

SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO DNA DE BACTERIÓFAGOS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO SOBRE *Salmonella* Enteritidis EM AVES

CSL Vaz^{1*}, D Voss¹, L Alves², IM Trevisol¹

¹Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

²Bolsista de iniciação científica – PIBIC/CNPq, Universidade do Contestado, Concórdia, SC, Brasil.

Introdução

O uso de bacteriófagos líticos (BL) pode ser viável para o controle biológico de *Salmonella* em frangos de corte. Três BL com ação sobre *Salmonella* Enteritidis (SE) foram isolados de fezes de aves pela Embrapa Suínos e Aves e vêm sendo pesquisados quanto ao seu potencial terapêutico. Estes BL, denominados CNPSA 1, 3 e 4, apresentam estrutura com cabeça e cauda, possuem genoma DNA dupla fita e multiplicam-se em frangos de corte infectados por SE (1). Fornecidos a frangos de corte pela via oral promovem a redução da concentração de SE PT4 no ceco (2). A ação dos BL é mais efetiva quando administrados a aves contendo altas concentrações do patógeno no conteúdo cecal (3). Para aperfeiçoar a tecnologia de uso terapêutico destes BL na redução de SE em aves é necessário ampliar o conhecimento sobre os fagos utilizados, o que envolve a caracterização genotípica. O objetivo do presente trabalho foi obter a caracterização molecular destes BL através do sequenciamento parcial de regiões aleatórias de seu DNA.

Material e Métodos

O DNA genômico dos três BL foi obtido conforme previamente descrito (1), a partir do qual foi utilizando o primer 5'AACGCGCAAC3' para amplificar regiões aleatórias do genoma por RAPD com o sistema *Ready-to-go* (GE Healthcare). Produtos de amplificação característicos de cada BL foram purificados e clonados no vetor pCR XL-TOPO (Invitrogen), sendo a transformação realizada com células quimicamente competentes TOP10 (Invitrogen). Colônias transformadas foram selecionadas em ágar LB contendo 50mg/mL de kanamicina e o DNA plasmidial recombinante foi isolado com o kit *HiYield* (Real Genomics), sendo os insertos amplificados por PCR utilizando primers M13. Estes produtos foram purificados com o kit *GFX PCR Purification* (GE Healthcare) e após marcados com o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), sendo sequenciados no ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os dados foram coletados com o *software Data Collection v1.0.1* (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas com a sequência do vetor através do *Clustal W*, sendo então comparadas a sequências de bacteriófagos (fagos) depositadas no *GenBank* utilizando o EMBL-EBI.

Resultados e Discussão

Dentro dos perfis de RAPD obtidos, um fragmento característico de cada BL foi selecionado para sequenciamento de DNA (Figura 1), a partir dos quais foram identificados 375, 499 e 435 nucleotídeos dos BL CNPSA 1, 3 e 4, respectivamente. Estas sequências de DNA não apresentaram similaridades significativas frente a sequências de bacteriófagos da ordem *Caudovirales* de genoma DNA dupla fita depositadas no *GenBank* (Tabela 1). Níveis mais elevados de similaridade podem ser identificados se forem analisadas regiões mais extensas e conservadas do genoma dos três BL pesquisados pela Embrapa para redução de SE em aves.

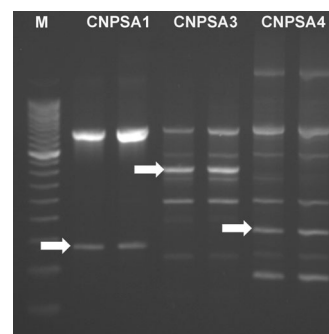


Figura 1 - Perfis de RAPD obtidos com os BL (CNPSA 1, 3 e 4). Os fragmentos de DNA sequenciados de cada BL são indicados. M, marcador (*ladder* 100 pb).

Tabela 1 - Principais similaridades identificadas entre sequências de DNA de outros bacteriófagos.

BLCNPSA	Bacteriófago, família e bactéria de origem	Nº acesso EMBL	Similaridade (%)
CNPSA1	Fago cs-t <i>Myoviridae</i> <i>C. botulinum</i> tipo C	AP008983	66,7
	Fago Lv-1 <i>Siphoviridae</i> <i>Lactobacillus jensenii</i>	EU871039	65,4
CNPSA3	Bacteriófago K1F <i>Podoviridae</i> <i>Escherichia coli</i>	DQ111067	61,8
	Bacteriófago 187 <i>Siphoviridae</i> <i>S. aureus</i>	AY954950	65,9
	Profago <i>Campylobacter jejuni</i>	EF694684	60,8
CNPSA4	Fago P-SSM2 <i>Myoviridae</i> <i>Prochlorococcus</i>	AY939844	59,8
	Gene <i>alt</i> do Fago T4 <i>Myoviridae</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	X15811	78,6
	Fago Xop411 <i>Siphoviridae</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	DQ777876	75,0
	Fago EL <i>Myoviridae</i> <i>P. aeruginosa</i>	AJ697969	72,9
	Fago phiEco32 <i>Podoviridae</i> <i>Escherichia coli</i>	EU330206	72,3

Conclusão

As regiões do genoma dos BL analisados não apresentaram similaridades significativas frente a sequências de DNA de bacteriófagos depositadas no *GenBank*.

Bibliografia

- Fiorentin L, Vieira ND, Barioni Junior W. *et al. Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2004; 6(2):121-8.
- Fiorentin L, Vieira ND, Barioni Junior W. *Avian Pathology* 2005; 34(3):258-63.
- Fiorentin L, Vaz CSL, Voss D. *et al. Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2008; S10:241.