



ISOLAMENTO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS COM POTENCIAL APLICAÇÃO ANTIMICROBIANA CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE INTERESSE MÉDICO.

MICHELE ZORTEA¹, ANA CAROLINA RIBAS¹, GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI²

1 Introdução/Justificativa

Nos últimos anos tem ocorrido um aumento do número de infecções causadas por bactérias multirresistentes aos antibióticos disponíveis para tratamento, aumentando a morbimortalidade causada por doenças infecciosas. Uma saída para tratar tais infecções tem sido buscar alternativas como o uso de bacteriófagos, que são vírus específicos que infectam somente bactérias. Seu uso no controle de infecções bacterianas apresenta importantes vantagens: os bacteriófagos são abundantes e fáceis de serem isolados; não são tóxicos, não infectam e nem se replicam em células eucarióticas e são seguros ao meio ambiente.

2 Objetivos

Objetivo geral: Isolar bacteriófagos do meio ambiente que poderiam ter utilidade como potenciais agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções bacterianas em humanos.

Objetivos específicos: Coletar resíduos provenientes de esgoto urbano contendo um extrato rico em patógenos e flora intestinal humana; Isolar os bacteriófagos destas amostras de esgoto que sejam específicos para as seguintes bactérias patogênicas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*; Determinar a concentração máxima de bacteriófagos obtidos através de ensaio de titulação viral.

3 Material e Métodos/Metodologia

1. Linhagens bacterianas a serem utilizadas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. **2. Cultivo bacteriano:** meio líquido LB

¹ Discente do curso de Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo-RS, contato: michelezortea@gmail.com

² Docente do curso de Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo-RS, **Orientador.**



(Meio Luria-Bertani) e meio sólido LB com ágar a 1,5%. Os cultivos realizados a 37°C. **3.**

Isolamento de bacteriófagos de amostras líquidas: As amostras foram isoladas a partir de água de esgoto coletada junto a Estação de Tratamento de Esgotos da Universidade de Passo Fundo (UPF). O sobrenadante foi decantado em recipiente separado e misturado com polietilenoglicol a 10% (m/v) e posteriormente decantado por pelo menos 12 horas a 4°C. Em seguida, foi centrifugado a 11.000g por 20min. O precipitado foi ressuspensão em 8-10ml de tampão de diluição de fago (tampão SM: 50mM TRIS-Cl pH7,5; 0,1M NaCl; 8mM MgSO₄·7H₂O; 0,01% gelatina) e extraído uma vez, com igual volume de clorofórmio seguido por decantação a 4°C e centrifugação (4000g, 10min, 4°C) e mantido a 4°C. **4.**

Plaqueamento de bacteriófagos: 300µl do concentrado de vírus foi misturada com 200µl de uma cultura bacteriana e incubada por 5-30min a 37°C. Em seguida, foi adicionado 3ml de meio semi-sólido (0,6% ágar) fundido a 50°C. A mistura resultante foi despejada em placa de cultura. Após a solidificação do meio semissólido as placas foram incubadas durante a noite em estufa, sob temperatura adequada. No dia seguinte, a presença de placas de lise foi observada. Após esta preparação, placas de lise individuais foram coletadas com palitos autoclavados para servir como fonte para propagação de fagos em cultura líquida. **5.**

Titulação de bacteriófagos: Para cada titulação, uma placa contendo a bactéria hospedeira adequada em meio nutriente com ágar foi preparada conforme mencionado anteriormente. Em seguida, diluições decimais de cada estoque de bacteriófagos foram feitas em tampão SM (diluições de $1,0 \times 10^{-1}$ até $1,0 \times 10^{-6}$) e 20µL destas diluições foram aplicadas em placas contendo uma monocamada de bactérias solidificadas em meio ágar nutriente. Em seguida as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. No dia seguinte, o número de placas de lise foi contado e o título do estoque de bacteriófagos, expresso em unidades formadoras de placas (PFUs), determinado de acordo com a fórmula: (número de placas de lise)/(volume de diluição em µl x fator de diluição) x 1000 µl/ml = PFU/ml.

4 Resultados e Discussão

Foram coletadas 05 amostras de 01 Litro de esgoto não tratado na estação de tratamento de esgoto da Universidade de Passo Fundo (UPF), as quais foram submetidas ao laboratório para filtragem e processamento, realizado pela equipe do professor colaborador Prof. Vandré



Brião, na UPF. As amostras foram enviadas ao laboratório de microbiologia da UFFS Campus Passo Fundo para execução do protocolo de tentativa de isolamento de bacteriófagos. Foi então realizado o protocolo de enriquecimento com as cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*. O processo de enriquecimento com as cepas padrões de bactérias foi realizado utilizando cada cepa de bactéria isoladamente gerando 32 amostras de esgoto enriquecido. Cada uma das amostras foi submetida ao protocolo de isolamento de bacteriófagos com clorofórmio pelo menos três vezes, de forma a garantir o isolamento do maior número possível de bacteriófagos.

Em seguida, foi feito o plaqueamento em meio semissólido contendo monocamada das bactérias de interesse e a presença de bacteriófagos foi então constatada se na monocamada de bactérias fosse observada a formação de placas de lise, causadas pela presença de bacteriófagos líticos. Foram observadas placas de lise (bacteriófagos) em todas as amostras de esgoto coletada, mas somente em culturas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica typhimurium*. Nenhuma tentativa de isolar bacteriófagos específicos para *Pseudomonas aeruginosa* teve êxito.

De um total de 32 amostras de esgoto enriquecidas (10 de *Salmonella*, 12 de *Pseudomonas* e 10 de *Staphylococcus*), sete apresentaram placas de lise (04 amostras de *Salmonella* e 03 de *Staphylococcus* e nenhuma em *Pseudomonas*). Todas as placas de lise observadas foram submetidas ao protocolo de propagação de fagos por três passagens consecutivas em meio semissólido, de modo a isolar o clone específico de bacteriófago da placa de lise observada no isolamento inicial, resultando em um total de oito placas de lise propagáveis (clones de bacteriófagos), sendo 06 de *Salmonella*, denominados F-SAL-01 a 06 e 02 de *Staphylococcus*, denominados F-STA-01 e F-STA-02. Após a terceira passagem consecutiva o bacteriófago foi propagado em meio líquido em larga escala, em um volume final de 15 mL e armazenado a 4°C. Nem todos os fagos observados no isolamento inicial foram possíveis de serem isolados durante as três passagens consecutivas em meio semissólido.

Os bacteriófagos propagados foram então submetidos aos ensaios de titulação para determinar a concentração de vírus em cada estoque. Os estoques de bacteriófagos foram



submetidos ao protocolo de titulação, obtendo-se o seguinte resultado: bacteriófagos de *Salmonella* F-SAL 01 a 06 obtiveram títulos iguais a $1,331.10^5$; $5,76.10^5$; $4,76.10^4$; $2,77.10^5$; $4,99.10^6$ e $1,75.10^6$ PFU/mL, respectivamente, enquanto os bacteriófagos de *Staphylococcus* F-STA-01 e F-STA-02 apresentaram títulos de $4,33.10^6$ e $3,66.10^5$ PFU/mL.

5 Conclusão

A análise do título das amostras revela uma heterogeneidade na cinética de replicação dos diferentes fagos isolados. Todos os oito bacteriófagos isolados foram cultivados nas mesmas cepas de bactérias, com a mesma quantidade de bactérias no inóculo, incubados sempre nas mesmas condições, e, mesmo assim, cada clone de vírus apresentou um título diferente. Tal fato pode indicar que as amostras de vírus isoladas provavelmente podem se tratar de espécies de vírus diferentes, cada um com uma cinética de replicação distinta, ou então que no isolamento inicial realizado a quantidade inicial de vírus obtida variou bastante de ensaio para ensaio. Esta resposta somente poderá ser dada em uma próxima fase do projeto, na qual os vírus isolados serão analisados molecularmente para se determinar se são oito espécies diferentes de vírus ou se existem vírus da mesma espécie repetido isolado mais de uma vez.

Referências

- SCHOOLNIK, G. K.; SUMMERS, W. C.; WATSON, J. D. Phage offer a real alternative. *Nature Biotechnology*, v. 22, n. 5, p. 505-506, mai. 2004.
- SUMMERS, W. C. Bacteriophage Therapy. *Annual Reviews of Microbiology*, v. 55, p. 437-451, 2001.
- SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS JR, J. G. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 3, p. 649-659, mar. 2001.
- SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, in press. 2005.

Palavras-chave: Bacteriófago; Infecções bacterianas; Resistência a antibióticos.

Financiamento: Edital CNPq – PIBIC: 398/GR/UFFS/2017.