa espécie (*Homo sapiens*) há menos de 100-150 mil anos (WOOD;RICHMOND, 2000). Em contraste, evidências fósseis de micro-organismos sugerem sua presença desde 3-3,5 bilhões de anos atrás (MATHIEU;SONEA, 1995; BRASIER Et al., 2006). A sobrevivência e prosperidade por tanto tempo em condições tão diversas indica uma capacidade de adaptação sem par. De fato, micro-organismos e vírus representam as maiores fontes de inovação da biosfera (MATHIEU;SONEA, 1995; ALANIS, 2005; FERNANDEZ, 2005; ULVESTAD, 2009; KRISTENSEN Et al., 2010)

Não é surpresa, portanto, que tenhamos interagido de maneira complexa com eles desde nossa própria origem (SORUM;SUNDE, 2001). Muitas dessas interações são benéficas e necessárias para o funcionamento normal de nosso organismo (HOOPER;MIDTVEDT;GORDON, 2002; ULVESTAD, 2009). Bactérias foram responsáveis pela produção do oxigênio que a maioria dos eucariotos respira e pela simbiose que originou nossas mitocôndrias (e cloroplastos de plantas) (MATHIEU;SONEA, 1995; DYALL;BROWN;JOHNSON, 2004). Também contribuíram de maneira essencial com a formação de nosso sistema imune (ARTIS, 2008) e

coevolúram em nossos intestinos, expandindo consideravelmente nossa capacidade de metabolizar nutrientes (HOOPER;MIDTVEDT;GORDON, 2002). Vírus supostamente introduziram fontes de variação em nossos genomas, e possivelmente introduziram proteínas necessárias para nosso sistema imune, para nosso desenvolvimento embriológico e para a placentação, contribuindo de maneira fundamental para a imunotolerância materna em relação aos fetos (como revisto por FORTERRE;PRANGISHVILI, 2009). Dados recentes ainda sugerem um papel de vírus na fisiologia cerebral (PERRON Et al., 2005).

Nossa presença, contudo, também influenciou a evolução de micro-organismos. Nós provemos um ambiente sequestrado, rico em nutrientes, mas reativo, através de nossos sistemas imunes, inato e adaptativo (SORUM;SUNDE, 2001; ULVESTAD, 2009). As mudanças de hábitos que contribuíram de maneira decisiva para a evolução de nossa espécie, como a agricultura e criação de animais, criaram novos nichos a serem explorados por micróbios, que foram prontamente preenchidos (MIRA;PUSHKER;RODRIGUEZ-VALERA, 2006; PEARCE-DUVET, 2006). Nossa dispersão geográfica e expansão populacional tornaram os nichos ecológicos que oferecemos mais promissores (MIRA;PUSHKER;RODRIGUEZ-VALERA, 2006), atraindo diversos organismos que passaram a coevoluir de maneira próxima a nós, estabelecendo relações que variam de simbiose a patogenicidade (SORUM;SUNDE, 2001; HOOPER;MIDTVEDT;GORDON, 2002; ESMAEILI Et al., 2007; ULVESTAD, 2009). Embora a minoria em termos de abundância, micro-organismos patogênicos são muito importantes para os seres humanos, fato verificado pela prevalência de estudos microbiológicos da área médica. Estados considerados como “doença”, muitas vezes causados por infecções, são supostamente conhecidos desde períodos mais primitivos e preteridos em relação a estados de “saúde”

(NESSE, 2001). É provavelmente vantajoso evolutivamente evitar morbidade, e obviamente também a mortalidade, ocasionada por micróbios (NESSE, 2001).

Possuímos relatos de abordagens terapêuticas folclóricas desde o início da história humana. Substâncias como alho, mel, cebola, bem como bolores e infusões de plantas, e até mesmo álcool e metais, encontram-se entre os compostos empregados por civilizações como gregos, chineses, ameríndios e egípcios (FOSTER;RAOULT, 1974; RUSSELL, 2004; OLAITAN;ADELEKE;OLA, 2007). Seu emprego provavelmente foi puramente empírico, envolvendo rituais religiosos, motivados por superstição e misticismo. Assim sendo é possível supor resultados diversos, embora haja confirmação científica moderna da atividade de alguns destes.

A disciplina de microbiologia na era moderna começa com a invenção do microscópio e observação direta de micro-organismos, por van Leeuwenhoek no século 17 (FOSTER;RAOULT, 1974). As primeiras observações registradas sobre antibiose foram realizadas pelos ingleses, William Roberts, de Manchester em 1874, e John Tyndall, de Londres em 1876 (FOSTER;RAOULT, 1974). Roberts observou o antagonismo entre bactérias e *Penicillium*, notando que soluções apresentando crescimento de um dos dois dificilmente eram contaminadas pelo outro. Tyndall fez observações similares, mais sistemáticas, trabalhando com infusões de plantas e tecidos animais, notando claramente igual antagonismo entre bactérias e *Penicillium* (FOSTER;RAOULT, 1974). Os efeitos bacteriolíticos deste fungo foram também notados por Sturli em 1908 e Gratia em 1925 (FOSTER;RAOULT, 1974). Mas a descoberta, tida como oficial, dos antibióticos é atribuída a Alexander Fleming, trabalhando em 1928 com *Staphylococcus aureus* e uma cepa contaminante particularmente potente de *Penicillium notatum* (FOSTER;RAOULT,

1974). Fleming foi o primeiro a isolar o bolor e propor a ação de uma substância antimicrobiana produzida por este, designada penicilina. Ele trabalhou com preparações impuras devido à instabilidade da penicilina, não prosseguiu nos estudos por falta de auxílio especializado em química. Florey, Chain e colaboradores, em Oxford, decidiram, por volta de 1940, trabalhar com compostos antimicrobianos naturais e optaram pelo estudo da penicilina. Conseguiram purificá-la, escalonar sua produção a níveis terapêuticos, e por fim, com o auxílio de Fletcher, iniciar testes clínicos. Fleming, Chain e Florey foram agraciados com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1944, e iniciaram a chamada “era de ouro dos antibióticos” (POWERS, 2004).

Entre 1940-1970, novos compostos antimicrobianos foram descobertos ou sintetizados, e foram incluídos na prática médica (POWERS, 2004; JAGUSZTYN-KRYNICKA; WYSZYNSKA, 2008; CLARDY; FISCHBACH; CURRIE, 2009; FISCHBACH; WALSH, 2009). Pertencem a diversas classes e têm por alvo diversas estruturas da célula bacteriana, expandindo assim o arsenal para o combate de bactérias (NORMARK; NORMARK, 2002; FISCHBACH; WALSH, 2009). Restrito a aflições potencialmente fatais em um primeiro momento, o uso de antimicrobianos logo passou a ser aplicado no controle de infecções mais simples, auto-resolvidas (ALANIS, 2005), e tal restrição inicial ainda aplicada atualmente é um fator desestimulante para investimentos da indústria farmacêutica (FISCHBACH; WALSH, 2009). Este controle representa um dos pontos cruciais onde o ser humano escapa da pressão seletiva exercida por doenças infecciosas, obtendo melhora considerável em tempo e qualidade de vida (POWERS, 2004; ALANIS, 2005; FINCH, 2007; FAJARDO Et al., 2008). Nas décadas seguintes observa-se estagnação na descoberta de novas classes de drogas antibacterianas, mas expansão de

compostos pertencentes a classes já descritas, com melhorias notáveis em biodistribuição, eficiência, espectro de ação, e redução de toxicidade (POWERS, 2004; PAYNE, 2008; FISCHBACH;WALSH, 2009). Novas classes de drogas surgiram recentemente, mas o contraste entre o ritmo atual de desenvolvimento e o ritmo dos primeiros anos é bastante evidente (JAGUSZTYN-KRYNICKA;WYSZYNSKA, 2008; PAYNE, 2008; FISCHBACH;WALSH, 2009). Embora o uso de antimicrobianos tenha se tornado parte fundamental da prática médica moderna, a indústria farmacêutica preteriu investimentos em antibióticos em relação a outros medicamentos com retorno financeiro certo, como remédios para tratamento de problemas crônicos e incuráveis (POWERS, 2004; FINCH, 2007; FISCHBACH;WALSH, 2009). E além da falta de investimentos, grandes empresas detém propriedade intelectual sobre substâncias promissoras, reduzindo o interesse de pequenas e médias empresas em investir neste campo (FINCH, 2007; PAYNE, 2008). Em suma, há uma carência considerável no desenvolvimento de antibióticos, apesar da difusão e necessidade de seu uso na prática médica moderna.

1.2 Resistência microbiana a antibióticos

Uma consequência mais importante do uso disseminado de antibióticos é a aquisição e evolução de resistência por parte dos micro-organismos. Escapando da pressão seletiva imposta pelos micróbios patogênicos, através do emprego de substâncias antimicrobianas, os seres humanos passaram a impor uma pressão seletiva ainda maior sobre todos os micro-organismos que interagem com eles. A já mencionada capacidade impressionante de adaptação destes seres promoveu a evolução e dispersão de genes de resistência, que interferem de diversas formas com a ação dos diversos antibióticos

(GILLESPIE, 2001; LEVY, 2001; NORMARK; NORMARK, 2002; LIVERMORE, 2003; RUSSELL, 2004; ALANIS, 2005; PATERSON, 2006; AMINOV;MACKIE, 2007; JAGUSZTYN-KRYNICKA;WYSZYNSKA, 2008; MARTINEZ, 2008; SIEGEL, 2008; EL SOLH;ALHAJHUSAIN, 2009; LIVERMORE, 2009).

Buscas simples em bases de dados científicos como o PubMed (U.S National Library of Medicine, National Institutes of Health) revelam uma vasta literatura a respeito de resistência a antimicrobianos, principalmente a respeito dos mecanismos moleculares responsáveis, mas uma revisão detalhada desta está fora do escopo desta tese. Dentre os diversos mecanismos envolvidos com resistência encontram-se mudanças na estrutura de alvos celulares, inativação e modificação do agente antimicrobiano, redução de permeabilidade, efluxo ativo da célula bacteriana, entre outros, como a formação de biofilmes (NORMARK; NORMARK, 2002; LIVERMORE, 2003; ALANIS, 2005; PATERSON, 2006; DANTAS Et al., 2008; SIEGEL, 2008). De maneira bastante simplificada, é possível apontar como agravantes do aparecimento de resistência o mal uso de antibióticos (tanto por parte de médicos que ocasionalmente os receitam em situações desnecessárias como por parte de pacientes que interrompem o tratamento no fim dos sintomas e não da infecção), a permanência de diversos desses antibióticos no ambiente após a excreção e, principalmente, o uso profilático disseminado dos mesmos na agricultura e pecuária, como promotores de crescimento, inclusive (MONROE;POLK, 2000; GILLESPIE, 2001; LEVY, 2001; SORUM;SUNDE, 2001; LIVERMORE, 2003; ALANIS, 2005; ALMEIDA Et al., 2009; DERESINSKI, 2009; ALLEN Et al., 2010).

Historicamente a resistência a antibióticos foi observada pouco após a descoberta dos mesmos (ALANIS, 2005). Já se conhecia a capacidade microbiana de adaptação a

compostos tóxicos, como corantes, cloreto de mercúrio e ácido bórico, desde 1887 (SUMMERS, 2001; RUSSELL, 2004). Com raras exceções, observou-se resistência a antibióticos recém-descobertos ou há pouco introduzidos no mercado. A possibilidade de substituição decorrente da gama de medicamentos disponíveis foi bastante explorada durante a era de ouro dos antibióticos, para sanar tais dificuldades (MONROE;POLK, 2000; FINCH, 2007). Contudo, recentemente, linhagens multirresistentes a drogas tornam-se mais comuns, e as consequências decorrentes do estabelecimento dessas incluem maior morbidade, mortalidade e tempo de internação, aumentando o ônus dos serviços de saúde pública e piorando consideravelmente o prognóstico dos pacientes infectados (ACAR, 1997; LIVERMORE, 2003; 2009; MINAHK;DUPUY;MORERO, 2004; ALANIS, 2005; JAGUSZTYN-KRYNICKA;WYSZYNSKA, 2008; SIEGEL, 2008; EL SOLH;ALHAJHUSAIN, 2009; ALLEN Et al., 2010). De fato, uma busca recente encontrou diversos isolados que não apenas resistem a diversas drogas, mas são capazes de subsistir utilizando estas substâncias como fonte de carbono e nitrogênio (DANTAS Et al., 2008). Muitos consideram inevitável a prevalência de linhagens resistentes e consideram o atraso deste surgimento a meta mais atingível (STONE, 2002; SIEGEL, 2008). Outros preveem, há algum tempo, o retorno à era pré-antibiótica, com consequências indesejáveis para a realização de procedimentos médicos hoje rotineiros (ALANIS, 2005).

Parte do problema pode decorrer, além do disseminado e indiscriminado uso dos antibióticos, de erros conceituais referentes ao papel dessas substâncias na natureza (LINARES Et al., 2006; YIM Et al., 2006; YIM;WANG;DAVIES, 2007; FAJARDO Et al., 2008). A prevalência de genes de resistência na natureza já é conhecida há muito tempo, principalmente nos solos (MARTINEZ, 2008; ALLEN Et al., 2010). Recentemente,

abordagens independentes de cultivo reforçam a sugestão de organismos não cultiváveis como fonte importante de tal resistência (ALLEN Et al., 2010). Tais genes podem igualmente ser encontrados em ambientes marinhos e na microbiota normal de animais, e até nas próprias preparações de antibióticos (SORUM;SUNDE, 2001; AMINOV;MACKIE, 2007; ALLEN Et al., 2010). O fato de antibióticos e genes de resistência estarem presentes em ambientes naturais complexos, em organismos outros além dos produtores de drogas, sugeriu seu envolvimento na competição entre micro-organismos (LINARES Et al., 2006; AMINOV;MACKIE, 2007; YIM;WANG;DAVIES, 2007; MARTINEZ, 2008; ALLEN Et al., 2010). Contudo, posteriormente foi verificado que, nestes ambientes, as concentrações não atingem níveis tóxicos, permanecendo em quantidades sub-inibitórias (LINARES Et al., 2006; ALLEN Et al., 2010). Experimentos com tais concentrações sub-inibitórias notaram alterações do perfil de expressão de proteínas, sem efeitos deletérios em viabilidade (LINARES Et al., 2006; YIM Et al., 2006; YIM;WANG;DAVIES, 2007; FAJARDO Et al., 2008; MARTINEZ, 2008). Vários autores suportam, portanto, um papel ecológico de antibióticos na natureza como moléculas sinalizadoras, de modo análogo a mediadores de *quorum sensing* (LINARES Et al., 2006; YIM;WANG;DAVIES, 2007; MARTINEZ, 2008; ALLEN Et al., 2010). Corroborando tal sugestão, observa-se efeito deletério em altas concentrações de mediadores de *quorum sensing*, podendo inclusive influenciar células eucarióticas (KRAVCHENKO Et al., 2008). A alteração do perfil de expressão *in vivo* durante a terapia pode trazer consequências graves em certos casos, como a infecção por *Pseudomonas* em pacientes com fibrose cística, geralmente refratária a tratamento com antibióticos (LINARES Et al., 2006; FAJARDO Et al., 2008).

Tal exemplo apenas ilustra a complexidade do assunto e pervasividade da resistência na natureza, bem como lacunas em nosso conhecimento sobre o tópico.

1.3 Alternativas terapêuticas

Diante deste quadro de resistência crescente a antibióticos associado à redução do ritmo de descoberta de novos antimicrobianos (NORMARK; NORMARK, 2002; POWERS, 2004; JAGUSZTYN-KRYNICKA; WYSZYNSKA, 2008; PAYNE, 2008; SIEGEL, 2008; DERESINSKI, 2009; EL SOLH; ALHAJHUSAIN, 2009), alternativas são necessárias. Há indícios de que mesmo o uso racional de antibióticos na clínica e redução dos mesmos em agricultura e veterinária, eliminando assim a pressão seletiva dos antibióticos, não resultarão em redução de resistência (MONROE; POLK, 2000; GILLESPIE, 2001; LIVERMORE, 2003; AMINOV; MACKIE, 2007). Outros modelos ecológicos também apontam para a falta de sucesso de estratégias como ciclagem de antibióticos em hospitais, apontada como alternativa para redução de resistência (MONROE; POLK, 2000; BERGSTROM; LO; LIPSITCH, 2004). Embora abordagens como a utilização de regimes de tratamento com várias drogas simultaneamente (ainda que controversa) (DERESINSKI, 2009; EL SOLH; ALHAJHUSAIN, 2009) e utilização de agentes potencializadores de antimicrobianos (VIVEIROS; AMARAL, 2001; MINAHK; DUPUY; MORERO, 2004; ESMAEILI Et al., 2007) ainda estejam disponíveis, muitos autores suportam a necessidade de expansão de nosso arsenal antimicrobiano tanto quanto possível (SIEGEL, 2008; EL SOLH; ALHAJHUSAIN, 2009).

A aplicação de vacinas representa uma abordagem válida, ainda que restrita a determinados patógenos atualmente (RAPPUOLI, 2007). A imunização contra micro-organismos causadores de infecções diminuiria sua prevalência, incluindo a de variantes resistentes destes. Trata-se, contudo, de uma abordagem profilática que visa geralmente à prevenção de infecções e não o tratamento das mesmas após seu estabelecimento (STERN;MARKEL, 2005; WEINBERGER Et al., 2008). Há considerações importantes também sobre a imunização de populações crescentes de idosos e indivíduos imunocomprometidos, como receptores de transplantes, portadores de câncer e pacientes HIV positivos (WEINBERGER Et al., 2008). A resposta imune deficiente nestes casos impossibilita uma imunização por vacinas e requer quase obrigatoriamente uma intervenção terapêutica durante infecções, a fim de evitar complicações (WEINBERGER Et al., 2008).

A exploração de organismos probióticos representa alternativa em alguns casos, como infecções intestinais e vaginose bacteriana (KAUR Et al., 2009; MINOCHA, 2009). Diversos mecanismos podem contribuir para o efeito terapêutico de probióticos, como redução da permeabilidade intestinal, exclusão competitiva, imuno-estimulação e produção própria de compostos antimicrobianos (KAUR Et al., 2009; WOHLGEMUTH;LOH;BLAUT, 2010). Contudo, há considerável divergência sobre a aplicabilidade de probióticos, com resultados variáveis em alguns casos. Aparentemente há efeitos linhagem e hospedeiros específicos, ainda não completamente elucidados (MINOCHA, 2009; WEST Et al., 2009). Quando tais diferenças são levadas em conta, observa-se efeito em determinados casos, embora seja necessária certa atenção para distinguir entre sugestões teóricas (bastante comuns na literatura) e experimentações clínicas adequadas (MINOCHA, 2009). Entretanto, é comum a conclusão pela necessidade

de mais estudos e destaque do papel de suporte de probióticos, ou seja, de sua associação com outras formas de tratamento (KAUR Et al., 2009; WOHLGEMUTH;LOH;BLAUT, 2010).

A soroterapia, ou administração direta de anticorpos a pacientes, representa mais uma alternativa. Trata-se de uma das primeiras formas científicas de terapia, obscurecida com o uso de antibióticos (CASADEVALL;DADACHOVA;PIROFSKI, 2004; BERGHMAN Et al., 2005; CASADEVALL, 2006), mas ainda hoje usada para o tratamento de algumas doenças virais, câncer e para neutralizar o veneno de cobras e outros animais peçonhentos (CASADEVALL;DADACHOVA;PIROFSKI, 2004; CASADEVALL, 2006; SAYLOR;DADACHOVA;CASADEVALL, 2009). O desenvolvimento de anticorpos monoclonais soluciona alguns problemas encontrados na aplicação prática desta terapia (CASADEVALL, 2006; SAYLOR;DADACHOVA;CASADEVALL, 2009) e vem recebendo mais atenção ultimamente (CASADEVALL;DADACHOVA;PIROFSKI, 2004). Apesar de apresentar certas dificuldades, como alto custo e necessidade de diagnóstico e intervenção rápidos para ser efetiva, a soroterapia vêm sendo sugerida como alternativa válida para o combate de infecções multirresistentes (CASADEVALL;DADACHOVA;PIROFSKI, 2004; CASADEVALL, 2006; SAYLOR;DADACHOVA;CASADEVALL, 2009).

Por fim, uma alternativa um tanto inusitada, mas que apresenta vantagens interessantes é a terapia de debridamento com larvas, ou bioterapia (TORRES, 2005; SMITH Et al., 2006; CHAN Et al., 2007; SHERMAN, 2009). Ferimentos e úlceras contendo tecido necrosado apresentam circulação deficiente e são propensos a infecções, ocasionalmente por organismos resistentes a antibióticos (TORRES, 2005; CHAN Et al.,

2007). Larvas estéreis de moscas removem tecidos necrosados e bactérias contaminantes, facilitando e estimulando a recuperação destes ferimentos (TORRES, 2005; SMITH Et al., 2006; CHAN Et al., 2007; SHERMAN, 2009). Esta terapia representa uma alternativa barata e eficiente em certos casos, e vem sendo explorada em diversos países (TORRES, 2005).

1.4 Terapia com bacteriófagos

Uma última terapia alternativa a ser discutida é a terapia envolvendo bacteriófagos, tema avaliado nesta tese. Trata-se, como outros tratamentos supracitados, de uma das primeiras formas de combate a infecções bacterianas empregada cientificamente, que como outras, ressurge frente à emergência de patógenos multirresistentes a antibióticos (SUMMERS, 2001; STONE, 2002; LEVIN;BULL, 2004; FIORENTIN;VIEIRA;BARIONI, 2005; KUTTER;SULAKVELIDZE, 2005; JAGUSZTYN-KRYNICKA;WYSZYNSKA, 2008). Envolve o uso de vírus que infectam bactérias como agentes terapêuticos, empregando a ação bacteriolítica envolvida no ciclo replicativo destes no combate a infecções, tanto em ambientes médicos, como em veterinária e agricultura (LEVIN;BULL, 2004; KUTTER;SULAKVELIDZE, 2005; JAGUSZTYN-KRYNICKA;WYSZYNSKA, 2008).

Observações de atividade bacteriolítica e termolábil de filtrados dos rios Ganges e Jumna na Índia, em 1896, efetivos contra *Vibrio cholerae*, e filtrados bacterianos, efetivos contra *Bacillus*, em 1898, bem como algumas outras similares, talvez sejam os primeiros relatos científicos da existência de fagos (STONE, 2002; SUMMERS, 2005). Contudo, atribui-se a Frederick Twort, um bacteriologista da Inglaterra, em 1915, a primeira

observação de lise em culturas de micrococcos (*Staphylococcus*), acompanhado da sugestão da atribuição do fenômeno, entre outras possibilidades, à ação viral (VAN HELVOORT, 1992; SUMMERS, 2005). Paralelamente, Félix D’Herelle, um microbiologista franco-canadense, trabalhando no Instituto Pasteur, na França, com *Shigella*, em 1915-1917, fez observações semelhantes, e propôs como única explicação a lise mediada por um “ultravírus”, cunhando o termo bacteriófago (“comedor de bactérias”) (VAN HELVOORT, 1992; SUMMERS, 2001; STONE, 2002; SULAKVELIDZE; KUTTER, 2005; SUMMERS, 2005).

D’Herelle estudava a patogênese de *Shigella*, buscando um vírus como cofator na disenteria, de modo análogo ao que se acreditava que ocorria na cólera suína (*Salmonella enterica* Choleraesuis) (VAN HELVOORT, 1992; SUMMERS, 2001, 2005). Entretanto, fez outras observações ao misturar um ultrafiltrado de fezes de pacientes disentéricos e culturas de *Shigella*. Encontrou lise em culturas líquidas e zonas claras circulares em placas (VAN HELVOORT, 1992; SUMMERS, 2005). Concluiu pela presença de um vírus, e verificou em seguida sua multiplicação, na presença de células e mediada pela lise destas, procedendo em ondas, ou passos, indefinidamente. Notou a possibilidade de quantificar esses agentes invisíveis, que concebeu como partículas, através do plaqueamento, técnica utilizada ainda atualmente, sem alterações até recentemente (VAN HELVOORT, 1992; SUMMERS, 2005).

Observou ainda que os títulos de fagos em pacientes infectados aumentavam ao longo do tempo, concomitantemente à melhora clínica. Dado que havia incerteza nessa época quanto à natureza da imunidade, D’Herelle postulou o papel de fagos como “agentes exógenos de imunidade”, ou resposta imune contagiosa como os patógenos, ou ainda uma

epidemia de cura, sendo os vírus os únicos responsáveis pela recuperação contra infecções (SUMMERS, 2001, 2005; HÄUSLER, 2006), ideia reformulada recentemente (GORSKI;WEBER-DABROWSKA, 2005). Uma consequência direta desta hipótese foi a defesa do uso de bacteriófagos como agentes terapêuticos, iniciando diversos estudos visando o tratamento de infecções na era pré-antibiótica (SUMMERS, 2001, 2005; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

O primeiro relato do uso terapêutico de bacteriófagos é uma nota de Bruynoghe e Maisin, de 1921, descrevendo redução de dor e inchaço em furúnculos, bem como redução de febre, após inoculo direto de uma preparação de fagos contra *Staphylococcus* (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; SUMMERS, 2005). D’Herelle iniciou seus estudos em 1919, mas sua primeira publicação data de 1921 (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Após a publicação pioneira de Bruynoghe e Maisin em 1921, outros estudos foram realizados entre 1920 e 1940. André Gratia, aluno de Bordet, publicou em 1922 um estudo com fagos contra *Staphylococcus* também (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). O prestígio de Bordet rendeu certa publicidade e ambos tornaram-se opositores de D’Herelle, sugerindo que o “fenômeno bacteriófago” se tratava de uma enzima, que induzia uma alteração fisiológica na célula bacteriana acarretando lise (VAN HELVOORT, 1992; SUMMERS, 2005). A maioria dos pesquisadores da época tomou o partido de Bordet, ganhador do prêmio Nobel, e Gratia, e os bacteriófagos só foram aceitos como vírus em meados de 1940, com o advento da microscopia eletrônica (VAN HELVOORT, 1992; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; SUMMERS, 2005).

O primeiro trabalho de D’Herelle tratava de experimentos com a bactéria atualmente conhecida como *Salmonella enterica* Gallinarum, causadora do tifo aviário

(SUMMERS, 2001, 2005; SULAKVELIDZE;BARROW, 2005). Ele conduziu estudos em laboratório com sucesso, dentro dos parâmetros exigidos na época, e depois passou a testes em campo na França. Em geral, seus resultados sugeriam uma melhora, com redução do total de óbitos e tempo de epidemia, e prevenção de reinfecções (SUMMERS, 2001, 2005; SULAKVELIDZE;BARROW, 2005; HÄUSLER, 2006). Houve confirmação independente de tais resultados por um pesquisador holandês, Kramer (D'HERELLE, 1926 apud SUMMERS, 2001). Em seguida, D'Herelle realizou testes clínicos na Indochina, protegendo búfalos d'água contra infecções experimentais de *Pasteurella multocida*, causadora da geralmente fatal septicemia hemorrágica bovina (SUMMERS, 2001, 2005).

Seguindo a linha de D'Herelle com estudos da atividade bactericida de fagos de *Salmonella* em aves, diversos pesquisadores realizaram estudos similares. Topley et al. utilizaram um modelo sistêmico de *Salmonella* Typhimurium em camundongos, mas não observaram efeito terapêutico da administração intraperitoneal dos fagos (1925 apud SULAKVELIDZE;BARROW, 2005; BARROW;LOVELL;BERCHIERI, 1998). Uma das possíveis razões inclui a baixa patogenicidade dos vírus empregados, fato suportado por experimentos de Fisk que obteve 24 horas de proteção no mesmo modelo utilizando fagos capazes de lise completa *in vitro* (1938 apud SULAKVELIDZE;BARROW, 2005). Há relatos tanto positivos como negativos sobre terapia com fagos em modelos animais (BARROW;LOVELL;BERCHIERI, 1998; SULAKVELIDZE;BARROW, 2005). Exemplos negativos incluem a falta de sucesso em infecções experimentais de coelhos, camundongos, ratos e cobaias, envolvendo patógenos como *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Yersinia* (SULAKVELIDZE;BARROW, 2005). Um estudo, inclusive, não conseguiu reproduzir a proteção observada por D'Herelle contra tifo aviário, mesmo utilizando fagos

bastante virulentos *in vitro* (PYLE, 1926 apud SULAKVELIDZE;BARROW, 2005). Exemplos bem sucedidos incluem redução de mortalidade em coelhos com meningite meningocócica experimental, cura ou melhora clínica de cistite causada por *Escherichia coli* em coelhos e cobaias, e recuperação de camundongos infectados por via intracerebral com *Shigella dysenteriae* após inóculo intraperitoneal de fagos (DUBOS;STRAUS;PIERCE, 1943; SULAKVELIDZE;BARROW, 2005).

D'Herelle também realizou testes em humanos, continuando o combate contra *Shigella* (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; SUMMERS, 2005; HÄUSLER, 2006). As práticas da época em relação à avaliação de toxicidade, que incluíam o inóculo de altas doses do agente em teste no pesquisador, familiares e colegas de laboratório, foram prontamente obedecidas, antes do tratamento em si (SUMMERS, 2001, 2005; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Sob supervisão e consentimento do prof. Victor-Henri Hutinel, chefe da pediatria do “Hôpital des Enfants-Malades”, D'Herelle tratou um menino de 12 anos, internado com disenteria severa (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; SUMMERS, 2005). Uma administração de 2 mililitros de seu preparado de bacteriófagos mais potente por via oral ocasionou uma recuperação rápida, com desaparecimento completo dos sintomas na manhã seguinte (STONE, 2002; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; SUMMERS, 2005). Três outros pacientes (3, 7 e 12 anos), também internados com disenteria severa após o óbito de sua irmã em casa pela mesma doença, receberam os fagos e se recuperaram em até 24 horas (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; SUMMERS, 2005). Contudo, o trabalho de D'Herelle em Alexandria, no Egito, contra a peste (*Yersinia pestis*), talvez tenha sido o responsável pela maior publicidade da terapia com bacteriófagos. Ele aplicou um preparado de fagos contra *Yersinia* nos bulbos de quatro passageiros de navios

no Canal de Suez, com diagnóstico laboratorial confirmado. Todos melhoraram de maneira impressionante e o estudo foi publicado em um famoso periódico médico francês (SUMMERS, 2001, 2005; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Amostras de fagos contra peste foram enviadas para as Índias Britânicas, mas os tratamentos foram sem sucesso, mesmo após uma visita de D’Herelle e o isolamento de novos bacteriófagos; D’Herelle atribuiu essa falha à “virulência extrema” de cepas de *Yersinia* prevalentes na Índia (HÄUSLER, 2006). Ainda assim, a publicidade resultante de seu estudo rendeu um convite do governo britânico a D’Herelle para chefiar estudos do uso terapêutico e profilático de bacteriófagos na Índia, contra peste e cólera (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; SUMMERS, 2005; HÄUSLER, 2006). Os estudos, na prática, foram focados no combate a cólera (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; HÄUSLER, 2006), provavelmente devido à falha anterior. Experimentos controlados em laboratório, realizados em Calcutá, reduziram taxas de mortalidade de 27-30% a zero. Estudos em campo na mesma região obtiveram reduções impressionantes de óbitos, de 63% para 8% (D’HERELLE Et al., 1928 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; HÄUSLER, 2006). Os estudos foram expandidos para outras regiões, mas sob a supervisão de Igor Asheshov, visto que D’Herelle mudou-se para os EUA em 1928, para trabalhar na universidade de Yale e divulgar o uso de bacteriófagos nos Estados Unidos pelos próximos cinco anos (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

O brasileiro José da Costa Cruz, trabalhando no Instituto Oswaldo Cruz, foi um dos responsáveis pela confirmação dos resultados de D’Herelle ao redor do mundo (PACHECO, 1941; HÄUSLER, 2006). Inicialmente por volta de 1920, seus resultados discordavam dos de D’Herelle. Após conselho deste sobre a busca de fagos com maior atividade, os estudos brasileiros confirmaram o potencial terapêutico observado por

D'Herelle, com o tratamento de 24 pacientes com disenteria (HÄUSLER, 2006). Costa Cruz supervisionou pessoalmente a ampliação, no período de um ano, da produção do produto “Bacteriophagina”, chegando a distribuir 10 mil doses por todo o país, um dos primeiros registros em larga escala do uso clínico de fagos (PACHECO, 1941; HÄUSLER, 2006). Foi também responsável pela divulgação do produto pelo país, contribuindo bastante para o uso disseminado do mesmo até ao menos a década de 40 (PACHECO, 1941; HÄUSLER, 2006). Também explorou nos anos seguintes diversos aspectos da biologia dos bacteriófagos (PACHECO, 1941).

Outros estudos com disenteria foram realizados, como o de Spence Et al. em 1924, observando 30% de redução de mortalidade nos grupos tratados com bacteriófagos, bem como 6 dias a menos em recuperação (SPENCE Et al., 1924 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Há relatos de sucessos mais impressionantes no controle de *Staphylococcus* causadores de septicemia, após injeção intravenosa de fagos, por Schultz em 1932 (SCHULTZ, 1932 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005), e causadores de meningite, após inóculo intraespinal, por Schless também em 1932 (SCHLESS, 1932 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

Asheshov continuou o trabalho de D'Herelle na Índia, realizando estudos com descontaminação ambiental durante uma peregrinação religiosa, e estudos em hospitais, em ao menos duas regiões (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; HÄUSLER, 2006). Os estudos ambientais, envolvendo aplicação de fagos repetidamente em fontes de água de determinada região, utilizadas por cerca de 10 mil peregrinos, obtiveram uma redução de 10 vezes nos casos de cólera, em comparação com regiões vizinhas abrigando cerca de 70 mil peregrinos (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Os estudos em hospitais em Puri e

Patna obtiveram resultados menos reprodutíveis. Puri possuía uma baixa taxa de mortalidade e, alegadamente, menos cooperação das equipes do hospital e problemas em diagnóstico, logo, os efeitos da administração de fagos não foram verificados (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Em Patna, com maior cooperação e empenho da equipe médica, a terapia com fagos associada a outros tratamentos preveniu completamente as fatalidades durante o período de estudos (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Asheshov passou a estudar biologia básica de bacteriófagos e os estudos na Índia continuaram sob a supervisão de Pasricha e posteriormente de Morison, com experimentos em hospitais e vilas endêmicas para cólera, respectivamente, por volta da década de 30 (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; HÄUSLER, 2006). Pasricha observou sucesso da terapia com fagos em pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado de cólera e melhora clínica significativa no grupo tratado, embora tenha trabalhado com grupos maiores onde as diferenças gerais não tenham sido significativas (PASRICHA Et al., 1936 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Morison evitou surtos de cólera em uma das vilas estudadas, através da distribuição de preparados de fagos livremente. O sucesso dessa etapa levou o governo indiano a adotar o tratamento também na vila controle, eliminando igualmente o surto, durante o período estudado. No entanto, a eliminação do controle gerou dúvidas sobre a eficácia do tratamento (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; HÄUSLER, 2006). Houve um período de descontinuidade desses estudos na Índia, embora a administração terapêutica de fagos tenha sido adotada nos anos seguintes (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). No auge do tratamento, o Shillong Pasteur-Institut chegou a produzir mais de um milhão de doses de fago contra *Vibrio* (HÄUSLER, 2006). A empolgação foi tal que métodos de tratamento tradicionais, como desinfetantes ou vacinas,

foram abandonados, levando a um aumento dos casos de cólera a partir de 1937, culminando em uma grande epidemia em 1944, com 150 mil óbitos. Abordagens mais abrangentes passaram a ser empregadas desde então (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Estudos posteriores com cólera observam um efeito positivo apenas em altas doses de fagos, sugerindo uma “lise por fora” (onde a adesão de uma grande quantidade de fagos destrutura a membrana bacteriana sem sequer iniciar a infecção), bem como a existência de bolsões de bactérias aparentemente inacessíveis aos fagos no intestino delgado (SUMMERS, 2001; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Um estudo mais recente de Cervený Et al. (2002) obteve resultados similares com *Vibrio vulnificus*, observando proteção apenas após o uso de altos títulos de fago, em modelo murino.

No período que antecedeu a descoberta de antibióticos (discutida previamente) diversas preparações contendo fagos foram comercializadas (SUMMERS, 2001; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). D’Herelle o fazia através de um laboratório comercial em Paris (*Laboratoire du Bactériophage*), utilizando preparações contra diversos patógenos. Nos EUA, empresas farmacêuticas como Eli Lilly, E.R. Squibb and Sons e Swan-Myers (uma divisão dos laboratórios Abbott) também investiram em bacteriófagos nos anos 30 (SUMMERS, 2001; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). No Brasil, como citado previamente, o Instituto Oswaldo Cruz produzia em massa o produto “Bacteriophagina”, distribuído e utilizado amplamente antes do surgimento de antibióticos (PACHECO, 1941).

A febre tifoide representou outro alvo importante da terapia com bacteriófagos, nos EUA e no Canadá, durante os anos 40 (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Os primeiros antibióticos disponíveis na época não funcionavam contra esse patógeno, e o tratamento

com fagos anti-antígeno Vi (importante fator de virulência) de *Salmonella Typhi* ocasionou reduções na mortalidade de 93% para 6% em camundongos, durante infecções experimentais em laboratório (WARD, 1942 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Estudos em humanos observaram reduções de 20% para 5% nos casos fatais, acompanhados de melhora clínica rápida (KNOUF, 1946 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Outro estudo, com 100 pacientes, utilizando mistura de fagos observou redução mais proeminentes na mortalidade, de 20% para 2% (DESRANLEAU, 1949 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

Apesar de diversos estudos mostrando resultados positivos, os fagos foram abandonados com o surgimento e difusão dos antibióticos, conforme discutido anteriormente. Diversos fatores contribuíram para tal declínio, incluindo o amplo espectro de ação de antibióticos, resultados conflitantes de alguns estudos e perda de credibilidade, conforme discutido por Sulakvelidze e Kutter (2005). Na “era de ouro” dos antibióticos, a abundância de opções para tratamento, afetando amplo espectro de bactérias alvo contrastava claramente com bacteriófagos, bem mais específicos (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Embora o amplo espectro de antimicrobianos possa prejudicar a microbiota normal do organismo há distinta vantagem na clínica para casos de diagnóstico errado ou ausente do patógeno, onde o tratamento com fagos é ineficaz (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Uma revisão de Eaton e Bayne-Jones, de 1934, patrocinada pela Associação Médica Americana, cobrindo mais de 100 artigos, e outra subsequente por Krueger e Scribner, de 1941, contribuíram bastante para o desinteresse na terapia com fagos (SUMMERS, 2001, 2005; STONE, 2002; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Ambas suportavam as conclusões de Gratia e Bordet, sobre a qualidade de enzima

de bacteriófagos, ao invés da hipótese viral de D'Herelle (VAN HELVOORT, 1992; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Concluía negativamente também, com base em resultados experimentais ambíguos, sobre a utilidade da terapia, e o prestígio de autores e patrocinadores foi bastante importante para a aceitação de suas conclusões e abandono de fagos como agentes terapêuticos na maior parte do Ocidente. A perda de credibilidade, ocasionada por diversos fatores, também é apontada como agravante da aceitação de fagos (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). A falta de regulação e padronização de preparações virais por parte de empresas, associada a conceitos errados sobre a natureza da partícula viral, resultou em muitos problemas deste tipo. Preparações de fagos foram divulgadas como efetivas contra doenças atualmente conhecidas como não causadas por bactérias (como herpes ou eczema) (BARROW;SOOTHILL, 1997 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Outras preparações recebiam aditivos e conservantes químicos que afetavam negativamente a viabilidade dos vírus, inativando o efeito terapêutico (SUMMERS, 2001; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Straub Et al. (1933) e D'Herelle, por exemplo, testaram preparações comerciais contendo pouco ou nenhum título de bacteriófagos viáveis (SUMMERS, 2001; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Erros conceituais também agravaram o problema, levando, por exemplo, à propagação conjunta de diversos fagos utilizados em coquetéis, o que ao longo do tempo acabou selecionando apenas um dos fagos contidos na mistura e reduzindo a amplitude de hospedeiros afetados inicialmente (SUMMERS, 2001). Impurezas ocasionalmente presentes nos lisados contendo fagos também foram reportadas em alguns estudos, ocasionando efeitos colaterais variando de leves a graves. Interessantemente, mesmo nestes casos há conclusões gerais da eficácia da terapia, sendo positiva em 79% de 67 pacientes em um estudo (CIPOLLARO,

SHEPLAR, 1932, apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005) e 78% de 208 pacientes em outro (LARKUM, 1929, apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). A possibilidade teórica de efeitos imunoestimulatórios benéficos de contaminantes é conhecida há algum tempo (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005) e, inclusive, sugerida como mecanismo de ação de produtos como o SPL (*Staph phage lysate*), discutido posteriormente.

Por fim, embora a aplicação terapêutica de fagos tenha sido preterida em relação a antibióticos no Ocidente, o mesmo não ocorreu na Europa Oriental, por motivos políticos e econômicos. Estudos e terapia com fagos continuaram, mesmo após a descoberta de antibióticos, na antiga União Soviética, e posteriormente na Rússia, bem como na Geórgia e na Polônia (como revisado por SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). A associação da terapia com bacteriófagos e o socialismo também contribuiu de forma marcante para o declínio desta prática em quase todo o Ocidente capitalista, durante o pós-guerra e a guerra fria. O declínio do uso terapêutico de fagos no Ocidente foi concomitante ao interesse de seu uso como ferramenta molecular (STONE, 2002; SUMMERS, 2005). Bacteriófagos combinam certo grau de simplicidade, necessária para estudo em laboratório, e complexidade, suficiente para elucidar questionamentos sobre propriedades básicas de outras entidades biológicas, incluindo outros vírus e organismos celulares (WOMMACK;COLWELL, 2000; SUMMERS, 2005; BRATKOVIC, 2010). Seu emprego como modelo biológico contribuiu de modo inestimável para a resolução de questões elementares da biologia e para o desenvolvimento da biologia molecular moderna (WOMMACK;COLWELL, 2000; CHIBANI-CHENNOUFI Et al., 2004; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; SUMMERS, 2005).

É importante ressaltar que o desinteresse e abandono do uso terapêutico de fagos no Ocidente não foram absolutos. Há descrições do uso de fagos no Egito até o começo da década de 90 (ABDUL-HASSAN Et al., 1990 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). A Suíça manteve uma empresa, a Saphal, produzindo bacteriófagos mesmo durante a era dos antibióticos (HÄUSLER, 2005). O Instituto Pasteur, na França, manteve sua produção até metade da década de 70, e há descrições de uso clínico até o final desta década (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

Em contraste, após o surgimento dos antibióticos, o uso terapêutico de fagos nos Estados Unidos da América foi praticamente extinto. A exceção é o produto SPL, que emprega fagos para produção de um lisado de *Staphylococcus* com fins vacinais, tanto em veterinária como em humanos, comercializado até a atualidade (embora apenas para vacinação de interesse veterinário) (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). A segurança do SPL foi testada e aprovada em 1959 e o produto foi licenciado em seguida pelos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Há diversas confirmações posteriores da segurança e eficácia da vacina em campo, incluindo um estudo duplo-cego randômico com 31 pacientes, apresentando resultado positivo estatisticamente significativo (ANGEL Et al., 1987 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). O mecanismo pelo qual o lisado apresenta efeito é atribuído a imunoestimulação específica e inespecífica. Contudo, o laboratório de Kutter encontrou altos títulos de fagos ativos em preparações obtidas de diversos pontos dos EUA, não sendo, portanto, possível descartar um efeito de lise direta (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

Em outras partes do mundo, a terapia com bacteriófagos persistiu independente do uso de antibióticos, conforme citado anteriormente. A barreira linguística e divergências

políticas isolaram a ampla literatura a respeito proveniente da Europa Oriental, até recentemente (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Revisões do assunto revelam algumas das centenas de artigos *peer-reviewed*, resumos e anais de congressos e dissertações demonstrando a alta eficácia da terapia com bacteriófagos (SUMMERS, 2001; STONE, 2002; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

Na antiga União Soviética os fagos foram amplamente utilizados por todas as vias possíveis, praticamente (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Grandes esforços foram canalizados para produção de preparações de bacteriófagos contra disenteria, baratos, estáveis e com altos títulos (KRESTOVIKOVA, 1947 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; STONE, 2002). Lisados, preparados com vapor de clorofórmio, na forma pastilhas, na década de 40, cumpriram essas exigências e não apresentaram efeitos colaterais, mesmo após solubilização e injeção. Observou-se inclusive aumento da imunização contra o patógeno (SERGIENKO, 1945 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Estudos em larga escala, envolvendo milhares de participantes e milhões de pastilhas suportam tais conclusões, timidamente em geral, mas de forma marcante para crianças com menos de nove anos (SERGIENKO, 1945 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Estudos com gangrena gasosa (*Clostridium perfringens*), inicialmente em camundongos e cobaios, e posteriormente em soldados no fronte, demonstraram bons resultados também, com resultados variando de 19-66% de redução de mortalidade (KRESTOVIKOVA, 1947 apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Há resultados interessantes contra diversas infecções por *Staphylococcus*, provenientes de diversos estudos distintos (revisado por SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). É necessária certa precaução com dados soviéticos, no entanto, visto que muitos de seus estudos não apresentam informações completas nos

moldes exigidos atualmente. Há muitos estudos sem controle, resultantes provavelmente do paradigma de eficácia dos fagos nesta região, e diversos com dados importantes omitidos, provavelmente censurados pelo regime comunista (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

Na atual Geórgia, ex-membro da União Soviética, há um dos dois grandes centros de pesquisa com bacteriófagos, o Instituto Eliava de Bacteriófagos, Microbiologia e Virologia (EIBMV) (STONE, 2002; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Originalmente chamado de Instituto de Microbiologia, foi fundado por Giorgi Eliava, colaborador próximo de D'Herelle, em 1923. Eliava visitou o Instituto Pasteur na França diversas vezes e tornou-se amigo e colaborador de D'Herelle. De fato, em 1933, após deixar os EUA, D'Herelle passou alguns anos na Geórgia. Mesmo após a execução de Eliava em 1937 pela polícia secreta de Stalin, o instituto sobreviveu e expandiu-se, tornando-se um dos maiores centros de pesquisa de fagos no mundo e principal fornecedor de preparados de bacteriófagos terapêuticos para a União Soviética por algum tempo (STONE, 2002; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Em seu auge o EIBMV empregou mais de mil funcionários e produziu toneladas de preparações por dia, em diversas formas (pastilhas, sprays e líquida), contra diversos patógenos (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Entre seus feitos é possível enumerar o preparo de formulações injetáveis seguras de fagos contra *Staphylococcus* causadores de quadros sistêmicos, amplamente utilizada pelos soviéticos, e estudos diversos sobre virulência de bacteriófagos, identificando genes e produtos que contribuem para a capacidade lítica dos mesmos (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). O instituto passou por um período de crise com o fim da União Soviética e independência da Geórgia quando sofreu cortes de orçamento e perdeu grande parte de seu público alvo, bem como instalações e funcionários (STONE, 2002; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). No

entanto, manteve suas pesquisas e, em 2000, licenciou um produto chamado “PhageBioDerm”, composto por um polímero biodegradável, não tóxico, contendo ciprofloxacina, benzocaína, α -quimiotripsina, biocarbonato de sódio e uma mistura de fagos líticos, ativos contra *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus* e *Proteus* (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). O produto, comercializado na Geórgia, teve sua atividade comprovada ao menos em dois artigos recentes, substituindo tratamentos convencionais sem sucesso (STONE, 2002; JIKIA, Et al., 2005). Aguarda testes mais amplos para ser adotado por outros países, mas já gera derivados como uma versão formulada para aplicações periodontais, “PhageDent” (KATSARAVA, comunicação pessoal apud SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

O segundo grande centro de pesquisas com bacteriófagos na Europa Oriental é o Instituto Hirsfeld de Imunologia e Terapia Experimental (HIIET), na Polônia (STONE, 2002; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). O HIIET foi fundado em 1952 e pesquisa ativamente bacteriófagos desde 1957. Um dos expoentes nestes estudos foi Stefan Slopek, um dos responsáveis pelos estudos mais detalhados a respeito de terapia com bacteriófagos provenientes da antiga União Soviética (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Em uma série de artigos publicados nos anos 80, culminando com uma revisão em 87, Slopek Et al. (1987) descreve o tratamento de 550 pacientes, de uma semana a 86 anos de idade, septicêmicos e refratários a tratamentos convencionais. Os tratamentos foram iniciados ao menos um mês após o diagnóstico, e apenas quando houve pouca ou nenhuma melhora utilizando antibióticos (SLOPEK Et al., 1987). Após o isolamento do patógeno (ou patógenos em infecções múltiplas), um levantamento contra um painel de mais de 250 fagos líticos contra *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*, *Klebsiella* e

Salmonella foi realizado (SLOPEK Et al., 1987). Os fagos foram aplicados por diversas vias, sendo substituídos na ausência de efeito observável, de maneira contínua, por períodos de uma semana a três meses. As taxas de recuperação foram em média de 92%, variando de 75% a 100% (SLOPEK Et al., 1987; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). O HIET também obteve sucesso contra diversas outras infecções (STONE, 2002) e representa um dos principais investigadores do mundo sobre a interação de bacteriófagos com o sistema imune de vertebrados (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

Um dos marcos mais recentes, que incentivou a redescoberta dos bacteriófagos no Ocidente, é o conjunto de trabalhos do grupo de Herbert Williams Smith, da Grã-Bretanha, na década de 80. Ele e seu grupo realizaram testes com bacteriófagos contra *E. coli* em diversos modelos (SMITH;HUGGINS, 1982, 1983; SMITH;HUGGINS;SHAW, 1987b). A principal inovação de seus trabalhos, além de seguir requerimentos metodológicos modernos e aceitos, foi o emprego de isolados virais que utilizavam como receptor o antígeno capsular (K), um dos principais fatores de virulência dessas linhagens bacterianas (SMITH;HUGGINS, 1982; SMITH;HUGGINS;SHAW, 1987b). A emergência de mutantes resistentes a infecção, via oclusão do receptor, resultava, portanto, na atenuação do patógeno. Estudos em camundongos septicêmicos mostraram que uma única injeção intramuscular de bacteriófagos contra o antígeno K foi mais eficiente do que múltiplas doses de vários antibióticos, e no mínimo tão eficiente quanto muitas doses de estreptomicina, o melhor tratamento disponível (SMITH;HUGGINS, 1982). Verificaram a permanência dos fagos em circulação por 24h e persistência dos mesmos no baço por dias, notando um efeito protetor da administração de fagos 3-5 dias antes do inóculo bacteriano (SMITH;HUGGINS, 1982). O sucesso de experimentos prévios os levou a expandir seus

estudos para modelos suínos, caprinos e bovinos (SMITH;HUGGINS, 1983; SMITH;HUGGINS;SHAW, 1987b). Nestes últimos verificaram redução dos títulos de *E. coli*, com concomitante atenuação de sintomas e mortalidade, mesmo com tratamentos apenas após aparecimento de sintomas. Verificaram posteriormente a susceptibilidade dos fagos a diversas condições, como redução de pH no abomaso, o quarto e último compartimento do estômago de ruminantes (SMITH;HUGGINS;SHAW, 1987a). Outros resultados interessantes incluem proteção após distribuição de apenas 10^2 partículas virais nas baias, e mesmo proteção de animais que apenas foram colocados nas mesmas baias de animais previamente tratados com fagos (SMITH;HUGGINS;SHAW, 1987b). Há repetição posterior de alguns desses experimentos, confirmando seus resultados (BARROW;LOVELL;BERCHIERI, 1998), e há inclusive modelos matemáticos a respeito de alguns destes experimentos (LEVIN;BULL, 2004).

Outra inovação moderna consistiu na seleção de fagos com maior tempo de circulação *in vivo*. Merrill Et al. propuseram como obstáculo para um tratamento bem sucedido a rápida eliminação desses vírus através da resposta imune inata, via sistema mononuclear fagocitário (anteriormente conhecido como sistema reticuloendotelial) (1996). Assim, empregaram rodadas de seleção *in vivo* em camundongo e amplificação *in vitro* (que chamaram de “passagens seriais”) para obter bacteriófagos capazes de evadir o sistema imune e permanecer mais tempo em circulação. Os mutantes resultantes, que possuíam alteração estrutural na proteína E do capsídeo (mudança de ácido glutâmico para lisina), apresentaram maior efeito terapêutico (MERRILL Et al., 1996).

O mesmo grupo também demonstrou a aplicabilidade da terapia com fagos para o combate de *Enterococcus* vancomicina resistentes. Empregaram para isso um modelo

sistêmico em camundongo, utilizando um isolado clínico de *Enterococcus faecium* (BISWAS Et al., 2002). Observaram um efeito claro dose-dependente e conseguiram recuperar 50% dos animais infectados mesmo após tratamento de animais moribundos (BISWAS Et al., 2002). Experimentos adicionais verificaram a necessidade de vírions e descartaram efeitos imunoestimulatórios indiretos (BISWAS Et al., 2002).

Estudos mais recentes (1991) com *Salmonella* Typhimurium observaram efeito estatisticamente significativo no tratamento de infecções experimentais em frangos na Inglaterra (BERCHIERI;LOVELL;BARROW, 1991 apud SULAKVELIDZE;BARROW, 2005). Observou-se redução de mortalidade, bem como de carga bacteriana no sistema digestivo, redução de virulência em mutantes resistentes à infecção e ausência do surgimento de anticorpos neutralizantes por até um mês. A necessidade de altos títulos de fagos e de um *timing* específico para o início do tratamento também foram verificadas, levantando questionamentos sobre a interferência da etapa intracelular da patogênese dessa bactéria no tratamento com fagos (BERCHIERI;LOVELL;BARROW, 1991 apud SULAKVELIDZE;BARROW, 2005). Em modelo em frangos, infectados com *S. enterica* Enteritidis PT4, Fiorentin, Vieira e Barioni (2005) observaram um efeito terapêutico, mas não profilático da administração oral de uma mistura de três fagos líticos, em alta multiplicidade de infecção. Notaram redução de três e meia ordens de grandeza na titulação de bactérias presentes no ceco e uma aceleração na redução natural da contaminação por *Salmonella* Enteritidis nestes animais (FIORENTIN;VIEIRA;BARIONI, 2005).

Com a retomada de interesse na terapia com fagos, muitos estudos recentes destacam a aplicação bem sucedida da mesma, sendo possível citar tratamentos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a iminepen (WANG Et al., 2006), em modelo de

queimadura (MCVAY;VELASQUEZ;FRALICK, 2007), e infecção pulmonar (DEBARBIEUX Et al., 2010), de infecção pulmonar por *Burkholderia cenocepacia* (CARMODY Et al., 2010), de *E. coli* produtora de β -lactamase de espectro estendido, de *Mycobacterium avium* utilizando *Mycobacterium smegmatis* infectados com fago como carreador (DANELISHVILI;YOUNG;BERMUDEZ, 2006), de *Staphylococcus aureus* (CAPARELLI Et al., 2007), incluindo animais imunosuprimidos (ZIMECKI Et al, 2009) e após transplante de medula óssea (ZIMECKI Et al., 2010), entre outros. Um último estudo a ser detalhado, é uma publicação recente utilizando um modelo murino de infecção sistêmica com *Salmonella enterica* Paratyphi (CAPARELLI Et al., 2010). Caparelli Et al. conseguiram resgatar 100% de animais infectados com doses letais de bactérias. Obtiveram ainda eliminação do patógeno, após tratamento com fagos duas semanas pós-desafio, em inóculos subletais da bactéria (CAPARELLI Et al., 2010). Não verificaram anticorpos neutralizantes contra os fagos, mas verificaram um limiar de densidade bacteriana necessário para a propagação dos mesmos (CAPARELLI Et al., 2010). Notaram ainda que há o aparecimento de linhagens bacterianas resistentes aos bacteriófagos empregados, mas que estas são atenuadas o suficiente para servir como vacinas, sugerindo assim uma nova abordagem profilática envolvendo os fagos (CAPARELLI Et al., 2010).

Em paralelo a estes trabalhos sobre utilização terapêutica de bacteriófagos, muitos estudos sobre a biologia dos bacteriófagos foram realizados desde seu descobrimento até a atualidade (LEVIN;BULL, 2004; SUMMERS, 2005). Nas últimas décadas, o papel ecológico de fagos em ambientes naturais também vem sendo amplamente abordado, contribuindo para uma perspectiva menos negativa a respeito de vírus (WEINBAUER, 2004; GREGORACCI, 2006). Tais assuntos fogem do escopo central dessa tese e, tendo

sido amplamente discutidos previamente, não serão abordados em detalhes aqui (GREGORACCI, 2006). Contudo, faz-se necessário cobrir alguns tópicos sobre biologia de fagos relevantes para seu papel como agente terapêutico.

Um dos motores para o interesse renovado do estudo de bacteriófagos em ambientes naturais iniciou-se com observações feitas cerca de três décadas atrás sobre a abundância dos vírus nestes ambientes (TORRELA;MORITA, 1979 apud WEINBAUER, 2004). Quase uma década após as observações iniciais os resultados foram confirmados (BERGH Et al., 1989 apud KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; WEINBAUER, 2004), bem como complementados com evidências experimentais de atividade lítica dos mesmos (SUTTLE, 1990 apud KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; PROCTOR, 1990 apud KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005). Observações diretas por microscopia (eletrônica e/ou de epifluorescência) indicam grandes quantidades de vírus em ambientes marinhos (multiplicidade de infecção de 3-25; FUHRMAN, 1999; WOMMACK;COLWELL, 2000; CHIBANI-CHENNOUFI Et al., 2004; SHORT;SUTTLE, 2005) e terrestres (multiplicidade de infecção de 0,1-100; KIMURA Et al., 2008). Posteriormente, quantificações indiretas por metodologias independentes de cultivo, demonstram títulos virais em torno de dez vezes superiores aos demais organismos celulares (BREITBART;ROHWER, 2005). Dado que a maioria dos organismos presentes nos ambientes estudados são bactérias ou arqueias (talvez com exceção de solos; KIMURA Et al., 2008), a maioria dos vírus devem infectar estes domínios, sendo, portanto, bacteriófagos por definição (FUHRMAN, 1999; WOMMACK;COLWELL, 2000; GREGORACCI, 2006). É bem provável que haja alteração nesta definição e na classificação destes vírus em um futuro próximo, visto que estudos sobre vírus de arqueias revelam cada vez mais características únicas, separando-os

dos bacteriófagos convencionais (PRANGISHVILI;FORTERRE;GARRETT, 2006; PRANGISHVILI;GARRETT; KOONIN, 2006). Ainda assim, considerados em conjunto, ambos representam, sem dúvida, as entidades biológicas mais abundantes de todo mundo, totalizando 10^{30-32} partículas virais (BREITBART;MIYAKE;ROHWER, 2004; CHIBANI-CHENNOUFI Et al., 2004; WEINBAUER, 2004; BREITBART;ROHWER, 2005; KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; GREGORACCI, 2006). O *turnover* diário necessário para manutenção de uma população tão abundante implica em uma ciclagem de nutrientes imensa (FUHRMAN, 1999; WOMMACK;COLWELL, 2000; WEINBAUER, 2004; SHORT;SUTTLE, 2005; GREGORACCI, 2006; KIMURA Et al., 2008), e um elemento muito importante no controle de populações microbianas (FUHRMAN, 1999; WEINBAUER, 2004; GREGORACCI, 2006; LABRIE;SAMSON;MOINEAU, 2010). Seu papel na transferência horizontal de genes, por transdução, também é impressionante, mesmo com estimativas bastante reduzidas da ocorrência natural deste fenômeno (FUHRMAN, 1999; WOMMACK;COLWELL, 2000; CHIBANI-CHENNOUFI Et al., 2004; WEINBAUER, 2004; GREGORACCI, 2006; KIMURA Et al., 2008). A onipresença destes vírus em todos os ambientes resulta em contato direto com todos os organismos, virtualmente todo o tempo (GORSKI;WEBER-DABROWSKA, 2005), com implicações discutidas posteriormente, bem como na possibilidade de isolamento quase contínuo de bacteriófagos provenientes de ambientes apropriados, onde seus hospedeiros proliferem (STONE, 2002; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

Associada a esta abundância observa-se considerável diversidade (WOMMACK;COLWELL, 2000; WEINBAUER, 2004; BREITBART;ROHWER, 2005; GREGORACCI, 2006; STURINO;KLAENHAMMER, 2006). Estruturalmente não tão

evidente, a diversidade de fagos torna-se bastante óbvia após análises genéticas/genômicas, que revelam organização em mosaico e propensão à recombinação, assim como um grande *pool* gênico inexplorado, possivelmente o maior do mundo (HENDRIX, 2003; CHIBANI-CHENNOUFI Et al., 2004; WEINBAUER, 2004; BREITBART;ROHWER, 2005; GREGORACCI, 2006; LIMA-MENDEZ Et al., 2008). A coevolução com seus hospedeiros, bastante versáteis e tão ou mais diversos, implica em necessidade de variação nos vírus, tornada possível através de aceleradas taxas de evolução, associada à degradação e *turnover* contínuos (FUHRMAN, 1999; WOMMACK;COLWELL, 2000; WEINBAUER, 2004; GREGORACCI, 2006; KIMURA Et al., 2008; LABRIE;SAMSON;MOINEAU, 2010). Diversidade e abundância consideradas em conjunto tornam possível, segundo estimativas amplamente aceitas, o isolamento de ao menos dez vírus para cada linhagem bacteriana, em média (CHIBANI-CHENNOUFI Et al., 2004; GREGORACCI, 2006; LABRIE;SAMSON;MOINEAU, 2010), desconsiderando a coevolução contínua de fagos e hospedeiros (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Tornam esses vírus também uma possível fonte de novos genes, como as grandes quantidades de sequencias codificantes sem função definida encontradas após o sequenciamento de quase todos os organismos até o presente (DAUBIN;OCHMAN, 2004; BREITBART;ROHWER, 2005; GREGORACCI, 2006).

Apesar da quantidade e diversidade de vírus, a seleção natural favoreceu a persistência de populações naturais microbianas, através da especificidade de fagos (FUHRMAN, 1999; WOMMACK;COLWELL, 2000; WEINBAUER, 2004). A maioria dos fagos descritos, com poucas exceções, infecta uma gama um tanto restrita de bactérias, muitas vezes apenas linhagens dentro de uma espécie (SMITH;HUGGINS, 1982, 1983;

FUHRMAN, 1999; SUMMERS, 2001; CHIBANI-CHENNOUFI Et al., 2004; KIMURA Et al., 2008). Em ambientes naturais diversificados isso resulta em flutuações populacionais de bacteriófagos, que causam e respondem a flutuações nas populações de hospedeiros (FUHRMAN, 1999; WOMMACK;COLWELL, 2000; CHIBANI-CHENNOUFI Et al., 2004; WEINBAUER, 2004; GREGORACCI, 2006; KIMURA Et al., 2008). Essa marcada especificidade, principalmente em contraste com antibióticos, apresenta desvantagens e vantagens do ponto de vista terapêutico (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). A principal desvantagem é a necessidade de isolamento e/ou diagnóstico preciso do patógeno em questão, sob risco de falha completa da terapia (LEVIN;BULL, 2004). Tal prática, embora desejável também para antibióticos (KERR, 2005), não é estritamente necessária para o uso destes. Duas vantagens também emergem em contraste com drogas antimicrobianas. O tratamento com fagos não prejudica a microbiota natural do organismo (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005) e não há evolução de resistência em outras bactérias, afetadas de modo secundário ao patógeno, fruto de dano colateral resultante da ação inespecífica das drogas (LEVY, 2001; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Conforme apontado anteriormente, agravantes quanto ao aparecimento de resistência a antimicrobianos incluem o uso profilático de drogas em contexto agropecuário e a permanência de antibióticos no ambiente após a excreção, ambos sendo consequência da ação indiscriminada dos antibióticos sobre bactérias outras além das patogênicas (LEVY, 2001; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). É necessário ressaltar também que os mecanismos de resistência a fagos e antibióticos convencionais são distintos e não apresentam sobreposição, e, portanto, é possível combater patógenos multirresistentes sem

risco de agravar o problema (SMITH;HUGGINS, 1982, 1983; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; LABRIE;SAMSON;MOINEAU, 2010).

Outro ponto de destaque é o mecanismo antimicrobiano resultante da administração de bacteriófagos. A ação destes é prioritariamente bactericida, enquanto antibióticos com frequência são bacteriostáticos, ou seja, apenas inibem o crescimento bacteriano (MINAHK;DUPUY;MORERO, 2004). Em parte isso decorre da provável concepção errônea da função biológica destas moléculas no ambiente, conforme previamente abordado na seção 1.2 (LINARES Et al., 2006; YIM Et al., 2006; YIM;WANG;DAVIES, 2007; FAJARDO Et al., 2008). Neste quesito, não há dúvidas que bacteriófagos estritamente líticos devidamente selecionados resultam obrigatoriamente na morte e dissolução da bactéria hospedeira, sendo esse, inclusive, seu papel em ambientes naturais (SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; LIMA-MENDEZ Et al., 2008).

Conforme citado anteriormente, a enorme abundância de vírus que infectam bactérias e arqueias implica em seu contato direto com os demais organismos, incluindo humanos. Assim, caso algum prejuízo à saúde se manifestasse, haveria ampla oportunidade para o desenvolvimento de uma resposta imune específica para esse fim. O fato de muitos fagos não serem demasiado imunogênicos (BRUTTIN;BRUSSOW, 2005; DABROWSKA Et al., 2005; GREGORACCI, 2006), e possuírem distribuição virtualmente livre em organismos vertebrados (DABROWSKA Et al., 2005; GORSKI;WEBER-DABROWSKA, 2005), permite concluir por sua inocuidade. De fato, apenas contaminantes de preparações de bacteriófagos, subproduto da lise bacteriana, apresentaram problemas em testes clínicos, ainda que de modo pouco frequente (como revisto por SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Em geral, os resultados a respeito da biodistribuição dos fagos são impressionantes; há

relatos de transposição quase instantânea na mucosa intestinal (DABROWSKA Et al., 2005; GORSKI;WEBER-DABROWSKA, 2005) e ao menos três observações de transposição através da barreira hematoencefálica, embora sem mecanismo identificado (DUBOS;STRAUS;PIERCE, 1943; SMITH;HUGGINS, 1982; ROGERS Et al., 2005). Rogers Et al., inclusive, aproveitam a translocação do fago *fd* para transporte de enzimas ativas contra cocaína para seu sítio de maior efeito, o cérebro (2005). Há relatos recentes de não neutralização dos fagos após tratamentos múltiplos (BRUTTIN;BRUSSOW, 2005; CAPARELLI Et al., 2010), embora haja relatos mais antigos de neutralização e interferência no tratamento (SMITH;HUGGINS;SHAW, 1987a), sendo possível supor considerável variação na imunogenicidade. Como prova adicional de inocuidade, bacteriófagos (Φ X174) foram rotineiramente empregados para avaliação da resposta imune humoral em pacientes imunodeprimidos, sem relatos de efeitos colaterais (FOLGELMAN Et al., 2000; RUBINSTEIN Et al., 2000). Mais interessante ainda, há observações algo recentes de efeitos imunoestimulatórios benéficos, e alguns estudos sugerem imunomodulação mediada por fagos, contribuindo para restabelecer uma resposta imune normal, independente se esta se encontra deprimida ou exacerbada (GORSKI;WEBER-DABROWSKA, 2005).

Por fim é importante destacar outro ponto vantajoso dos bacteriófagos sobre outros tratamentos. Fagos são capazes de evoluir (LEVIN;BULL, 2004; STURINO;KLAENHAMMER, 2006), podendo, portanto, participar de uma corrida armamentista evolutiva com seus hospedeiros, contrapondo inovações bacterianas prejudiciais à sua replicação, como a evolução de resistência (WEINBAUER, 2004; STURINO;KLAENHAMMER, 2006; KIMURA Et al., 2008;

LABRIE;SAMSON;MOINEAU, 2010). Sua multiplicação rápida, em certos casos atingindo altos títulos, acarreta em amplo material para atuação de seleção, seja natural ou artificial (PASCHKE, 2006; BRATKOVIC, 2010). Essa característica constitui a base da metodologia conhecida por *phage display*, que emprega fagos para evolução artificial de proteínas (ROGERS Et al., 2005; PASCHKE, 2006; BRATKOVIC, 2010). A capacidade de evolução de bacteriófagos permite, com certa facilidade, a seleção de variantes virais com propriedades interessantes para terapia ou outros fins. Mencionado previamente neste texto, está o trabalho de Merrill et al., onde variantes com maior capacidade de evasão do sistema mononuclear fagocitário foram mais bem sucedidas na eliminação de *E. coli*, causadora de infecção sistêmica (2006). Outras características de interesse incluem também maior estabilidade *in vitro*.

É necessário ainda comentar algo sobre a resistência a bacteriófagos. Os mecanismos que efetivam tal resistência, como mencionado anteriormente, não se sobrepõem com os que conferem resistência a antibióticos (SMITH;HUGGINS, 1982, 1983; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005; LABRIE;SAMSON;MOINEAU, 2010). Revisões recentes dividem estes mecanismos em categorias como prevenção de adsorção (através de alteração ou oclusão de receptores, bloqueio dos mesmos com estruturas como a cápsula ou produção de moléculas competidoras), prevenção de injeção do genoma viral, bloqueio do genoma viral pós-injeção (via sistemas de restrição modificação, e via os recém-descobertos CRISPRs) ou infecções abortivas (SUMMERS, 2001; CHIBANI-CHENNOUFI Et al., 2004; WEINBAUER, 2004; STURINO;KLAENHAMMER, 2006; LABRIE;SAMSON;MOINEAU, 2010). Os diversos mecanismos ilustram a complexidade da coevolução fago-bactéria, indicando em longo período de interação, como afirmado no

início do texto (LABRIE;SAMSON;MOINEAU, 2010). É importante entender estes mecanismos de resistência para propor alternativas de forma a explorá-los (LEVIN;BULL, 2004), como exemplificado pelos estudos de Smith, Huggins e Shaw, previamente discutido (SMITH;HUGGINS, 1982; SMITH;HUGGINS;SHAW, 1987b).

Diversos produtos baseados em fagos encontram-se disponíveis atualmente ou em diversos estágios de desenvolvimento (HOUSBY;MANN, 2009). Como citado previamente, em Tbilisi na Geórgia, há produtos licenciados e explorados comercialmente na atualidade (STONE, 2002; JIKIA, Et al., 2005). Mesmo nos EUA, há ao menos dois produtos aprovados pelo FDA para utilização contra *Listeria* em alimentos (produzido pela empresa Intralytix) e para o combate de bactérias patogênicas de pimenta e tomate (produzido pela empresa Omnilytics) (HOUSBY;MANN, 2009). Há diversas outras empresas, nos EUA, Reino Unido, Canadá, Austrália, em diferentes estágios de desenvolvimento de fagos terapêuticos, desde pesquisa e desenvolvimento, passando por estudos pré-clínicos, e ao menos um preparado de fagos (contra infecções de ouvido causadas por *Pseudomonas*) aprovado em um estudo clínico de fase II pelo FDA (HOUSBY;MANN, 2009). A comercialização de preparados terapêuticos de bacteriófagos representa uma continuação necessária para produtos explorados cientificamente e demonstra aplicabilidade e interesse industrial estimulando pesquisa básica nesse campo.

2. OBJETIVOS

- Caracterização genômica dos bacteriófagos isolados em nosso laboratório;

- Abordar aspectos básicos necessários para a utilização terapêutica de alguns destes fagos:
 - purificação de vírions
 - toxicidade das preparações virais
 - seleção de variantes (estabilidade e maior circulação *in vivo*)
 - biodistribuição e eliminação de fagos utilizados em modelos sistêmicos;

- Estabelecer modelos representativos e testar a atividade profilática e terapêutica dos bacteriófagos nestes modelos;

3. CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL TERAPÊUTICO DE FAGOS DE *SHIGELLA*

3.1 Dados gerais

Title: Characterization and therapeutic potential of *Shigella* phages

Author(s) names & affiliations:

Gustavo B. Gregoracci¹ gustavo_biomed@yahoo.com

Alessandro S. Farias¹ farias.as@gmail.com

Ramon O. Vidal² ramon.vidal@gmail.com

Marcelo F. Carazzolle^{2,3} mcarazzo@lge.ibi.unicamp.br

Gonçalo A. G. Pereira² goncalo@unicamp.br

Leonilda M. B. Santos¹ leonilda@unicamp.br

Piotr A Mieczkowski⁴ miecz001@med.unc.edu

Marcelo Brocchi¹ mbrocchi@unicamp.br

¹Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Cidade Universitária “Zeferino Vaz”. Campinas, São Paulo, Brazil, CEP 13083-862. Phone: (55-19) 3521-6271. FAX: (55-19) 3521-6276.

² Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil.

³ CENAPAD-SP - Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo, Universidade Estadual de Campinas, CP 6141, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Genetics, School of Medicine, Carolina Center for Genome Sciences, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-3280

3.2 ABSTRACT

Aims

The isolation and characterization of lytic phages from sewage against *Shigella spp.*, and the evaluation of their therapeutic potential in vitro and in cell culture assay.

Material and Methods

Phages were isolated through concentration with polyethylene glycol, and characterized regarding morphology, nucleic acid type and host range. Five phages were completely sequenced and compared to related viruses. They were tested *in vitro* for *Shigella* time-kill experiments and one of them was tested in a HeLa cell invasion assay, evaluated by plate counting, flow cytometry and fluorescent microscopy.

Results

Several lytic phages with different morphologies were isolated, each lysing few strains, but altogether covering all *Shigella* strains tested. Sequenced phages were found to be related to previously known viruses, with different degrees of similarity. The phages were able to

reduce *Shigella* growth in vitro and a virulent isolate presented bactericidal activity in the cell culture assay.

Conclusions

We have isolated and fully characterized phages lytic to *Shigella spp.* Sequence and genomic structure similarity to different groups of phages were found, such as T1, T4-like, T7-like and N4. Shdy1 presented genomic recombination when aligned to similar phages. Interestingly, Shfl3 was similar to N4, a phage considered orphan for over forty years. With the exception of Shdy1, the *in vitro* activity, stability along time and HeLa invasion assay indicated a potential use of the phages in therapy. Altogether, our results reinforce the seminal work of D'Herele and claim for the rediscovery of therapeutic potential of *Shigella* phages in the occidental world.

KEYWORDS – bacteriophage, *Shigella*, characterization, genome sequencing, cell culture, invasion assay, sewage

3.3 INTRODUCTION

Shigella spp., members of the *Enterobacteriaceae* family, are gram-negative, rod-shaped, facultative anaerobic bacteria [Jennison, Verma, 2004; Schroeder, Hilbi, 2008]. This genus is composed by four “species” (*S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii* and *S. sonnei*) and is classified apart from the phylogenetically close *Escherichia* genus for historical reasons, even though recent genetic studies challenged this classification through comparative genomics [Jennison, Verma, 2004; Schroeder, Hilbi, 2008, Lan,Reeves, 2002]. Bacteria grouped within the *Shigella* genus are intracellular, primate-specific (including humans), pathogens [Lan,Reeves, 2002].

Shigellosis is an acute intestinal infection, marked by a strong inflammation caused by the bacteria [Jennison, Verma, 2004; Schroeder, Hilbi, 2008]. It is easily transmitted by the fecal-oral route and direct contact, given the highly infectious nature of the pathogen, product of its evasion from the innate immunity [Schroeder, Hilbi, 2008]. The disease is self-limiting but the absence of effective treatment favors, in rare occasions, the development of secondary complications such as septicemia and pneumonia. Also, *S. dysenteriae* can cause hemolytic uremic syndrome due to the expression of Shiga toxin [Jennison, Verma, 2004; Schroeder, Hilbi, 2008]. Immunocompromised patients are also more susceptible to persistent or recurrent infections and secondary complications as septicemia [Kotloff et al., 1999]. Shigellosis is a burden especially for the developing countries in which ca 99% of global infections occur [Jennison, Verma, 2004; Schroeder, Hilbi, 2008, Kotloff et al., 1999]. Poor sanitary conditions, poor hygienic habits, malnutrition and lack of appropriate medical intervention, all common in most of these places, are aggravating factors that contribute to this situation, especially to young children

[Schroeder, Hilbi, 2008]. It is estimated that 1.1 million of deaths can be attributed annually to this disease in developing countries, 61% of which attributable to children under five years of age [Jennison, Verma, 2004; Schroeder, Hilbi, 2008, Kotloff et al., 1999]. *Shigella* control is also complicated by the pathogen's ability to acquire plasmid encoded resistance genes against the favored drugs used in its treatment [Jennison, Verma, 2004, Kotloff et al., 1999]. Multiresistant strains are a burden especially in developing countries where the practicality and costs of treatment options are key features to be considered [Jennison, Verma, 2004; Schroeder, Hilbi, 2008, Kotloff et al., 1999].

Alternative control approaches, such as vaccination, are sought after since the 1940s, but no vaccine has been successful enough to be approved to field trials, even though several are currently in different clinical tests phase [Jennison, Verma, 2004; Schroeder, Hilbi, 2008, Kotloff et al., 1999]. Another approach involves the use of bacteriophages, viruses that kill bacteria, as antimicrobial agents. Phages against *Shigella* were actually the first described by Félix D'Herelle, one of the co-discoverers of these viruses, in 1915, and were readily tested as antibacterials [Sulakvelidze, 2001, Summers, 2001, Gregoracci, 2006]. Results from the time are considered with caution, given the differences in standard clinical trials of that time, and variable or unreliable, which can be attributed to a lack of basic understanding of the nature of bacteriophages in a time preceding virology and immunology [Sulakvelidze, 2001, Summers, 2001, Gregoracci, 2006]. Bacteriophage therapy has been forsaken for decades since the discovery of antibiotics, but has recently resurged as an alternative or complementary treatment option in modern times. Several studies reinforce this idea [Biswas, 2002, Caparelli, 2010], and several reviews discuss the advantages and disadvantages of such approach [Sulakvelidze, 2001, Gregoracci,

2006, Schoolnik, 2004, Skurnik, 2006]. With few exceptions [Projan, 2004], all conclude for the validity of and/or stimulate further exploration in this field [Sulakvelidze, 2001, Summers, 2001, Gregoracci, 2006, Biswas, 2002, Caparelli, 2010, Schoolnik, 2004, Skurnik, 2006]. Despite this, lytic phages to *Shigella spp* have not been explored in recent days as antimicrobial agents. In addition, there are few if any studies performing a systematic characterization of these phages with further characterization by genome sequencing. Considering the epidemiological importance and the emergence of multi-resistant *Shigella spp* isolates, phage therapy became an attractive approach to control this disease worldwide, particularly for poor populations. Because of this, the present work aims to isolate, characterize (both phenotype and genome) and test the therapeutic potential of bacteriophages isolated from sewage against *Shigella spp*.

3.4 MATERIALS & METHODS

3.4.1 Bacterial samples

The bacterial strains used in this study (Table 1) belong to the laboratory collection and consisted of clinical isolates and/or type strains of *Shigella spp*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Yersinia enterocolitica*. Bacterial species other than *Shigella spp* were used to test the specificity of the phages. *Shigella* type strains were kindly provided by Dr. Anthony Maurelli (Department of Microbiology and Immunology, F. Edward Hébert School of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, USA). *Salmonella enterica* Typhimurium UK1 and *Yersinia enterocolitica* FCF76 were kindly provided by Dr. Roy Curtiss III (Center for Infectious Disease and Vaccinology, The Biodesign Institute and School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, Arizona 85287, USA) and Dr. Juliana Pfrimer Falcão (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil), respectively. All strains were tested in selective media (*Shigella*-*Salmonella* agar and McConkey agar). They were routinely grown in LB culture medium incubated at 37°C, and permanent stocks were stored at -80°C in 20% glycerol.

Table 1 – Bacterial strains used in this study

Strain	Source
<i>S. flexneri</i> 17	Laboratory Collection
<i>S. flexneri</i> 37	Laboratory Collection
<i>S. flexneri</i> 67	Laboratory Collection
<i>S. flexneri</i> 2457T	Dr. Anthony Maurelli ¹
<i>S. sonnei</i> 15	Laboratory Collection
<i>S. sonnei</i> 17	Laboratory Collection
<i>S. sonnei</i> BS514	Dr. Anthony Maurelli ¹
<i>S. dysenteriae</i> 7172	Laboratory Collection
<i>S. dysenteriae</i> 8135	Laboratory Collection
<i>S. dysenteriae</i> 5862	Laboratory Collection
<i>S. dysenteriae</i> 3818T	Dr. Anthony Maurelli ¹
<i>S. boydii</i> BS608	Dr. Anthony Maurelli ¹
<i>E. coli</i> ATCC25922	American Type Culture Collection
<i>S. enterica</i> Typhimurium UK1	Dr. Roy Curtiss III ²
<i>S. enterica</i> Typhimurium ATCC13311	American Type Culture Collection
<i>S. enterica</i> Typhimurium ATCC14028	American Type Culture Collection
<i>S. enterica</i> Typhi ATCC19430	American Type Culture Collection
<i>S. enterica</i> Typhi ATCC10749	American Type Culture Collection
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis ATCC13076	American Type Culture Collection
<i>Y. enterocolitica</i> FCF76	Dr. Juliana Pfrimer Falcão

1. Kindly provided by Dr. Anthony Maurelli (Department of Microbiology and Immunology, F. Edward Hébert School of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, USA);
2. Kindly provided by Dr. Roy Curtiss III (Center for Infectious Disease and Vaccinology, The Biodesign Institute and School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, Arizona 85287, USA);
3. Kindly provided by Dr. Juliana Pfrimer Falcão (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil).

3.4.2 Phage isolation

Raw sewage samples (500-1000ml) were collected from the Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto (DAERP, São Paulo State, Brazil), the local water and sewage treatment facility. The sewage sample received NaCl to the final concentration of 1M and was centrifuged (10000g) to remove impurities. The supernatant received Polyethylene Glycol 8000 to a final concentration of 10%. After overnight decantation at 4°C, the

material was subjected to centrifugation at 11000g for 20 minutes. The pellet was re-suspended in SM buffer [Sambrook, Russel, 2001] and extracted with an equal volume of chloroform. The viral concentrate was stored in 4°C protected from light.

Phages were isolated through the agar overlay method [Carlson, 2005]. Single lysis plaques were collected with sterile picks, and added to an exponential growing bacterial culture following incubation overnight at the appropriated temperature. This procedure was repeated three times to ensure the isolation of a single viral type.

3.4.3 Phage phenotypic characterization

Host range of the isolates was determined by spotting pure viral preparations in lawns of target bacteria, according to [Carlson, 2005]. Each phage was tested against all other hosts other than the isolation one, with occasional repetitions.

Viral morphology was determined through transmission electron microscopy. Prior to analysis the samples were purified through ultracentrifugation (100,000g) in a sucrose cushion (25-27.5%). The samples were negatively stained with uranyl acetate 2% (pH 4.5) and observed in a LEO 906 MET (Carl Zeiss).

DNA extractions were performed according to [Sambrook, Russel, 2001]. Digestion with DNase and S1 Nuclease allowed the confirmation of dsDNA. Estimatives of genomic size were obtained through pulsed field gel electrophoresis after extraction with Sarkosyl-EDTA and proteinase K. Agarose blocks were washed with ultra pure water and TE, and

kept in a TE solution at 4°C. Electrophoresis conditions were as following: 0.1-10s at 6 V cm^{-1} , 20-22h, for a 1.0-1.2% agarose gel.

3.4.4 Phage genomic sequencing

Phage lysates were digested with DNase to eliminate contaminating bacterial DNA. Phenol-chloroform extraction followed and the product of the extraction was passed through a purification column (Illustra PlasmidPrep Minispin Kit[®], GE Healthcare).

The sequencing of the phage genomes was performed in the Illumina GenomeAnalyzer IIx System by 76 bp Paired-Ends protocol with insert size of ca 400 bp (Illumina Inc., USA) in the High Throughput Sequencing Facility of the University of North Carolina at Chapel Hill. Each purified genomic DNA sample was fragmented by nebulization, size selected and unique identifier tags were added (sample multiplexing) during DNA library preparation according to original Illumina protocol. DNA libraries were sequenced in single lane of the Illumina Paired-Ends flowcell.

Before the assembly process, the SOAPdenovo [Li, 2010] short-read correction tool was used to correct the Illumina GA reads. Besides the correction of nucleotides, it also trims 5' and 3' ends with poor quality or, ultimately, discards the entire low quality sequence. It generates a paired file or a single file for sequences where the other mate-pair was discarded. The single file was discarded and the paired sequences were assembled with Velvet assembler (version 0.7.57) [Zerbino, 2008]; the best parameters for each genome assembly were calculated by the VelvetOptimizer module. The GapCloser module from SOAPdenovo was used to close the gaps emerging during the scaffolding process by

Velvet, since it uses the abundant pair relationships of short reads to close the gaps in the scaffold.

Gene prediction was performed by Glimmer and GenemarkS using the appropriate genetic code [Delcher, 1999, Besemer, 2001]. Automated annotation was performed with SABIA (A System for Automated Bacterial Genome Integrated Annotation) [Almeida, 2004]. There was a general agreement among programs, so ORFs found in Glimmer were used for annotation. Sequences were annotated manually using translated peptides through BlastX and compared to close relatives through BlastN [Altschul, 1990]. They were subsequently aligned with closed relatives using the Mauve software [Darling, 2004]. Genome comparisons were also performed with the Blastatlas [Hallin, 2008].

Phages genomes (Shf11 and Shf12) were deposited in the Pubmed database under the accession numbers HM035024 and HM035025, respectively. The remainder phages are under final annotation phase in order to be submitted to Pubmed.

3.4.5 Time-kill curves

Shigella spp. strains were cultivated in LB medium overnight at 37°C in a stationary incubator. Afterwards they were re-inoculated 1/100 in fresh LB broth (50ml) and re-incubated at 37°C in a shaker (150-200rpm). Phages were added (the MOI was variable, according to individual titers) at the exponential phase (3h later) and the optic density (λ 600) was measure at different times. Bacterial cultures not treated with phages were used as control.

3.4.6 Invasion assay

The *S. flexneri* HeLa invasion assay was performed as described by [Elsinghorst, 1994]. Briefly, approximately $5 \cdot 10^5$ HeLa cells were added to each well in a 6-well plate. This culture was incubated overnight at 37°C in a CO₂ incubator, for the confluency of the cell layer. Calf serum residue is removed with a Minimum Essential Medium (MEM) washing in the next morning. A bacterial inoculum of approximately $5 \cdot 10^7$ colony forming units of *Shigella* (MOI 100) resuspended in MEM was used for infection. A centrifugation at 1500g for 10 minutes follows. This represents the initial time (T0) for treatments. Phage treatments with Shf11 MOI10 (virus-to-bacterium ratio) were administered in times T0, T30 and T60. PBS washings removed excess bacteria and viruses, and extracellular bacteria were eliminated with Gentamicin sulfate (40µg/ml) treatment for another 30 minutes at 37°C. Residues of gentamicin are washed away with PBS and cells are lysed with Triton X-100 0,1% in saline solution, to determine the amount of invasion after removal of extracellular bacteria. The amount of bacteria (in colony forming units, CFU) was determined by plating bacterial cells after serial dilution. Each test was performed at least in triplicate for statistical validation.

Due to the remarkable adhesion of phages to the plasticware utilized in this assay, a variation of this methodology was developed where *Shigella* cells were stained with PKH-26 stain according to the manufacturer protocol, for approximately 10 minutes (Sigma Aldrich, CA, USA). This experiment allowed the quantification of intracellular bacteria quickly after lysis, in a Gallios® flow cytometer (Beckman Coulter, CA, USA) using a known

concentration of labeled beads to calculate the concentration of bacteria recovered.

Additionally, it was possible to observe the invasion in a fluorescence microscope (Carl Zeiss, CA, USA)

3.5 RESULTS

Several bacteriophages were isolated mainly against *S. flexneri* and *S. dysenteriae*, but also *S. sonnei*. All bacteriophages were properly propagated and selected for stability by increasing the intervals in-between propagations. Currently the viruses endure for about two years with minimal titer alteration, if any.

Phage phenotypic characterization was performed in all samples (summarized in Table 2). All phages were found, through transmission electron microscopy, to be tailed, with exemplars presenting the three different tails (Figure 1). All phages were digested by DNase and not by S1 Nuclease, demonstrating double stranded DNA in all samples (data not shown). The estimated size of the phage genomes were obtained through pulsed field gel electrophoresis and are depicted in Table 2. The genome size was confirmed for the phages Shfl1, Shfl2, Shfl3, Shdy1 and Shdy3 by sequencing. All considered, phenotypic characteristics suggested the grouping of similar isolates as viral variants (as depicted in Table 2). Phages isolated were specific to few *Shigella* strains tested, but considered altogether were able to lyse all of them (Table 3).

Table 2. Phenotypic characteristics of the bacteriophages

Phage	Isolation host	Susceptible genus	Nucleic acid	Genome estimative	Morphology	Suggested classification
Shdy1	<i>Shigella dysenteriae</i>	---	dsDNA	45130kb*	Icosahedral, long tail	<i>Siphoviridae</i>
Shdy2	<i>Shigella dysenteriae</i>	---	dsDNA	39kb	Icosahedral, contractile tail	<i>Myoviridae</i>
Shdy3	<i>Shigella dysenteriae</i>	---	dsDNA	39115kb*	Icosahedral, short tail	<i>Podoviridae</i>
Shdy3v2	<i>Shigella dysenteriae</i>	---	dsDNA	40kb	Icosahedral, short tail	<i>Podoviridae</i>
Shfl1	<i>Shigella flexneri</i>	---	dsDNA	50625bp*	Icosahedral, long tail	<i>Siphoviridae</i>
Shfl2	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia</i>	dsDNA	165883bp*	Icosahedral, contractile tail	<i>Myoviridae</i>
Shfl2v2	<i>Shigella sonnei</i>	---	dsDNA	165kb	Icosahedral, contractile tail	<i>Myoviridae</i>
Shfl2v3	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Salmonella</i>	dsDNA	165kb	Icosahedral, contractile tail	<i>Myoviridae</i>
Shfl3	<i>Shigella flexneri</i>	---	dsDNA	69940kb*	Icosahedral, short tail	<i>Podoviridae</i>

* Precise estimate of non-redundant genome size based on DNA sequencing

Fig. 01

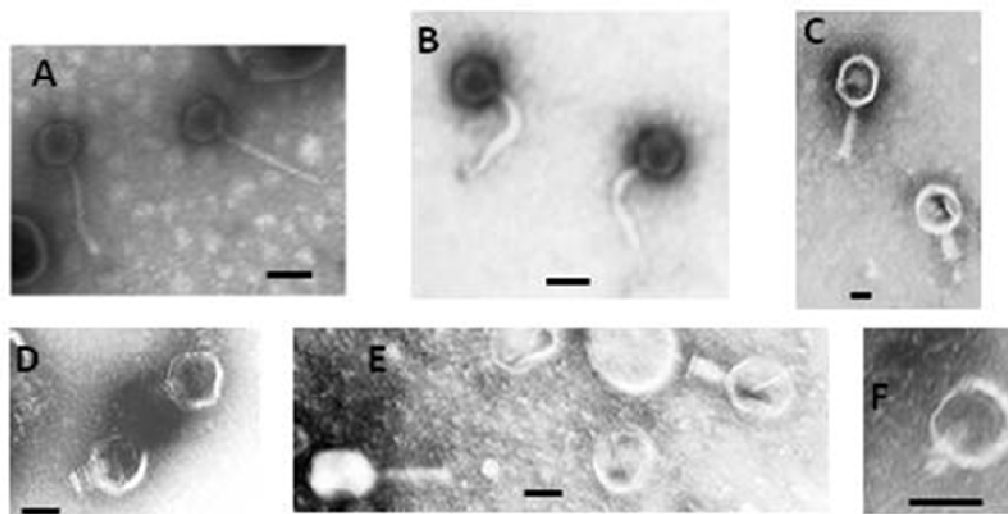


Figure 1 – Digitalized images of TEM negatives. Bacteriophages were negatively stained with uranyl acetate 2% (pH 4,5). The bars represent approximately 50nm respectively in each picture. **A)** Shfl1 **B)** Shdy 1 **C)** Shfl2 **D)** Shfl3 **E)** Shdy2 **F)** Shdy3.

Table 3. Range of hosts infected by the phages

	Shfl1	Shfl2	Shfl2v2	Shfl2v3	Shfl3	Shdy1	Shdy2	Shdy3	Shdy3v2
<i>S. flexneri</i> 17	++	++	++	++	-	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i> 37	++	++	++	++	-	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i> 67	-	-	+	+/-	++	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i> 2457T	++	++	++	++	++	-	-	+	+/-
<i>S. sonnei</i> 15	-	-	++	++	-	-	++	++	+
<i>S. sonnei</i> 17	+	-	++	++	+	+	++	++	-
<i>S. sonnei</i> SSB5914	++	++	-	++	-	-	+	-	++
<i>S. dysenteriae</i> 7172	-	-	++	++	++	-	++	++	++
<i>S. dysenteriae</i> 8135	-	-	-	-	++	++	-	-	-
<i>S. dysenteriae</i> 5862	-	-	++	++	++	-	++	++	++
<i>S. dysenteriae</i> 3818T	++	+/-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. boydii</i> SB608	-	+	-	++	-	-	-	-	++
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	++	-	-	++	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> Typhimurium UK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> Typhimurium ATCC13311	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> Typhimurium ATCC14028	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> Typhi ATCC19430	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i> Typhi ATCC10749	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
<i>S. enterica</i> Enteritidis ATCC13076	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> FCF76	-	-	-	-	-	-	-	-	-

The squares mark the isolation host from each phage. The + sign denotes lysis, while the - sign denotes absence of lytic activity. The ++ sign denotes pronounced lysis. The +/- sign denotes verifiable but highly reduced lysis.

To further characterize the samples, phages Shfl1, Shfl2, Shfl3, Shdy1 and Shdy3 were sequenced completely. Genome sequencing allowed a more precise estimative on non repetitive genome size of the phages (as depicted in Table 2). Phage Shfl1 presented a genome of 50625bp and, with coverage of 239-fold, GC content of 45.41% and was found to be 85% similar to phage T1 and 43% similar to phage TLS (Figure 1). From the 80

ORFs detected by the Glimmer software, 50 were closely aligned with T1 phage, ten were partially aligned with T1 phage, five aligned with other phages and 15 had no similarity to database sequences. Phage Shfl2 presented a genome of 165883bp (35.57% GC), with 162-fold coverage, and was found to be highly related to T4-like phages such as RB14, RB32, RB51 and T4 itself. Its genome presents regions more homologous to one or another of these interrelated phages, forming a mosaic of genes attributable to one of these by BlastN analysis (Figure 2B). From the total 265 ORFs found by the Glimmer software, 204 aligned closely to T4 and T4-like phages, 23 were partially similar to the same phages, 14 presented similarity to other enterobacterial phages and 24 showed no similarity to database sequences. Phage Shfl3 presented a genome of 69940bp and, with coverage of 362-fold and GC content of 42.94%. It was found to be 62% similar to phage N4 (Figure 2C). From the 83 ORFs detected by the Glimmer software, 43 were closely aligned with N4 phage, two were partially aligned with N4 phage, three aligned with other phages and 35 had no similarity to database sequences. Shfl3 also presented very low sequence similarity to N4-like phages such as LIT and LUZ7 that were recently described [Ceyssens, 2010] (Figure 4). Phage Shdy1 presented a genome of 45130bp, with coverage of 177-fold and GC content of 54.22%. It was similar to Sodalys phage SO-1 (92%) and Enterobacteria phage SSL-2009a (79%). From the 60 ORFs detected by SABIA, the majority presented similarity to proteins of SO-1 than SSL-2009. However, these phages were not syntenic (Figure 3A). Interestingly, some of the tail proteins of Shdy1 presented higher similarity to proteins of SSL-2009a phage (data not shown), which indicate adaptation of this phage to infect *Shigella* spp. The genome of phage Shdy3 is 39115bp (50.04% GC), with coverage of 682-

fold, and was found to be 21% similar to phage T3, 90% similar to phage EcoSD1 and 88% similar to phage K1F (Figure 3B).

Fig. 2.

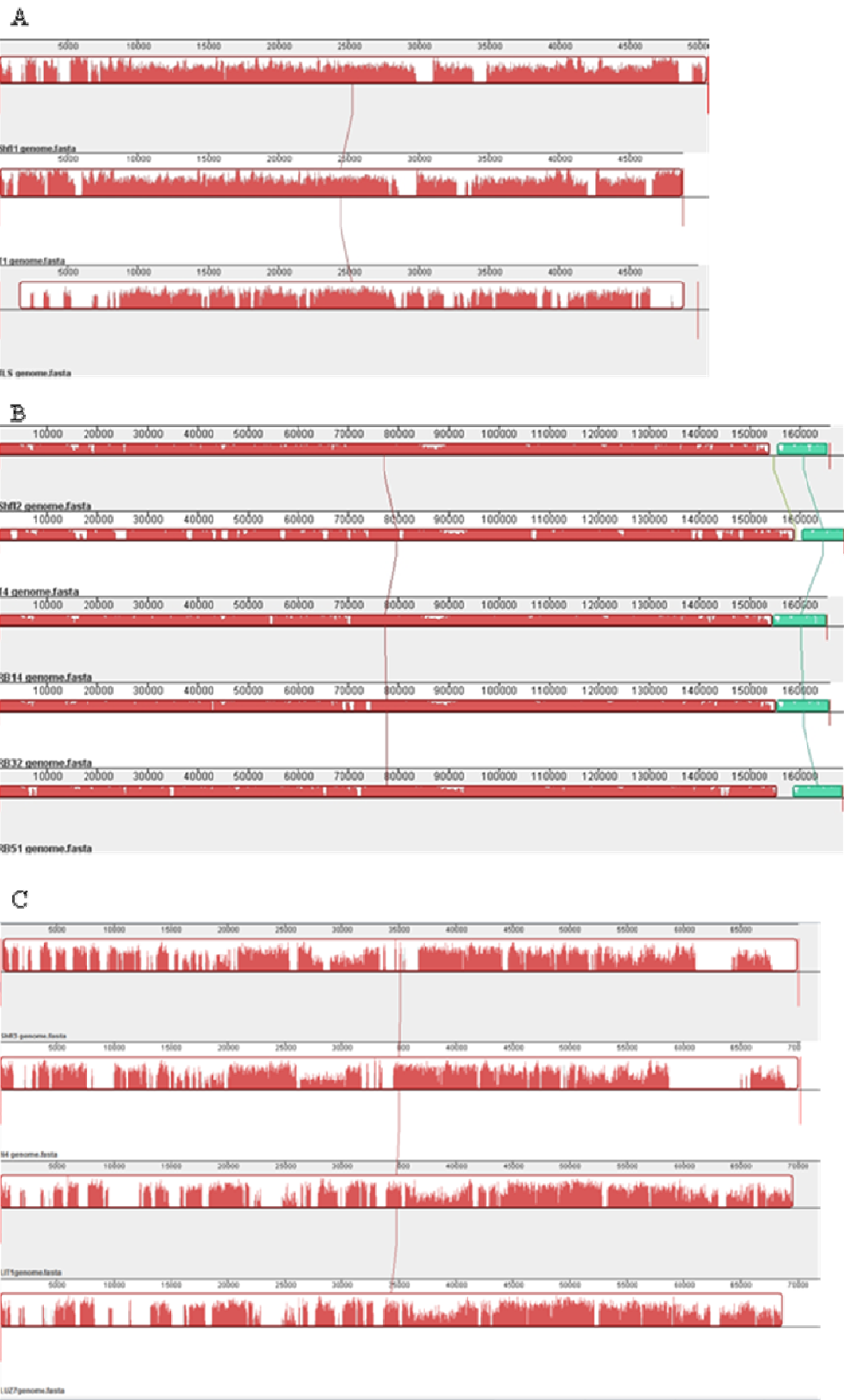


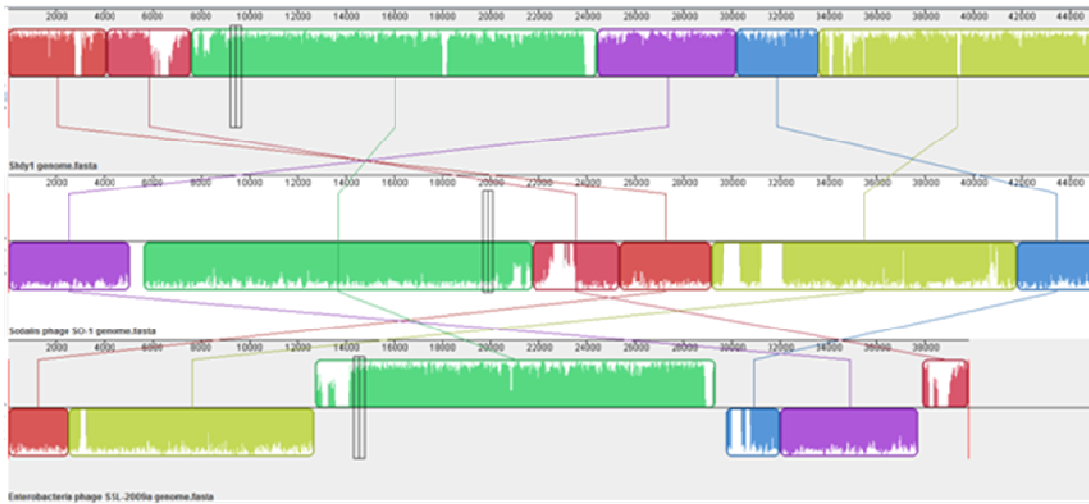
Figure 2 – Alignment of the *Shigella flexneri* phage genomes and close relatives using the Mauve software.

A) Alignment among phages Shfl1, T1 and TLS; reference genome belongs to phage Shfl1. **B)** Alignment between phages Shfl2, RB14, RB32, RB51 and T4; reference genome belongs to phage Shfl2. **C)** Alignment between phages Shfl3, N4 and LIT1; reference genome belongs to phage Shfl3.

With the exception of phage Shdy1, all phages were found to be syntenic to the related phages and no large rearrangements were observed (Figures 2 and 3).

Fig. 3.

A



B

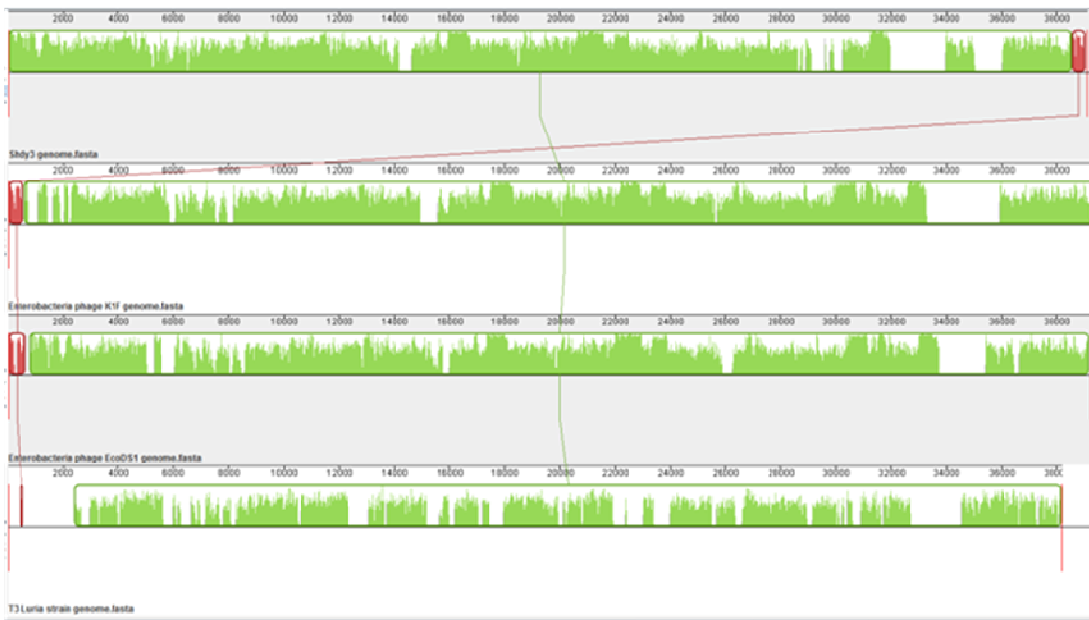


Figure 3 - Alignment of the *Shigella dysenteriae* phage genomes and close relatives using the Mauve software. **A)** Alignment among phages Shdy1, Sodalis phage S-O1 and Enterobacteria phage SSI-2009a; reference genome belongs to phage Shdy1. **B)** Alignment among phages Shdy3, Enterobacteria phage K1F

and Enterobacteria phage EcoDs1; reference genome belongs to phage Shdy3. Note the lack of total synteny among Shdy1, S-O1 and SSI-2009a.

Fig. 4

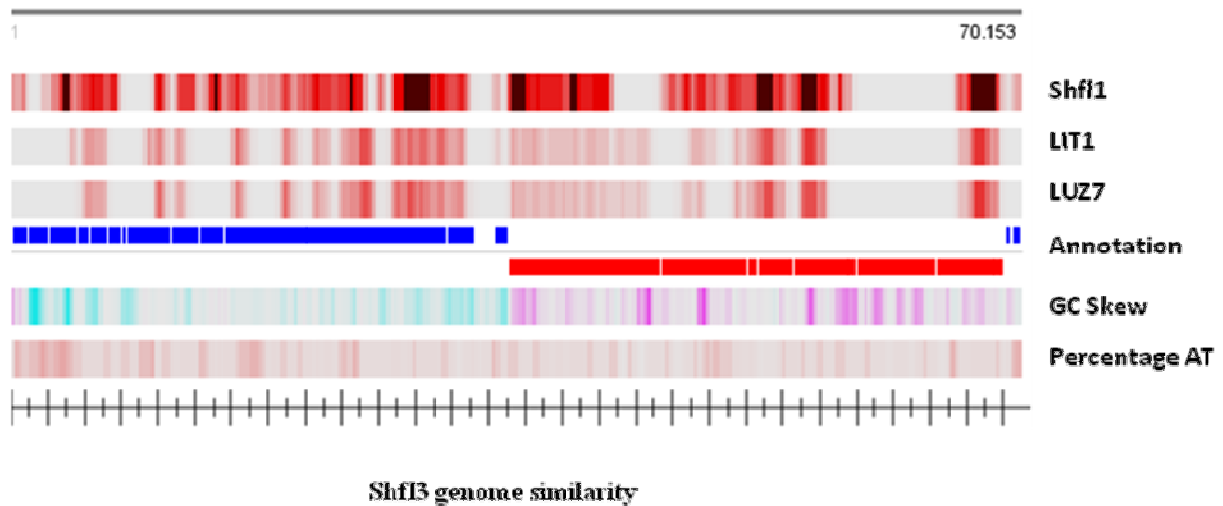


Figure 4 – Overall similarity determined by the BLASTatlas program among phages Shf13, LIT1 and LUZ7 using N4 as reference genome. From up to down: bacteriophage Shf13; bacteriophage LIT1; bacteriophage LUZ7; annotation; GC skew; percent AT. The intensity of the colors indicates high similarity. Note that phage Shf13 is the more similar to N4 than LIT1 and LUZ7.

All phages were further explored about their biological activity on bacterial strains in time-kill experiments (Figure 5). In this experiment, MOI between 0.2 and 0.7 were used (except for Shf13 in 2457T with MOI10). Again, with exception of Shdy1, all the other phages presented lytic activity associated with a pronounced reduction of the bacterial growth along time. In some cases, the growth reduction persists for 24 hours (Figure 5).

Fig. 05

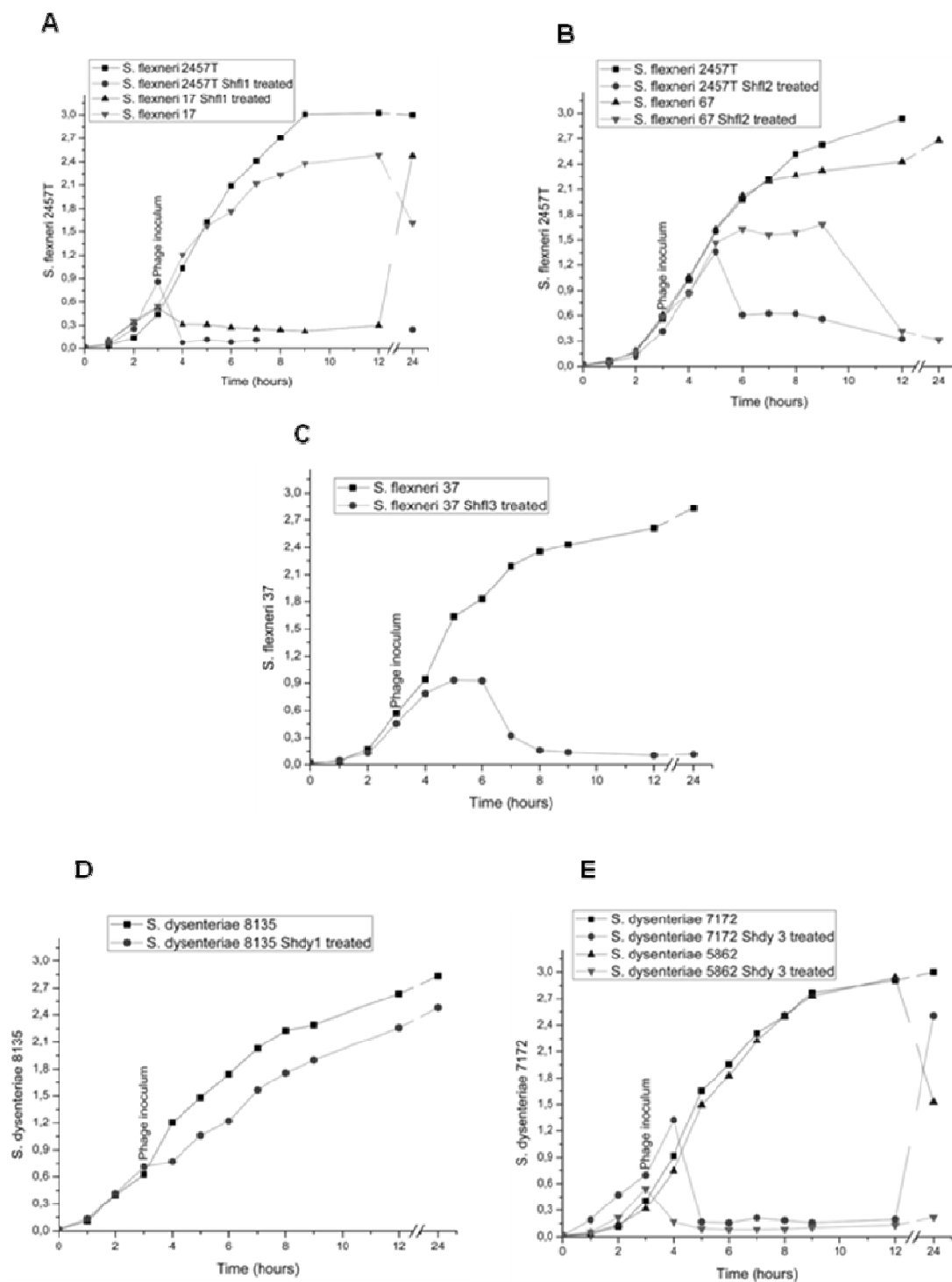


Figure 5 – Time-kill curves caused by lytic activity of phages on different *Shigella spp* strains. A) *S. flexneri* 2457T and 17 time-kill curves after addition of phage Shfl1 (MOI 10 and 0.7, respectively); B) *S. flexneri* 2457T and 67 time-kill curves after addition of phage Shfl2 (MOI 0.3 in both tests); C) *S. flexneri* 37 time-kill curve after addition of phage Shfl3 (MOI 0.3); D) *S. dysenteriae* 8135 time-kill curve after addition of phage Shdy1 (MOI 0.2); E) *S. dysenteriae* 7172 time-kill curve after addition of phage Shdy3 (MOI 0.2). The bacterial growth without phage was used as control. Note that phage Shdy1 inhibit the growth of *S. dysenteriae* 8135 only marginally.

Additionally, we investigate the effect of phage Shfl1 in the HeLa invasion assay. A confluent HeLa cell culture, infected with *S. flexneri*, was treated with phages Shfl1. A reduction in the amount of bacteria was observed in all times, statistically significant in comparison with the control ($p < 0,01$) (Figure 6A and 6C). Intracellular bacteria were counted by direct plating of dilutions of cell lysate and stained cells were also counted through flow cytometry (Figure 6A-C). Direct observation of invasive stained *Shigella* in HeLa cells was also possible through fluorescent microscopy (Figure 6D-L), even though the therapeutic effect was not easily visualized, as discussed in the next section.

Fig. 06

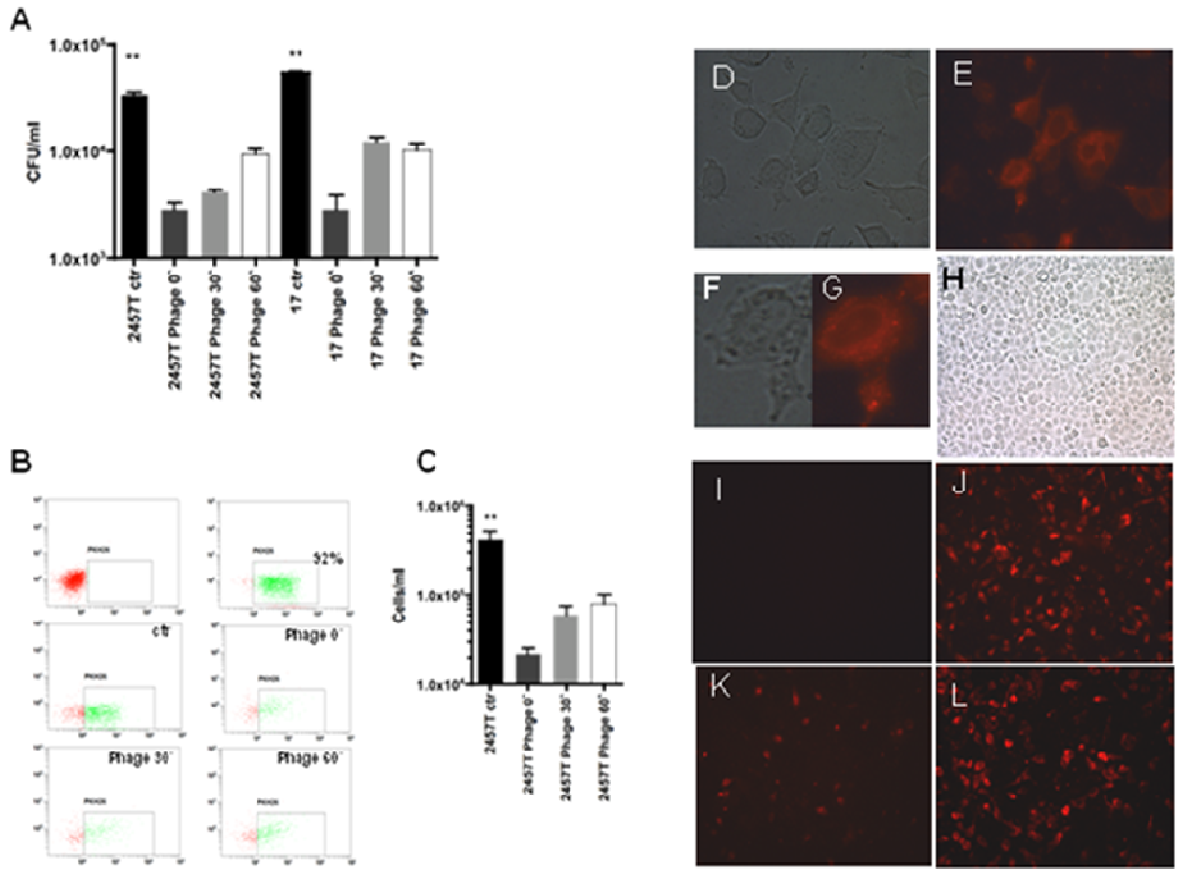


Figure 6 - The *S. flexneri* HeLa invasion assay. **A**) The amount of intracellular bacteria (17 or 2457T in colony forming units, CFU), recovered after phage addition. **B**) PHK-26 labeled *Shigella* and the recovery after lysis: control, T0, T30 and T60 phage treatment. **C**) Quantification of *Shigella* after HeLa lysis based on flow cytometry analysis. Visualization of *Shigella* invasion under light microscopy (**D**) and Fluorescence microscopy (**E**) (40x). Single cell (100x) after invasion of *Shigella* under light microscopy (**F**) and Fluorescence microscopy (**G**). Control HeLa cells without bacterial invasion under light microscopy (20x) (**H**) and Fluorescence microscopy (**I**). HeLa cells after invasion of PHK-26 labeled *Shigella* without phage incubation (**J**) and after phage incubation: T0 (**K**), T30 (**L**).

3.6 DISCUSSION

In this study we have found tailed phages from each of the three families (*Siphoviridae*, *Myoviridae* and *Podoviridae*) in Brazilian sewage. Even though there were differences in host susceptibility, we were able to isolate at least one phage that lyses each of the *Shigella* strains tested. All phages were also successfully selected for stability, now withstanding long periods of time without significant titer alterations, a valuable characteristic for a therapeutic phage. Given the ease in isolating *Shigella* phages from sewage, it seems a feasible and cheap alternative for the control of this important pathogen. Although phage therapy against dysentery was first employed with success in 1926 by Felix D'Herele [reviewed by Summers, 2001], there are few works that systematically characterize these particular phages, especially through molecular approaches such as genome sequencing. Given this, this work contributes with the characterization of lytic phages to *Shigella spp* isolated from sewage.

3.6.1 Phage genomic sequencing

All phages presented variable degree of similarity to other described phages, as depicted in Figures 2 to 4. Regions of reduced or absent similarity (white regions), as observable in Figures 2 and 3 correspond to new ORFs (hypothetical proteins or poorly conserved hypothetical ones) unique to phages here presented. With the exception of the Shdy1, the other four phages are similar to previously described *Escherichia coli* phages reinforcing the overlap between these genera. It seems that few alterations allow such phages to change host, consistent with the homology of their regulation and metabolism. Interestingly, alterations in tail fibers or spikes (phage receptor recognition proteins) were noted in all phages. Sequences for such genes (Shf11 ORF51, Shf12 ORF251-253 and Shf13

ORF80-81) aligned poorly with the most similar phages (Shfl1) or aligned with different phages such as T2 and K3 (Shfl2) or z3032 and c341 (Shfl3), probably explaining alteration in host range. For instance, it is known that phage K3 receptor is *E. coli* OmpA protein, which is highly conserved in *Shigella* as well [Montag,1987], and phage Shfl2 infected *E. coli* ATCC25922 (Table 2). The variability of tail fiber-containing gene regions is such that they represent a break point in the T4-like phage genomes, dividing two different genomic blocks, as depicted in Figure 2B. In addition, tail-fiber recombination is also probably involved in the adaptation of Shdy1 to infect *Shigella spp*, since tail-fiber present higher similarity to Enterobacteria phage SSL-2009a than Sodalís SO-1 isolated from the Enterobacteriaceae *Sodalís glossinidius* (data not shown).

We also found the high identity between Shfl1 and T1 ORFs quite interesting. It was unexpected to us to find such a degree of relatedness between a phage isolated in the last decade in Brazil and a phage from the original set of Delbruck's group isolated in the 40's in the USA. The conservation of ORFs for more than 50 years imply in either similar selective pressures or a considerable functional cohesiveness among this set of genes, resulting in a remarkable evolutive advantage to this virus and allowing it to survive and multiply in different ecological settings for quite a long period of time. In fact, a BlastN analysis indicates TLS as the phage with higher similarity (41%) to T1 in the databank. Another interesting feature observed is that the degree of relatedness between T1 and Shfl1 nucleotide sequence (ca 85%) closely resembles the degree of nucleotide relatedness between their hosts (ca 85%), as observed in other siphoviruses [Brussow, Desiere, 2001]. More studies should evaluate properly these initial observations.

Shfl2 relatedness to T4-like viruses is less remarkable, since it is inferred these viruses are widespread literally all over the world [Filee, 2005; Comeau, 2008]. The major capsid protein of this phage (Shfl2 ORF174) is identical to phage RB14, but most of its genome aligns closely to several phages in the T-even group, including T4, RB14, RB32 and RB51, with distinct portions being identical to distinct phages. All in all, ca 85% of its ORFs (227 of 265) align closely or not so closely with phages in this group, and Shfl2 should therefore be placed within this group.

Bacteriophage N4 was isolated in 1966 using *Escherichia coli* K-12 as template [Shito, 1966]. This phage is atypical since it is not dependent on the host RNA polymerase for transcription of early genes. It contains three different viral RNA polymerase (rRNAP) including a giant one [Lavigne, 2008]. Only recently other phages reported to be related to N4 were isolated from marine bacteria or *Pseudomonas aeruginosa* [Ceyssens, 2010, Zhao, 2009]. They presented a genomic structure that resemble N4 phage but with low sequence similarity. On the other hand, Shfl3 presented three rRNAP, including the giant one supposed to assist the transcription of early genes, and presented genetic similarity to N4 (ca 62%). Accordingly, very low similarity to the other N4-like phages was observed (Figure 2A and 4).

Shdy1 was the only phage described here that was not completely syntenic to related phages in public databases (Sodalis phage SO-1 and Enterobacteria phage SSL-2009a). Interestingly, this phage is the least virulent one analyzed in the time-kill experiments. It is possible to speculate that this phage has recently adapted to infect *Shigella* spp, which could explain the genetic structure modifications observed in its genome.

Shdy3 is similar to T7-like phages K1F [Scholl, 2005] and EcoDS1. Phage K1F is able to infect and replicate on K1 capsulate strains of *Escherichia coli* by expressing an endo-neuraminidase [Scholl, 2005]. No genes homologous to endosialidase were found in phage Shfl3 genome (data not shown).

3.6.2 Biological activity of phages in time-kill curves and in cell culture assay

The time-kill experiments demonstrate the potential of phages Shfl1, Shfl2, Shfl3 and Shdy3 to be employed in the therapy against shigellosis. All these phages promote an expressive reduction in bacterial numbers as quickly as 1 hour after addition to the culture. This reduction persists along time in some cases even after 24 hours of culture. However, we verified that some bacteria restart the growth after this time. The reasons for these results is unclear but must be addressed in the future in order to discard resistance. These experiments were conducted with phage-to-bacteria ratio (MOI) varying between 0.3 to approximately 0.7 (with one exception; Shfl1 was employed at MOI10 against 2457T). We also assayed the effect of higher concentrations of Shfl1 (MOI10) to the culture. In this case, the reduction of bacterial growth was more pronounced than other MOIs (0.3 and 0.7) indicating that an excess of phage can be more effective in the control of bacterial growth (data not shown).

On the other hand, phage Shdy1 was less effective to reduce *Shigella* growth which is a bottleneck for the use of this phage in therapy.

To evaluate the dynamics of phage and *Shigella* host in a somewhat more complex scenario than the simple test tube, we employed a cell culture assay using HeLa cells. The test was originally described to quantify the invasiveness of facultative intracellular pathogens as *Shigella*. Biological effect of phage preparations was clearly observable in all treatments in the HeLa invasion assay, suggesting that the compartmentalization of the environment does not hamper the bactericidal effect of phage Shfl1 or that compartmentalization does not exist in *Shigella*. Even after a 60min delay in the treatment, it was possible to obtain a statistically significant reduction in the amount of bacteria, comparing to control. Based only on this experiment, it is not possible to speculate if the phage is capable of reaching intracellular environment. In fact, the lower number of bacteria detected in the treated samples can represent the lysis of bacteria outside cell, reducing the number of *Shigella* that effectively invade the cells. Indeed, previous results obtained with *Salmonella enterica* concluded that phages are not able to lyse intracellular bacteria [Kim, 2006]. However, we cannot exclude that Shfl1 gains access to the intracellular environment alongside host bacteria, given the non-phagocytic nature of HeLa cells. Still, the complexification represented in this model seems a good yet simple way to observe the bactericidal effect of phages in the midst of a dynamical invasion process, which should represent the disease process given the nature of *Shigella* pathogenesis.

The titers observed in the two distinct count methods presented a variation of circa ten times. The detection of bacteria through flow cytometry was devised after noting the remarkable adherence of Shfl1 phage to the plasticware used in this experiment, as a means

to speed the counting and avoid phage killing (and consequent distortion in the counting) of bacteria after HeLa lysis in the end of the experiment. However, given the similar reduction in treated and control samples, it is possible to discard the interference of this contamination. The difference could perhaps be credited to intrinsic characteristics in the methodology, for instance, the counting on non-viable cells through flow cytometry, which does not distinguish such cells as long as they are stained and preserve roughly their size. Based on our results, we suggest that this methodology can be used in to replace plating methodologies that are more time-consuming, when speed is a matter.

In the fluorescent microscopic observation of stained *Shigella* after invasion of HeLa cells, it was possible to discern differences only between treatment T0 and control but not between treatments T30 or T60 and control. Supposedly, the addition of phages before or during the infection step eliminates the bacteria before the invasion, reducing the amount of visible stained intracellular bacteria. Such effect is not obvious in T30 or T60 treatments; since *Shigella* cells have already invaded, their lysis release PKH-26 inside cells. This stain probably interacts with cell membranes in such cases, which compromises the quality and the specificity of the experiment.

3.7 CONCLUSIONS

This study represents a systematically characterization of *Shigella* phages isolated from sewage, by morphological and molecular approaches. Although the use of phages in shigellosis therapy is not recent, a revision of the literature indicates a lack of a deeply description of these phages. The phages here described were selected for stability, a desirable characteristic for therapeutic purposes, which obviously reduced the number of virus studied in more detail. Stable phages lytic to virtually all *Shigella* strains tested were

isolated from sewage, when all are considered together. Genomic analyses pointed out that the phages present variable degree of similarity to different groups, mainly T1, T4, T7 and N4, and such association was only possible through genome sequencing. The adaptation of the phages to infect new host seems to be determined by few alterations, particularly ones in tail fibers or spikes. The evaluation of *Shigella* phages in time-kill experiments and cell culture assay support the potential use of these phages in therapy. Further studies are necessary to relate the time-kill and cell based assay here described and the real therapeutic effect of such phages in the human host. Still, it should be simple and sufficient to discard phages whose biological activity is incompatible with more complex situations encountered in the course of natural *Shigella* infections, such as phage Shdy1. Altogether, we would like to reinforce the use of phages to control shigellosis, an approach that in modern time has been forgotten in the occidental world but that deserves more attention, particularly considering the bacterial multi-resistant phenotype.

3.8 REFERENCES

Almeida LG, Paixão R, Souza RC, Costa GC, Barrientos FJ, Santos MT, Almeida DF, Vasconcelos AT: A System for Automated Bacterial (genome) Integrated Annotation--SABIA. *Bioinformatics*. 20, 2832-3 (2004).

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-10 (1990).

Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M: GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Research* 29(12), 2607-2618 (2001).

Biswas B, Adhya S, Washart P, *et al.*: Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70(1), 204–210 (2002).

Brüssow H, Desiere F: Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: insights from dairy phages. *Mol. Microbiol.* 39(2), 213-222 (2001).

Capparelli R, Nocerino N, Iannaccone M, *et al.*: Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: a fresh appraisal of bacteriophage therapy. *J. Infect. Dis.* 201(1), 52-61 (2010).

Carlson K: Working with bacteriophages: Common techniques and methodological approaches. In: *Bacteriophages: Biology and Applications*. Kutter E, Sulakvelidze A (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 437-494 (2005).

Ceyssens PJ, Brabban A, Rogge L, Lewis MS, Pickard D, Goulding D, Dougan G, Noben JP, Kropinski A, Kutter E, Lavigne R: Molecular and physiological analysis of three *Pseudomonas aeruginosa* phages belonging to the "N4-like viruses". *Virology*. 405, 26-30 (2010).

Comeau A, Krisch HM: The capsid of the T4 phage superfamily: The evolution, diversity, and structure of some of the most prevalent proteins in the biosphere. *Mol. Biol. Evol.* 25(7), 1321–1332 (2008).

Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT: Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequences with rearrangements. *Genome Res* 14(7), 1394-1409 (2004).

Delcher AL, Harmon D, Kasif S, White O, Salzberg SL: Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Research* 27 (23), 4636-4641 (1999).

Elsinghorst EA: Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol.* 236, 405-420 (1994).

Filée J, Tétart F, Suttle CA, Krisch HM: Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. *PNAS* 102(35), 12471–12476 (2005).

Fuhrman JA: Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399, 541-548 (1999).

Gregoracci GB, Silveira WD, Brocchi M: The biology of bacteriophages. In: *Modern Bacteriophage Biology and Biotechnology*. Wegrzyn G (Ed.), Research Signpost, Kerala, India, 1-36 (2006).

Hallin PF, Binnewies TT, Ussery DW: The genome BLASTatlas-a GeneWiz extension for visualization of whole-genome homology. *Mol Biosyst* 4, 363–371(2008).

Jennison AV, Verma NK: *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(1), 43-58 (2004).

Kim HJ, Kim EY, Hong Y, Rhee JH, Choy HE: Alternative methods to limit extracellular bacterial activity for enumeration of intracellular bacteria. *J. Microbiol. Methods* 64, 17-26 (2006).

Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, *et al.*: Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. World Health Organ.* 77(8), 651-666 (1999).

Lan R, Reeves PR *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *Microbes Infect.* 4(11), 1125-1132 (2002).

Lavigne R, Seto D, Mahadevan P, Ackermann HW, Kropinski AM: Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools. *Res Microbiol.* 159, 406-14 (2008).

Li R, Zhu H, Ruan J, *et al.*: De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Res.* 20, 265-272 (2010).

Montag D, Riede I, Eschbach ML, Degen M, Henning U: Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages. Constant and hypervariable regions and an unusual case of evolution. *J Mol Biol.* 196, 165-74 (1987).

Projan S: Phage-inspired antibiotics? *Nat Biotechnol* 22(2), 167-168 (2004).

Sambrook J, Russel DW: *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3rd ed. (2001).

Schito GC, Rialdi G, Pesce A: Biophysical properties of N4 coliphage. *Biochim Biophys Acta.* 129, 482-90 (1966).

Scholl D, Merrill C: The genome of bacteriophage K1F, a T7-like phage that has acquired the ability to replicate on K1 strains of Escherichia coli. *J Bacteriol.* 187, 8499-503 (2005).

Schoolnik GK, Summers WC, Watson JD: Phage offer a real alternative. *Nat. Biotechnol.* 22(5), 505-506 (2004).

Schroeder GN, Hilbi H: Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(1), 134-56 (2008).

Skurnik M, Strauch E: Phage therapy: facts and fiction. *Int. J. Med. Microbiol.* 296(1), 5-14 (2006).

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr.: Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(3), 649-659 (2001).

Summers WC: Bacteriophage therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 437-451 (2001).*

Zerbino DR, Birney E: Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821-829 (2008).

Zhao Y, Wang K, Jiao N, Chen F: Genome sequences of two novel phages infecting marine roseobacters. *Environ Microbiol.* 11, 2055-64 (2009).

3.9 FINANCIAL DISCLOSURE/ACKNOWLEDGEMENTS

We'd like to thank the Laboratórios de Microscopia Eletrônica, both from the FMRP-USP and also from IB-Unicamp, for the assistance provided with the electron microscopy. This work was supported by grants from the Brazilian Research National Council (Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, process n. 475533/2004-6) and from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process n. 2005/60034-0). GBG was supported by a fellowship from the Brazilian Fellowship Support Agency (MS - Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES) and from the Brazilian Research National Council (PhD - Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq).

4. TERAPIA COM FAGOS CONTRA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *SALMONELLA*: UM FAGO, DOIS MODELOS MURINOS, DOIS RESULTADOS

4.1 Dados Gerais

Title: Phage Therapy against Experimental Infection of *Salmonella*: One Phage, Two Mouse Models, Two Outcomes.

Short running title: Phage Therapy against *Salmonella*

Authors: Gustavo Bueno Gregoracci^{1*}, Marcelo Brocchi¹

Contact information: ¹Depto. de Genética, Evolução e Biopatógenos, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

*Corresponding author. Tel: +55-19-35216271; Fax: +55-19-35216276; E-mail: gustavo_biomed@yahoo.com

Keywords: bacteriophage, therapy, Typhi, Typhimurium,

4.2 Abstract

Background

Salmonella enterica is a rod, Gram-negative bacteria of the *Enterobacteriaceae* family. This species can cause enteric and/or systemic infections in humans representing an important cause of morbidity and mortality worldwide. It comprises over 2500 serotypes, some presenting a rather narrow host range, like Typhi infecting humans, while others are dispersed in nature, like Typhimurium. The treatment of salmonellosis, particularly the systemic infections, is based on the use of antibiotics. However, the number of *S. enterica* isolates resistant to one or more antibiotics is increasing worldwide. Therefore, the exploration of alternative therapies is necessary.

Methodology/Principal findings

Based on this, the aim of this study was to isolate, characterize and evaluate the therapeutic potential of lytic phages to *S. enterica*. Four phages were isolated from sewage and characterized regarding morphological and genomic characteristics, and host specificity. The data suggested that they are variants of the same phage. Two of them (Saen1v2 and Saen1v4) were selected for the *in vivo* tests in mouse models assays. After intraperitoneal inoculation of mice, the phages distributed systemically. Phage Saen1v2 did not protect mouse after infection with *S. enterica* Typhimurium. On the other hand, Saen1v4 exhibited prophylactic and therapeutic property in the acute model of mouse infection with *S. enterica* Typhi strain. Saen1v4 effectively sterilized the organs of treated animals.

Conclusions/Significance

These results suggest that phage therapy of typhoid fever is feasible, which encourages further studies.

4.3 Author summary

Salmonella are bacteria that cause a range of diseases, such as enteritis and typhoid fever, affecting a wide variety of animals, including humans. These diseases are still a health concern in developing countries and the situation will probably get worse with the growing number of antibiotic resistant bacteria around the world. Therefore, alternative treatments are desirable such as therapy using bacteriophages, viruses that infect and kill bacteria. Bacteriophage treatment can be described as the microbial equivalent of biologic control, specific to bacteria and completely harmless to animals.

Animal testing of *Salmonella* is tricky since bacteria that cause a naturally progressing typhoid fever in mice cause enteritis in humans (Typhimurium), while bacteria that cause naturally progressing typhoid fever in humans cause enteritis in mice (Typhi). We managed to test both aspects of the disease using phage variants that killed both. Even though we could not influence the course of a Typhimurium infection, we were able to prevent and, to certain extent, recover mice infected with the Typhi bacteria. Despite the use of low amounts of infecting viruses it was possible to eliminate the disease-causing bacteria from the mouse, showing the feasibility of such approach.

4.4 Introduction

Salmonella enterica is a Gram negative pathogen which inhabits the intestinal tracts of reptiles, birds, mammals, and even insects. This species can cause enteric and/or systemic infections in humans representing an important cause of morbidity and mortality worldwide [1]. It comprises over 2500 serotypes, some presenting a rather narrow host range, like Typhi infecting humans, while others are dispersed in nature [2]. Serotypes from the genus *Salmonella* have a broad host range and clinical manifestations involving a combination of factors from both the host and the bacterial serotype [1,3]. This presents a challenge to the modeling of infection in animals, since each combination of bacteria and host has its own characteristics and peculiarities.

One serotype of particular medical interest is *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi, which infects human and some primates [3-5] causing typhoid fever, and afflicts over 27 million people per year, causing at least 200,000 deaths [6]. It burdens mainly developing countries, especially in South East Asia and India [7], but it also represents an important pathogen to travellers [7-8]. Symptoms of typhoid fever include fever, headache, gastrointestinal symptoms, splenomegaly and leucopenia [8-9]. No animal model represents closely this infection, with the exception perhaps of some primates. Some aspects of the disease, specially its chronic nature and slow development, are simulated in the infection of mice with *S. enterica* Typhimurium [10].

Treatment against typhoid fever includes the utilization of antibiotics such as chloramphenicol, ampicillin and co-trimetrozole, as well as fluorquinolones, but it is dependent of local patterns of resistance [6,9]. Cooke and Wain [7] point to the global establishment of chloramphenicol resistance after 1972, and the growing multi-drug

resistance (involving the three first drugs above) in endemic regions such as South East Asia and India. They also note that, even though resistance data in some endemic regions is sparse, a reduction in fluorquinolone sensitivity (such as ciprofloxacin) is observable (but see also [6]). The evolution of resistance allegedly will complicate treatment, and necessary substitutions of antibiotics in clinical practice will increase the burden in developing economies [1,6]. Therefore, it is important to keep alternatives at hand.

One such approach involves the therapeutic and/or prophylactic use of bacteriophages, as biological control of their hosts. This approach predates the use of antibiotics and its history is well covered in several reviews of interest [11-13]. Tens of articles were published in the last few years about phage therapy, exploiting different animal models of different bacterial infections (as reviewed by [14,15]). Several commercial products are also being developed or tested (as reviewed by [16]). The advantages generally appointed to this practice include specificity, safety, evolvability, different mode of action than antibiotics, allegedly low cost and abundance in the environment [11,14-16]. Specificity can be a disadvantage as well, especially in *S. enterica* Typhi trials, since the disease caused by this bacteria in animal models do not represent properly the disease caused in humans. A non-ideal, but applicable model was developed in the second half of last century, by [17]. Even though acute in mice, it utilizes bacteria infectious to humans, leading the mouse to death in usually less than 24h.

Here, we present an initial step, as the potential of a phage, isolated from raw sewer, as an antibacterial agent against the human pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhi, evaluated in two mouse animal models, with two different outcomes.

4.5 Methods

4.5.1 Ethics statement – This study was carried out in strict accordance with the ethical recommendations from the Brazilian Society of Laboratory Animal Sciences (SBCAL), and guidelines established by the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA) in the Science and Technology Ministry (MCT). The protocol was approved by the Committee of Ethics in Animal Utilization (CEUA) of the Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) (Protocol numbers 1888-1 and 1924-1).

4.5.2 Bacterial strains – The *Salmonella enterica* strains utilized in this work belong to the *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Typhi and Typhimurium. A clinical Typhi strain, belonging to our laboratory collection, designed 710, was utilized as host for isolation and amplification of the phage, while the type strain ATCC 19430 was utilized in the animal infection tests. Strain UK1 of the Typhimurium serotype was utilized both as isolation and amplification host, and in animal tests. The phages were also evaluated regarding the ability to infect strains of other Gram-negative bacterial species such as *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*.

4.5.3 Phage isolation and propagation – Four separated bacteriophages isolates were recovered in our laboratory from raw sewage, by PEG precipitation [18]. Phage propagation involved regular techniques as described in [19]. The phage was plated and amplified from single plaques five times before further characterization and biological activity tests. These steps of amplification were performed for two reasons: i) the isolation

of single phages, since we have observed that some preparations contain more than one type of phage; ii) selection of stable phages.

4.5.4 Phage characterization

4.5.4.1 Morphology - Phage isolates were subjected to transmission electron microscopy (TEM), after ultracentrifugation. A 25% sucrose cushion [20] was utilized and the phage was resuspended in SM buffer [18]. A drop of the partially purified phage was placed in a formvar-coated TEM grid, and after drying the excess liquid, the grid was floated upside down in 2% uranyl acetate (pH 4,5). TEM was performed in a LEO 906 MET (Carl Zeiss).

4.5.4.2 Host range - The host range of the isolates was evaluated against different genera and species from our laboratory collection, by regular plating techniques [19].

4.5.4.3 Nucleic acid analysis - Nucleic acid was extracted with phenol-chloroform, precipitated with ethanol. Digestion with DNase, S1 Nuclease and RNase A/T1 was performed in normal agarose gel to check nucleic acid composition. Estimatives of genomic size were obtained through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) using a protocol adapted from [21]. Briefly, agarose gel blocks containing phage samples were extracted with sarkosyl-EDTA and proteinase K. They were washed with ultra pure water and TE, and kept in a TE solution at 4°C. Electrophoresis conditions were as following: 0.1-10s at 6 V cm⁻¹, 20-22h, for a 1.0-1.2% agarose gel.

4.5.5 Animal models – Female Balb/C UniAn 6-7 weeks old were utilized in all experiments. They were kept in isolator cages and received food and water *ad libitum*.

Strain ATCC19430 or UK1 were grown to exponential phase, washed in sterile saline (NaCl 0,85%), properly diluted and inoculated, intraperitoneally (i.p.) for Typhi and intragastrically (i.g.) for Typhimurium. No adjuvants, complements or special regimens were required. Average lethal dosage was determined empirically and lethal dosages (about 10 times average lethal dosage) were utilized thereafter. Animals were observed up to 15 days for Typhi and 30 days for Typhimurium following inoculation for mortality or clinical signs (reduced mobility, ruffled fur, closed eyes, unawareness of environment; as described by [17]).

4.5.6 Serial passages and Phage therapy – Crude phage preparations were tested for toxicity through i.p. inoculation in mice. Mortality and clinical signs (as described above) were observed up to 30 days. Phages tested against Typhimurium were also subjected to selection for stability in circulation (as described in [22]). Phage titration was checked against both *S. enterica* strains, host and infective in animals, after serial dilution in saline. Several phage concentrations were utilized in the experiments and dilutions were performed in sterile saline (NaCl 0,85%). Both prophylactic (1 and 2 hours prior to challenge) and therapeutic (1 and 2 hours after challenge) treatments were tested. In the Typhimurium model, only 24h prophylactic treatment was tested, through both i.p. and i.g. Blood samples from infected animals (12-14h p.i.) were collected with EDTA, diluted in sterile saline and plated in agar. Liver samples and whole spleen were also collected aseptically (12-14h p.i.), homogenized in sterile saline, diluted and plated in agar. Bacterial colonies present in blood, liver and spleen were enumerated after overnight incubation of the plates at 37°C in an incubator.

4.6 Results

The four phage isolates were successfully characterized in respect to morphology, nucleic acid type and host range. The morphological and molecular characteristics suggested that they were variants of the same phage, and were denominated Saen1 followed by a variant number (v1-4). Figure 1 depicts the morphological characteristics of the phages. All the variants present icosahedric capsids and contractile tails, consistent with the *Myoviridae* family, from the *Caudovirales* order. Nucleic acid type was determined as double stranded DNA, since it was digested by DNase and not by S1 nuclease (which digests only single stranded DNA) (data not shown). The genome of the phages was estimated to be about 180kb in length by PFGE (data not shown). Preliminary sequencing data obtained from variants Saen1v2 and Saen1v4 support filiation to the *Myoviridae* family and close relatedness of such phages to each other (unpublished results). Even though a full contig was not obtained in this first effort for neither of the phages, it is possible to suggest that our phages are related to *Shigella* phage phiSboM-AG3, except for the proteins of the tip of the tail. Both phages presented unusual tail proteins for myoviruses, closely aligned to the ones described as podoviral-like tailspike protein in *Salmonella* phage Det7 [23]. This preliminary data is available on request and efforts are being made to provide a new round of sequencing, hopefully with better enough results to submit to the PubMed database.

Saen1v1 showed wider host range, lysing weakly a *Shigella* strain, besides *Salmonella*. Saen1v1-3 were isolated against *S. enterica* Typhimurium UK1 and lyse predominantly other Typhimurium strains. Saen1v4 was isolated against *S. enterica* Typhi

710, and lysed predominantly other Typhi strains. Some overlap of host range between Typhimurium and Typhi phages was observed from time to time, depending on the preparation, but the general patterns were reproducible (data not shown). Phages Saen1v2 for Typhimurium and Saen1v4 for Typhi were selected for further *in vivo* testing, due to good titers and host range.

Fig 1

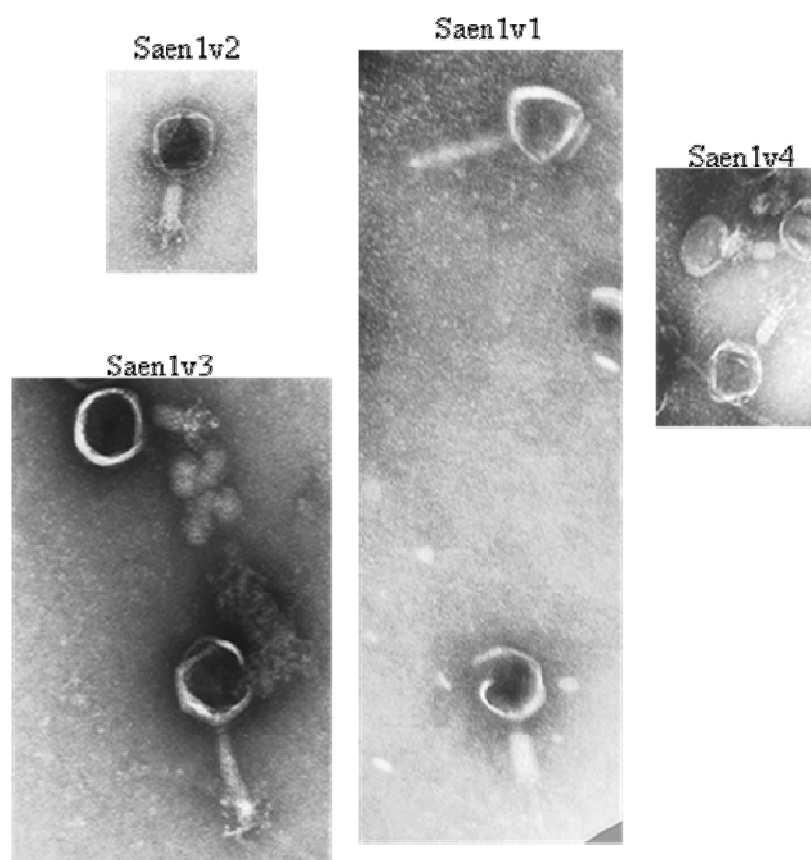


Figure 1. Morphological characteristics of the Saen1 bacteriophages. Digitalized images of TEM negatives. Phages Saen1v1, Saen1v2, Saen1v3, and Saen1v4 (77500x) were negatively stained with uranyl acetate 2% (pH 4,5).

Phage Saen1v2 and Saen1v4 were found to be quite innocuous in mice, even as crude preparations. Intraperitoneal injections of up to 0,5ml of crude phage preparations were found to be non-harmful, with occasional mild fever, as inferred by reduced mobility and slightly ruffled fur for some hours post inoculum (p.i.). These clinical manifestations occurred much more frequently in preparations of phage Saen1v2, since it was routinely grown in a Typhimurium host, more pathogenic to mice. The dynamics of phage distribution in mice after intraperitoneal inoculum was also inferred. In-between one and two hours p.i. the phage is absorbed from the peritoneal cavity into the bloodstream, and is distributed to all internal organs checked (liver, spleen, lungs, kidneys, heart). In about four hours p.i., Saen1v2 and Saen1v4 is within the organs and bloodstream (Figure 2 presents representative data for Saen1v4) and is slowly retained by the mononuclear phagocytic system (MPS; formerly known as reticuloendothelial system) from there on. In about 24 hours p.i., the phage is retained in the spleen and is slowly eliminated with few to none phages recoverable at 48 hours p.i. (Figure 2). For Saen1v2, phages recovered from the spleen after 24h were amplified *in vitro* and re-inoculated in animals, as proposed by [22]. After each serial passage, phage persistence in circulation, implying selection for escape from MPS system, was improved by circa 1 day. After 5 serial passages, phage Saen1v2 persisted in mice circulation and tissues for 5 days and could be recovered from spleen of infected animals after 6 days post-inoculum (p.i.). This isolate was denominated Saen1v2p5 and was utilized in animal tests.

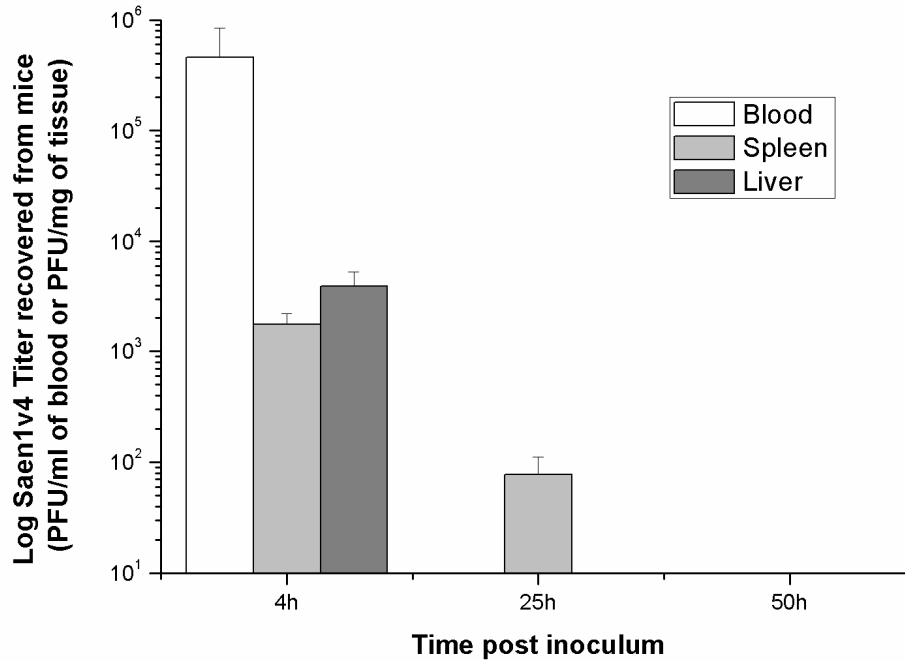


Figure 2. Distribution of Saen1v4 phage in blood, spleen and liver of mice after intraperitoneal inoculation. The values represent the mean of PFU recovered from three mice. The standard deviation of the data is indicated.

In vivo experiments regarding the Typhi model utilized ATCC19430 type strain instead of the clinical isolate 710, due to the higher pathogenicity of the former requiring a reduced inoculum. The average lethal dosage for *S. enterica* serovar Typhi ATCC19430 was determined empirically as circa 10^6 colony forming units (CFU) in the BALB/c UniAn strain after i.p. inoculum. Lethal dosages utilized thereafter were about tenfold larger, and varied within $1.4-5.6 \times 10^7$ CFU in individual experiments. The untreated mice, with one exception, were all dead in less than 24 hours p.i.; none of these survived for more than 48

hours. Figure 3 depicts the sum of several experiments with several phage-to-bacteria ratios (multiplicity of infection or MOI). Very low MOI were initially tested due to reduced efficiency of infection in ATCC19430 in relation to the original phage host, strain 710. Two rounds of culturing in the ATCC19430 host improved hundredfold this efficiency, but it still remained 0,1% of the original strain 710 host (data not shown). A considerable small plaque size was also observed in strain ATCC19430, with no deleterious effect in *in vivo* treatment (as depicted in Figure 3). Therapeutic treatments after 2 hours p.i. were less effective than 1 hour p.i. Prophylactic treatments protected 66% of infected animals with MOI as low as 0,001 and all infected animals with superior MOI (Figure 3). It was possible to observe the sterilization of mice organs and blood after phage Saen1v4 treatment by sacrificing infected animals 12-14h p.i. (Figure 4). Bacterial titers in control groups (infected but untreated) reached high numbers while Saen1v4 treated groups exhibited non-detectable levels of bacteria, either in blood, spleen or liver (Figure 4).

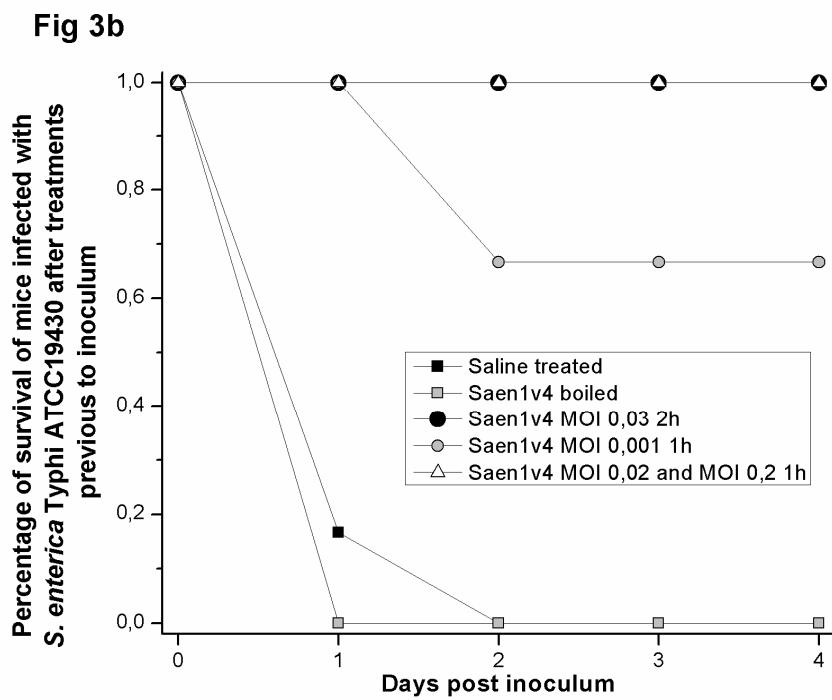
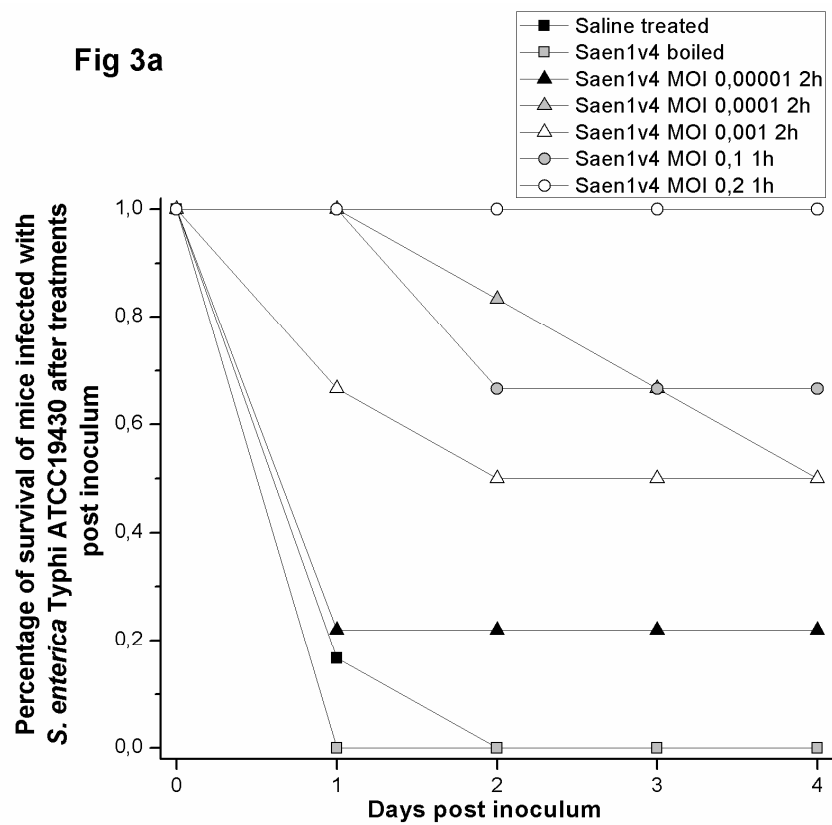


Figure 3. Therapeutic and prophylactic properties of phage Saen1v4 in mice infected with *S. enterica* Typhi ATCC19430. Percentage of survival of mice inoculated intraperitoneally with a lethal dose of *S. enterica* Typhi and treated as specified in the legend. A) Treatment was administered post inoculum, 1 or 2 hours after the bacteria; B) Treatment was administered previously to the inoculum, 1 or 2 hours before the bacteria. At least three mice were used for each treatment. MOI indicates phage to bacterium ratios.

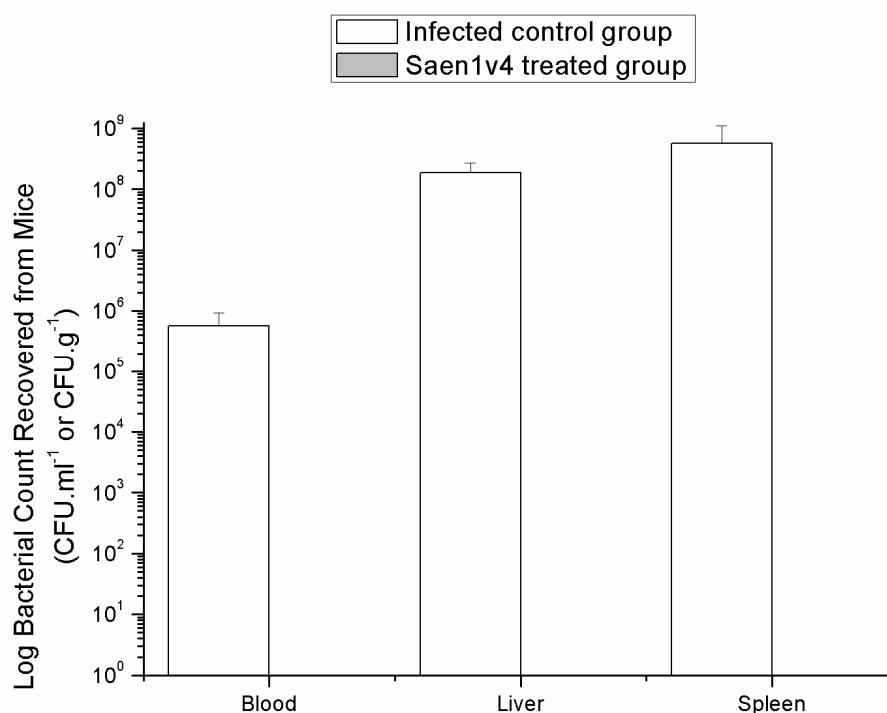


Figure 4. Bacterial counts in blood (CFU.ml⁻¹) or in spleen and liver (CFU.g⁻¹) from *Salmonella* Typhi infected animals, sacrificed 12-14h p.i. Organs were collected aseptically and homogenized in sterile saline. Counts were made after overnight incubation at 37°C.

The average lethal dosage for *S. enterica* serovar Typhimurium UK1 was determined empirically as circa 10³ colony forming units (CFU) in the BALB/c UniAn strain after i.g. inoculum. Lethal dosages utilized thereafter were about ten to hundredfold larger, and varied within 2,84-4,3x10⁴ to 2,84-4,3x10⁵ CFU in individual experiments. The

untreated mice died in about 9 days, as observed from average lethal dosage experiments. Figure 5 depicts two experiments, as representative data for treatments involving phage Saen1v2p5. No influence of phage treatment was noted, regardless of inoculum route (i.p. or i.g.); higher dosages provided similar results.

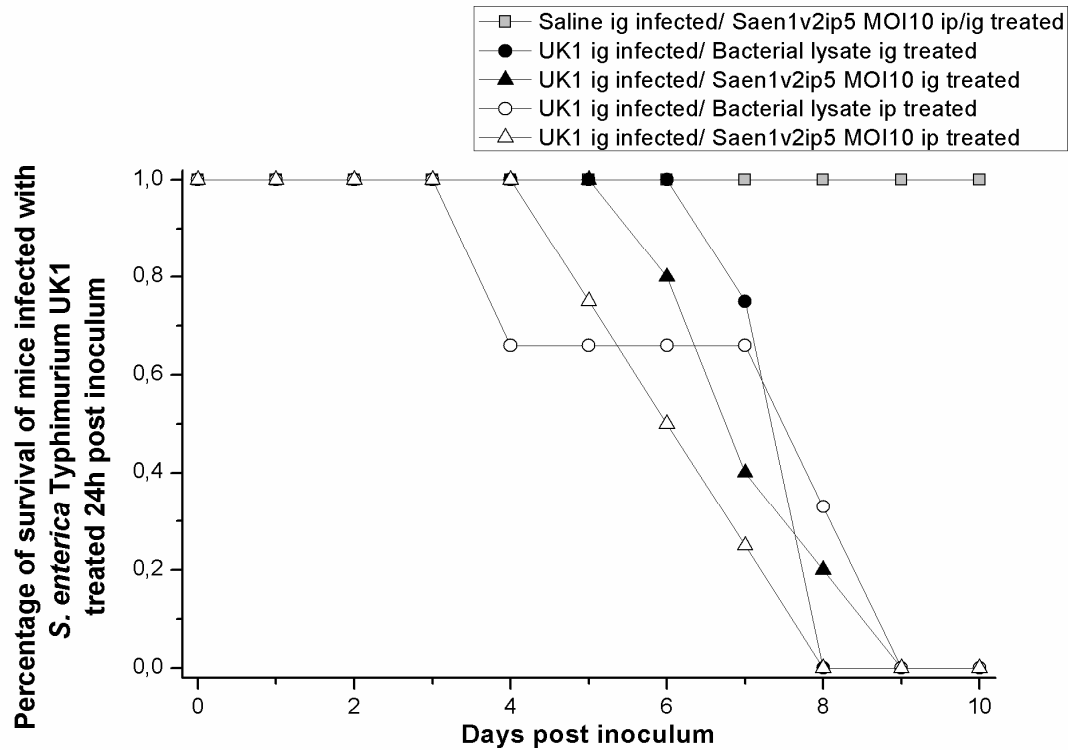


Figure 5. Therapeutic properties of phage Saen1v2 in mice infected with *S. enterica* Typhimurium. Percentage of survival of mice inoculated intragastrically with a lethal dose of *S. enterica* Typhimurium and treated with Saen1v2. Three mice were used for each treatment. The MOI values are indicated.

4.7 Discussion

To our knowledge, this study represents the first comparison of a phage therapy against a pathogen in both acute and slower progressing infectious models. Two variants of phage Saen1 were tested against *Salmonella enterica*, in two different infection models, with different outcomes, as suggested in the literature [10,17]. Additionally, an observable biological effect of phage Saen1v4 in the acute infection model was clear. It is worth mentioning that phage Saen1 was directly isolated from sewers and presents a large genome (results not shown; approximately 180kb), which suggests the possibility of further genetic manipulation, like deletion of morons or genes uninteresting for therapeutic purpose, which could theoretically improve its antimicrobial effect.

Another interesting result was the effect of therapy in non-optimal lytic conditions. Phage variant Saen1v4 was isolated against *S. enterica* serotype Typhi host 710. Initial susceptibility results demonstrated activity against type strain ATCC19430, by drop assay, and biological tests followed. However, during preparation of inocula for animal treatments, smaller plaque morphology was observed, as well as reduced titers, compatible with the suggestion of reduced efficiency of plating of this phage in this host. Still, there was an observable protective/therapeutic effect attributable to the intact virions, since boiling (Figure 3) as well as chloroform-treated bacterial lysate (results not shown) did not prevent deaths of infected mice. After two rounds of culturing using strain ATCC19430 as host, viral titers improved (but plaque morphology remained small) and biological activity also improved, since higher MOIs become more feasible. This suggests that plaque size *in vitro* is not a direct determinant of phage effect *in vivo*, at least in this case.

The utilization of crude phage preparations represents another noteworthy point. It was rather inevitable in this case since data from our lab suggest that the receptor of these phages is the lateral chain of lipopolysaccharide molecules (unpublished results). Our preliminary sequencing data supported such interaction since tail proteins of our phages showed high similarity to the tailspike protein of phage Det7, unmistakably characterized as LPS ligant [23]. This interaction, unforeseen by us, is not generally mentioned in phage therapy literature but amounts to complications in phage purification, interfering with regularly used techniques such as ultracentrifugation in cesium chloride gradient. As mentioned before, except in the case of large amounts of Typhimurium LPS, no side effect to crude preparations was observed. Acute models allow the inconsideration of such contamination since the model resolves itself more quickly than the time necessary for complications to arise [24]. And even in the slower progressing model, deleterious effect (ruffled fur) was only observed in pure preparations, and few to none were acknowledged in diluted inocula.

The lack of an animal model for *S. enterica* Typhi that completely mimic the human infection represents a hindrance for studies requiring the evaluation of biological effects *in vivo* of pathogenic bacteria, like phage therapy or vaccine development. We hoped to avoid such handicap by examining the effect of two variants of the same phage in relation to different aspects of disease in different models. A phage variant specific to Typhi was successfully acquired and its effect *in vivo* in an acute model involving the pathogenic Typhi strain was observable, even in somewhat small virus-to-bacteria ratios, implying the possible applicability of a similar phage in a prophylactic or even a therapeutic context. It should be noted that the reduced multiplicity of infection in this case may suggest an

indirect immunostimulatory effect of the phage or a phage side product, instead of direct lytic action, as hypothesized by [25]. In fact, the phage lysate itself could provide some measure of immune stimulation perhaps alike Staph Phage Lysate [19]. Further studies evaluating the cytokine profile of both phage-treated and several control groups (utilizing different cell lysates) could offer some insight in this case. Even though these possibilities cannot be ruled out by our tests, the control treatments with other lysates (chloroform treated or boiled phages) imply the necessity for biological effect of intact phage virions, which diffuse through the mouse tissues (Figure 2) and culminate in the sterilization of those (Figure 4).

On the other hand, the slower progressing aspect of the disease, evaluated by the Typhimurium infection model, could not be properly treated, even after selection of long-circulating bacteriophages (Figure 5), which should have improved the efficacy of therapy, as demonstrated by [22]. The intracellular nature of this pathogen and the higher adaptation of Typhimurium strains to the murine system are obvious obstacles that could forebode problems to the treatment of systemic *Salmonella* infections in humans.

It is difficult to completely extrapolate the results obtained with the two animal models to humans, since both models present some limitations. However, based on the acute infection model, our results pointed out that phage therapy to treat or prevent typhoid fever is feasible and deserves future analysis. Also, considering the relatively higher length of the Saen1 genome, as suggested above, further genetic engineering approaches, such as the genomic integration in phages of genes toxic to bacteria, could improve the therapeutic

potential of this phage. Ours results also encourage the search for new phage variants with reduced genome size and higher virulence.

In addition, we propose the applicability of the two animal models (acute and slower progressing) of typhoid fever as indicators of therapeutic potential. A good performance of candidate phages in both aspects evaluated in these models seems a strong indicative of effectiveness for further biological tests.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo a pesquisa do estado de São Paulo, process n. 2006/60034-0) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa, process n. 475533/2004-6). The corresponding author was supported by a fellowship from CNPq (process n. 140217/2006-1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

4.8 References

1. Woc-Colburn L, Bobak DA (2009) The expanding spectrum of disease due to *Salmonella*: an international perspective. *Curr Infect Dis Rep*. 11(2):120-4.
2. Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT (2004) Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin Infect Dis* 39(4):546-51.
3. Santos RL, Tsois RM, Bäumler AJ, Adams LG (2003) Pathogenesis of *Salmonella* induced enteritis. *Braz J Med Biol Res* 36 (1):3-12.
4. Holt KE, Parkhill J, Mazzoni CJ, Roumagnac P, Weill FX, Goodhead I, Rance R, Baker S, Maskell DJ, Wain J, Dolecek C, Achtman M, Dougan G (2008) High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. *Nat Genet*. 40(8): 987-93.
5. Baker S, Dougan G (2007) The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin Infect Dis* 45(1): S29-33.
6. Parry CM, Threlfall EJ (2008) Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis* 21(5):531-8.
7. Cooke FJ, Wain J (2004) The emergence of antibiotic resistance in typhoid fever. *Travel Med Infect Dis* 2(2):67-74.
8. Cunha BA (2006) Typhoid fever: the temporal relations of key clinical diagnostic points. *Lancet Infect Dis* 6(6):318-320.
9. Huang DB, Dupont HL (2005) Problem pathogen: extra-intestinal complications of *Salmonella enterica* serotype Typhi infection. *Lancet Infect Dis* 5(6):341-48.
10. Mastroeni P, Maskell D (2006) *Salmonella* infections: Clinical, immunological and molecular aspects. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

11. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr (2001) Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3):649-59.
12. Summers WC (2001) Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol* 55:437-51.
13. Gregoracci GB, Silveira WD, Brocchi M (2006) The biology of bacteriophages. In *Modern bacteriophage biology and biotechnology*. Research Signpost.
14. Hanlon GW (2007) Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* 30(2):118-28.
15. Matthey M, Spencer J (2008) Bacteriophage therapy – coked goose or phoenix rising? *Curr Opin Biotechnol* 19(6):608-12.
16. Housby JN, Mann NH (2009) Phage therapy. *Drug Discov Today* 14(11-12):536-40.
17. Gerichter CB, Boros DL (1962) Dynamics of infection of the blood stream and internal organs of white mice with *Salmonella typhi* by intraperitoneal injection. *J Hyg (Lond)* 60:311-321.
18. Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3rd Edition.
19. Kutter E, Sulakvelidze A (2005) *Bacteriophages: biology and applications*. Boca Raton, FL: CRC Press.
20. Bachrach U, Friedmann A (1971) Practical procedures for the purification of bacterial viruses. *Appl Microbiol* 22(4): 706-715.
21. Brocchi M, Covone MG, Palla E, Galeotti CL (1999) Integration of minitransposons for expression of the *Escherichia coli* *elt* genes at a preferred site in *Salmonella typhimurium* identifies a novel putative fimbrial locus. *Arch Microbiol* 171(2):122-6.
22. Merrill CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S (1996) Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(8):3188-92.

23. Walter M, Fiedler C, Grassl R, Biebl M, Rachel R, Hermo-Parrado XL, Llamas-Saiz AL, Seckler R, Miller S, van Raaij MJ (2008) Structure of the receptor binding protein of bacteriophage Det7: a podoviral tailspike in a myovirus. *J Virol* 82(5):2265-73.
24. Duckworth DH, Gullig PA (2002) Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections. *BioDrugs* 16(1):57-62.
25. Kurzepa A, Dabrowska K, Skaradzinski G, Gorski A (2008) Bacteriophage interactions with phagocytes and their potential significance in experimental therapy. *Clin Exp Med* 9(2):93-100.

5. DISCUSSÃO

A terapia com bacteriófagos representa uma das mais antigas formas de controle de bactérias patogênicas, precedendo, inclusive, o uso de antibióticos (SUMMERS, 2001, 2005; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005). Embora amplamente difundida em sua época e vantajosa em diversos aspectos, acabou preterida em relação a drogas antimicrobianas por diversos motivos previamente apresentados no Capítulo 1. Com o surgimento de linhagens bacterianas refratárias a tratamentos convencionais, ocasionalmente resistentes a múltiplos antibióticos (DERESINSKI, 2009; EL SOLH;ALHAJHUSAIN, 2009), alternativas e/ou complementos terapêuticos são necessários, e a terapia com bacteriófagos torna-se novamente alvo de estudos (SUMMERS, 2001; STONE, 2002; LEVIN;BULL, 2004; FIORENTIN;VIEIRA;BARIONI, 2005; KUTTER;SULAKVELIDZE, 2005; JAGUSZTYN-KRYNICKA;WYSZYNSKA, 2008). Os conhecimentos adquiridos sobre biologia de fagos, durante as décadas de estudos em biologia molecular, estabelecem nova fundação para abordagens inovadoras evitando diversos problemas encontrados nos estudos iniciais (LEVIN;BULL, 2004; SULAKVELIDZE;KUTTER, 2005).

Esta tese sumariza os primeiros resultados neste âmbito obtidos em nosso laboratório, ao longo dos últimos anos. É importante ressaltar o caráter exploratório destes dados, resultado da implantação desta linha de pesquisa durante a realização destes estudos. O isolamento e a caracterização fenotípica dos bacteriófagos pertencentes à coleção do laboratório já havia sido previamente concluído, resultando na dissertação de mestrado que precedeu esta tese (GREGORACCI, 2006). Uma sugestão de efeito terapêutico do fago Shf11 também já haviam sido proposta, com experimentos preliminares em cultura de

células HeLa (GREGORACCI, 2006). Infelizmente, o artigo contendo tais dados não pôde ser publicado por falta de análise de sequências genômicas.

Assim, um dos objetivos da atual tese foi a realização do sequenciamento genômico completo destas amostras. Inicialmente fora proposto através da fragmentação e construção de uma biblioteca contendo o DNA dos fagos com atividade biológica confirmada. A fragilidade dos genomas virais, relativa ao DNA plasmidial, exigiu diversas mudanças de estratégia durante a fragmentação. Os resultados mais promissores foram obtidos com digestão enzimática, completa via *Sau3AI* ou incompleta com *DNAse I*. Posteriormente, surgiu a oportunidade de uma parceria com o Dr. Piotr A. Mieczkowski, permitindo o sequenciamento completo de quase todos os bacteriófagos de nossa coleção, através da plataforma de segunda geração Illumina, com marcação *multiplexing* (PARAMESWARAN Et al., 2007). Os resultados obtidos completam a caracterização básica de nossos fagos, identificando sem dúvida a identidade de cada isolado. As análises dos fagos *Shfl1*, *Shfl2*, *Shfl3*, *Shdy1* e *Shdy3* descritas no terceiro capítulo, bem como a análise parcial dos fagos *Saen1v2* e *Saen1v4*, descritas no quarto capítulo, foram priorizadas sobre as demais. As sequências restantes encontram-se ainda sob avaliação para verificar a possibilidade de uma terceira publicação. De modo geral, todos os fagos de nossa coleção são variantes de fagos já descritos, com maior ou menor homologia de sequência, variando de 55 a 99% de cobertura com identidade alta. Há sugestões na literatura sobre a movimentação recente de fagos entre biomas (BREITBART;MIYAKE;ROHWER, 2004; SHORT;SUTTLE, 2005), e o isolamento de fagos tão relacionados em ambientes geograficamente distintos suporta tal proposta. A organização em mosaico é também bastante nítida e mudanças nas proteínas supostamente responsáveis pelo reconhecimento do hospedeiro são comuns, como descrito

previamente (HENDRIX, 2003; WICHMAN;MILLSTEIN;BULL, 2005; LIMA-MENDEZ Et al., 2008). Um ponto de destaque é a similaridade entre o fago Shf11 e o colifago T1, componente do conjunto original de Delbruck. O fago T1 teve seu genoma sequenciado em 2004, mas foi isolado no início da década de 40 (ROBERTS;MARTIN;KROPINSKI, 2004; SUMMERS, 2005). A homologia de 85% destes genomas, com alta identidade, sugere, ou pressões seletivas similares nos locais de isolamento, ou, mais provavelmente, grande sucesso evolutivo desse conjunto de genes, capaz de adaptar-se localmente a ambientes distintos mantendo considerável coesão.

Em relação ao segundo objetivo da tese, novos problemas foram encontrados. O principal contaminante de lisados de bactérias Gram-negativas são moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) (PETSCH;ANSPACH, 2000; BORATYŃSKI Et al., 2004; MAGALHÃES Et al., 2007), que induzem a produção de uma série de citocinas pró-inflamatórias, estimulando o sistema imune de mamíferos, e em grandes quantidades culminando em choque séptico (BORATYŃSKI Et al., 2004; MAGALHÃES Et al., 2007). A eliminação de LPS de preparações proteicas, no entanto, é um procedimento bastante trabalhoso e sem fórmula padrão definida. É necessário considerar as condições físico-químicas da mistura bem como as propriedades das proteínas contidas em solução a fim de definir a estratégia adequada para separação (MAGALHÃES Et al., 2007). No caso de bacteriófagos contidos em lisados celulares, a técnica clássica empregada é o gradiente isopícnico em cloreto de cério (SAMBROOK;RUSSELL, 2001; BISWAS Et al., 2002; KUTTER;SULAKVELIDZE, 2005; CAPARELLI Et al., 2007 e muitos outros), abordagem inicialmente sugerida para esse projeto, particularmente para os vírus líticos para *Salmonella*, necessários em espaços extraintestinais (WORLEY Et al., 2006). No

entanto, a etapa de purificação não pôde ser completada adequadamente segundo essa metodologia.

Diversas concentrações de gradiente foram testadas em diversas condições de ultracentrifugação, cobrindo toda faixa usual esperada para fagos, mas sem concentração viral, apesar da formação adequada do gradiente. Os testes realizados com o fago Saen1v2, bem como testes realizados com o fago Shf11 apresentaram resultados similares. Alternativas baseadas em diferenças de densidade, como centrifugação diferencial e separação em duas fases (BACHRACH;FRIEDMANN, 1971) foram igualmente mal-sucedidas. A técnica de precipitação ácida (BACHRACH;FRIEDMANN, 1971) eliminou os vírus juntamente com o LPS. A ultracentrifugação em colchão de sacarose foi bem sucedida na redução de contaminantes, visivelmente através de microscopia eletrônica, mas os níveis permaneceram muito acima do idealizado para o projeto, conforme mensurado através do ensaio do lisado de amebócitos de *Limulus*. Sabe-se que moléculas de LPS, anfipáticas, se organizam em micelas de tamanho bastante variável em soluções aquosas, constituindo um gradiente de densidade (PETSCH;ANSPACH, 2000; MAGALHÃES Et al., 2007), de forma compatível com a observada nos experimentos. A única maneira concebida de explicar o espalhamento observado dos fagos no cloreto de cério seria uma possível interação entre estes e moléculas de LPS de seus hospedeiros, permitindo assim a distribuição de um vírus com densidade fixa em um gradiente de densidade. É razoável supor que estas alterações de densidade tenham interferido nas demais técnicas empregadas também. Uma alternativa a separações por afinidade, baseada na afinidade da polimixina por moléculas de LPS foi empregada, através de cromatografia. Contudo, os elevados níveis de LPS dos lisados saturavam a coluna rapidamente, e havia perda de vírus no final

do processo, sugerindo uma ligação fago-LPS relativamente estável. Tais indícios, tomados em conjunto, sugeriram o papel de LPS como receptor para o vírus.

A possibilidade da utilização de moléculas de LPS como receptor para adesão viral foi verificada, para o fago Saen1v2, através da construção de uma *Salmonella* Typhimurium mutante para três enzimas responsáveis pela cadeia lateral de LPS, de modo a evitar a síntese de pouco mais de algumas unidades do polímero de glicano. Essa linhagem foi construída através de mutação sítio-dirigida utilizando o sistema LambdaRed (KARLINSEY, 2007), e após a mutação tornou-se resistente à infecção pelo fago Saen1v2. A análise genômica deste vírus corroborou independentemente essa hipótese, revelando a homologia entre o receptor desse fago e o do fago Det7, claramente caracterizado como ligante de LPS (WALTER Et al., 2008), conforme discutido no capítulo 4. Dessa forma, estratégias mais complexas para separação do LPS seriam necessárias, possivelmente fruto de sugestões mais recentes da literatura (MAGALHÃES Et al., 2007). Na busca de fagos para Gram-negativos é bastante interessante evitar vírus que adsorvam a LPS, para evitar problemas posteriores com purificação, e esta linhagem mutante, em conjunto com a selvagem, podem ser utilizadas como indicadores no caso de *Salmonella* e vírus relacionados.

Contudo, ao contrário das expectativas iniciais, testes de toxicidade não revelaram efeitos adversos da administração de preparações brutas de fagos, permitindo a continuidade dos ensaios biológicos. Algum efeito tóxico foi observado apenas após o inóculo intraperitoneal de grandes quantidades do lisado bruto de fagos contra *Salmonella* Typhimurium, muito acima das doses necessárias para esses testes.

A implementação dos modelos animais também não correspondeu a expectativas iniciais. A proposta do projeto envolvia modelos murinos para *Shigella flexneri* e para *Salmonella enterica* Typhi e Typhimurium (SINGER; SANSONETTI, 2004). No caso do modelo animal de *Shigella*, um inóculo substancial da bactéria por via intrarretal, associada à interleucina-8 recombinante humana, permitiria o desenvolvimento de uma colite compatível com a patologia humana (SINGER; SANSONETTI, 2004). Contudo uma publicação mais recente, posterior à submissão do projeto, revelou que cobaios prescindiriam da interleucina recombinante, respondendo de maneira similar e ainda fornecendo um sinal clínico fácil de acompanhar, uma perda de peso marcante durante a infecção transitória (SHIM Et al., 2007). Embora os autores deste estudo não tenham verificado nenhuma variação de linhagens quanto à patogenicidade, é provável que exista alguma interferência, pois o modelo não foi reprodutível com nossos isolados. Houve perda de peso transitória em todos os animais, mesmo os inoculados com salina, e não foi verificada inflamação no grupo que recebeu inóculo bacteriano, após análise histológica. Após diversas tentativas, testes com animais para *Shigella* foram abandonados. O modelo padrão para *Salmonella enterica* Typhimurium, já adaptado para as condições de nosso laboratório, foi implantado sem problemas. Um modelo alternativo de enterocolite, também envolvendo *Salmonella* Typhimurium e camundongos, após eliminação da microbiota natural com estreptomicina (BARTHEL Et al., 2003), não mostrou sinais de inflamação nas análises histológicas e não apresentou títulos bacterianos nas fezes, sendo, portanto, abandonado também. Por fim, o modelo de infecção sistêmica em camundongos inoculados com *S. enterica* Typhi foi reproduzido com alterações (CHIBBER; BHARDWAJ, 2004). Em ambos os modelos para Typhi e Typhimurium foi verificada uma maior

susceptibilidade da linhagem de camundongos Balb/c AnUni, empregada nestes testes, exigindo consequentemente ajustes nas determinações de dose letal média e nas doses letais utilizadas nos desafios. Além disso, verificou-se desnecessária a adição de mucina gástrica suína para a infecção por *S. enterica* Typhi, considerada importante para o modelo pelos autores (CHIBBER;BHARDWAJ, 2004).

Em relação à demonstração da atividade biológica do fago Shf11 a solução encontrada foi o aprimoramento das análises prévias em culturas de células HeLa. O ensaio consiste na contagem de bactérias invasivas intracelulares, após algum tempo de invasão e um tempo para eliminação de bactérias extracelulares (ELSINGHORST, 1994; MENARD;SANSONETTI, 1994; KIM Et al., 2006). Essa eliminação é efetuada por exposição à gentamicina, antibiótico para com o qual células eucarióticas são pouco permeáveis (ELSINGHORST, 1994; MENARD;SANSONETTI, 1994), embora haja penetração do antibiótico em altas doses (KIM Et al., 2006). Um maior tempo de invasão geralmente é acompanhado por maior título intracelular (ELSINGHORST, 1994). A incubação com o bacteriófago Shf11 reduz, de forma estatisticamente significativa, os títulos bacterianos mesmo após atraso de 60 minutos no tratamento. A contagem de bactérias intracelulares é feita após lise das células HeLa e plaqueamento das bactérias intracelulares (ELSINGHORST, 1994; MENARD;SANSONETTI, 1994). Os testes haviam sido descontinuados anteriormente devido à dúvida quanto a possibilidade de infecção após lise das células eucarióticas, dada a grande adsorção do fago testado ao material plástico envolvido no teste. Uma nova estratégia, permitindo controlar essa fonte de variação foi a contagem bacteriana através de citometria de fluxo, mais rápida, concomitante com a contagem em placas, cujo resultado só é aferido após incubação *overnight*. Uma vez que a

análise em citômetro requer alguma marcação, e a adição de um corante para membranas celulares foi empregada nas bactérias, o material também foi visualizado em microscópio de fluorescência. Além da observação direta da invasão e da redução de bactérias intracelulares após tratamento com fagos, foi possível observar a não interferência de lise mediada por vírus aderidos à placa pós-ruptura das células HeLa, validando independentemente as contagens em placa. O efeito bactericida dos fagos é, portanto, verificado contra *Shigella* neste ensaio, representando um ambiente mais complexo do que o tubo de ensaio, como discutido no capítulo 3. É interessante ressaltar também a pouca exploração de ensaios com células antes de testes biológicos de bacteriófagos, e a diferença observada em nossos testes com *S. flexneri* em contraste com outro estudo da literatura, com *Salmonella* (KIM Et al., 2006). Este último observou aumento de bactérias intracelulares após tratamento com fagos, concluindo pela não interferência de fagos após invasão.

Em relação aos testes com *Salmonella* efeito terapêutico e profilático foi observado apenas contra o sorotipo Typhi e não contra o sorotipo Typhimurium. Mesmo o emprego de fagos com meia-vida de cinco dias em circulação no camundongo não foi suficiente para prevenir a patogênese e óbito por *S. Typhimurium*, independente da quantidade de doses ou atraso do tratamento. Entre as possíveis explicações para essa falha pode-se citar a adaptação da bactéria ao hospedeiro ou a falta de adaptação do fago à bactéria, observada através da lise incompleta de culturas líquidas. Em nosso conhecimento apenas um estudo observou efeito terapêutico de fagos de *Salmonella* Typhimurium em camundongos e, para isso, empregou fagos altamente virulentos. Em retrospecto, a melhor alternativa neste caso

teria sido a busca de novos fagos líticos, mais virulentos, que se encontra atualmente em processo no laboratório.

O sucesso do tratamento com o bacteriófago Saen1v4 foi um tanto inesperado, por outro lado. O modelo representa uma infecção aguda com resolução rápida, culminando na morte do animal em menos de 24 horas, em geral, diferentemente do artigo original (CHIBBER;BHARDWAJ, 2004). O tratamento com um lisado bruto do fago preveniu a letalidade de modo dose dependente, como demonstrado no capítulo 4. Contudo, a amostra empregada na infecção experimental (ATCC19430) diferiu da amostra utilizada para o isolamento do fago (isolado 710). Um consequência dessa diferença foi uma redução na eficiência de plaqueamento do fago neste outro hospedeiro, com redução no diâmetro de placas de lise *in vitro* e dos títulos de vírus infectando esse novo hospedeiro. Ainda assim, mesmo empregando multiplicidades de infecção reduzidas, foi possível resgatar parte dos animais e prevenir a maioria dos óbitos, de modo consistente. A incapacidade de separação deste bacteriófago do LPS contaminante no lisado, conforme discutido previamente, impossibilita descartar efeitos imunoestimulantes de outros componentes do lisado. Contudo, observações da falha na prevenção de óbitos em animais inoculados com lisados bacterianos (efetuados através de lise com clorofórmio), bem como com preparações de fagos fervidas, sugere necessidade de vírions intactos para o efeito protetor.

Sumarizando estes testes biológicos, é possível concluir pela maior dificuldade na demonstração do efeito lítico dos fagos em relação ao isolamento dos mesmos, ao menos em relação à enterobactérias. A estratégia adotada atualmente em nosso laboratório constitui estabelecer o modelo para teste como prioridade, seguido da verificação do efeito

biológico nestes modelos, e por fim a caracterização fenotípica e/ou genotípica dos isolados bem-sucedidos, invertendo completamente o delineamento empregado nestes estudos iniciais, sendo tal sugestão bastante pertinente frente às dificuldades encontradas.

6. CONCLUSÕES

- A caracterização genômica da maioria dos bacteriófagos da coleção foi completada com sucesso, corroborando a caracterização fenotípica prévia;
- Aspectos básicos necessários para a utilização terapêutica dos fagos Shfl1, Saen1v2 e Saen1v4 foram estabelecidos:
 - As etapas de purificação não puderam ser completadas com sucesso, devido à interação dos fagos com LPS do hospedeiro;
 - Não foi verificada toxicidade em camundongos das preparações de fagos utilizadas;
 - Variantes estáveis de todos os fagos foram obtidas;
 - Uma variante do fago Saen1v2, denominada Saen1v2ip5, com maior tempo de circulação *in vivo*, foi obtida com sucesso;
 - Aspectos da biodistribuição e eliminação de fagos Saen1 foram elucidados;
- Um modelo de invasão por *Shigella flexneri* em cultura de células foi estabelecido:
 - O fago Shfl1 foi bem sucedido em reduzir a carga bacteriana neste modelo, mesmo após atraso no tratamento;

- A invasão e redução de bactérias intracelulares foram confirmadas por metodologias independentes;
- Modelos de infecção por *Salmonella* em camundongos foram estabelecidos e os fagos Saen1v2 e Saen1v4 foram testados:
 - Não foi possível proteger ou recuperar camundongos infectados com *Salmonella enterica* Typhimurium, independente de tratamentos atrasados, múltiplos ou com fagos de maior circulação;
 - A variante Saen1v4 protegeu quase completamente, e recuperou boa parte de animais infectados com *S. enterica* Typhi, de modo dose dependente, mesmo utilizando baixas multiplicidades de infecção;

7. REFERÊNCIAS

ACAR, J.F. Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice. *Clinical Infectious Diseases*, v.24 Suppl 1, p.S17-18,1997.

ALANIS, A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, v.36, n.6, p.697-705,2005.

ALLEN, H.K.; DONATO, J.; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, K.A.; DAVIES, J.;
HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, v.8, n.4, p.251-259,2010.

ALMEIDA, A.; CUNHA, A.; GOMES, N.C.; ALVES, E.; COSTA, L.; FAUSTINO, M.A.
Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Marine Drugs*, v.7, n.3, p.268-313,2009.

AMINOV, R.I.; MACKIE, R.I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, v.271, n.2, p.147-161,2007.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology*, v.8, n.6, p.411-420, 2008.

BACHRACH, U.; FRIEDMANN, A. Practical procedures for the purification of bacterial viruses. *Applied Microbiology*, v.22, n.4, p.706-715,1971.

BARROW, P.; LOVELL, M.; BERCHIERI, A., JR. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.5, n.3, p.294-298, 1998.

BARTHEL, M.; HAPFELMEIER, S.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; KREMER, M.;
ROHDE, M.; HOGARDT, M.; PFEFFER, K.; RUSSMANN, H.; HARDT, W.D. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infection and Immunity*, v.71, n.5, p.2839-2858,2003.

BERGHMAN, L.R.; ABI-GHANEM, D.; WAGHELA, S.D.; RICKE, S.C. Antibodies: an alternative for antibiotics? *Poultry Science*, v.84, n.4, p.660-666,2005.

BERGSTROM, C.T.; LO, M.; LIPSITCH, M. Ecological theory suggests that antimicrobial cycling will not reduce antimicrobial resistance in hospitals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v.101, n.36, p.13285-13290, 2004.

BISWAS, B.; ADHYA, S.; WASHART, P.; PAUL, B.; TROSTEL, A.N.; POWELL, B.; CARLTON, R.; MERRIL, C.R. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, v.70, n.1, p.204-210, 2002.

BORATYŃSKI, J.; SYPER D.; WEBER-DABROWSKA, B.; ŁUSIAK-SZELACHOWSKA, M.; POŻNIAK, G.; GÓRSKI, A. Preparation of endotoxin free bacteriophages. *Cellular and Molecular Biology Letters*, v.9, p.253-259,2004.

BRASIER, M.; MCLOUGHLIN, N.; GREEN, O.; WACEY, D. A fresh look at the fossil evidence for early Archaean cellular life. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, v.361, n.1470, p.887-902,2006.

BRATKOVIC, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.67, n.5, p.749-767, 2010.

BREITBART, M.; MIYAKE, J.H.; ROHWER, F. Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*, v.236, p.249-256, 2004.

BREITBART, M.; ROHWER, F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*, v.13, n.6, p.278-284,2005.

BRUTTIN, A.; BRUSSOW, H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.49, n.7, p.2874-2878,2005.

CAPPARELLI, R.; NOCERINO, N.; IANNACCONE, M.; ERCOLINI, D.; PARLATO, M.; CHIARA, M.; IANNELLI, D. Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: a fresh appraisal of bacteriophage therapy. *The Journal of Infectious Disease*, v.201, n.1, p.52-61,2010.

CAPPARELLI, R.; PARLATO, M.; BORRIELLO, G.; SALVATORE, P.; IANNELLI, D. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.51, n.8, p.2765-2773,2007.

CARMODY, L.A.; GILL, J.J.; SUMMER, E.J.; SAJJAN, U.S.; GONZALEZ, C.F.; YOUNG, R.F.; LIPUMA, J.J. Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *The Journal of Infectious Disease*, v.201, n.2, p.264-271,2010.

CASADEVALL, A.; DADACHOVA, E.; PIROFSKI, L.A. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, n.9, p.695-703,2004.

CASADEVALL, A. The third age of antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v.42, n.10, p.1414-1416,2006.

CERVENY, K.E.; DEPAOLA, A.; DUCKWORTH, D.H.; GULIG, P.A. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infection and Immunity*, v.70, n.11, p.6251-6262,2002.

CHAN, D.C.; FONG, D.H.; LEUNG, J.Y.; PATIL, N.G.; LEUNG, G.K. Maggot debridement therapy in chronic wound care. *Hong Kong Medical Journal*, v.13, n.5, p.382-386,2007.

CHIBANI-CHENNOUFI, S.; BRUTTIN, A.; DILLMANN, M.L.; BRUSSOW, H. Phage-host interaction: an ecological perspective. *Journal of Bacteriology*, v.186, n.12, p.3677-3686,2004.

CHIBBER, S.; BHARDWAJ, S.B. Protection in a mouse peritonitis model mediated by iron-regulated outer-membrane protein of *Salmonella typhi* coupled to its Vi antigen. *Journal of Medical Microbiology*, v.53, n.Pt 7, p.705-709,2004.

- CLARDY, J.; FISCHBACH, M.A.; CURRIE, C.R. The natural history of antibiotics. *Current Biology*, v.19, n.11, p.R437-441,2009.
- DABROWSKA, K.; SWITALA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, n.1, p.7-13,2005.
- DANELISHVILI, L.; YOUNG, L.S.; BERMUDEZ, L.E. *In vivo* efficacy of phage therapy for *Mycobacterium avium* infection as delivered by a nonvirulent mycobacterium. *Microbial Drug Resistance*, v.12, n.1, p.1-6,2006.
- DANTAS, G.; SOMMER, M.O.; OLUWASEGUN, R.D.; CHURCH, G.M. Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*, v.320, n.5872, p.100-103,2008.
- DAUBIN, V.; OCHMAN, H. Start-up entities in the origin of new genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, v.14, n.6, p.616-619,2004.
- DEBARBIEUX, L.; LEDUC, D.; MAURA, D.; MORELLO, E.; CRISCUOLO, A.; GROSSI, O.; BALLOY, V.; TOUQUI, L. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *The Journal of Infectious Disease*, v.201, n.7, p.1096-1104,2010.
- DERESINSKI, S. Vancomycin in combination with other antibiotics for the treatment of serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clinical Infectious Diseases*, v.49, p.1072-1079, 2009.
- DYALL, S.D.; BROWN, M.T.; JOHNSON, P.J. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science*, v.304, n.5668, p.253-257, 2004.
- DUBOS, R.; STRAUS, J.H.; PIERCE, C. The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effect against and experimental infection with *Shigella dysenteriae*. *Journal of Experimental Medicine*, v.20, p.161-168, 1943.
- EL SOLH, A.A.; ALHAJHUSAIN, A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.64, p.229-238, 2009.

- ELSINGHORST, E.A. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods in Enzymology*, v.236, p.405-420,1994.
- ESMAEILI, F.; HOSSEINI-NASR, M.; RAD-MALEKSHAHI, M.; SAMADI, N.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine*, v.3, n.2, p.161-167,2007.
- FAJARDO, A.; MARTINEZ-MARTIN, N.; MERCADILLO, M.; GALAN, J.C.; GHYSELS, B.; MATTHIJS, S.; CORNELIS, P.; WIEHLMANN, L.; TUMMLER, B.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J.L. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One*, v.3, n.2, p.e1619,2008.
- FERNANDEZ, L.A. Exploring prokaryotic diversity: there are other molecular worlds. *Molecular Microbiology*, v.55, n.1, p.5-15,2005.
- FINCH, R. Innovation - drugs and diagnostics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.60 Suppl 1, p.i79-82,2007.
- FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.D.; BARIONI, W. Jr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathology*, v.34, n.3, p.258-263, 2005.
- FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, v.325, n.5944, p.1089-1093,2009.
- FOGELMAN, I.; DAVEY, V.; OCHS, H.D.; ELASHOFF, M.; FEINBERG, M.B.; MICAN, J.; SIEGEL, J.P.; SNELLER, M.; LANE, H.C. Evaluation of CD4+ T cell function In vivo in HIV-infected patients as measured by bacteriophage phiX174 immunization. *The Journal of Infectious Diseases*, v.182, n.2, p.435-441,2000.
- FORTERRE, P.; PRANGISHVILI, D. The origin of viruses. *Research in Microbiology*, v.160, n.7, p.466-472,2009.

- FOSTER, W.; RAOULT, A. Early descriptions of antibiosis. *The Journal of the Royal College of General Practitioners*, v.24, n.149, p.889-894,1974.
- FUHRMAN, J.A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, v.399, n.6736, p.541-548,1999.
- GILLESPIE, S.H. Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.17, n.3, p.171-176,2001.
- GORSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.62, n.5, p.511-519,2005.
- GREGORACCI, G.B. *Levantamento de Bacteriófagos Líticos: Isolamento e caracterização de vírus provenientes de esgoto comum com potencial aplicação microbiana*. (2006). 101 f. f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia [Genética e Biologia Molecular]) - Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, 2006.
- HÄUSLER, T. *Viruses vs. Superbugs*. London: Macmillan, 2006.
- HENDRIX, R.W. Bacteriophage genomics. *Current Opinion in Microbiology*, v.6, n.5, p.506-511,2003.
- HOOVER, L.V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, v.22, p.283-307,2002.
- HOUSBY, J.N.; MANN, N.H. Phage therapy. *Drug Discovery Today*, v.14, n.11-12, p.536-540,2009.
- JAGUSZTYN-KRYNICKA, E.K.; WYSZYNSKA, A. The decline of antibiotic era--new approaches for antibacterial drug discovery. *Polish Journal of Microbiology*, v.57, n.2, p.91-98,2008.

- JIKIA, D.; CHKHAIDZE, N.; IMEDASHVILI, E.; MGALOBlishvili, I.; TSITLANADZE, G.; KATSARAVA, R.; GLENN MORRIS, J., JR.; SULAKVELIDZE, A. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. *Clinical and Experimental Dermatology*, v.30, n.1, p.23-26, 2005.
- KARLINSEY, J.E. Lambda-Red genetic engineering in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Methods in Enzymology*, v.421, p.199-209, 2007.
- KAUR, I.P.; KUHAD, A.; GARG, A.; CHOPRA, K. Probiotics: delineation of prophylactic and therapeutic benefits. *Journal of Medicinal Food*, v.12, n.2, p.219-235, 2009.
- KERR, J.R. Antibiotic treatment and susceptibility testing. *Journal of Clinical Pathology*, v.58, n.8, p.786-787, 2005.
- KIM, H.J.; KIM, E.Y.; HONG, Y.; RHEE, J.H.; CHOY, H.E. Alternative methods to limit extracellular bacterial activity for enumeration of intracellular bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v.64, n.1, p.17-26, 2006.
- KIMURA, M.; JIA, Z.-J.; NAKAYAMA, N.; ASAKAWA, S. Ecology of viruses in soils: Past, present and future perspectives. *Soil Science and Plant Nutrition*, v.54, p.1-32, 2008.
- KRAVCHENKO, V.V.; KAUFMANN, G.F.; MATHISON, J.C.; SCOTT, D.A.; KATZ, A.Z.; GRAUER, D.C.; LEHMANN, M.; MEIJLER, M.M.; JANDA, K.D.; ULEVITCH, R.J. Modulation of gene expression via disruption of NF-kappaB signaling by a bacterial small molecule. *Science*, v.321, n.5886, p.259-263, 2008.
- KRISTENSEN, D.M.; MUSHEGIAN, A.R.; DOLJA, V.V.; KOONIN, E.V. New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. *Trends in Microbiology*, v.18, n.1, p.11-19, 2010.

- KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida: CRC Press, 2005.
- LABRIE, S.J.; SAMSON, J.E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, v.8, n.5, p.317-327,2010.
- LEVIN, B.R.; BULL, J.J. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, n.2, p.166-173, 2004.
- LEVY, S.B. Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clinical Infectious Diseases*, v.33 Suppl 3, p.S124-129,2001.
- LIMA-MENDEZ, G.; VAN HELDEN, J.; TOUSSAINT, A.; LEPLAE, R. Reticulate representation of evolutionary and functional relationships between phage genomes. *Molecular Biology and Evolution*, v.25, n.4, p.762-777,2008.
- LINARES, J.F.; GUSTAFSSON, I.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J.L. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v.103, n.51, p.19484-19489,2006.
- LIVERMORE, D.M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases*, v.36, n.Suppl 1, p.S11-23,2003.
- LIVERMORE, D.M. Has the era of untreatable infections arrived? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.64 Suppl 1, p.i29-36,2009.
- MAGALHÃES, P.O.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P.G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T.C.V.; PESSOA, A. Jr. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, v.10, n.3, p.388-404,2007.
- MARTINEZ, J.L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, v.321, n.5887, p.365-367,2008.
- MATHIEU, L.G.; SONEA, S. A powerful bacterial world. *Endeavour*, v.19, n.3, p.112-117,1995.

- MCVAY, C.S.; VELASQUEZ, M.; FRALICK, J.A. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v.51, n.6, p.1934-1938,2007.
- MENARD, R.; SANSONETTI, P.J. *Shigella flexneri*: isolation of noninvasive mutants of gram-negative pathogens. *Methods in Enzymology*, v.236, p.493-509,1994.
- MERRIL, C.R.; BISWAS, B.; CARLTON, R.; JENSEN, N.C.; CREED, G.J.; ZHULO, S.; ADHYA, S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v.93, p.3188-3192, 1996.
- MINOCHA, A. Probiotics for preventive health. *Nutrition in Clinical Practice*, v.24, n.2, p.227-241,2009.
- MINAHK, C.J.; DUPUY, F.; MORERO, R.D. Enhancement of antibiotic activity by sub-lethal concentrations of enterocin CRL35. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.53, n.2, p.240-246,2004.
- MIRA, A.; PUSHKER, R.; RODRIGUEZ-VALERA, F. The Neolithic revolution of bacterial genomes. *Trends in Microbiology*, v.14, n.5, p.200-206,2006.
- MONROE, S.; POLK, R. Antimicrobial use and bacterial resistance. *Current Opinion in Microbiology*, v.3, n.5, p.496-501,2000.
- NESSE, R.M. On the difficulty of defining disease: a Darwinian perspective. *Medicine, Health Care and Philosophy*, v.4, n.1, p.37-46,2001.
- NORMARK, B.H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, v.252, n.2, p.91-106,2002.
- OLAITAN, P.B.; ADELEKE, O.E.; OLA, I.O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, v.7, n.3, p.159-165,2007.
- PACHECO, G. José da Costa Cruz: 1894-1940. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.36, n.1, p.25-31,1941.

- PARAMESWARAN, P.; JALILI, R.; TAO, L.; SHOKRALLA, S.; GHARIZADEH, B.;
RONAGHI, M.; FIRE, A.Z. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils
opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic Acids Research*, v.35, n.19, p.e130-
138,2007.
- PASCHKE, M. Phage display systems and their applications. *Applied Microbiology and
Biotechnology*, v.70, n.1, p.2-11, 2006.
- PATERSON, D.L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American
Journal of Infection Control*, v.34, n.5 Suppl 1, p.S20-28; discussion S64-73,2006.
- PAYNE, D.J. Desperately seeking new antibiotics. *Science*, v.321, p.1644-1645,2008.
- PEARCE-DUVET, J.M. The origin of human pathogens: evaluating the role of agriculture
and domestic animals in the evolution of human disease. *Biological Reviews of the Cambridge
Philosophical Society*, v.81, n.3, p.369-382,2006.
- PERRON, H.; LAZARINI, F.; RUPRECHT, K.; PECHOUX-LONGIN, C.; SEILHEAN,
D.; SAZDOVITCH, V.; CREANGE, A.; BATTAIL-POIROT, N.; SIBAI, G.; SANTORO, L.;
JOLIVET, M.; DARLIX, J.L.; RIECKMANN, P.; ARZBERGER, T.; HAUW, J.J.; LASSMANN,
H. Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in
human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *Journal of
Neurovirology*, v.11, n.1, p.23-33,2005.
- PETSCH, D.; ANSPACH, F.B. Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of
Biotechnology*, v.76, p.97-119, 2000.
- POWERS, J.H. Antimicrobial drug development--the past, the present, and the future.
Clinical Microbiology and Infection, v.10 Suppl 4, p.23-31,2004.
- PRANGISHVILI, D.; FORTERRE, P.; GARRETT, R.A. Viruses of the Archaea: a
unifying view. *Nature Reviews Microbiology*, v.4, n.11, p.837-848,2006.

PRANGISHVILI, D.; GARRETT, R.A.; KOONIN, E.V. Evolutionary genomics of archaeal viruses: unique viral genomes in the third domain of life. *Virus Research*, v.117, n.1, p.52-67,2006.

QIU, J. It's a microbial world. *Nature*, v. 2010, p.1, 2010. Disponível em:<<http://www.nature.com/news/2010/100418/full/news.2010.190.html>>.

RAPPUOLI, R. Bridging the knowledge gaps in vaccine design. *Nature Biotechnology*, v.25, n.12, p.1361-1366,2007.

ROGERS, C.J.; MEE, J.M.; KAUFMANN, G.F.; DICKERSON, T.J.; JANDA, K.D. Toward cocaine esterase therapeutics. *Journal of the American Chemical Society*, v.127, n.28, p.10016-10017,2005.

RUBINSTEIN, A.; MIZRACHI, Y.; BERNSTEIN, L.; SHLIOZBERG, J.; GOLODNER, M.; LIU, G.Q.; OCHS, H.D. Progressive specific immune attrition after primary, secondary and tertiary immunizations with bacteriophage phi X174 in asymptomatic HIV-1 infected patients. *AIDS*, v.14, n.4, p.F55-62,2000.

RUSSELL, A.D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *Journal of Hospital Infection*, v.57, n.2, p.97-104,2004.

ROBERTS, M.D.; MARTIN, N.L.; KROPINSKI, A.M. The genome and proteome of coliphage T1. *Virology*, v.318, p.245-266,2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001.

SAYLOR, C.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibody-based therapies for microbial diseases. *Vaccine*, v.27 Suppl 6, p.G38-46,2009.

SHERMAN, R.A. Maggot therapy takes us back to the future of wound care: new and improved maggot therapy for the 21st century. *Journal of Diabetes Science and Technology*, v.3, n.2, p.336-344,2009.

- SHIM, D.-H.; SUZUKI, T.; CHANG, S.-Y.; PARK, S.-M.; SANSONETTI, P.J.; SASAKAWA, C.; KWEON, M.-N. New Animal Model of Shigellosis in the Guinea Pig: Its Usefulness for Protective Efficacy Studies. *The Journal of Immunology*, v.178, p.2476–2482,2007.
- SHORT, C.M.; SUTTLE, C.A. Nearly identical bacteriophage structural gene sequences are widely distributed in both marine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.1, p.480-486, 2005.
- SIEGEL, R.E. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. *Respiratory Care*, v.53, n.4, p.471-479,2008.
- SINGER, M.; SANSONETTI, P.J. IL-8 Is a Key Chemokine Regulating Neutrophil Recruitment in a New Mouse Model of *Shigella*-Induced Colitis. *The Journal of Immunology*, v.173, p.4197–4206,2004.
- SLOPEK, S.; WEBER-DABROWSKA, B.; DABROWSKI, M.; KUCHARIEWICZ-KRUKOWSKA, A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*, v.35, n.5, p.569-583, 1987.
- SMITH, H.W.; HUGGINS, M.B. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *Journal of General Microbiology*, v.128, n.2, p.307-318,1982.
- SMITH, H.W.; HUGGINS, M.B. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *Journal of General Microbiology*, v.129, n.8, p.2659-2675,1983.
- SMITH, H.W.; HUGGINS, M.B.; SHAW, K.M. Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. *Journal of General Microbiology*, v.133, n.5, p.1127-1135,1987a.

SMITH, H.W.; HUGGINS, M.B.; SHAW, K.M. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *Journal of General Microbiology*, v.133, n.5, p.1111-1126,1987b.

SMITH, A.G.; POWIS, R.A.; PRITCHARD, D.I.; BRITLAND, S.T. Greenbottle (*Lucilia sericata*) larval secretions delivered from a prototype hydrogel wound dressing accelerate the closure of model wounds. *Biotechnology Progress*, v.22, n.6, p.1690-1696,2006.

SORUM, H.; SUNDE, M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*, v.32, n.3-4, p.227-241,2001.

STERN, A.M.; MARKEL, H. The history of vaccines and immunization: familiar patterns, new challenges. *Health Affairs*, v.24, n.3, p.611-621,2005.

STONE, R. Bacteriophage therapy. Stalin's forgotten cure. *Science*, v.298, n.5594, p.728-731, 2002.

STURINO, J.M.; KLAENHAMMER, T.R. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nature Reviews Microbiology*, v.4, n.5, p.395-404,2006.

SULAKVELIDZE, A.; BARROW, P. Phage Therapy in Animals and Agribusiness. In: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. (Ed.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida: CRC Press, 2005. p. 335-380.

SULAKVELIDZE, A.; KUTTER, E. Bacteriophage Therapy in Humans. In: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. (Ed.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida: CRC Press, 2005. p. 381-436.

SUMMERS, W.C. Bacteriophage Research: Early History. In: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. (Ed.). *Bacteriophages: Biology and Applications*. Florida: CRC Press, 2005. p. 5-28.

SUMMERS, W.C. Bacteriophage therapy. *Annual Reviews in Microbiology*, v.55, p.437-451,2001.

TORRES, M.L.M. *Efeito de quatro antibióticos sobre larvas de Chrysoma putoria (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) utilizadas em bioterapia.* (2005). 93f. f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, 2005.

ULVESTAD, E. Cooperation and conflict in host-microbe relations. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, v.117, n.5-6, p.311-322,2009.

VAN HELVOORT, T. Bacteriological and physiological research styles in the early controversy on the nature of the bacteriophage phenomenon. *Medical History*, v.36, n.3, p.243-270,1992.

VIVEIROS, M.; AMARAL, L. Enhancement of antibiotic activity against poly-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* by phenothiazines. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.17, n.3, p.225-228,2001.

WALTER, M.; FIEDLER, C.; GRASSL, R.; BIEBL, M.; RACHEL, R.; HERMOPARRADO, X.L.; LLAMAS-SAIZ, A.L.; SECKLER, R.; MILLER, S.; VAN RAAIJ, M.J. Structure of the receptor-binding protein of bacteriophage det7: a podoviral tail spike in a myovirus. *Journal of Virology*, v.82, n.5, p.2265-2273,2008.

WANG, J.; HU, B.; XU, M.; YAN, Q.; LIU, S.; ZHU, X.; SUN, Z.; REED, E.; DING, L.; GONG, J.; LI, Q.Q.; HU, J. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Medicine*, v.17, n.2, p.309-317,2006.

WEINBAUER, M.G. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, v.28, n.2, p.127-181,2004.

WEINBERGER, B.; HERNDLER-BRANDSTETTER, D.; SCHWANNINGER, A.; WEISKOPF, D.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. *Clinical Infectious Diseases*, v.46, n.7, p.1078-1084,2008.

- WEST, N.P.; PYNE, D.B.; PEAKE, J.M.; CRIPPS, A.W. Probiotics, immunity and exercise: a review. *Exercise Immunology Review*, v.15, p.107-126,2009.
- WICHMAN, H.A.; MILLSTEIN, J.; BULL, J.J. Adaptive molecular evolution for 13,000 phage generations: a possible arms race. *Genetics*, v.170, n.1, p.19-31,2005.
- WOHLGEMUTH, S.; LOH, G.; BLAUT, M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *International Journal of Medical Microbiology*, v.300, n.1, p.3-10,2010.
- WOMMACK, K.E.; COLWELL, R.R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.1, p.69-114,2000.
- WOOD, B.; RICHMOND, B.G. Human evolution: taxonomy and paleobiology. *Journal of Anatomy*, v.197 n.1, p.19-60, 2000.
- WORLEY, M.J.; NIEMAN, G.S.; GEDDES, K.; HEFFRON, F. *Salmonella* typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v.103, n.47, p.17915-17920,2006.
- YIM, G.; DE LA CRUZ, F.; SPIEGELMAN, G.B.; DAVIES, J. Transcription modulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promoters by sub-MIC levels of rifampin. *Journal of Bacteriology*, v.188, n.22, p.7988-7991,2006.
- YIM, G.; WANG, H.H.; DAVIES, J. Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, v.362, n.1483, p.1195-1200,2007.
- ZIMECKI, M.; ARTYM, J.; KOCIEBA, M.; WEBER-DABROWSKA, B.; BORYSOWSKI, J.; GORSKI, A. Effects of prophylactic administration of bacteriophages to immunosuppressed mice infected with *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, v.9, p.169,2009.

ZIMECKI, M.; ARTYM, J.; KOCIEBA, M.; WEBER-DABROWSKA, B.;

BORYSOWSKI, J.; GORSKI, A. Prophylactic effect of bacteriophages on mice subjected to chemotherapy-induced immunosuppression and bone marrow transplant upon infection with *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*, v.199, n.2, p.71-79,2010.

8. ANEXO 1 – Datos preliminares sobre fago Encl1

Tentative title: Phenotypic characterization and genomic analysis of the *Enterobacter cloacae* bacteriophage Encl1

Introduction

Enterobacter cloacae is a Gram-negative bacterium, member of the *Enterobacteriaceae* family (SANDERS; SANDERS, 1997; EUZÉBY, 1997). Even though the first isolate has been identified in 1890, the taxonomy of this genus is still under study, and additions, removals and reassignments are quite common in the literature (EUZÉBY, 1997; HOFFMANN; ROGGENKAMP, 2003; HOFFMANN et al., 2005). In fact, only recently the genomic and environmental diversity of *Enterobacter cloacae* has been properly explored, and members of this species are found as plant and insects pathogens, as well as distributed in terrestrial and aquatic environments (HOFFMANN; ROGGENKAMP, 2003, and further references). Part of this lack of interest results from the fact that this bacterium is clearly defined as an opportunistic pathogen, and little was known about its virulence factors besides the enterotoxin, common to Gram-negative pathogens (HOFFMANN; ROGGENKAMP, 2003). More recently some virulence factors, such as siderophores and yersiniabactin, were identified in a High Pathogenicity Island, widely present in outbreak strains of the *Enterobacter cloacae* complex (PAAUW et al., 2009; PAAUW et al., 2010).

Besides these, it is commonly accepted that the main virulence factor for these opportunists are resistance related genes (HOFFMANN; ROGGENKAMP, 2003). Sanders and Sanders (1997) stand out the greater resistance of this bacterium to disinfectants and antimicrobials. They also point to the fact that *Enterobacter* were never found in nosocomial bacteria surveys in the pre-antibiotic era (SANDERS; SANDERS, 1997; PAAUW et al., 2009). Their prevalence, though, is increasing in recent times, when antibiotic use is widespread. In recent surveys, *Enterobacter* always figure among the *Enterobacteriaceae* bacteria more commonly isolated in nosocomial infections (SANDERS; SANDERS, 1997; PAAUW et al., 2009; KIRATISIN;HENPRASERT, 2010), especially from intensive care units (SANDERS;SANDERS, 1997; MANZUR et al., 2007) and patients with previous exposure to antibiotic treatment (SANDERS;SANDERS, 1997). They are known to contain several types of β -lactamases, both chromosomal and frequently plasmid encoded (SANDERS; SANDERS, 1997; MANZUR et al., 2007; KIRATISIN;HENPRASERT, 2010). Moreover they were identified as containing metallo- β -lactamases (MBL), a matter of concern to those involved in the clinics, including the so called “hidden” MBLs, whose genes are present but not expressed normally (FALCONE et al.,2009). Falcone et al. (2009) also correlate the presence of MBLs with poorer clinical outcomes of the patients, resulting in prolonged antibiotic therapy course and more likeliness of failure. The detection of three *Enterobacteriaceae* isolates in the USA, including one *Enterobacter cloacae*, carrying the New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1), raised alarm very recently (CDC, 2010). These strains, increasingly common in UK, come from Southeast Asia and are resistant to all β -lactam agents, except aztreonam (but these three strains were also resistant to it, by an alleged independent mechanism) (CDC,

2010). Given the mobilization of lateral transfer agents such as plasmids and genomic islands (KIRATISIN;HENPRASERT, 2010; PAAUW et al., 2010) and the ubiquity and adaptive potential of *Enterobacter* strains (SANDERS;SANDERS, 1997; PAAUW et al., 2010) it is foreseeable that the situation will tend to deteriorate in the near future.

During a survey of phages isolated from sewage and lytic to *Enterobacteriaceae* species, a T4-like phage specific to *Enterobacter cloacae* was isolated and characterized by phenotypic and molecular approach. This phage, denominated Enc11, presented sequence similarity below 60% to T4-like phages such as JS10 (56%), JS98 (55%), RB69 (50%), T4 (43%) (ZUBER et al., 2007; MILLER et al., 2003; DESPLASTS;KRISCH, 2003; TÉTART et al., 2001). The basic properties of Enc11 are here described.

Material and Methods

Bacterial samples

The bacterial strains used in this study (Table 1) belong to the laboratory collection and consisted of clinical isolates and/or type strains of *Enterobacter cloacae*, *Shigella spp*, *Salmonella enterica*, and *Yersinia enterocolitica*. Other *Enterobacteriaceae* species besides *Enterobacter spp* were used to test the specificity of the phages. All strains were tested in selective media (McConkey agar). They were routinely grown in LB culture medium incubated at 37°C, and permanent stocks were stored at -80°C in 20% glycerol.

Phage isolation

Raw sewage samples (500-1000ml) were collected from the Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto (DAERP, São Paulo State, Brazil), the local water and sewage treatment facility. The sewage sample received NaCl to the final concentration of 1M and was centrifuged (10000g) to remove impurities. The supernatant received Polyethylene Glycol 8000 to a final concentration of 10%. After overnight decantation at 4°C, the material was subjected to centrifugation at 11000g for 20 minutes. The pellet was re-suspended in SM buffer (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) and extracted with an equal volume of chloroform. The viral concentrate was stored in 4°C protected from light.

Phages were isolated through the agar overlay method (CARLSON, 2005). Single lysis plaques were collected with sterile picks, and added to an exponential growing bacterial culture following incubation overnight at the appropriated temperature. This procedure was repeated at least three times to ensure the isolation of a single viral type.

Phage phenotypic characterization

Host range of the isolate was determined by spotting pure viral preparations in lawns of target bacteria, according to Carlson (2005). Each phage was tested against all other hosts other than the isolation one, with occasional repetitions.

Viral morphology was determined through transmission electron microscopy. Prior to analysis the samples were purified through ultracentrifugation (100,000g) in a sucrose cushion (25-27.5%). The samples were negatively stained with uranyl acetate 2% (pH 4.5) and observed in a LEO 906 MET (Carl Zeiss).

DNA extractions were performed according to Sambrook and Russel (2001). Digestion with DNase and S1 Nuclease allowed the confirmation of dsDNA. Estimatives of genomic size were obtained through pulsed field gel electrophoresis after extraction with Sarcosyl-EDTA and proteinase K. Agarose blocks were washed with ultra pure water and TE, and kept in a TE solution at 4°C. Electrophoresis conditions were as following: 0.1-10s at 6 V cm^{-1} , 20-22h, for a 1.0-1.2% agarose gel.

Phage genomic sequencing

Phage lysates were digested with DNase to eliminate contaminating bacterial DNA. Phenol-chloroform extraction followed and the product of the extraction was passed through a purification column (Illustra PlasmidPrep Minispin Kit[®], GE Healthcare).

The sequencing of the phage genomes was performed in the Illumina GenomeAnalyzer IIX System by 76 bp Paired-Ends protocol with insert size of ca 400 bp (Illumina Inc., USA) in the High Throughput Sequencing Facility of the University of North Carolina at Chapel Hill. Each purified genomic DNA sample was fragmented, size selected and unique identifier tags were added (sample multiplexing) during DNA library preparation according to original Illumina protocol. DNA libraries were sequenced in single lane of the Illumina Paired-Ends flowcell.

Before the assembly process, the SOAPdenovo (LI, et al., 2010) short-read correction tool was used to correct the Illumina GA reads. Besides the correction of nucleotides, it also trims 5' and 3' ends with poor quality or, ultimately, discards the entire low quality sequence. It generates a paired file or a single file for sequences where the other mate-pair was discarded. The single file was discarded and the paired sequences were

assembled with Velvet assembler (version 0.7.57) (ZERBINO;BIRNEY, 2008); the best parameters for each genome assembly were calculated by the VelvetOptimizer module. The GapCloser module from SOAPdenovo was used to close the gaps emerging during the scaffolding process by Velvet, since it uses the abundant pair relationships of short reads to close the gaps in the scaffold.

The gene prediction was performed by Glimmer and GenemarkS using the appropriate genetic code (DELCHER et al., 1999; BESEMER;LOMSADZE;BORODOVSKY, 2001). There was a general agreement between both programs, so ORFs found in Glimmer were used for annotation. Sequences were annotated manually using translated peptides through BlastX and compared to close relatives through BlastN (ALTSCHUL et al., 1990). They were subsequently aligned with closed relatives using the Mauve software (DARLING et al., 2004).

Phage Enc11 was deposited in the Pubmed database under the accession numbers XXXX.

Results

Besides phages described elsewhere, one phage lytic against *Enterobacter cloacae* clinical isolates was isolated. It was named Enc11, and will be referred as such from now on. It presents morphology compatible with the *Caudovirales* order of tailed phages (Fig 1A). Two different tail lengths were observable (Fig1B), suggesting the classification of this virus in the *Myoviridae* family. The digestion of Enc11 genome by DNase, but not S1

nuclease, which digests only single-stranded DNA, implied in double-stranded DNA as genetic material (data not shown).

Phage Enc11 lysed equally well both clinical *Enterobacter cloacae* isolates (Table 1), as well as ATCC35030 and CDC3437. It lysed weakly *E. cloacae* 3443 and *E. aerogenes* ATCC13048. No other *Enterobacter* strains tested (Table 1) resulted in lysis, even weak one. No other *Enterobacteriaceae* tested were susceptible to Enc11, suggesting high specificity to host genus.

Enc11 genome was predicted to be circa 175kb through PFGE analysis (data not shown). After sequencing, with coverage of 91.76 times, it was revealed to have 174919bp of non-repetitive DNA. BlastN analyses revealed similarity to phages JS10 (56%), JS98 (55%) and RB69 (50%) and the Glimmer software identified 294 ORFs. One hundred and twenty seven (43.2%) ORFs were highly similar to such phages, while 10 ORFs (3.4%) were partially similar to the same phages. Twenty three ORFs (7.82%) were similar to other enterobacteria phages and 134 (45.58%) were completely unknown, resulting therefore in hypothetical proteins. The overall similarity among Enc11 and some of the T4-like phages are described in Figure 2. These phage are also syntenic. Figure 3 exhibits the comparison of Enc11 with JS98 and T4.

References

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v.215, n.3, p.403-410,1990.

- BESEMER, J.; LOMSADZE, A.; BORODOVSKY, M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Research*, v.29, n.12, p.2607-2618,2001.
- CARLSON, K. Working with bacteriophages: Common techniques and methodological approaches. In: *Bacteriophages: Biology and Applications*. KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 437-494, 2005.
- CDC. Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo-beta-lactamase - United States, 2010. *The Morbidity and Mortality of Weekly Report*, v.59, n.24, p.750,2010.
- DARLING, A.C.; MAU, B.; BLATTNER, F.R.; PERNA, N.T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, v.14, n.7, p.1394-1403,2004.
- DELCHER, A.L.; HARMON, D.; KASIF, S.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L. Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Research*, v.27, n.23, p.4636-4641,1999.
- EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, n.47, p.590-592. (<http://www.bacterio.net>).1997.
- FALCONE, M.; MEZZATESTA, M.L.; PERILLI, M.; FORCELLA, C.; GIORDANO, A.; CAFISO, V.; AMICOSANTE, G.; STEFANI, S.; VENDITTI, M. Infections with VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. *Journal of Clinical Microbiology*, v.47, n.11, p.3514-3519,2009.
- HOFFMANN, H.; ROGGENKAMP, A. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. *Applied Environonmental Microbiology*, v.69, n.9, p.5306-5318,2003.
- HOFFMANN, H.; STINDL, S.; LUDWIG, W.; STUMPF, A.; MEHLEN, A.; HEESEMANN, J.; MONGET, D.; SCHLEIFER, K.H.; ROGGENKAMP, A. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and

- emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. *Systematic and Applied Microbiology*, v.28, n.3, p.196-205,2005.
- KIRATISIN, P.; HENPRASERT, A. Genotypic analysis of plasmid-mediated beta-lactamases amongst *Enterobacteriaceae* other than *Escherichia* spp. and *Klebsiella* spp. that are non-susceptible to a broad-spectrum cephalosporin. *International Journal of Antimicrobial Agents*,2010.
- LI, R.; ZHU, H.; RUAN, J.; QIAN, W.; FANG, X.; SHI, Z.; LI, Y.; LI, S.; SHAN, G.; KRISTIANSEN, K.; YANG, H.; WANG, J. *De novo* assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Research*, v.20, n.2, p.265-272,2010.
- MANZUR, A.; TUBAU, F.; PUJOL, M.; CALATAYUD, L.; DOMINGUEZ, M.A.; PENA, C.; SORA, M.; GUDIOL, F.; ARIZA, J. Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase- producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.8, p.2365-2369,2007.
- PAAUW, A.; CASPERS, M.P.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A.; SCHUREN, F.H.; MONTIJN, R.C.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. *Microbiology*, v.155, n.Pt 5, p.1478-1488,2009.
- PAAUW, A.; LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A.; VERHOEF, J.; FLUIT, A.C. Evolution in quantum leaps: multiple combinatorial transfers of HPI and other genetic modules in *Enterobacteriaceae*. *PLoS One*, v.5, n.1, p.e8662,2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3rd ed., 2001.
- SANDERS, W.E., JR.; SANDERS, C.C. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical Microbiology Reviews*, v.10, n.2, p.220-241,1997.

ZERBINO, D.R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, v.18, n.5, p.821-829,2008.

Table 1 - Bacterial strains used in this study

Clinical isolates

E. cloacae (urine and surgical wound)
S. flexneri 17, 37 and 67
S. sonnei 15 and 17
S. dysenteriae 5862, 7172 and 8135
S. maltophilia 599
S. enterica (Typhi 710)
Y. enterocolitica FCF76

Type strains

E. cloacae ATCC35030
E. aerogenes ATCC13048
E. cloacae CDC3437
E. sakazakii CDC7008
E. cloacae CDC3430
E. cloacae 3443
E. cloacae 4422
E. cloacae 3054
S. enterica (Typhimurium UK1)

Figure 1

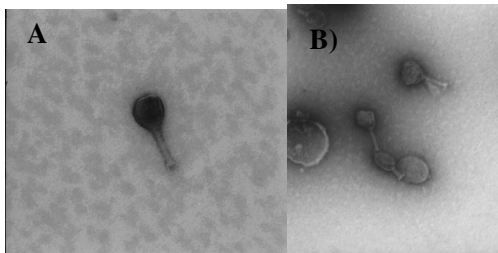


Figure 2

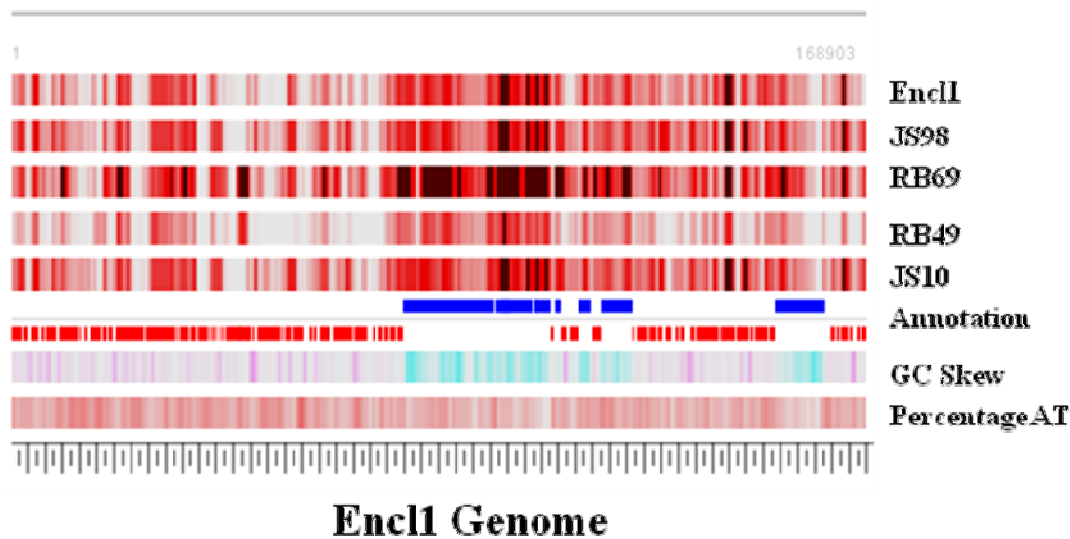
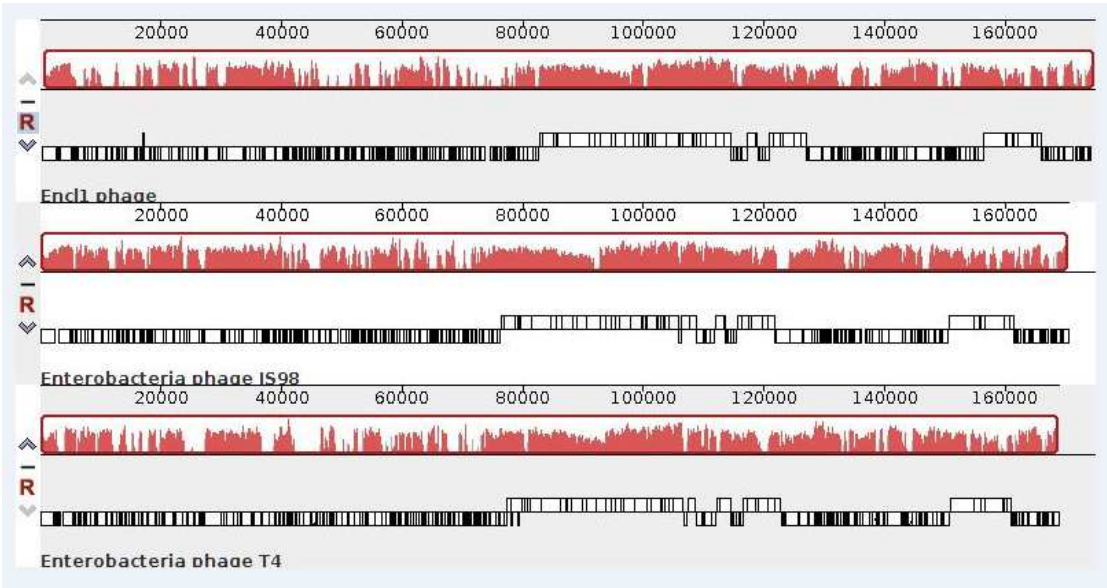


Figure 3.



9. ANEXO 2 – Declaração de Bioética e Biossegurança

DECLARAÇÃO

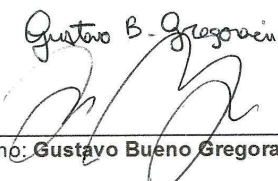
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada "TERAPIA EXPERIMENTAL COM BACTERÍOFAGOS":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

Comissão de Ética na Experimentação Animal, sob Protocolo(s) nº e 1888-1 e 1924-1.

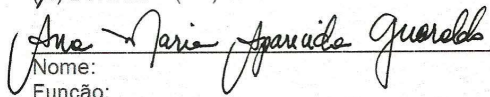
** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Gustavo Bueno Gregoracci

Orientador: Marcelo Brocchi

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: _____
Função: _____

Prof.ª. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUERALDO
Presidente do CENABIO