

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli, normalmente conhecida por *E. coli*, recebe o nome em homenagem ao seu descobridor Theodor Escherich, sendo normalmente encontrada no intestino de animais homeotérmicos ou de sangue quente. A maioria das estirpes de *E. coli* são inofensivas, no entanto, algumas, como o serótipo O157:H7 podem causar graves intoxicações alimentares em humanos, quando estes consomem vegetais não lavados ou carne mal cozinhada, uma vez que esta bactéria produz exotoxinas potencialmente letais. No entanto, as estirpes inofensivas que fazem parte da microbiota do intestino, podem ter uma acção benéfica sob o seu hospedeiro, através da produção da vitamina K2, ou evitando que bactérias patogénicas se instalem no intestino.

Como a *E. coli* tem a capacidade de sobreviver por breves períodos, no exterior do organismo dos animais, é considerado o organismo ideal a utilizar como indicador de contaminação fecal em amostras de água naturais. No entanto, esta característica torna os locais contaminados com *E. coli* potencialmente perigosos para o homem.

Desde a descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, há cerca de 71 anos, o tratamento de doenças de etiologia bacteriana tem sido efectuado com estas substâncias. Porém, o uso generalizado e massivo destas substâncias em medicina, medicina veterinária e produção animal é apontado como causa do desenvolvimento crescente de resistência bacteriana a estes compostos, tornando-os cada vez menos eficazes no combate às doenças (Tauber 2001, Heuer et al., 2006). Actualmente, estamos a entrar numa “era pré-antibióticos”, enfrentando a ameaça de bactérias resistentes à maioria dos antibióticos disponíveis (Parisien et al., 2007). O uso destas substâncias terapêuticas, mesmo em situações não clínicas como a produção animal é altamente controverso, tendo fortes implicações na saúde pública, como sejam:

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

- i) a possibilidade de deposição de resíduos destas substâncias nos tecidos animais pode levar à alteração da microbiota do intestino humano, ao mesmo tempo que podem levar a problemas de toxicidade e de alergias (Cabello, 2006);
- ii) as resistências desenvolvidas por bactérias patogénicas para animais podem ser transferidas a outras bactérias, mesmo de espécies diferentes, incluindo patógenos humanos (Alderman & Hastings, 1998; Ho et al., 2000). O desenvolvimento de resistências torna ainda mais difícil o seu controlo;
- iii) a contaminação e persistência nos ecossistemas (Hektoen et al., 1995) podem afectar negativamente as comunidades bacterianas naturais, e, conseqüentemente os ciclos biogeoquímicos (Fuhraman, 1999).

Os bacteriófagos (fagos), são vírus que infectam e lisam especificamente bactérias, replicando-se exponencialmente durante esse processo, sem no entanto atacarem outras células ou organismos. Os fagos ocupam todos os habitats onde se podem encontrar o seu hospedeiro. Eles são o grupo de “organismos” mais abundante e versátil na Terra. Em amostras ambientais, existem cerca de 10 a 100 vezes mais (por vezes 1000 vezes mais) fagos do que bactérias, estando a população global de fagos estimada em 10^{31} (Wommack & Colwell, 2000; Weinbauer, 2004; Brussow & Kutter, 2005; Skurnik et al., 2008). Os fagos co-evoluíram com as próprias bactérias, e constituem outra das entidades naturais que podem ser exploradas no combate às bactérias, incluindo as resistentes aos antibióticos. Esta propriedade faz com que eles possam ser usados no tratamento de infecções bacterianas (bacterioses). Como agentes profiláticos/terapêuticos evitam os principais problemas associados ao uso dos antibióticos, podendo mesmo ser usados contra bactérias resistentes a várias destas substâncias. Para além disto, os efeitos secundários associados à utilização de fagos como agentes terapêuticos são raros, tendo em conta que não afectam células eucarióticas. Uma vez que os fagos são constituídos por proteínas e ácidos nucleicos, e como a degradação destes compostos apenas origina aminoácidos e bases azotadas, não são considerados xenobióticos, e ao contrário dos antibióticos e agentes antissépticos, a sua introdução no meio ambiente pode ser vista como um processo natural.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

Este trabalho é constituído por 4 actividades distintas a serem efectuadas de um modo sequencial:

1. Preparação de material e meios de cultura;
2. Isolamento e purificação de *Escherichia coli* de amostras de água;
3. Isolamento e purificação de fagos patogénicos para *E. coli*;
4. “Host Range” e “EOP” dos fagos isolados.

As diferentes actividades a serem efectuadas neste desafio estão relacionadas umas com as outras. Na primeira “Preparação de material e meios de cultura”, preparar-se-á todo o material necessário para a realização das restantes actividades.

Na segunda, “Isolamento e purificação de *Escherichia coli* de amostras de água”, diferentes grupos na mesma escola poderão recolher amostras de água de diferentes cursos de água com o intuito de determinar se essa água terá sido contaminada por alguma fonte de poluição orgânica e se ela pode ser utilizada para consumo humano directo.

Com a terceira actividade, “Isolamento e purificação de fagos patogénicos para *Escherichia coli*, que pode ser feita ao mesmo tempo e com a mesma amostra de água que a segunda actividade, “Isolamento e purificação de *Escherichia coli* de amostras de água”, vão-se isolar fagos (vírus de bactérias), que são microrganismos que podem ser utilizados para o tratamento de infecções bacterianas, quando as bactérias se revelam resistentes aos antibióticos.

Como diferentes fagos podem infectar diferentes isolados de *E. coli*, com a quarta actividade ““Host Range” e “EOP” dos fagos isolados” vai-se determinar o painel de hospedeiros que cada fago e a sua eficiência de plaqueamento.

2 MATERIAL & MÉTODOS

Para a realização das actividades propostas será fornecida uma série de reagentes e material biológico. No entanto, é necessário que as escolas possuam outros materiais e reagentes.

Antes de efectuar cada uma das actividades deve-se ler atentamente o protocolo da respectiva actividade, para se saber:

1. A quantidade de material a utilizar (placas, tubos);
2. A quantidade de meios e reagentes necessários para a realizar;
3. O que deve fazer nos diferentes passos;
4. Tirar dúvidas antes de o realizar;
5. Limpar a bancada de trabalho com álcool de desinfecção, antes de iniciar cada actividade.

ACTIVIDADE 1. PREPARAÇÃO DE MATERIAL E MEIOS

Para realização das actividades propostas é necessário preparar diversos meios de cultura e reagentes. Os reagentes necessários para a realização de cada um dos meios foi padronizado para 1 L, pelo que deverão fazer as contas do material e meios necessários para cada uma das actividade, mediante o número de alunos/grupos.

Os reagentes e meios de cultura a preparar são:

1. Preparação de Soro Fisiológico;
2. Preparação de TBX;
3. Preparação de LB Broth;
4. Preparação de LB agar;
5. Preparação de LB-10x;
6. Preparação de LB Top;
7. Tampão de conservação.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

Para a realização deste desafio serão necessários aproximadamente 500 ml de Soro Fisiológico, 400 ml de TBX, 1 L de LB Broth, 4 L de LB Agar, 200 ml de LB-10x, 600 ml de LB Top e 500 ml de tampão de conservação.

A esterilização do material de vidro deve ser feito numa estufa ou forno a 180 °C durante uma hora. Os tubos de ensaio devem ter tampa de metal ou então ser fechados com folha de alumínio para evitar contaminações e só depois esterilizados na estufa. As pipetas de vidro devem ser colocadas em recipientes de vidro ou de metal fechados com papel de alumínio ou agrupados e embalados em pacotes de papel.

Os meios de cultura líquidos devem ser esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 1 atmosfera. Caso não haja acesso a um autoclave, os meios de cultura podem ser “esterilizados” por ebulição numa estufa ou num forno a 180 °C durante 2 horas, no entanto, esta ebulição não irá ter como resultado a esterilidade completa, devendo, no entanto, ser suficiente para as actividades propostas.

Durante a manipulação das culturas, ter sempre uma lamparina de álcool ou um bico de Bunsen ligado, devendo-se ter cuidado em nunca se deixar os meios destapados.

Para a realização das actividades propostas será fornecida uma série de reagentes e material biológico. No entanto, é necessário que as escolas possuam outros materiais e reagentes.

MATERIAL A FORNECER:

- *Escherichia coli* B;
- Tubos de microcentrífuga;
- Tubos falcon;
- Meio TBX desidratado;
- LB 10x Concentrado;
- Suplemento para o “LB Top” Agar (Solução A);
- Tampão de conservação.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

OUTRO MATERIAL NECESSÁRIO:

- Componentes para a produção de LB

Broth, LB Agar e LB Top:

- | | |
|---|---|
| I. Triptona; | • Garrafas de plástico; |
| II. Extracto de levedura; | • Forno; |
| III. Cloreto de Sódio (NaCl); | • Pompete; |
| IV. Agar-Agar. | • Lamparina de álcool ou bico de Bunsen; |
| • Água destilada | • Ansa de microbiologia; |
| • Álcool de desinfecção; | • Vareta ou pipeta de Pasteur de vidro; |
| • Pipetas de vidro de 10 ml e 1 ml; | • Banho-Maria ou estufa regulável a 37 e a 55 °C; |
| • Placas de Petri; | • Balança; |
| • Tubos de ensaio de vidro com tampas de metal ou tapados com folha de alumínio dobrado em 4; | • Magnetes; |
| | • Placa de aquecimento ou fogão; |
| | • Centrifuga (não é imprescindível). |

PREPARAÇÃO DE SORO FISIOLÓGICO

O soro fisiológico (solução salina), é utilizado em microbiologia para se efectuar diluições das amostras e/ou culturas bacterianas, já que se trata de um meio isotónico, evitando assim a ruptura das células bacterianas. Para a sua preparação são necessários 9,5 g/L de NaCl.

MÉTODO:

- 1 Para um frasco autoclavável, com o dobro do volume final medir, 1 L de água destilada;
- 2 Pesar o cloreto de sódio;
- 3 Adicionar ao frasco e agitar até dissolver;
- 4 Esterilizar o soro em autoclave a 121 °C durante 15 minutos;

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

PREPARAÇÃO DE TBX

O TBX (do inglês Tryptone Bile X-GLUC) é um meio cromogénico e selectivo para o isolamento e contagem de *Escherichia coli*. Este meio é constituído por:

- Triptona 20 g/L;
- Sais Biliares 1,5g/L;
- Agar-agar 15,0 g/L;
- X-gluconídeo 0,075 g/L

MÉTODO:

- 1 Para um frasco com o dobro da capacidade, medir 1 L de água desionizada;
- 2 Pesar 36,6 g do meio TBX desidratado (fornecido);
- 3 Adicionar ao frasco e ferver o meio de cultura, em agitação, até que o agar esteja dissolvido;
- 4 Esterilizar o meio de cultura em autoclave a 121 °C durante 15 minutos;
- 5 Depois de autoclavar, deixar arrefecer até cerca de 50 °C;
- 6 Em esterilidade, encher placas de Petri, previamente esterilizadas com aproximadamente 20 a 25 mL de meio de cultura (meia altura da placa);
- 7 Deixar solidificar e marcar as placas com "TBX";
- 8 Deixar a desidratar, à temperatura ambiente, em posição invertida, pelo menos, de um dia para o outro.

PREPARAÇÃO DE LB BROTH E LB AGAR

O meio LB (Luria-Bertani) é o meio tradicionalmente utilizado para crescimento e manutenção de *Escherichia coli*. Ele pode ser utilizado sobre a forma de caldo (Broth) ou sobre a forma de meio sólido (agar), sendo neste caso necessário adicionar agar-agar.

O meio LB é constituído por:

- Triptona 10 g/L;
- Extracto de levedura 5 g/L;
- Cloreto de sódio 10 g/L;
- Agar-agar 15 g/L (para o meio sólido)

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE LB BROTH

- 1 Para um balão Erlenmeyer medir, 800 ml de água desionizada;
- 2 Pesar o extracto de levedura, a triptona e o cloreto de sódio;
- 3 Adicionar ao frasco e agitar até dissolver;
- 4 Perfazer o volume da solução a 1 L, adicionando água desionizada e agitar;
- 5 Transferir o meio de cultura para um frasco com o dobro da capacidade;
- 6 Esterilizar o meio de cultura em autoclave a 121 °C durante 15 minutos;

MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE LB AGAR

1. Para um balão Erlenmeyer medir, 800 ml de água desionizada;
2. Pesar o extracto de levedura, a triptona e o cloreto de sódio;
3. Adicionar ao frasco e agitar até dissolver;
4. Adicionar 15 g de agar-agar, ferver em agitação até que o agar esteja dissolvido;
5. Transferir o meio de cultura para um frasco com o dobro da capacidade;
6. Esterilizar o meio de cultura em autoclave a 121 °C durante 15 minutos;
7. Depois de autoclavar, deixar o meio arrefecer até atingir cerca de 50 °C;
8. Em esterilidade, encher placas de Petri, previamente esterilizadas com aproximadamente 20 a 25 mL de meio de cultura (meia altura da placa);
9. Deixar solidificar e marcar as placas com "LB";
10. Deixar a desidratar, à temperatura ambiente, em posição invertida, pelo menos, de um dia para o outro.

PREPARAÇÃO DE LB-10X

Numa amostra natural, os fagos estão presentes numa densidade muito baixa. Para que o seu isolamento seja possível, a sua concentração terá que ser aumentada, sendo portanto necessário proceder previamente à sua amplificação. Para tal, é necessário utilizar um meio de cultura em que as bactérias normalmente cresçam, só que este deverá estar 10x concentrado.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

Para se preparar LB-10x é necessário¹:

- Triptona 100 g/L;
- Extracto de levedura 50 g/L;
- Cloreto de sódio 100 g/L.

MÉTODO:

- 3 Para um balão Erlenmeyer medir, 800 ml de água desionizada;
- 4 Pesar o extracto de levedura, a triptona e o cloreto de sódio;
- 5 Adicionar ao frasco e agitar até dissolver;
- 6 Perfazer o volume da solução a 1 L, adicionando água desionizada e agitar;
- 7 Transferir o meio de cultura para um frasco com o dobro da capacidade;
- 8 Esterilizar o meio de cultura em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

PREPARAÇÃO DE LB TOP

Para se preparar LB Top é necessário:

- Triptona 10 g/L;
- Extracto de levedura 5 g/L;
- Cloreto de sódio 10 g/L;
- Agar-agar 4g/L;
- Suplemento para o Top Agar 20 ml/L (fornecido).

MÉTODO:

- 1 Para um balão Erlenmeyer medir, 800 ml de água desionizada;
- 2 Pesar o extracto de levedura, a triptona e o cloreto de sódio;
- 3 Adicionar ao frasco e agitar até dissolver;
- 4 Adicionar o agar-agar;
- 5 Ferver o meio de cultura, em agitação, até que o agar esteja dissolvido
- 6 Perfazer o volume da solução a 980 ml, adicionando água desionizada e agitar;

¹ Apesar deste material ser fornecido já preparado, deixa-se a referência à metodologia de preparação para possíveis acções futuras.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

- 7 Transferir o meio de cultura para um frasco com o dobro da capacidade;
- 8 Esterilizar o meio de cultura em autoclave a 121 °C durante 15 minutos;
- 9 Depois de autoclavar deixar arrefecer o meio de cultura até aproximadamente 50°C;
- 10 Em esterilidade, adicionar 20 ml do suplemento para o “LB Top”.

PREPARAÇÃO DE TAMPÃO DE CONSERVAÇÃO

Para se preparar Tampão de conservação é necessário:

- NaCl 5,8 g/L;
- MgSO₄•7H₂O 2 g/L;
- Tris-HCl (1M, pH 7,5) 50 ml/L;
- Gelatina 2 g/L.

MÉTODO:

- 1 Para um balão volumétrico, medir 800 ml de água desionizada;
- 2 Pesar o NaCl e o sulfato de magnésio e dissolver nos 800 ml de água;
- 3 Adicionar o Tris-HCl e a gelatina;
- 4 Ferver a solução, em agitação, até que a gelatina esteja dissolvida;
- 5 Perfazer o volume da solução até 1 L, adicionando água desionizada e agitar;
- 6 Transferir para um frasco autoclavável com o dobro do volume
- 7 Esterilizar a solução em autoclave a 121 °C durante 15 minutos;
- 8 Em esterilidade, dividir a solução por frascos mais pequenos, previamente esterilizados.

ACTIVIDADE 2. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* DE AMOSTRAS DE ÁGUA

E. coli é o organismo mais comum do grupo dos coliformes fecais, sendo um dos parâmetros microbiológicos mais importantes da qualidade da água (Dufour, 1977). A sua presença na água indica que esta foi contaminada por matéria fecal proveniente do Homem ou de outros animais homeotérmicos. Actualmente, considera-se que para a avaliação microbiológica da qualidade da água deve usar-se a concentração de *E. coli* e não a de coliformes fecais. Em Portugal, a concentração de *E. coli* presente na água para consumo directo humano encontra-se regulamentada pelo Decreto-Lei Nº 306/2007, considerando-se que uma água está própria para consumo quando não existe qualquer *E. coli* na água.

Como foi referido, muitas estirpes de *E. coli* não são patogénicas para o Homem, no entanto, como esta bactéria coexiste, muitas vezes, com bactérias patogénicas entéricas, a sua presença serve como indicador da presença destas.

São várias as possíveis fontes de contaminação de cursos de água por *E. coli*. As mais problemáticas são as fontes difusas ou não pontuais, como por exemplo, as descargas dos sistemas de tratamento de águas residuais, tanques sépticos, enxurradas ou ainda populações animais naturais (An *et al.*, 2002).

Com esta actividade, determinar-se-á se a amostra do curso de água de onde foi recolhida, terá sido contaminada por alguma fonte de poluição orgânica, e se poderá ser consumida directamente pelo Homem. Para tal, vamos utilizar um meio de cultura específico, o TBX, no qual a *E. coli* origina colónias verdes.

Cada escola não deverá efectuar mais do que 3 amostras de água, que deverão ser de cursos de água distintos, com o intuito de se aumentar a variabilidade das *E. coli* isoladas. Esta amostragem pode ser feita por grupos de alunos distintos.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

De cada amostra de água deve ser repicada apenas uma colónia de cor verde. Se apenas for efectuado a amostragem de um curso de água, deve-se repicar no máximo 3 colónias distintas (colónias de diferentes tonalidades de verde, forma e tamanho distintos).

Para a realização desta actividade será necessário o uso de uma estufa regulável a 37 °C. Se não existir, a incubação das placas pode ser feito à temperatura ambiente, deixando-se a incubar sobre a bancada de trabalho, no entanto, o crescimento bacteriano poderá demorar mais tempo.

PROTOCOLO (2 horas):

1. Num frasco estéril, recolher uma amostra de água do meio natural para posterior análise, e cumprindo-se as seguintes condições:
 - 1.1. O frasco apenas deve ser aberto dentro de água;
 - 1.2. Se a amostra de água for recolhida num local com corrente, a recolha deve ser feita no sentido da corrente;
 - 1.3. O frasco não deve ficar totalmente cheio e deve ser fechado dentro de água;
 - 1.4. A amostra deve ser transportada refrigerada para o laboratório e analisada no prazo máximo de 24 horas, devendo neste caso ser mantida no frigorífico.
2. Marcar as placas de Petri contendo o meio TBX, com as diluições (até -4) e o local de recolha da amostra;
3. Encher tubos os de ensaio tapados e estéreis com 4,5 ml de soro fisiológico estéril;
4. Marcar os tubos de ensaio com os valores das diluições;
5. Adicionar ao primeiro tubo 0,5 ml da amostra de água e agitar (Fig. 1):
 - 5.1. Efectuar diluições seriadas de 1/10 até -4, trocando sempre de pipeta entre diluições;
 - 5.2. Agitar bem, antes de passar à diluição seguinte;
6. Com uma pipeta estéril retirar 0,1 ml de cada uma das diluições e coloca-la no centro da placa respectiva;

NOTA: Se neste passo partirmos da amostra mais diluída para a mais concentrada podemos usar sempre a mesma pipeta.
7. Encher um frasco com álcool;

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

8. Mergulhar um espalhador por álcool e esterilizá-lo à chama;

NOTA: Os espalhadores podem ser feitos com pipetas de Pasteur dobradas em L

9. Arrefecer o espalhador no interior da tampa da placa de Petri;
10. Sem destapar totalmente a placa, espalhar a amostra por toda a placa, rodando-a, até que a amostra seja absorvida pelo agar;
11. Repetir os passos 8 a 10 com todas as diluições;
12. Depois de espalhar todas as amostras, colocá-las a incubar a 37 °C em posição invertida até se observar crescimento bacteriano²;
13. Contar o número de colónias (CFU's do inglês colony-forming unit) em todas as placas;

NOTA: Só se devem contar as placas que contenham entre 30 e 300 CFU's.

14. Calcular os CFU/ml de amostra, utilizando a seguinte fórmula:

$$CFU/ml = \text{Número de colónias} \cdot \frac{1}{\text{Diluição}} \cdot 10$$

15. Para cada amostra de água escolher a placa contendo a diluição em que se observem colónias individualizadas;
 - 15.1. Todos os tipos diferentes de colónias devem ser repicadas para placas com LB Agar;
 - 15.1.1. Dar um código às diferentes colónias repicadas. Ex: Bactéria isolada do rio Douro a 12/02/2010 pode receber o seguinte código: Douro1.02.10.
 - 15.2. Incubar a 37 °C em posição invertida até se observar crescimento bacteriano¹;
 - 15.3. Efectuar, até um máximo de 3 repicagens sucessivas, até se obterem colónias de aspecto semelhante³;

² Aproximadamente 24 horas

³ Com forma, tamanho e aspecto semelhante.

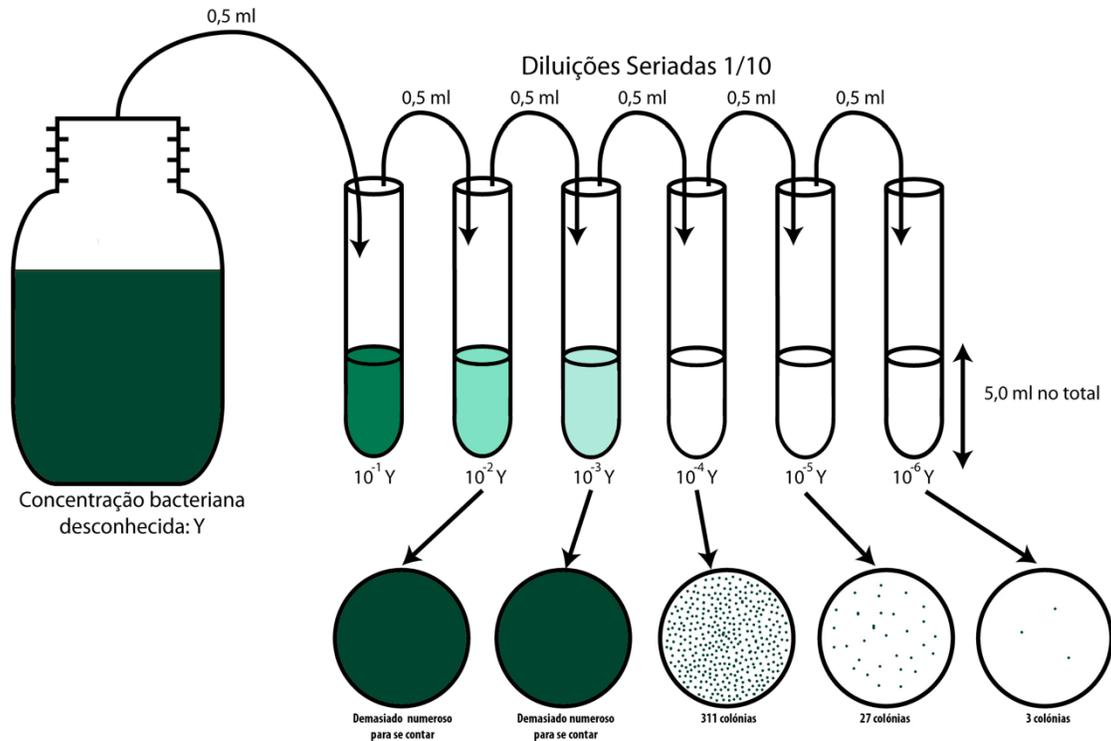


Figura 1. Diluições seriadas e contagem do número de bactérias na placa correspondente a cada diluição.

QUESTÕES:

1. O curso(s) de água onde recolhes-te a(s) amostra(s) de água encontra(m)-se contaminado(s) por uma fonte orgânica?
2. Que possíveis causas existem para a presença de *E. coli* nesta(s) amostra(s) de água?
3. Que possíveis efeitos pode ter a presença de *E. coli* na saúde pública?

ACTIVIDADE 3. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FAGOS PATOGENICOS PARA *E. COLI*.

Desde que Anton van Leeuwenhoek desenvolveu o primeiro microscópio (Ford, 2001), algumas das mais dramáticas alterações na forma de funcionamento do mundo biológico surgiram a partir da observação directa dos microrganismos presentes nas amostras ambientais. A compreensão da enorme diversidade e da importância biogeoquímica das bactérias nos oceanos ocorreu apenas à cerca de 30 anos, datando apenas de 1977 as primeiras contagens directas ao microscópio (Hobbie *et al.*, 1977). Dado o seu pequeno tamanho, os fagos foram o último grupo dentro dos microrganismos a ser observados directamente. A primeira contagem fiável directa de fagos em amostras de água, demonstrou que eles eram o microrganismo mais abundante na Terra (Berg *et al.*, 1989). Com concentrações de 10^4 a 10^8 fagos/ml, estes são cerca de 10 vezes mais abundantes que as bactérias na maior parte dos ambientes aquáticos (Wommack & Colwell, 2000; Weinbauer, 2004). Apesar dos primeiros estudos, em que se demonstrou a ubiquidade dos fagos, terem sido efectuados em ambientes aquáticos, tem-se verificado que o seu número em solos e em sedimentos aquáticos é muito maior.

As técnicas moleculares e de microscopia têm sido críticas na demonstração de que os fagos são um componente dinâmico da ecologia microbiana, sendo capazes de ter uma influência significativa na produtividade e na biologia populacional das comunidades hospedeiras. Estas técnicas, têm ainda vindo a descrever e a circunscrever a extrema diversidade genética das comunidades de fagos presentes no meio ambiente.

O isolamento de um fago envolve a utilização de uma estirpe bacteriana específica, que vai funcionar como hospedeiro, sobre a qual se espalha uma amostra ambiental, como por exemplo uma amostra de esgoto, água, solo ou fezes. A existência de fagos patogénicos para a bactéria em análise vão levar ao aparecimento de placas de lise, cada uma das quais deverá ser proveniente de um único fago (Fig. 2).

Apesar da amostra poder possuir milhões ou milhares de milhões de fagos, apenas os que forem patogénicos para a bactéria hospedeira e que sejam capazes de formar placas de lise é que vão ser visíveis.

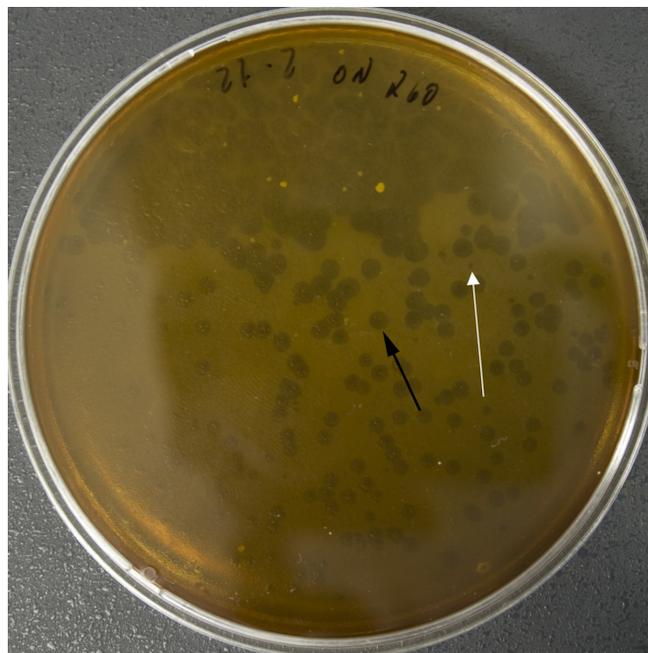


Figura 2. Plaqueamento de uma amostra natural contendo diferentes placas de lise (setas – distintas placas de lise corresponderão a fagos diferentes).

Uma amostra pode possuir fagos numa concentração suficiente para ser plaqueada directamente ou então, os fagos podem estar em concentrações elevadas, sendo necessário diluir a amostra antes de plaquear. No entanto, na maior parte dos casos, a sua concentração é tão baixa que é necessário um passo prévio de enriquecimento, de forma a aumentar-se o seu número. Neste caso, a maior parte das bactérias na amostra deverá ser removida, sendo posteriormente incubada durante um ou mais dias, à temperatura ideal para a bactéria, com nutrientes concentrados e diferentes bactérias hospedeiras. Após a amplificação, a cultura deverá ser lisada com clorofórmio e uma aliquota será plaqueada com cada uma das estirpes bacterianas utilizadas como hospedeira.

NOTA: Para este protocolo poder ser realizado, é necessário efectuar todos os dias, culturas diárias da estirpe de *E. coli* B fornecida e colocá-las a incubar a 37 °C durante 3 horas. É ainda necessário, todos os dias, preparar tubos de ensaio com LB Top.

Se não existir uma estufa regulável a 37 °C a incubação das placas pode ser feito à temperatura ambiente, deixando-se a incubar sobre a bancada de trabalho, no entanto, o crescimento bacteriano poderá demorar mais tempo.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

PROTOCOLO PARA REPICAR A *E. COLI* B FORNECIDA (5 minutos):

- 1- Limpar a bancada de trabalho com álcool de desinfecção;
- 2- Marcar uma placa de Petri contendo LB Agar com o código da bactéria;
- 3- Levar a ansa de microbiologia ao rubro;
- 4- Arrefecer a ansa no agar da placa de Petri;
- 5- Retirar uma pequena amostra do tubo de microcentrifuga contendo a *E. coli* B fornecida;
- 6- Efectuar um riscado na placa de Petri;
- 7- Pôr a placa a incubar durante aproximadamente 24 horas numa estufa regulada a 37 °C;
- 8- Guardar o tubo de microcentrifuga contendo o stock de *E. coli* B a 4 °C.

PROTOCOLO (5 horas divididas por vários dias):

1. No dia anterior ao de se efectuar o isolamento de fagos, fazer uma cultura nocturna da *E. coli* fornecida em 5 ml de LB Broth e colocar a incubar 37 °C;
2. Fazer uma cultura diária em 5 ml de LB Broth, a partir de uma diluição 1/100 da cultura nocturna e incubar a 37 °C durante 3 horas;
3. Amplificação dos fagos na amostra de água. Para um volume final de 40 ml:
 - 3.1. Colocar num frasco estéril 1/10 de meio LB-10x concentrado;
 - 3.2. Adicionar 35,6 ml da amostra de água;
 - 3.3. Adicionar 0,4 ml da cultura diária de *E. coli*B.
4. Incubar, durante 24 horas a 37 °C;
5. No dia seguinte, encher tubos de ensaio estéreis com 3 ml de LB Top e deixar a arrefecer em banho-maria a 55 °C (durante pelo menos 30 minutos);
6. Fazer uma cultura líquida com a *E. coli* B e incubar a 37 °C durante 3 horas;
7. Centrifugar 1 ml da cultura bacteriana (5000 g) durante 20 minutos;
NOTA: Se não existir centrifuga, saltar este passo.
8. Efectuar diluições seriadas do sobrenadante (até -6 ou -8) em tampão de conservação;
9. Marcar as placas de Petri com as diluições das diferentes amostras;
10. Retirar os tubos do banho-maria, e agitá-los, arrefecendo-os até que se possam segurar na mão durante uns segundos;
11. Adicionar a cada tubo de LB Top 0,1 ml de cultura bacteriana em fase exponencial de crescimento;

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

12. Adicionar a cada tubo de LB Top com a respectiva bactéria, 0,1 ml da respectiva diluição da amostra;
13. Assepticamente, plaquear os tubos contendo o LB Top com a bactéria e o fago na respectiva placa de Petri;
14. Deixar as placas a incubar à temperatura ambiente até que o agar solidifique;
15. Incubar a 37 °C, em posição invertida durante 24 horas;
16. No dia seguinte, encher tubos de ensaio estéreis com 3 ml de LB Top e deixar a arrefecer em banho-maria a 55 °C (durante pelo menos 30 minutos);
17. Verificar a diluição onde se obtiveram placas de lise;
 - 3.4. Dar um código às diferentes placas de lise isoladas.
18. Proceder à purificação das placas de lise:
 - 18.1. Encher tubos de microcentrífuga estéreis com 0,5 ml de tampão de conservação;
 - 18.2. Numa placa onde se observem placas de lise individualizadas, retirar, com uma pipeta de 10 ml estéril as diferentes placas de lise, para os diferentes tubos de microcentrífuga (no máximo 3 placas de lise distintas);
 - 18.3. Pôr os tubos de microcentrífuga a incubar a 37°C durante 2 horas;

NOTA: Se não existir estufa regulável para esta temperatura, deixar a 4 °C ou sobre a bancada de trabalho, em obscuridade, até ao dia seguinte.
19. Após o período de incubação, fazer diluições seriadas das diferentes amostras de fagos (até - 8);
20. Repetir os passos 10 a 16;
21. Após 24 h de incubação, verificar a diluição em que se observam placas de lise individualizadas;
22. Repetir os passos 19 a 21 mais duas vezes, até que todas as placas de lise, presentes na placa sejam uniformes;
23. Retirar 3 a 4 placas de lise, repetindo os passos 19.2 a 21;

QUESTÕES:

1. Qual a importância de se utilizar uma estirpe bacteriana específica para o isolamento dos fagos?

2. Qual a importância de se usar diferentes estirpes pertencentes à mesma espécie bacteriana no isolamento fágico?
3. Se quisermos isolar um *Vibrio parahaemolyticus*, bactéria responsável por enterites no Homem, que tipo de amostras se deve analisar?

ACTIVIDADE 4. “HOST RANGE” DOS FAGOS ISOLADOS

O conjunto de géneros, espécies e estirpes bacterianas que um fago é capaz de infectar, designa-se “*Host Range*” ou painel de hospedeiros, sendo uma das características biológicas desse fago. Vários factores, como o encobrimento dos receptores de ligação do fago na parede bacteriana ou a presença de enzimas de restrição na bactéria, afectam a injeção do material genético do fago, e consequentemente a eficiência de infecção (EOP – Efficiency of Plating). O EOP é dado pela razão entre a concentração do fago numa determinada estirpe e a concentração máxima observada em qualquer estirpe bacteriana. Esta razão pode variar significativamente de acordo com vários factores.

Alguns fagos patogénicos para *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria patogénica para o Homem, que consegue sobreviver em meios naturais – rios e mar – ou artificiais – próteses) apresentam um extenso painel de hospedeiros (Kutter, 2008), afectando todas as pseudomonas fluorescentes (Kellm & Warren, 1971) e salmonelas (Kuhn et al., 2002). No entanto, outros fagos patogénicos para as *Pseudomonas* spp. apresentam um painel de hospedeiros muito limitado (Bigbi & Kropinsky, 1989).

Muitos fagos, como por exemplo, T4, apresentam em condições óptimas de crescimento, uma eficiência de plaqueamento de 100%, ou seja, cada fago liga-se a uma bactéria hospedeira, injecta o seu material genético na bactéria, originando uma placa de lise em meio de cultura sólido. No entanto, factores como a especificidade da bactéria hospedeira, podem afectar a eficiência de plaqueamento, daí a importância da determinação do EOP em várias bactérias hospedeiras.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

NOTA: Para este protocolo poder ser realizado, é necessário efectuar uma cultura diária das estirpes de *E. coli* B fornecida e das *E. coli* isoladas na Actividade 2, colocá-las a incubar a 37 °C durante 3 horas.

Se não existir uma estufa regulável a 37 °C a incubação das placas pode ser feito à temperatura ambiente, deixando-se a incubar sobre a bancada de trabalho, no entanto, o crescimento bacteriano poderá demorar mais tempo.

PROTOCOLO (1 hora):

- 1 Encher tubos de ensaio estéreis com 5 ml de TSB;
- 2 Fazer uma cultura líquida com as bactérias em teste e pô-las a incubar a 37 °C até atingirem metade da fase exponencial de crescimento (verificar por densidade óptica);
- 3 Encher tubos de ensaio estéreis com 3 ml de "LB Top" e deixar a arrefecer em banho-maria a 55 °C;
- 4 Fazer diluições seriadas 1/10 dos diferentes fagos em Tampão de conservação;
- 5 Marcar as placas de Petri com o código das bactérias, dos fagos e respectivas diluições;
- 6 Retirar os tubos do banho-maria, e agitá-los, arrefecendo-os até que se possam segurar na mão durante uns segundos
- 7 Adicionar a cada tubo de "LB Top" 0,1 ml de cultura bacteriana em fase exponencial de crescimento;
- 8 Adicionar a cada tubo de "LB Top" com a respectiva bactéria, 0,1 ml da respectiva diluição do fago
- 9 Asepticamente, plaquear os tubos contendo o "LB Top" com a bactéria e o fago na respectiva placa de Petri;
- 10 Deixar as placas a incubar à temperatura ambiente até que o Top agar solidifique;
- 11 Incubar a 37 °C em posição invertida durante 24 horas;
- 12 Ver qual é o fago que atinge o maior número de estirpes bacterianas, e o que se encontra em maior concentração.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

QUESTÕES:

1. Qual a importância de se fazer um “Host Range” dos fagos isolados?
2. “O desenvolvimento de uma coleção bacteriana com várias centenas de estirpes pertencentes à mesma espécie, é essencial na escolha de um fago para ser utilizado em fagoterapia.” Comente a afirmação anterior.
3. Para o desenvolvimento de um produto terapêutico de origem fágica, será necessário um ou vários fagos?

QUESTÕES GERAIS POSTERIORES:

1. O uso de fagos para tratamento de doenças de etiologia bacteriana pode seguir o mesmo percurso do uso de antibióticos?
2. Quais as grandes vantagens do uso de fagos quando comparado com o uso de antibióticos?
3. Existem desvantagens no uso de fagos para o tratamento de doenças de etiologia bacteriana?
4. Os fagos podem ser utilizados para o tratamento de infecções bacterianas múltiplas?
5. Para além da fagoterapia, em que outras situações se poderão utilizar os fagos?
6. Os fagos podem ser utilizados como “magic bullet” e substituir totalmente o uso de antibióticos?

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bergh, O., Børshiem KY, Bratbak G, Haldal M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* (London), 340: 467–468.

Bigby, D. & Kropinski, A. M. (1989). Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage with a very limited host range. *Can. J. Microbiol.* 35: 630–635.

d’Herelle, F. (1926). *The Bacteriophage and Its Behavior*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland.

Doermann, A.H. (1953). The vegetative state in the life cycle of bacteriophage: Evidence for its occurrence and its genetic characterization. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* XVIII: 3–11.

Ellis, E.L. and Delbrück, M. (1939). The growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 22: 365.

Ford, B.J. (2001) The Royal Society and the microscope. *Notes Rec. R. Soc. Lond.* 55(1): 29–49.

Heuer, O. E., Hammerum, A. M., Collignon, P. and Wegener, H. C. (2006) Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food. *Clin Inf Dis* 43, 911–916

Ho S-P, Hsu T-Y, Chen M-H, Wang W-S (2000) Antibacterial effect of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria. *Journal of Veterinary Medical Science* 65:479-485

Hobbie, J.E., R.J. Daley, and S. Jasper (1977). Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1225–1228.

Kelln, R. A. & Warren, R. A. (1971). Isolation and properties of a bacteriophage lytic for a wide variety of pseudomonads. *Can. J. Micro- biol.* 17: 677–682.

Kuhn, J., Suissa, M., Chiswell, D., Azriel, A., Berman, B., Shahar, D., Reznick, S., Sharf, R., Wyse, J., Bar-On, T. et al. (2002). A bacteriophage reagent for *Salmonella*: molecular studies on Felix 01. *International Journal of Food Microbiology* 74: 217–227.

Mathews, C.K., Kutter, E., Mosig, G. and Berget, P.B. (Eds.) *Bacteriophage T4* (1983). American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Parisien, A., B. Allain, et al. (2008). "Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides." Journal of Applied Microbiology 104:1-13

Teuber, M. (2001) Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 4, 493–499.

Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 28(2): 127–81.

Wommack, K.E. and R.R. Colwell (2000). Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 64: 69–114.