

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

ACTIVIDADES COMPLEMENTARES

1 MATERIAL & MÉTODOS

Para a realização das actividades suplementares deverá ser utilizada a *Escherichia coli* B fornecida. O restante material terá de ser garantido pelas escolas.

Os reagentes a utilizar nas actividades de apoio são idênticos ao das actividades gerais. No entanto, é necessário que as escolas possuam ou tenham acesso a um autoclave e a um espectrofotómetro.

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

1. A quantidade de material a utilizar (placas, tubos);
2. A quantidade de meios e reagentes necessários para a realizar;
3. O que 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.

Neste material de apoio são propostas duas actividades suplementares:

- A. Curva de crescimento de *E. coli* em LB;
- B. Cinética de um fago.

Com estas actividades pretende-se dar uma visão mais completa do tema já que apesar de não se terem proposto como actividades gerais, elas são fundamentais para a realização de um trabalho com fagos, uma vez que estão relacionadas com os fundamentos biológicos do sistema bactéria-fago.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

Na Actividade Suplementar A “Curva de crescimento de *E. coli* em LB” realizar-se-á a curva de crescimento de *E. coli*. Este passo é muito importante num sistema fágico. De uma maneira geral, os fagos infectam bactérias que se encontram numa fase exponencial de crescimento, pois é nesta fase de crescimento bacteriano que toda a maquinaria enzimática da bactéria necessária à replicação dos fagos está em pleno funcionamento. Para além disto, e de uma maneira geral, esta fase só ocorre em locais ricos em nutrientes, garantindo-se assim que a progenia fágica vai encontrar outras células para se multiplicar. No entanto, existem fagos que só infectam bactérias em fase estacionária, portanto a compreensão e conhecimento de cada uma das fases de crescimento bacteriano é essencial quando se trabalha com fagos.

Esta actividade deverá ser efectuada logo após a Actividade 2 “Isolamento e purificação de *Escherichia coli* de amostras de água”.

A Actividade Suplementar B “Cinética de um fago” deverá ser a última actividade a efectuar, logo após a Actividade 4 ““Host Range” dos fagos isolados”. Com esta actividade vai-se estudar o crescimento de um fago numa cultura bacteriana, determinando-se a taxa de multiplicação (“Burst size”) e o período de latência, ou seja, o tempo que vai desde a infecção até ao momento em que os novos fagos começam a ser libertados para o meio ambiente. Com esta actividade vai-se ainda determinar e compreender a importância da multiplicidade de infecção (MOI, do inglês Multiplicity Of Infection), que é a razão entre o número de fagos e o número de bactérias numa determinada experiência de infecção. Este parâmetro é muito importante para um tratamento fágico eficiente, já que pretendemos um baixo MOI.

ACTIVIDADE SUPLEMENTAR A. CURVA DE CRESCIMENTO DE *E. COLI* EM LB

O crescimento bacteriano resulta da divisão de uma bactéria em duas células filhas por um processo conhecido por divisão binária. Se não ocorrer qualquer mutação durante a divisão, as duas células filhas são geneticamente idênticas à bactéria original. Se aquelas sobreviverem (situação que nem sempre acontece), a população bacteriana entra numa fase de crescimento exponencial, em que o tamanho da população duplica a intervalos regulares. A contagem do número de bactérias numa cultura em meio líquido pode ser feito por métodos directos, como a microscopia e a citometria de fluxo, ou por

métodos indirectos como a contagem do número de colónias, a técnica do número mais provável e a densidade óptica, existindo modelos matemáticos que relacionam várias destas medidas e os conhecimentos teóricos existentes.

Uma curva de crescimento bacteriano é específica para uma determinada estirpe em determinadas condições ambientais. No entanto, em todas elas se observam 4 fases distintas (Fig. 1):

- Fase de latência ou fase lag;
- Fase exponencial ou logarítmica;
- Fase estacionária;
- Fase de declínio.

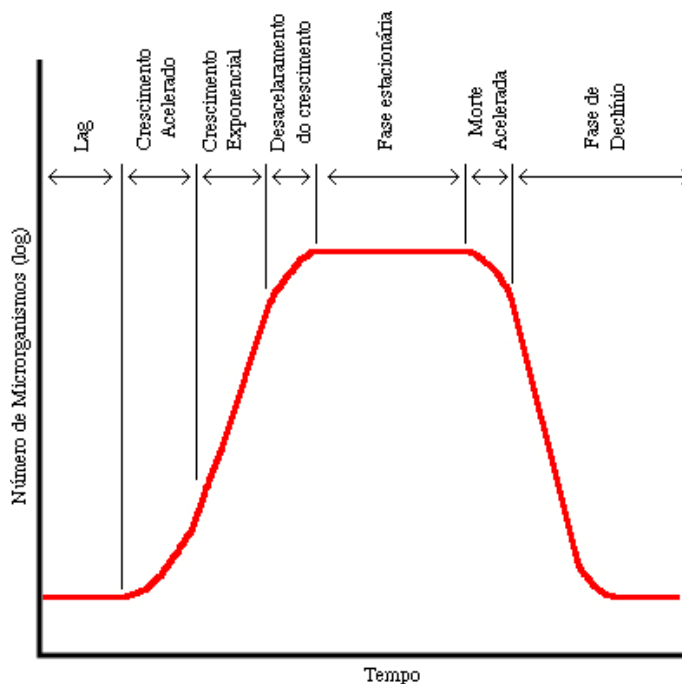


Figura 1. Diferentes fases de crescimento de uma cultura bacteriana.

Muitos dos trabalhos em microbiologia, principalmente os trabalhos com fagos a realizar nas próximas actividades, exigem o conhecimento da fase exponencial de crescimento.

Durante a fase de crescimento exponencial (ou logarítmico), uma cultura bacteriana reage como uma reacção química de primeiro grau, isto é, o aumento do número de bactérias é proporcional ao seu número num determinado momento.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

A constante de proporcionalidade μ , mede a taxa de crescimento bacteriano e é conhecida como constante de crescimento.

O valor de μ pode ser determinado a partir da seguinte equação (A):

$$\mu = \frac{(\log_{10} N - \log_{10} N_0) \cdot 2,303}{t - t_0} \quad (A)$$

em que:

μ é a constante de crescimento;

N é o número de unidades formadoras de colónias no tempo t ;

N_0 é o número de unidades formadoras de colónias no tempo t_0

Esta equação mostra-nos que a constante de crescimento (μ) pode ser calculada se determinarmos o aumento do número de bactérias ao longo de um período de tempo.

O tempo de geração ou duplicação (g) é o tempo médio necessário para que ocorra a formação de 2 células filhas a partir de uma célula mãe. Este valor é calculado a partir da seguinte equação (B):

$$g = \frac{(\log_{10} N - \log_{10} N_0)}{\log_{10} 2} \quad (B)$$

em que:

g é o tempo de geração ou duplicação

N é o número de unidades formadoras de colónias no tempo t ;

N_0 é o número de unidades formadoras de colónias no tempo t_0

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

μ e g estão relacionados um com o outro, segundo a seguinte equação (C):

$$\alpha = \frac{\ln 2}{g} \quad (C)$$

NOTA: Para se efectuar uma curva de crescimento bacteriano com o menor número de erros possível e sem grandes confusões, tudo deverá ser preparado previamente. As curvas de crescimento de bactérias devem ser iniciadas o mais cedo possível. O intervalo de tempo a que se devem fazer medições varia de acordo com a bactéria em estudo, devendo-se ter particular atenção aos pontos de inflexão da curva, ou seja, da passagem da fase lag para a fase de crescimento exponencial e desta para a fase de latência.

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

À medida que se vão lendo as densidades ópticas da cultura, deve-se ir fazendo o gráfico da densidade óptica com o tempo para se poder ir verificando em que fase nos encontramos.

Em caso de dúvida sobre a técnica do espalhamento em superfície, consultar o protocolo da Actividade 2 – Isolamento e purificação de *E. coli* de amostras de água.

PROTOCOLO (4 a 5 horas):

1. No dia anterior ao de se efectuar a curva de crescimento, fazer, com uma colónia reavivada da amostra de *E. coli* B enviada, uma cultura nocturna em 5 ml de LB Broth e colocar a incubar a 37 °C;
2. Marcar placas de Petri contendo LB Agar e preparar os tubos para as diluições, enchendo-os com 4,5 ml de LB Broth;
3. Após o período de crescimento nocturno, retirar 1 ml da cultura bacteriana para uma cuvete de espectrofotómetro e medir a densidade óptica (OD, do inglês Optical Density) da cultura nocturna (600 nm);
4. Fazer uma diluição 1/100 da cultura nocturna em 50 ml de meio LB Broth e agitar bem;
5. Retirar 1 ml da cultura bacteriana para uma cuvete de espectrofotómetro e medir a OD a 600 nm (tempo zero);
6. Retirar 0,5 ml da cultura bacteriana e efectuar diluições seriadas até -8 nos tubos de ensaio;
7. Fazer o espalhamento em superfície de 0,1 ml de cada uma das diluições em duplicado;
8. Repetir os passos 4-6 a cada 20 minutos, até se atingir a fase de latência (aproximadamente 4 a 5 horas):

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

9. Nas pontos de inflexão da curva, diminuir o tempo de amostragem para 5 minutos;
10. Pôr as placas de Petri a incubar, durante 24 horas, em posição invertida a 37 °C.;
11. Após o período de incubação, contar o número de colónias e calcular os CFU/ml para os diferentes pontos de amostragem de acordo com a seguinte fórmula (D):

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

12. Fazer o gráfico da variação da densidade óptica e dos CFU/ml com o tempo:
 - 12.1. O gráfico deverá possuir dois eixos de Y com escala diferente; o da densidade óptica que terá uma escala linear, e o da variação dos CFU/ml que terá uma escala semi-logarítmica. O eixo dos X tem uma escala linear e é o eixo do tempo.
13. Calcular a constante de crescimento e o tempo de geração de acordo com as fórmulas A, B ou C.

QUESTÕES:

1. Qual a constante de crescimento e o tempo de duplicação da cultura bacteriana?
2. Que implicações tem para a saúde pública, uma bactéria de crescimento rápido?
3. O que acontecerá às bactérias de origem humana quando são colocadas num ambiente como o marinho?
 - 3.1. Qual o principal parâmetro responsável por esta situação?
 - 3.2. Será que todas se vão comportar da mesma forma?

ACTIVIDADE SUPLEMENTAR B. CINÉTICA DE UM FAGO

Em cultura, a infecção de uma bactéria por um fago pode ser dividido em vários passos sequenciais:

- (i) Colisão do fago com a bactéria susceptível;
- (ii) ligação do fago à bactéria;
- (iii) injeção do ácido nucleico do fago na bactéria;
- (iv) período de eclipse, durante o qual as proteínas e os ácidos nucleicos do fago são sintetizados;
- (v) período post-eclipse durante o qual as partículas fágicas amadurecem;
- (vi) libertação dos fagos;
- (vii) difusão dos novos fagos e procura de novas bactérias para infectar.

Desde os primeiros estudos efectuados por Félix d'Herelle (1926), as interacções entre os fagos e os seus hospedeiros têm sido estudadas com base na “single-step growth curve” (Fig. 2) ou curva da cinética de um fago (Ellis & Delbrück, 1939). Os dois parâmetros biológicos mais importantes no estudo das interacções de um fago com o seu hospedeiro, são o período de latência e o período de eclipse. O período de eclipse é o

intervalo de tempo que vai do momento de infecção até ao momento em que partículas fágicas capazes de infectar novas bactérias são produzidas no interior da célula hospedeira. O período de latência é o intervalo de tempo que vai do momento em que se dá a infecção (fase ii e iii) até ao momento da libertação de novas partículas fágicas para o meio ambiente (fase vi).

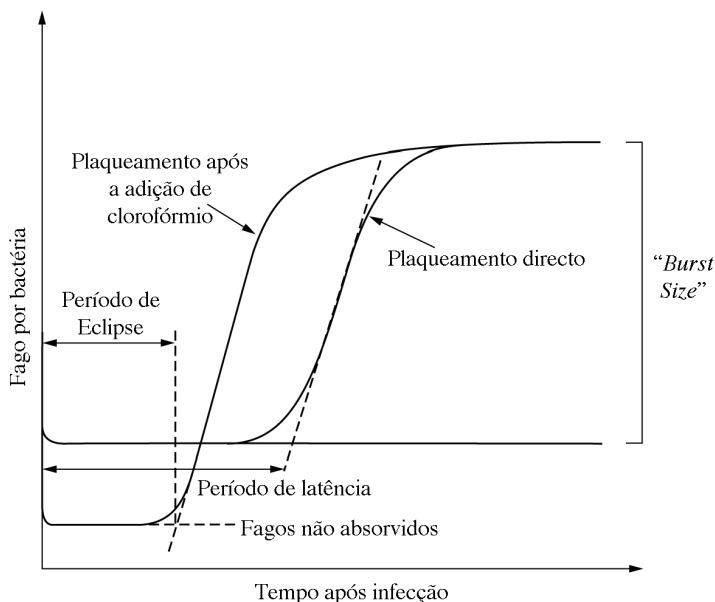


Figura 2. Cinética de um fago com base na “Single step growth curve” (adaptado de Guttman *et al.*, 2005).

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

Na “*single-step growth curve*”, os fagos são misturados com a bactéria hospedeira a uma baixa multiplicidade de infecção (0,1 a 1 fago/bactéria) (*Multiplicity Of Infection - MOI*). O volume de fago a adicionar à cultura bacteriana para efectuar esta técnica, é dado pela seguinte fórmula (E):

$$V_f = \frac{V_c \cdot MOI \cdot C_b}{C_f} \quad (E)$$

em que:

V_f é o volume de fagos a adicionar à cultura bacteriana (em ml);

V_c é o volume total da cultura (em ml);

MOI é a multiplicidade de infecção que pretendemos utilizar;

C_b é a concentração bacteriana na cultura no momento da infecção (em CFU/ml);

C_f é a concentração da amostra de fagos que vamos utilizar na infecção (em PFU/ml).

A intervalos de tempo pré-determinados, a amostra é plaqueada para se determinar os centros de infecção. Um centro de infecção resulta de uma única partícula fágica ou de uma célula bacteriana infectada que sofre lise, libertando os fagos para o meio, originando-se assim uma placa de lise.

De um modo geral, inicialmente o número de placas de lise mantém-se constante (período de latência), findo o qual este número aumenta exponencialmente, estabilizando num valor muitas vezes superior ao inicial. A razão entre o número de placas de lise antes e depois do processo de infecção chama-se “*burst size*”.

O “*burst size*” e o período de latência são característicos de cada fago sobre determinadas condições, podendo ser afectados pela estirpe hospedeira, meio de cultura e temperatura de crescimento.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

Como foi referido, para além do período de latência, na curva da cinética de um fago temos que considerar ainda o período de eclipse, que foi inicialmente descrito por Doermann (1953). Se durante este período, as bactérias forem lisadas a diferentes intervalos de tempo após a infecção, verifica-se que, até certo momento, os fagos parecem ter desaparecido. O período de eclipse foi um mistério até que a natureza dos fagos e do seu processo de infecção ter sido compreendido. Verificou-se então que, durante este período, não estavam presentes fagos no interior das bactérias infectadas, estando apenas presente o seu ácido nucleico. Com base nestes e noutros dados, deduziu-se que durante o período de eclipse ocorria a síntese do ácido nucleico e das proteínas que vão constituir os novos fagos. Se durante o período de eclipse se provocar, com auxílio de clorofórmio, a lise da cultura bacteriana e uma amostra desta for plaqueada, vai conseguir-se determinar o período de eclipse e subsequente síntese intracelular de novas partículas fágicas.

Como se pode ver, o processo de infecção e multiplicação dos fagos envolve uma série de passos muito bem programados (Fig. 3). A eficiência, sincronização e outros aspectos deste processo

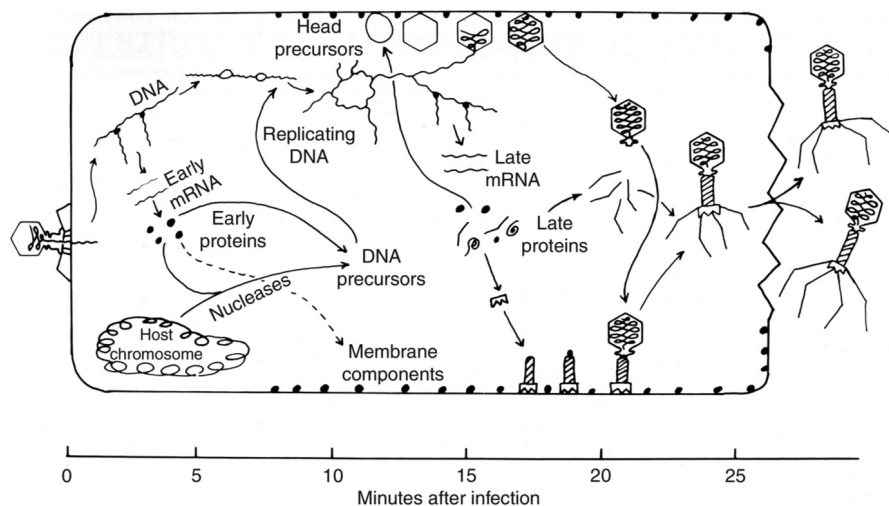


Figura 3. Diagrama do processo de infecção do fago T4 (adaptado de Mathews *et al.*, 1983).

podem ser afectados pelo estado metabólico da célula hospedeira e, em muitos casos, a célula hospedeira pode não ser capaz de se adaptar a grandes alterações metabólicas que ocorram no meio ambiente.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

PROTOCOLO (4 a 5 horas):

1. Escolher o fago que originou o melhor “Host Range” na Actividade 4 - “Host Range” dos fagos isolados;
2. No dia anterior a realizar-se a cinética do fago, a partir de uma colónia bacteriana fazer uma cultura nocturna com a *E. coli* B fornecida em 5 ml de meio LB e colocar a incubar a 37 °C durante a noite;

NOTA: 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.

3. No dia seguinte, medir OD da cultura nocturna (600 nm);
4. Fazer uma cultura diária em 10 ml de LB, a partir de uma diluição 1/100 da cultura nocturna (cultura A);
5. Encher tubos de ensaio estéreis com 3 ml de LB Top e deixar arrefecer em banho-maria a 55 °C (durante pelo menos 30 minutos);
6. Colocar 0,1 ml de formol em tubos de ensaio estéreis;
7. Marcar as placas de Petri com as diferentes diluições bacterianas e de fagos para os diferentes intervalos de tempo.
8. Calcular o volume de fago (fórmula E) a adicionar-se à cultura bacteriana de modo a ter-se um MOI de 0,1;

NOTA: O Cálculo do MOI deve ser feito para a concentração da cultura bacteriana em fase lag.

9. Fazer uma cultura diária em 50 ml de LB Broth, a partir de uma diluição 1/100 da cultura nocturna (cultura B);
10. Adicionar, à cultura B, o volume de fago previamente calculado:
 - a. Agitar bem a cultura;
 - b. Retirar, para uma cuvete de espectrofotómetro, 1 ml da cultura e medir a OD a 600 nm (tempo zero);
 - c. Retirar 0,5 ml da cultura e colocar no tubo com clorofórmio, agitar bem e fazer diluições seriadas 1/10 até -8 em tampão de conservação;
 - d. Colocar 0,1 ml da cultura A em 8 tubos com LB Top e 0,1 ml de cada uma das diluições de fagos e plaquear;

NOTA: Em caso de dúvida sobre a técnica do plaqueamento de fagos, consultar o protocolo da Actividade 4 – Isolamento e purificação de fagos patogénicos para *E. coli* B.

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

11. Retirar 0,5 ml da cultura, colocar num tubo estéril, e fazer diluições seriadas 1/10 até -8 em soro fisiológico, mantendo-os posteriormente em gelo;
 - a. Fazer o espalhamento em superfície de 0,1 ml de cada uma das diluições;

NOTA: Em caso de dúvida sobre a técnica do espalhamento em superfície, consultar o protocolo da Actividade 2 – Isolamento e purificação de *E. coli* de amostras de água.
12. Repetir o ponto 10 e 11 a cada 15 minutos;
13. Pôr as placas de Petri a incubar, durante 24 horas, em posição invertida a 37°C;

NOTA: 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.
14. Após o período de incubação, contar o número de colónias e calcular os CFU/ml para os diferentes pontos de amostragem;
15. Após o período de incubação, contar o número de placas de lise e calcular os PFU/ml para os diferentes pontos de amostragem:

$$PFU / ml = \text{Número de placas de lise} \cdot \frac{1}{\text{Diluição}} \cdot 10 \quad (F)$$

16. Fazer o gráfico da variação da densidade óptica, dos CFU/ml e PFU/ml com o tempo:
 - a. O gráfico deverá possuir 2 curvas distintas, uma para os CFU/ml (sobreviventes bacterianos) e PFU/ml. Ele deverá ter dois eixos de Y com escala diferente; o da densidade óptica que terá uma escala linear, e o da variação dos CFU/ml terá uma escala semi-logarítmica. O eixo dos X tem uma escala linear e é o eixo do tempo.

QUESTÕES:

1. Qual a importância do estudo da cinética de um fago?
2. Verificou-se o aumento do número de sobreviventes bacterianos com o tempo?
 - 2.1. Qual a razão para isso?
3. O que poderia explicar o aumento do número de sobreviventes bacterianos?
 - 3.1. Que medidas se poderiam tomar para evitar o aumento do número de sobreviventes bacterianos?

E QUANDO OS ANTIBIÓTICOS NÃO FUNCIONAM?

QUESTÕES GERAIS FINAIS:

1. Será que um fago isolado para *E. coli* pode ser usado contra outra espécie bacteriana?
 - 1.1. Justifique a sua resposta.
2. Será que as bactérias são capazes de desenvolver resistência aos fagos?
 - 2.1. Justifique a sua resposta.
 - 2.2. Se as bactérias forem capazes de desenvolver resistência aos fagos, será que estes podem ser utilizados da mesma forma que os antibióticos?
 - 2.3. Se o desenvolvimento de resistências for possível, que medidas se deverão tomar para as limitar?
 - 2.3.1. Que passos se devem tomar para ultrapassar o desenvolvimento de resistências?
3. Neste trabalho, falamos da aplicação de fagos para o tratamento de doenças. No entanto, que papel podem eles ter no meio ambiente, em particular nos oceanos?

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

d'Herelle, F. (1926). *The Bacteriophage and its Behavior*, Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

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

Guttman B., Raya, R., Kutter, B. (2005). *Basic Phage Biology in Bacteriophages Biology and Application*

(Kutter, E., Sulakvelidze, A. Ed.) CPR Press Boca Raton.

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