

Universidade Estadual Julho de Mesquita Filho

Universidade Federal de São Paulo

Disciplina de Infectologia - Departamento de Medicina

Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – LEMC/Laboratório Alerta

Caracterização de Bacteriófagos Infectando Isolados Clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* Armazenados em uma Coleção de Cultura.

Trabalho de Conclusão de Curso de **Roberta Cristina Cabral Mingrone**

Orientador: **Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari**

Supervisora: **Prof. Dra. Daniela Carvalho dos Santos**

São Paulo

2011

Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho

Universidade Federal de São Paulo

Disciplina de Infectologia - Departamento de Medicina

Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – LEMC/Laboratório Alerta

Roberta Cristina Cabral Mingrone

Caracterização de Bacteriófagos Infectando Isolados Clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* Armazenados em uma Coleção de Cultura.

Projeto de iniciação científica
apresentado à seção de
Graduação como trabalho de
conclusão do curso
Biomedicina, da Universidade
Estadual Julio de Mesquita
Filho - UNESP, sob orientação
do Prof. Dr. Antônio Carlos
Campos Pignatari.

São Paulo

2011

MINGRONE, Roberta C. Cabral.

Caracterização de Bacteriófagos Infectando Isolados Clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* Armazenados em uma Coleção de Cultura./ Roberta C. Cabral Mingrone - São Paulo, 2011.

Trabalho de Conclusão do Curso de Biomedicina da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho - UNESP. Desenvolvido na Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

Key-words: 1. *Pseudomonas aeruginosa* , 2. Bacteriófagos, 3. Coleção de Cultura, 4. Microscopia Eletrônica, 5. Biologia Molecular, 6. Resistência aos antimicrobianos.

À minha mãe **Cristina Cabral**,
que nos apoiou nos momentos difíceis, despertou
nossa sede para o conhecimento e incentivou
nosso crescimento intelectual ...

Dedico

Também...

À minha avó **Djanira Cabral** e ao meu avô **Pedro**

Cabral, por uma infância maravilhosa e todo apoio apesar de não estarem mais entre nós...

Ao meu padrasto **Mauro Cabral** por toda sua coragem e perseverança na luta contra o câncer e, também, por todas as suas conversas e orientações.

Ao meu pai **Sergio**, que eu amo tanto apesar do seu gênio...

Ao meu irmão **Renan**, por saber que sempre teremos um ao outro...

Ao meu noivo **Diego**, por participar dos meus sonhos, e ser companheiro...

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari por abrir as portas do LEMC, por aceitar a orientação do meu projeto e por ser um exemplo a seguir.

Agradeço à Cynthea Carolina Sanches Zanetti por abrir as portas do seu conhecimento, me ensinar e guiar em toda a minha trilha da pesquisa, principalmente por sua amizade.

Agradeço à Rita, Vinicius Sales, e à Martha Gabriella pela ajuda técnica e grande amizade.

Agradeço a todos do instituto Adolfo Lutz, por toda ajuda no setor de Microscopia Eletrônica.

Agradeço a Fernanda Inoue, Rafaela Sitolin, Katia Lorenzete e Vinicius Gaspari por toda amizade, ombro amigo, companheirismo e força. A contribuição que vocês deram foi inestimável! Devo muito a vocês!

Agradeço à secretária do LEMC Rosana Capecce por ter sido tão prestativa, eficiente e amiga, sempre disposta a ajudar.

Agradeço a Sebastiana pela companhia nos experimentos matinais, pelo cafezinho e por escutar todos meus desabafos quando as coisas não estavam bem.

Agradeço a todos os meus amigos e companheiros do LEMC/ALERTA por todo auxílio!!!

SUMÁRIO

Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	14
3. Revisão Bibliográfica.....	15
3.1. O LEMC.....	15
3.1.1. A Coleção de Cultura.....	15
3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
3.2.1. Fatores de Virulência.....	17
3.2.2. Mecanismos de Resistência aos antimicrobianos.....	18
3.3. Bacteriófagos.....	21
3.3.1. História dos Bacteriófagos.....	21
3.3.2. Classificação dos Bacteriófagos.....	23
3.3.3. Replicação dos Bacteriófagos.....	25
3.3.4. Bacteriófagos em <i>P. aeruginosa</i>	27
3.3.5. Terapia Fágica.....	30
4. Material e Métodos.....	32
4.1. Amostras bacterianas e bacteriófagos.....	32
4.2. Teste de influência da temperatura no aparecimento do halo lítico na placa de cultura.....	32
4.3. Padronização da solução estoque de fago.....	33
4.3.1. Obtenção da solução estoque de fago – adaptado de Sillankorva, 2004.....	34

4.3.2. Obtenção de solução estoque de fago – adaptado de Tom Bergan, 1978.....	37
4.4. Avaliação da atividade lítica dos bacteriófagos, infectando diferentes hospedeiros.....	37
4.5. Caracterização da morfologia dos bacteriófagos por microscopia eletrônica.....	38
5. Fluxograma.....	41
5.1. Fluxograma do Estudo.....	41
5.2. Fluxograma da Microscopia Eletrônica.....	42
6. Resultados.....	43
6.1. Teste de influência da temperatura na formação no halo de lise na placa de meio de cultura.....	43
6.2. Teste de infecção das amostras de <i>P. aeruginosa</i> com as soluções estoque de bacteriófagos.....	43
6.3. Fotos das diferentes técnicas de Microscopia eletrônica descritas no item 4.5 material e métodos.....	45
6.3.1. Fotos obtidas no Centro de Microscopia da UNESP.....	45
6.3.2. Fotos obtidas no Centro de Microscopia da UNIFESP..	45
6.3.3. Fotos obtidas no Centro de Microscopia do IAL.....	47
7. Discussão.....	50
8. Conclusão.....	55
9. Referências Bibliográficas.....	56
10. Anexos.....	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das principais famílias de Bacteriófagos.....	28
--	-----------

Tabela 2: Tabela de isolados clínicos e controles negativos para bacteriófagos utilizados no estudo	36
--	-----------

Tabela 3: Influência da Temperatura de incubação na formação de placa de lise	43
--	-----------

Tabela 4: Interação espécie-específica entre as possíveis cepas propagadoras e os bacteriófagos extraídos dos isolados clínicos.....	44
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estratégias de virulência da <i>P. aeruginosa</i> durante o processo de infecção.....	22
Figura 2: Fotografia de bacteriófago obtida por microscopia eletrônica de coloração negativa.....	22
Figura 3: Classificação dos fagos com base na morfologia e no tipo de ácido nucleico.....	24
Figura 4: Adsorção do fago a uma célula hospedeira e conseqüente penetração por injeção de ácido nucleico.....	25
Figura 5: Tipos de ciclos fágicos.....	26
Figura 6: Fotografia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
Figura 7: Fotografia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
Figura 8: Fotografia de <i>P. aeruginosa</i> com suposta contaminação de microrganismo desconhecido.....	45

Figura 9: Fotografia de suposto bacteriófago extraído do isolado clínico 9583 do banco de microrganismo do LEMC.....	46
Figura 10: Fotografia de suposto bacteriófago extraído do isolado clínico P9583 do banco de microrganismo do LEMC.....	46
Figura 11: Fotografia de suposto bacteriófago extraído do isolado clínico P9583 do banco de microrganismo do LEMC.....	46
Figura 12: Fotografia da amostra controle de infecção de <i>E. coli</i> e fago lambda.....	47
Figura 13: Fotografia da amostra controle de infecção de <i>E. coli</i> e fago lambda.....	47
Figura 14: Fotografia obtida no momento de infecção do fago lambda na bactéria <i>E. coli</i> 7026.....	48
Figura 15: Fotografia do bacteriófago do isolado P9842 da coleção de cultura.....	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEME – Centro de Microscopia Eletrônica

D.O. - Densidade ótica

LEMC – Laboratório Especial de Microbiologia Clínica

LB – Luria Bertani (meio de cultura bacteriana)

IAL – Instituto Adolfo Lutz

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

NaCl – Cloreto de Sódio

PBP – Proteína ligadora de penicilina

PEG 8000 – Polietileno Glicol 8000

PFGE – Eletroforese de campo pulsado

PTA – Fosfotungstato de potássio

rpm – Rotações por minuto

TSB – *Tryptone Soya Broth* (caldo trípico de soja)

UNESP – Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

UV – Ultravioleta

Resumo

Objetivos: Isolar, concentrar e purificar bacteriófagos de amostras de *P. aeruginosa*; Observar a capacidade infectante dos bacteriófagos em amostras de *P. aeruginosa* sensíveis e multirresistentes à antimicrobianos; Caracterizar os bacteriófagos através de técnicas de microscopia eletrônica; **Material e Métodos:** Foram estudadas 10 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* originárias da coleção de cultura do LEMC foram submetidas aos experimentos de teste de temperatura ideal para o aparecimento do halo de lise em placa de cultura MaConkey e a dois métodos de extração para concentração dos fagos em uma solução estoque com clorofórmio (Sillankorva) e com filtração e centrifugação (Bergan). Três amostras infectadas de *P. aeruginosa* multirresistentes de isolados clínicos e a amostra controle PA01, multissensível foram avaliadas por TRÊS técnicas de microscopia eletrônica de transmissão para caracterizar eventuais fagos morfolologicamente (“on grid”, “on drop” e extração direta do halo de lise em placa de cultura). **Resultados e Conclusão:** A temperatura de 37°C foi ideal para obtenção de halo de lise. As soluções estoque obtidas, através das metodologias de Sillankorva e Bergan, tiveram resultado satisfatório na infecção dos isolados clínicos multirresistentes e controle negativo para fago. Dentre as três técnicas testadas de microscopia eletrônica a direta da placa de lise foi a mais adequada para a obtenção de micrografia dos fagos.

Abstract

Objectives: To isolate, to concentrate and to purify bacteriophages from isolates of *P. aeruginosa*; To observe the capacity of bacteriophages to infect isolates of *P. aeruginosa* susceptible and multiresistant to antimicrobial; To characterize bacteriophages by electronic microscopy techniques. **Material and**

Methods: 10 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from LEMC culture collection were submitted to the experiments of ideal temperature for the lyse region appearance in the MacConkey culture plate and 2 extraction methods for the concentration of the phages, chloroform (Sillankorva) and filtration plus centrifugation (Bergan). Three infected clinical isolates of multiresistant *P. aeruginosa* and one susceptible isolate (PA01) were evaluated by 3 transmission electron microscopy techniques to characterize phages morphologically ("on grid", "on drop" and direct extraction from the lyse region of the culture plate). **Results and Conclusion:** The ideal temperature to obtain lyses region was 37°C. The stock solutions, obtained through the methodologies of Sillankorva and Bergan, had satisfactory results in infecting the multiresistant isolate and the negative control. Among the 3 techniques of electronic microscopy tested the direct from the lyse plate was the best to obtain the micrography of the phages.

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas são uma das principais preocupações dos órgãos de saúde pública na atualidade, principalmente, pois as taxas de resistência entre os patógenos Gram-negativos não fermentadores como *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* tem aumentado substancialmente na última década.

A *P. aeruginosa* destaca-se como um dos principais agentes responsáveis pelo aumento das infecções nosocomiais, que elevam a taxa de mortalidade principalmente, pela limitação de agentes antimicrobianos efetivos disponíveis.

Este agente é um patógeno com grande potencial propagador em ambientes hospitalares, equipamentos médicos e até mesmo em desinfetantes. É associado à alta morbidade e mortalidade nos serviços de cirurgia, oncologia, hematologia, unidades de tratamento intensivo e de queimados, pois atinge somente indivíduos imunodeprimidos, em geral pacientes hospitalizados, com queimaduras severas ou com fibrose cística (Gales *et al.*, 2004; Fluit *et al.*, 2000; Budzik *et al.*, 2004). As infecções causadas por este microrganismo são, geralmente, difíceis de tratar devido à sua virulência e à sua resistência a diversos agentes antimicrobianos (Quinn, 1994; Carmeli *et al.*, 1999; Gales *et al.*, 2003).

A crescente preocupação em relação ao aumento dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, adquiridos pelas bactérias ao longo dos anos, é relatado em numerosas publicações recentes que documentam este fato e o associam ao declínio na descoberta de novos antibióticos (Moellering Jr, 2011).

Diante desse contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e profiláticas para o controle de infecções, surgindo, então, um renovado interesse pela terapia fágica (McVay *et al.*, 2007; Sulakvelidze *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2007; Weber-Dabrowska *et al.*, 2000).

Bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* e tantas outras de importância clínica, são armazenadas em uma coleção de cultura no Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), referência em microbiologia no país e na América Latina, que atua realizando testes especiais de sensibilidade e projetos internacionais de vigilância de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

Notou-se que ao retirar algumas amostras de *P. aeruginosa* do banco de microrganismo do LEMC, quando inoculadas em ágar MacConkey para utilização em projetos de pesquisa ou para serem encaminhadas a outros laboratórios, não “cresciam” ou “cresciam” inibidas (algumas vezes apresentando placas de lise), levando à acreditar que os problemas na manutenção dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* da coleção de bactérias ocorriam devido à provável presença de bacteriófagos que infectavam as amostras, alterando seu padrão de “crescimento” e poder de infecção.

2. OBJETIVOS

1. Isolar, concentrar e purificar eventuais bacteriófagos contidos nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa*;
2. Verificar qual a melhor técnica de contrastação negativa para conseguir uma boa visualização do bacteriófago na imagem de microscopia eletrônica;
3. Observar a capacidade infectante dos bacteriófagos, infectando os isolados de *P. aeruginosa* que foram utilizados como controle negativo, tanto entre isolado sensível aos antimicrobianos quanto entre multirresistente;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O LEMC

O Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) é referência em microbiologia no país e na América Latina e foi constituído inicialmente como um laboratório de pesquisas e apoio à Microbiologia aplicada ao Controle das Infecções Hospitalares. Atualmente, atua realizando testes especiais de sensibilidade e projetos internacionais de vigilância de resistência bacteriana aos antimicrobianos. Dados clínicos dos pacientes, tais como, iniciais, idade, unidade de internação, sítio de infecção, identificação do microrganismo, teste de sensibilidade aos antimicrobianos são armazenados em banco de dados, para facilitar toda e qualquer análise ou seleção necessária. O LEMC disponibiliza esta atividade para laboratórios clínicos, hospitais e comissão de controle de infecção hospitalar que tenham interesse em armazenar bactérias para estudos especiais de microbiologia.

3.1.1. A Coleção de Cultura

Os isolados clínicos bacterianos são classificados em quatro grupos: H, P, S e A. No grupo H estão inseridas as amostras de *Haemophilus* spp. e *Neisseria* spp.; no grupo P, estão inseridas as amostras de *Pseudomonas* spp.; no grupo S estão inseridas as amostras de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans* e demais amostras de *Streptococcus* α -hemolíticos; e, finalmente, no grupo A estão inseridas todas as amostras bacterianas recebidas que não se enquadram em nenhum dos grupos citados anteriormente. Cada grupo de amostras bacterianas é armazenado em

condições diferentes. O Grupo H é armazenado em sangue de carneiro, à -70 °C; o grupo P é armazenado em água estéril, à temperatura ambiente; o grupo S é armazenado em sangue de carneiro com cinco por cento de glicerol, à -70 °C; e o grupo A é armazenado em *Tryptic Soy Broth* (TSB-Caldo tríptico de soja) com 15 por cento de glicerol, à -20 °C.

3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pertencente à família *Pseudomonaceae*, a *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose, aeróbio, não formador de esporos e móvel devido à presença de um único flagelo. Também pode produzir vários pigmentos extracelulares, os mais comuns entre as cepas são a piocianina (pigmento azul) ou pioverdina (amarelo-esverdeado) ou ambos, mas ainda podem existir outras colorações como piorrubina (vermelho) e piomelanina (marrom para o preto), ou até várias combinações desses pigmentos (Daly *et al.*, 1984).

A *P. aeruginosa* é uma bactéria metabolicamente versátil, ou seja, obtém crescimento favorável em diversos meios de cultura desde que contenham sais minerais e glicose. Sua morfologia é característica, com colônias planas e espalhadas, sem bordas regulares e bem delimitadas, produz pigmentos e apresenta odor de uvas. Existem variantes de colônias mais incomuns como as lisas, mucóides ou anãs, que são pequenas e puntiformes. Vale salientar que todos esses aspectos citados anteriormente são comuns quando a referida bactéria é semeada em meio de cultura MacConkey.

Como as espécies de microrganismos oportunistas, a *P. aeruginosa* é capaz de causar infecções invasivas em seres humanos, como pneumonia em

pacientes ventilados e infecções crônicas nas vias aéreas de indivíduos com fibrose cística (Jones *et al.*, 2010). É uma das principais causas de infecções hospitalares, atingindo o primeiro lugar como causa de pneumonia nosocomial nos hospitais brasileiros (Gales *et al.*, 2004).

No Brasil, segundo o Programa de Vigilância de Resistência aos Antimicrobianos - SENTRY, a *P. aeruginosa* foi a causa mais freqüente de infecções do trato respiratório (32%), seguido por infecções do trato urinário, ferida cirúrgica, e o sexto patógeno mais comum isolado em infecções da corrente sanguínea (7%) no período de 1997 a 2001 (Sader *et al.*, 2002).

3.2.1.1. Fatores de Virulência

São produtoras de diversos fatores de virulência celulares e extracelulares, que favorecem a colonização do seu hospedeiro e aumentam a intensidade da infecção (Figura 1).

Os fatores de virulência celulares incluem componentes da superfície da célula bacteriana que facilitam sua adesão à superfície da célula hospedeira e ativam a resposta imune, como: o pili, que são apêndices superficiais que promovem aderência do microrganismo a receptores de gangliosídeo GM-1, presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro; o flagelo, que também participa do mecanismo de aderência ao hospedeiro; e o lipopolissacarídeo presente na parede celular, que é uma endotoxina responsável por alguns dos sinais e sintomas da sepse, resultante da ativação e liberação de mediadores de vasodilatação.

Os fatores de virulência extracelulares são aqueles secretados pela célula bacteriana, como: as enzimas, um exemplo é a elastase, que degrada

imunoglobulinas e os componentes do sistema complemento; quanto às toxinas, temos como exemplos a exotoxina A e a exotoxina S, uma promove destruição tecidual inibindo a síntese protéica e a outra possui função de adesina, respectivamente; a leucocidina, substância citotóxica, que inibe a função de leucócitos e neutrófilos; a piocianina, que impede o crescimento de outras bactérias e inibe a atividade ciliar da mucosa respiratória. Além de todos esses mecanismos a bactéria ainda pode produzir polissacarídeo capsular (alginato) que permite a adesão da bactéria às superfícies epiteliais pulmonares, formando os biofilmes, responsáveis por protegê-las dos antimicrobianos e do sistema imunológico do hospedeiro. (Pearson *et al.*, 2000; Corech *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2010; Scharmann, 1976; Hay *et al.*, 2009; Pitt, 1986).

3.2.2. Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos

A resistência bacteriana aos antimicrobianos constitui um grande problema de saúde pública. A *P. aeruginosa* apresenta baixa sensibilidade a uma variedade de agentes antimicrobianos, como à maioria dos β -lactâmicos, às tetraciclina, ao cloranfenicol e grande parte das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, sendo esses mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos.

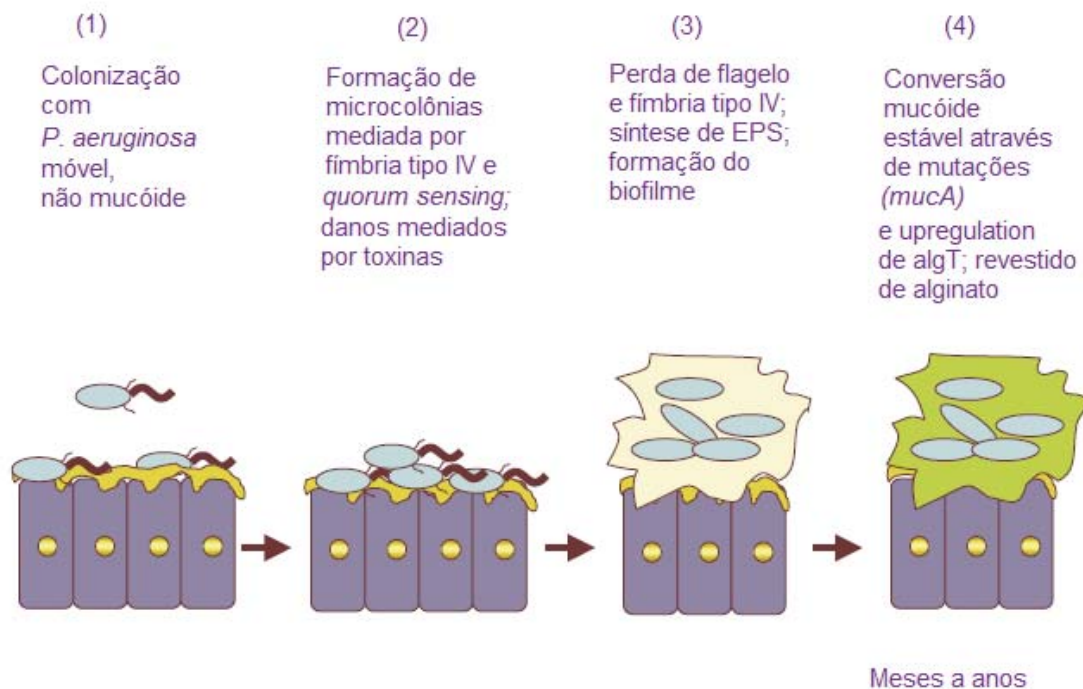


Figura 1. Estratégias de virulência da *P. aeruginosa* durante o processo de infecção (Ramsey & Wozniak, 2005).

Geralmente, as *P. aeruginosa* são sensíveis às carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina), ureidopenicilinas (azlocilina, piperacilina), algumas cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima, cefoperazona), à todas as cefalosporinas de quarta geração, ao monobactâmico aztreonam, e aos carbapenêmicos imipenem e meropenem (Strateva & Yordanov, 2009).

Dentre os principais mecanismos de resistência às drogas, observados em *P. aeruginosa*, estão: sistemas de efluxo ativo; diminuição da permeabilidade de membrana externa às drogas; mecanismos enzimáticos de resistência, como por exemplo, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos e a produção de β -lactamases cromossomais e adquiridas; e modificações do sítio de ação dos antimicrobianos, como alterações nas

Proteínas Ligadoras de Penicilinas (PBPs), resultando na diminuição da sensibilidade aos β -lactâmicos e modificações nas topoisomerasas observadas em cepas resistentes às fluoroquinolonas.

A baixa permeabilidade da sua membrana externa aos antibióticos das classes das penicilinas e betalactâmicos e a expressão constitutiva de bombas de efluxo, são mecanismos intrínsecos na *P. aeruginosa* capazes de protegê-la dos antimicrobianos e produtos adversos no ambiente em que vivem.

A codificação para a produção das beta-lactamases pode estar situada no DNA cromossômico ou no DNA extracromossômico (plasmídeos e “transposons”) bacteriano (Livermore *et al.*, 1991; Livermore *et al.*, 1993).

As enzimas betalactamases atuam hidrolisando a ligação amida do anel betalactâmico, causando, assim, a destruição irreversível do antimicrobiano (Livermore *et al.*, 1995). A atividade enzimática não é inibida pelos inibidores de betalactamase, utilizados na prática clínica, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Nordmann & Guibert, 1998). Alguns exemplos dessas enzimas são as metalo-betalactamases, betalactamase cromossômica do tipo AmpC (também conhecida como cefalosporinase)

Os sistemas de efluxo bacterianos são tipicamente formados por três proteínas, que estão localizadas na membrana interna, periplasma e membrana externa da célula bacteriana, capazes de ejetar antibióticos. São, na sua maioria, codificados por genes cromossômicos (Xavier *et al.*, 2010).

As bactérias também possuem proteínas de membrana externa, porinas, que são estruturas protéicas tridimensionais presentes na membrana externa formando canais preenchidos por água e que permitem a entrada por difusão de moléculas hidrofílicas e de baixo peso molecular, como os

aminoácidos, sacarídeos, antibióticos (Livermore *et al*, 2001a), e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (Nikaido *et. al*, 1996). Alterações estruturais nessas proteínas podem causar diminuição de sensibilidade até mesmo resistência aos antibióticos, os mais frequentes são carbapenêmicos, como imipenem e meropenem.

3.3 Bacteriófagos

Os bacteriófagos (Figura 2) ou fagos, são vírus que infectam bactéria e se multiplicam no interior dela, são amplamente distribuídos na natureza (Fischetti, 2008)

3.3.1. História dos Bacteriófagos

A história da descoberta dos bacteriófagos ou fagos tem sido controversa e sujeita a vários debates. O primeiro relato ocorreu em 1896, quando um bacteriologista notou a existência de uma elevada atividade antimicrobiana (contra *Vibrio cholerae*), sugerindo que alguma substância limitava a expansão das epidemias de cólera na região da Índia.

Os bacteriófagos, depois dessas observações, foram esquecidos por aproximadamente 20 anos até que Frederick W. Twort, cientista britânico, volta a fazer descobertas sobre eles, indiretamente, enquanto realizava pesquisas com vírus que pudessem se multiplicar em meios laboratoriais artificiais. Embora esta experiência não tenha obtido sucesso, na placa de ágar desenvolveram-se rapidamente alguns contaminantes bacterianos. Twort notou que algumas colônias bacterianas tinham sofrido uma mudança visível e

apresentavam, então, um aspecto aquoso, ou seja, mais transparente. Notou também que essas colônias tinham perdido a capacidade de se replicar e por esse motivo “lisavam”. Twort decidiu chamar este fenômeno de transformação transparente, demonstrando que ao infectar células em bom estado, com solução transparente, as bactérias tiveram suas paredes rompidas (lisadas).

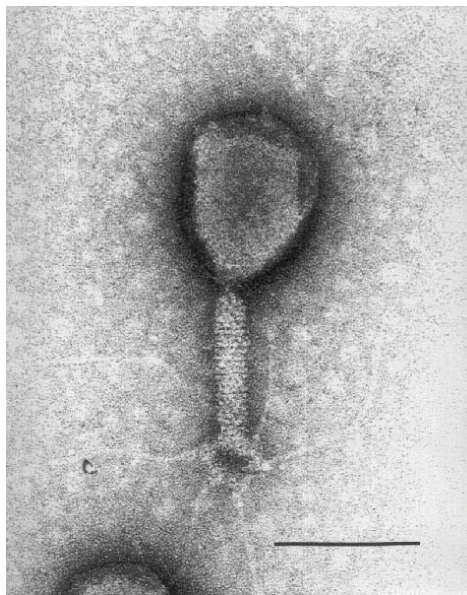


Figura 2. Fotografia de bacteriófago obtida por microscopia eletrônica de coloração negativa (Microbiology and Immunology On-line).

O pesquisador publicou um pequeno artigo sobre suas descobertas em 1915, mas os fagos só, foram oficialmente descobertos em 1917 por Félix D'Hérelle, um microbiologista do Instituto Pasteur de Paris, que investigava um grave surto de disenteria hemorrágica acometida pelas tropas francesas.

D'Hérelle continuou os seus ensaios e em pouco tempo isolou fagos de outras bactérias causadoras de doenças (ex.: cólera, antrax, difteria, praga bubônica, etc.), desenvolvendo, também, o método principal para quantificação de vírus e outras teorias, nomeadamente o do ciclo de replicação dos fagos.

Registros relatam que a contribuição dos bacteriófagos na patogenicidade das bactérias foi descoberta em 1927, quando Frobisher e Brown observaram que *Streptococcus* não toxigênicos, quando expostos a um filtrado de cultura de *Streptococcus* toxigênicos, adquiriram a habilidade de produzir a toxina da escarlatina (Frobisher & Brown, 1927). Hoje, sabe-se que tais filtrados continham um bacteriófago que codificava a toxina da escarlatina e que esses investigadores estavam descrevendo a transferência de material genético para a célula bacteriana, através da infecção pelo fago, ou seja, a transdução (Wagner & Walford, 2002).

De acordo com a descoberta da capacidade que o fago possui de lisar as bactérias, criaram-se diversas linhas de pesquisa para que a terapia fágica fosse utilizada em favor do controle de infecções bacterianas.

3.3.2. Classificação dos fagos

A classificação utilizada atualmente foi descrita por Ackerman *et al.* em 1992 (Figura 3).

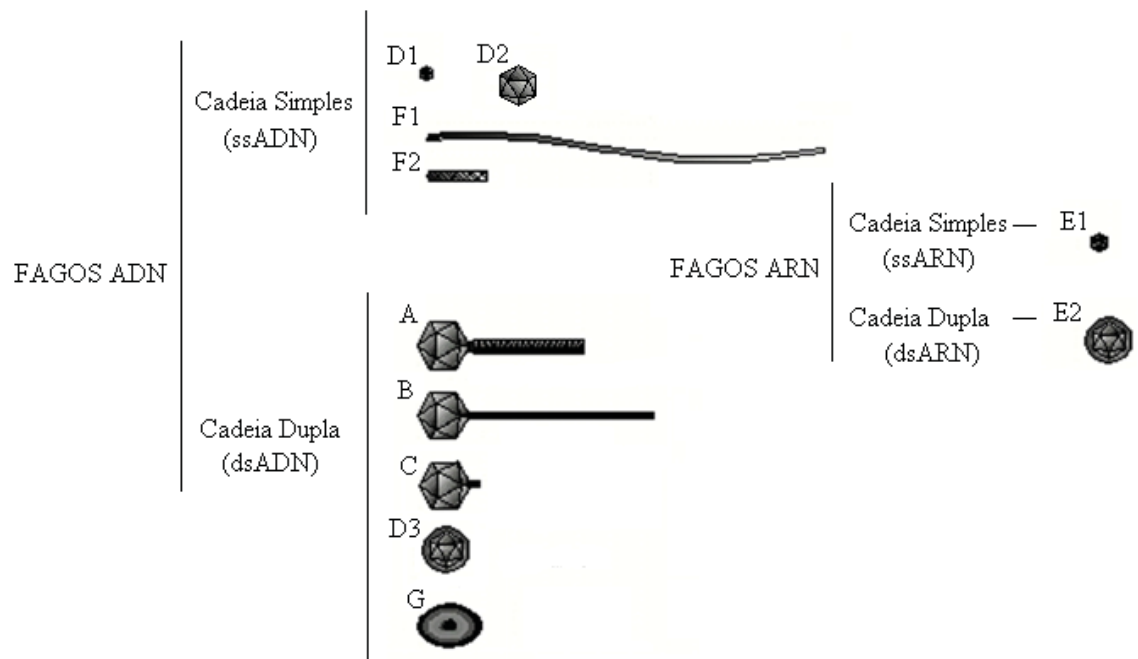


Figura 3 – Classificação dos fagos com base na morfologia e no tipo de ácido nucléico (Ackerman *et al.*, 1992).

O sistema de classificação taxonômico é regularmente atualizado e aprovado pelo Comitê Internacional da Taxonomia de Vírus (ICTV). De acordo com o ICTV os fagos são classificados com base nas propriedades morfológicas (tamanho, forma, presença ou ausência de envelope, simetria do capsídeo, estrutura), físico-químicas e físicas (massa molecular, coeficiente de sedimentação, estabilidade, tamanho do genoma (kb/kbp), ácido nucléico (cadeia simples ou dupla), genoma linear ou circular, número e tamanho de segmentos, etc.), biológicas (hospedeiro, modo de transmissão no ambiente, distribuição geográfica, patogenicidade), protéicas (número, tamanho e atividade funcional das proteínas estruturais e não-estruturais, detalhes de proteínas com atividade funcional especial), lipídicas.

3.3.3. Replicação dos Fagos

Para que um bacteriófago possa infectar uma bactéria é comum, primeiramente, que seja capaz de se ligar aos receptores específicos da célula. Uma ligação bem sucedida pode, então, ter como consequência a penetração do ácido nucléico do fago (Figura 4) para o interior da célula bacteriana (Lindberg, 1973).

Os fagos têm cinco fases de replicação, assim como os vírus: adsorção ou interação fago-hospedeiro; separação do ácido nucléico da proteína; expressão e replicação do ácido nucléico; formação de novas partículas fágicas; lise celular.

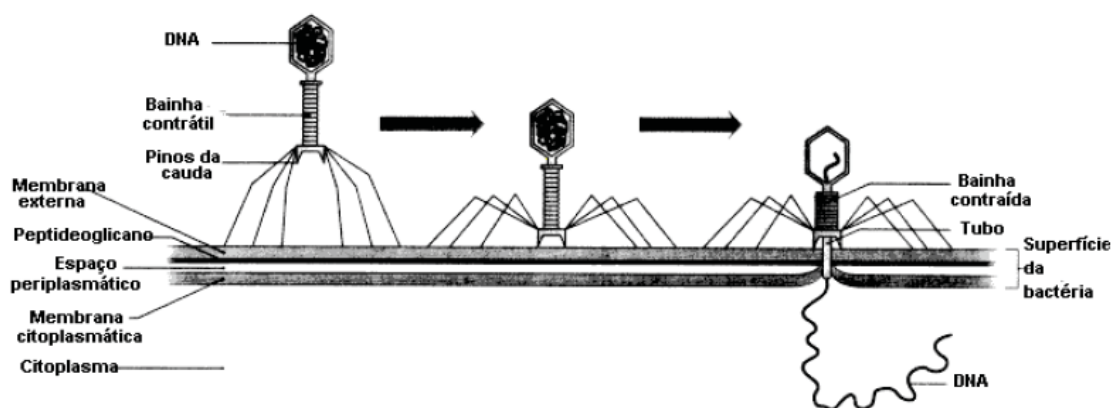


Figura 4 – Adsorção do fago a uma célula hospedeira e consequente penetração por injeção de ácido nucléico (Prezar *et al.* 1993)

Após sua entrada na célula hospedeira, quatro ciclos de replicação podem ocorrer (Figura 5), porém, é comum agrupar-se em, basicamente, duas respostas: **lítica** (causada por fagos virulentos) na qual o fago redireciona o metabolismo do hospedeiro para a produção de novos fagos que são liberados através da lise bacteriana; **lisogênica** (causado por fagos temperados) onde

fagos inserem seu material genético junto ao DNA da bactéria e o fago se replica junto com ela sem causar a lise, ou seja, o fago permanece em estado latente (prófago) e replicando juntamente com a célula hospedeira.

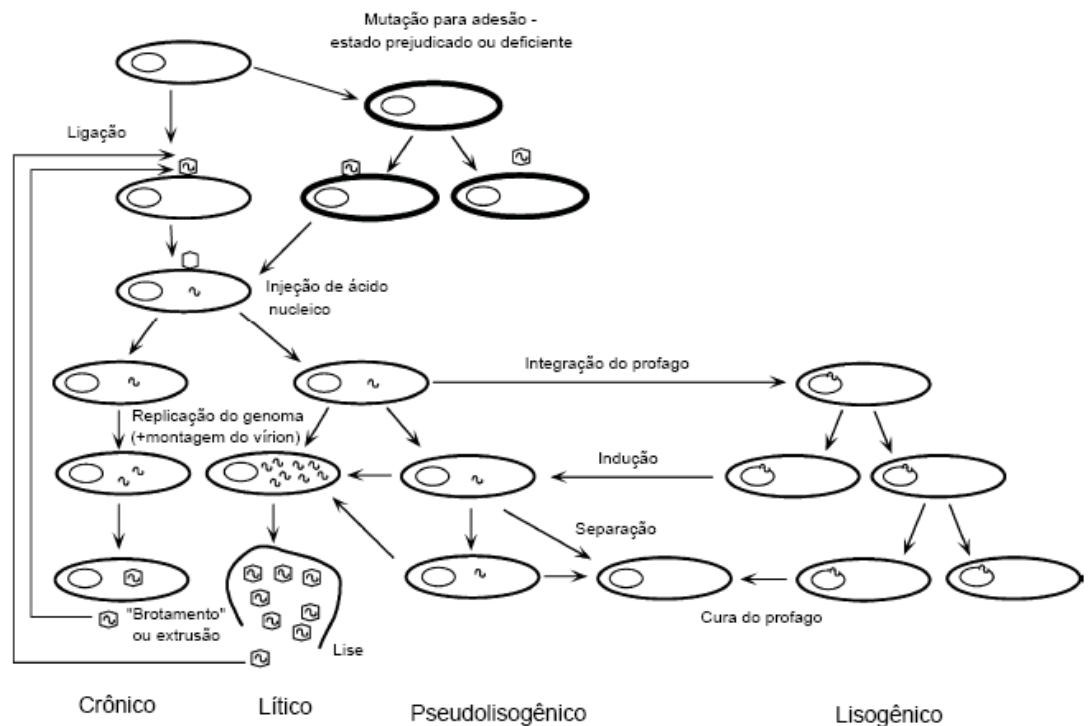


Figura 5 – Tipos de ciclos fágicos. O modelo foi adaptado de Weinbauer (2003).

Para garantir a sobrevivência do fago, é necessário que não ocorra lise total das células hospedeiras, pois ele depende dela para se replicar e continuar seu processo infeccioso.

Os fagos temperados e virulentos têm capacidade de inibir outros fagos, homólogos ou heterólogos, de invadirem a célula hospedeira em que estão inseridos para que sua estabilidade e seu processo de replicação (infecção) não sejam colocados em risco.

3.3.4. Bacteriófagos em *P. aeruginosa*

Atualmente, existem aproximadamente 5500 bacteriófagos descritos morfolologicamente, que estão distribuídos em uma ordem, 14 famílias e 37 gêneros, subdivididos de acordo com uma série de propriedades fenotípicas definidas pelo ICTV (Tabela 1). A tabela abaixo mostra os principais tipos de bacteriófagos já descritos por pesquisadores.

Tabela 1: Classificação das principais famílias de Bacteriófagos (adaptado de Ackermann, 2003).

Forma	Ácido nucleico	Família	Gênero	Detalhes	Exemplo	Membros
Com cauda	dsDNA (L)	<i>Myoviridae</i>	6	Cauda contrátil	T4	1,320
		<i>Siphoviridae</i>	7	Cauda longa, não contrátil	λ	3,229
		<i>Podoviridae</i>	4	Cauda curta	T7	771
Poliédrico	ssDNA (C)	<i>Microviridae</i>	4	Capsômeros conspicuos	ϕ X174	40
	dsDNA (C, S)	<i>Corticoviridae</i>	1	Capsídio complexo, lipídios	PM2	3?
	dsDNA (L)	<i>Tectiviridae</i>	1	Capsídio duplo, lipídios, pseudo-cauda	PRD1	19
	dsDNA (L)	SH1*		Capsídio duplo, lipídios	SH1	1
	dsDNA (C)	STIV*		Protrusões em forma de torre	STIV	1
	ssRNA (L)	<i>Leviviridae</i>	2	Tipo poliovírus	MS2	39
	dsRNA (L, M)	<i>Cystoviridae</i>	1	Envelope, lipídios	ϕ 6	3
	ssDNA (C)	<i>Inoviridae</i>	2	Filamento longo, haste curta	M13	67
	dsDNA (L)	<i>Lipothrrixviridae</i>	4	Envelope, lipídios	TTV1	7
Filamentoso	dsDNA (L)	<i>Rudiviridae</i>	1	Hastes rígidas, Tipo TMV	SIRV-1	3
	dsDNA (C, S)	<i>Plasmaviridae</i>	1	Envelope, sem capsídio, lipídios	L2	5
	dsDNA (C, S)	<i>Fuselloviridae</i>	1	Forma de limão, envelope, lipídios?	SSV1	11
	dsDNA (L, S)	—	1**	Forma de limão, envelope	His1	1
	dsDNA (C, S)	<i>Guttaviridae</i>	1	Forma de gota	SNDV	1
	dsDNA (L)	Ampullaviridae*		Forma de garrafa, NC helicoidal	ABV	1

Forma	Ácido nucleico	Família	Gênero	Detalhes	Exemplo	Membros
	dsDNA (C)	Bicaudaviridae*		Duas caudas, ciclo de desenvolvimento NC helicoidal	ATV	1
	dsDNA (L)	Globuloviridae*		Envelope, esférico, lipídios, NC helicoidal	PSV	1

C, circular; L, linear; M, multipartido; NC, nucleocapsídio; S, superenrolado; —, sem nome; *, não classificado; *Salterprovirus*. Membros indicam números de fagos examinados por microscopia eletrônica, excluindo bacteriocinas parecidas com fagos e fagos sabidamente defeituosos (baseado em computações de Janeiro de 2006; da referência Ackermann, 2007).

De acordo com a literatura, já foram observados 139 fagos da família *Myoviridae*, 241 fagos da família *Siphoviridae*, 119 fagos da família *Pododoviridae*, 499 fagos de cauda e 67 fagos filamentosos da família *Inoviridae* em *Pseudomonas* (Ackermann, 2007). Mais de 60 tipos diferentes de bacteriófagos temperados foram isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (Akhverdyan *et al.*, 1984). Os bacteriófagos dos tipos D3112 e B3 representam os dois maiores grupos de fagos que infectam esta bactéria (Wang *et al.*, 2004).

O fago D3112 é um fago temperado e, durante a infecção, o genoma do fago é integrado no genoma do hospedeiro através da transposição, o ciclo lítico é reprimido e sua integração no genoma se mantém estável. Acreditava-se que a sua estrutura genética fosse semelhante à do fago Mu, que tem como hospedeira a *E. coli*, porém, foi descoberto que não há similaridade, em nível de DNA, entre tais fagos e que a estrutura morfológica do bacteriófago D3112 é mais semelhante à do bacteriófago λ (Wang *et al.*, 2004).

O bacteriófago B3 também é um fago temperado e possui características sorológicas similares às do fago D3112. O fago B3 integra seu genoma linear no cromossomo da bactéria hospedeira, de forma randômica, durante o ciclo lítico e lisogênico, freqüentemente causando mutações nos genes da bactéria hospedeira (Braid *et al.*, 2004).

Além destes tipos de bacteriófagos, outros, como por exemplo ϕ KZ, F10, PA73, 119X, M6, F8, PA7, PA16, SD1-M, PA11, CTX, KMV, D3, F116, KZ e UNL-1 já foram reportados infectando *Pseudomonas aeruginosa* e alguns deles

com DNA seqüenciado (Krylov *et al.*, 2003; Kwan *et al.*, 2006; Shaffer *et al.*, 1999).

Como citado anteriormente, os bacteriófagos podem alterar propriedades relevantes ao processo de infecção, como a adesão, a colonização, a invasão, a capacidade de se difundir pelos tecidos humanos, a resistência às defesas imunes do indivíduo, produção de exotoxinas, sensibilidade aos antimicrobianos e transmissibilidade entre humanos. Consta na literatura que bacteriófagos tenham alterado propriedades de virulência em *P. aeruginosa*. O fago FIZ15 promove a capacidade de adesão desta bactéria às células epiteliais bucais (Wagner & Waldor, 2002).

3.3.5. Terapia Fágica

Durante as duas últimas décadas, tem sido mostrado que a terapia com fagos está se tornando uma importante alternativa no tratamento de infecções bacterianas. Em muitos casos de tratamento em humanos e animais, foram obtidos resultados bem sucedidos (Weber-Dabrowska *et al.*, 2000).

A eficácia terapêutica dos fagos no tratamento de infecções contra *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (incluindo os resistentes à oxacilina), *E. coli*, *Enterococcus faecium* (incluindo os resistentes à vancomicina), e *Streptococcus pneumoniae* tem sido comprovada durante experimentos realizados em modelos animais (Watanabe *et al.*, 2007).

Em estudo realizado no *Bacteriophage Institute*, na Georgia, foi observado que bacteriófagos específicos são efetivos tanto na profilaxia quanto no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes, de diferentes origens, e estudos mais abrangentes, envolvendo humanos, demonstraram que

a terapia fágica pode controlar o processo infeccioso (Weber-Dabrowska *et al.*, 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras bacterianas e bacteriófagos.

As amostras clínicas utilizadas para os experimentos do projeto pertencem ao Banco de Microrganismos do LEMC. Elas estão discriminadas na Tabela 2, todas elas passaram por antibiograma segundo o CLSI e posterior análise de eletroforese de campo pulsado (PFGE) para comprovar que não eram clones de *P. aeruginosa*, apenas a amostra P9809 e P9812 foram discriminadas como clones na análise, pois são amostras do mesmo paciente apenas de sítios de infecção diferentes.

As amostras discriminadas como controle negativo de lise incluídas no estudo por não apresentarem placas de lise ao serem cultivadas. As demais amostras foram incluídas por apresentarem placas de lise no cultivo antes de serem armazenadas na coleção e por serem, portanto, suspeitas de estarem infectadas por fagos.

Como controle positivo foi utilizado o fago lambda : Tn5 e sua cepa propagadora *Escherichia coli* E7026 (gentilmente cedidos pela Professora Dra. Rosa Maria do Departamento de Microbiologia e Imunologia básica da UNIFESP).

Foi utilizada a PA01 como controle negativo para lise.

4.2. Teste de influência da temperatura no aparecimento do halo de lise na placa de cultura.

Neste procedimento avaliou-se o efeito da temperatura de crescimento. As amostras foram crescidas a 26°C e a 37°C.

Fez-se crescer uma colônia de cada amostra bacteriana em 5 mL de Luria Bertani (LB – Sigma, St. Luis, EUA), em tubo de polipropileno com tampa, durante 24 horas, a 37°C. A suspensão foi, posteriormente, centrifugada a 4000 g, por 10 minutos, a 4°C (Eppendorf 5804 R, rotor A 4-44) e o *pellet* ressuspendido em tampão SM (1M Tris HCL pH 7,5; 10mM MgSO₄; 10mM NaCl; gelatina 2%) até uma densidade ótica (D.O.) a 640nm de aproximadamente 1.5. As soluções bacterianas foram armazenadas a 4°C até o momento do uso.

Fundiu-se o top ágar (LB, com 0,8% (p/v) de ágar, distribuído em 3 mL, por tubo) e manteve em Banho Maria a 45°C. Adicionou-se 100 µL da solução bacteriana em um tubo de top ágar (cada amostra foi preparada em duplicata) e verteu-se a mistura em uma placa (10 cm de diâmetro) de LB sólido (1,5% (p/v) de ágar), com movimentos rotacionais, de modo a distribuir o conteúdo uniformemente. Após a solidificação do top ágar, as placas foram incubadas invertidas, a 37 °C e a 26°C (cada duplicata foi incubada em uma temperatura diferente), durante a noite. No dia seguinte, observou-se a presença de placas de lise de acordo com a temperatura de incubação.

4.3. Padronização da propagação do fago.

Fez-se crescer uma colônia de cada amostra bacteriana em 20 mL de Luria Bertani (LB – Sigma, St. Luis, EUA), em tubo Falcon de 50 mL, a 37°C, sob agitação constante a 110 rpm, até as culturas atingirem uma densidade ótica (D.O.) a 640 nm de aproximadamente 1.0 (Espectofotômetro Thermo Spectronic – Bio Mate 5).

Foi pipetado um mL de cada amostra (10 amostras testes, PA01 como

controle de crescimento sem lise e LB líquido sem bactéria para controle negativo de crescimento) em microtubos de 1,5 mL (Eppendorfs). Para a E7026, foram pipetados 500 µL da bactéria e 500 µL da solução de fagoλ, em um mesmo tubo. As amostras foram incubadas a 37°C, por 15 minutos (para permitir a absorção do fago λ pela E7026).

Após a incubação, pipetou-se 200 µL de cada cultura em um tubo contendo top ágar (3,0 mL de LB, com 0,8% (p/v) de agarose – Invitrogen, Espanha) fundido e resfriado a 45°C. Foram usados 4 tubos de top ágar por amostra. Cada mistura foi homogeneizada e rapidamente vertida (com movimentos rotacionais, de modo a distribuir o conteúdo uniformemente) sobre uma placa de Petri esteril (de 10 cm de diâmetro), contendo uma fina camada de LB sólido (1,5% (p/v) de agarose). Dessa forma, foram obtidas 4 placas de Petri por amostra.

Após a solidificação do top ágar, as placas foram incubadas invertidas, a 37 °C, por 18 a 24 horas. No dia seguinte, observou-se a presença de placas de lise.

4.3.1. Obtenção da solução estoque de fago – adaptado de Sillankorva, 2004.

Foram adicionados 5 mL de tampão SM (1M Tris HCL pH 7,5; 10mM MgSO₄; 10mM NaCl; gelatina 2%) em cada placa e as placas foram incubadas a 4°C por 24 horas.

A fase líquida foi recolhida para tubos Falcon de 15 mL (as duas soluções referentes à mesma amostra foram recolhidas no mesmo tubo Falcon), aos quais adicionou-se lentamente e sob agitação, Cloreto de sódio (NaCl - Merck, Darmstadt, Alemanha), de modo a se obter uma concentração

final de 1M (para cada 200 mL, foram adicionados 11,68 g de NaCl).

Após a dissolução completa do NaCl, os tubos foram colocados em geladeira durante 1 hora. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 6000 rotações por minuto (rpm), por 20 minutos, a 4°C (Soraval RC6+/ Rotor F21S-8X50Y - Thermo Scientific) e recolheram-se os sobrenadantes para novos tubos Falcon de 15 mL, aos quais foi adicionado polietileno glicol 8.000 (PEG 8.000, Sigma – Aldrich, Alemanha) a 10% (p/v). Após a dissolução do PEG, em temperatura ambiente, a mistura foi incubada durante 19 horas a 4°C.

As amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. Ressuspenderam-se os *pellets*, contendo as partículas fágicas, em 1,4 mL de tampão SM e adicionaram-se 0,7 mL de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente no vortex durante 30 segundos e, em seguida, foram centrifugados a 3.000 g, por 15 minutos, a 4°C (5804R Centrifuge/ rotor A4-44 - Eppendorf).

O sobrenadante, contendo fago com um título elevado, foi recolhido cuidadosamente e filtrado através de membranas de 0,2 µm de porosidade (Millipore). As soluções fágicas purificadas foram armazenadas a 4°C até serem necessárias.

Foram obtidas 11 soluções finais de estoque de bacteriófagos: PH9582, PH9583, PH9611, PH9705, PH9715, PH9808, PH9809, PH9810, PH9812, PH9842 e λ. Foi preparada uma solução de controle negativo, onde não foi semeada bactéria.

Tabela 2: Tabela de isolados clínicos e controles negativos para bacteriófagos utilizados no estudo.

Nº do Banco	Bactéria	Iniciais dos Nomes	Hospital	Sítio	Idade	Sexo	Data do armazenamento
P1088	<i>P. aeruginosa</i>	MP	Giraac	Hemocultura	04 a	---	01/03/2001
P7960	<i>P. aeruginosa</i>	AR	Lab. Cimerman	Urina	70 a	M	15/03/2007
P9582	<i>P. aeruginosa</i>	LALR	Hospital São Paulo	Hemocultura	53 a	M	11/11/2008
P9583	<i>P. aeruginosa</i>	RAP	Hospital São Paulo	Hemocultura	69 a	M	11/11/2008
P9611	<i>P. aeruginosa</i>	AM	Hospital São Paulo	Ponta de cateter	67 a	M	19/11/2008
P9758	<i>P. aeruginosa</i>	LPF	Hospital São Paulo	Líq. Peritoneal	19 a	M	27/01/2009
P9715	<i>P. aeruginosa</i>	ZFS	Hospital São Paulo	Aspirado traqueal	33 a	F	06/01/2009
P9705	<i>P. aeruginosa</i>	MRG	Hospital Base de Brasília	Hemocultura	43 a	F	17/12/2008
P9808	<i>P. aeruginosa</i>	FLS	Hospital São Paulo	Aspirado traqueal	50 a	M	27/02/2009
P9809	<i>P. aeruginosa</i>	JSP	Hospital São Paulo	Hemocultura - sangue total	51 a	F	27/02/2009
P9810	<i>P. aeruginosa</i>	MSR	Hospital São Paulo	Urina - jato médio	76 a	F	27/02/2009
P9812	<i>P. aeruginosa</i>	JSP	Hospital São Paulo	Aspirado traqueal	51 a	F	27/02/2009
P9842	<i>P. aeruginosa</i>	AAAF	Hospital do Rim e Hipertensão	Urina - sonda de demora	17 a	F	03/03/2009

Legenda: A amostra P1088 apresenta resistência ao Imipenem e é produtora de SPM⁻¹; a P9758 é uma amostra sensível as drogas usadas no tratamento. A P7960 é uma cepa mucóide, resistente à carbapenem, mas sensível a ceftazidima (sugestivo de porina como mecanismo de resistência). Essas cepas são os controles negativos para lise, utilizados no estudo.

4.3.2. Obtenção de solução estoque de fago – adaptado de Tom Bergan, 1978.

Foram colocados 3 mL de tampão SM nas duas outras placas (sendo 3 mL em cada placa). Foram incubadas à 4°C por 24 horas. A fase líquida foi recolhida para tubo Falcon de 15 mL (as duas soluções da mesma amostra foram recolhidas no mesmo tubo). As amostras foram centrifugadas a 4500 g, por 30 minutos, à 4°C (5804R Centrifuge/ rotor A4-44 – Eppendorf).

O sobrenadante foi filtrado através de membranas de 0,22 µm de porosidade. As 11 soluções fágicas obtidas foram armazenadas à 4°C até serem utilizadas.

4.4. Avaliação da atividade lítica dos bacteriófagos, infectando diferentes hospedeiros.

Para este teste foram utilizadas as amostras bacterianas referenciadas anteriormente, no item 4.1., como controle negativo de lise, totalizando 4 amostras. Estas amostras foram testadas quanto à possibilidade de serem infectadas pelos fagos isolados e de apresentarem lise, sendo portanto, possíveis cepas propagadoras dos fagos.

A *E. coli* 7026 e o fago λ ::Tn5 foram utilizados como controle positivo. Como controle negativo foi utilizado uma solução de tampão SM sem bacteriófagos e 20 µL desta foi inoculado, também, em cada amostra bacteriana.

Para excluir contaminação da solução estoque de fago, 20 µL, de cada solução, foi inoculado em placa de Ágar MacConkey (sem ter sido semeada com a cepa propagadora), a qual foi incubada seguindo as mesmas condições

das demais placas semeadas.

As cepas propagadoras foram semeadas em ágar MacConkey (E7026, PA01, P1088, P7960 e P9758).

De três a cinco colônias, de cada bactéria crescida previamente em Ágar MacConkey, foram inoculadas em 3 mL de caldo TSB (OXOID, Basingstoke, Inglaterra) e incubadas a 37°C durante a noite.

No dia seguinte, foi realizada diluição de 1/10 da cultura em TSB e 200 µL desta diluição foi plaqueado em ágar MacConkey, utilizando alça de Drigalsky, para obtenção de crescimento confluyente. As placas, com a cepa propagadora semeada, foram inoculadas com 20 µL das soluções estoque de bacteriófago. Para cada possível cepa propagadora foram testadas as 20 soluções estoques de fago (10 obtidas segundo Tom Bergan e 10 segundo Sillankorva)

Após secarem em temperatura ambiente, as placas foram invertidas e incubadas por 16 às 18h, a 37°C.

No dia seguinte, observou-se o efeito da infecção.

4.5. Caracterização da morfologia dos bacteriófagos por microscopia eletrônica

As amostras de partículas fágicas purificadas foram colocadas em grades cobertas com carbono e coradas com 1% (p/v) de fosfotungstato de potássio (pH 6,5) (Gaidelytė *et al.*, 2007). As micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico transmissão: JEOL 1200 EX, operado a 120 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); JEOL JEM1011, operado a 120 kV, no CEME do Instituto

Adolfo Lutz (IAL); CM100 PHILIPS, no CEME da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP) de Botucatu.

Técnica 1: Alíquota de 10 µL da solução estoque de fagos foi pipetada sobre a grade, deixada aproximadamente por 2 minutos e o excesso foi retirado com o papel filtro. Em seguida, 20 µL do fosfotungstato de potássio (PTA) a 2% (p/v), com pH 6,2 ou outro corante como vanádio (Nanovan®) foram colocados na grade e mantidos por 40 segundos, o excesso foi retirado com papel filtro, finalizando o preparo da grade, que ficou por 24 horas secando, em ambiente ventilado, à temperatura ambiente.

Técnica 2: Uma alíquota de 10 µL da solução estoque de fagos foi colocada em um pocinho, e a grade ficou sobre a gota, permaneceu aproximadamente por 2 minutos e, então, foi removida com a alça. Em seguida 20 µL do PTA a 2% (p/v), pH 6,2, ou o vanádio (Nanovan®) foi colocado na grade e mantido por 40 segundos. O excesso também foi retirado com papel filtro, finalizando o preparo da grade, que ficou por 24 horas secando em ambiente ventilado, à temperatura ambiente.

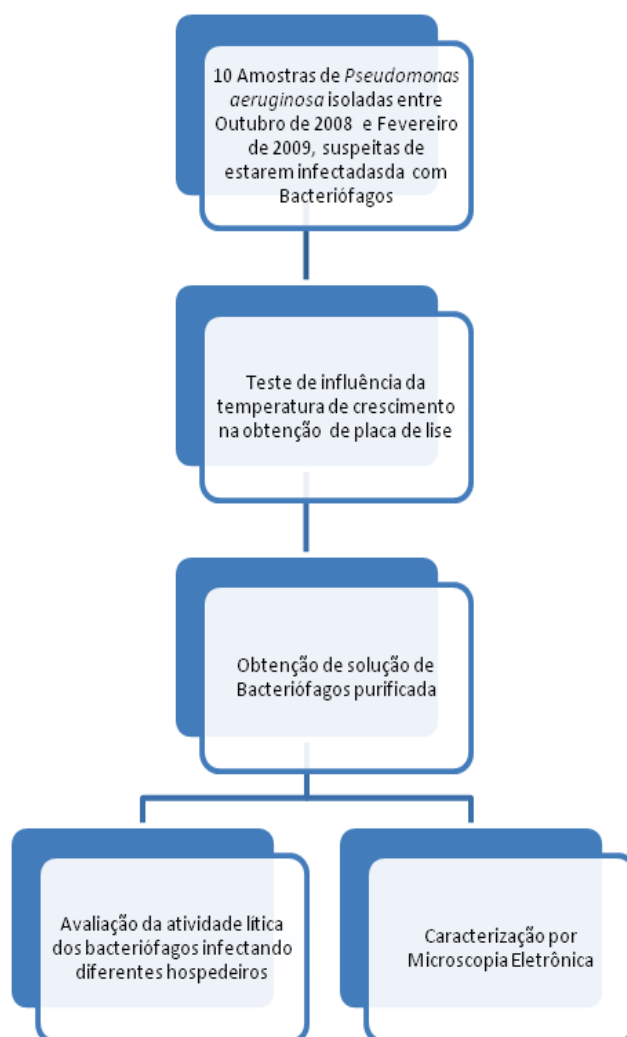
Técnica 3: Colocou a grade por 10 minutos, *on drop* na solução de *Alcian blue*, para tornar sua película mais hidrofílica. Em seguida foram feitas três lavagens com água destilada para remover o excesso do reagente, na terceira lavagem a grade permanece mergulhada no poçinho até que o material ficasse pronto para aderir a película. Ao mesmo tempo pipetou-se, diretamente, 70 µL do corante PTA a 1%, com pH 6,8, no halo de lise da placa de meio de cultura bacteriana, homogeneizou-se com a ponteira da pipeta. A grade foi removida da água, o excesso de água retirado com papel filtro. Depois foi passada por aproximadamente três vezes sobre a solução formada na placa e

em seguida a grade encostou por alguns instantes em um poçinho apenas com corante (PTA). Removeu-se a grade para um papel filtro, para secar, por 24 horas, em ambiente ventilado, à temperatura ambiente.

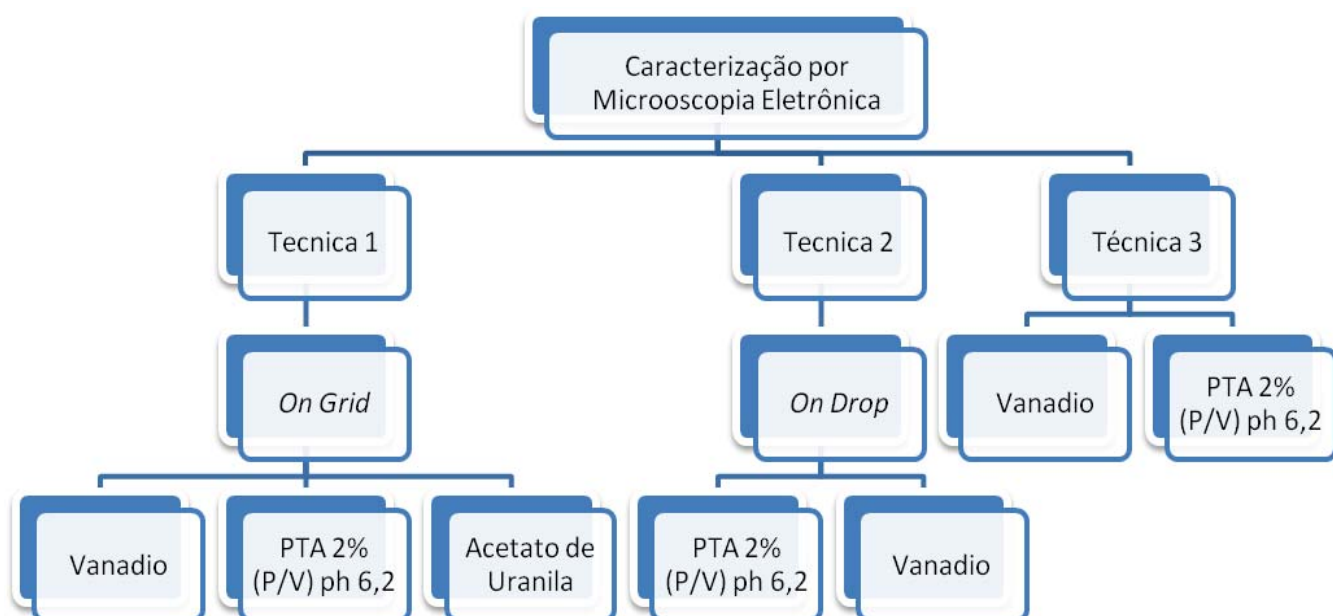
5. Fluxograma

Estes esquemas fornecem uma diretriz experimental de toda metodologia utilizada no projeto.

5.1. Do Estudo



5.2. Da Microscopia Eletrônica



6. RESULTADOS

6.1. Teste de influência da temperatura na formação no halo de lise na placa de meio de cultura.

Tabela 3: Influência da Temperatura de incubação na formação de placa de lise.

Número da amostra	Temperatura 37°C	Temperatura 26°C
9582	com lise	sem lise
9583	com lise	sem lise
9611	com lises pequenas	com lises pequenas
9705	sem lise	sem lise
9715	sem lise	com lise
9808	com lise	sem lise
9809	com lise	sem lise
9810	com lise	com lise
9812	com lise	sem lise
9842	com lise	sem lise
PA01	sem lise	sem lise
E7026/	com lise	sem lise

6.2. Teste de infecção das amostras de *P. aeruginosa* com as soluções estoque de bacteriófagos.

Tabela 4: Interação espécie-específica entre as possíveis cepas propagadoras e os bacteriófagos extraídos dos isolados clínicos.

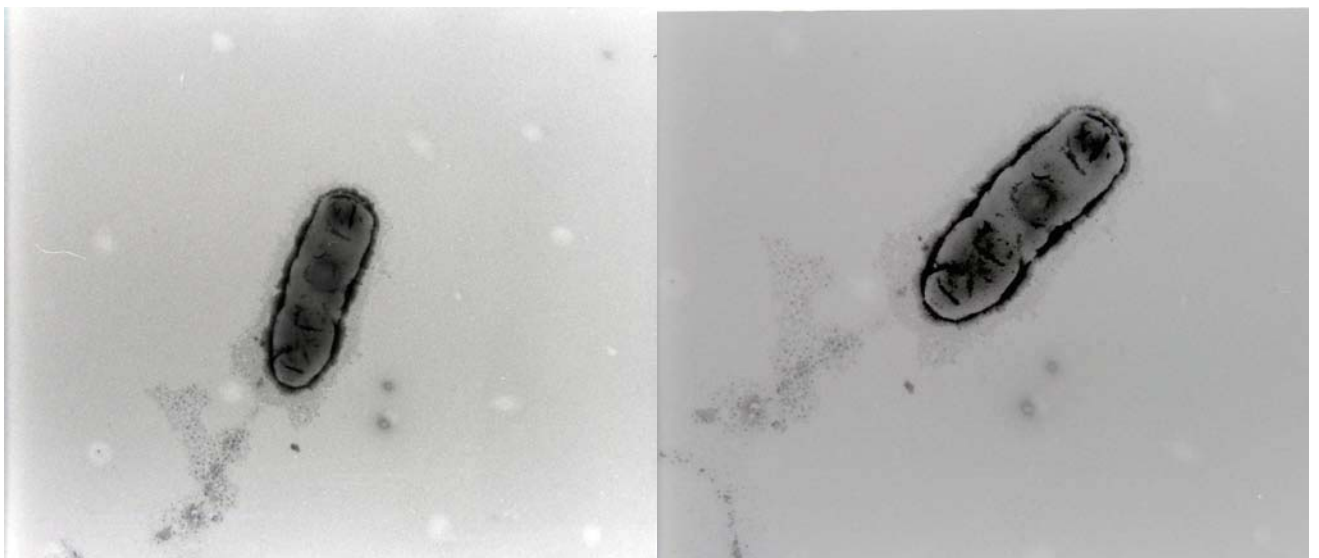
	1088	7960	9758	PA01
9810 S	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9810 B	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9808 S	FRACO POSITIVO	FRACO POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9808 B	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
9809 S	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
9809 B	NEGATIVO	POSITIVO	FRACO POSITIVO	NEGATIVO
9582 S	NEGATIVO	POUCO "CRESCIMENTO"	POSITIVO	NEGATIVO
9582 B	NEGATIVO	POUCO "CRESCIMENTO"	POSITIVO	NEGATIVO
9583 S	NEGATIVO	FRACO POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9583 B	NEGATIVO	FRACO POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9611 S	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9611 B	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9812 S	NEGATIVO	NEGATIVO	FRACO POSITIVO	NEGATIVO
9812 B	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
9842 S	NEGATIVO	FRACO POSITIVO	FRACO POSITIVO	NEGATIVO
9842 B	NEGATIVO	POSITIVO	FRACO POSITIVO	NEGATIVO
9705 S	NEGATIVO	FRACO POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9705 B	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9715 S	POUCO POSITIVO	POUCO "CRESCIMENTO"	NEGATIVO	NEGATIVO
9715 B	POSITIVO	POUCO "CRESCIMENTO"	NEGATIVO	NEGATIVO

Legenda: **S**, solução estoque obtida segundo Sillankorva (2004); **B**, solução estoque segundo Tom Bergan (1978); negativo, ausência de lise; fraco positivo, pouca lise; positivo, lise evidente.

O controle positivo, a amostra E7026 com fago lambda, apresentou formação de halo lítico evidente para as duas técnicas de solução estoque utilizadas.

6.3. Fotografias das diferentes técnicas de Microscopia eletrônica descritas no item 4.5 (material e métodos).

6.3.1. Fotografias obtidas no Centro de Microscopia da UNESP.



Figuras 6 (esquerda) e 7(direita): Fotografias de *P. aeruginosa* (obtida com a técnica1 de contrastação negativa; microscópio modelo CM100 PHILIPS, amplitude de 60kV).

6.3.2. Fotografias obtidas no Centro de Microscopia da UNIFESP.

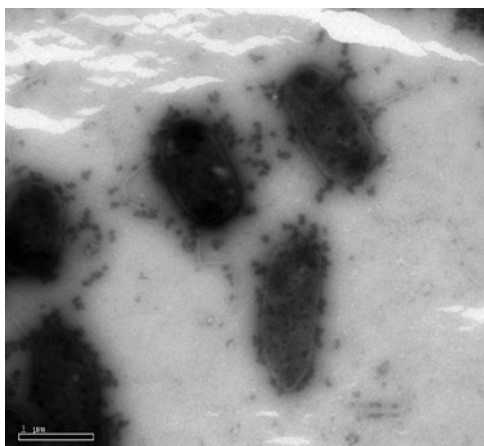
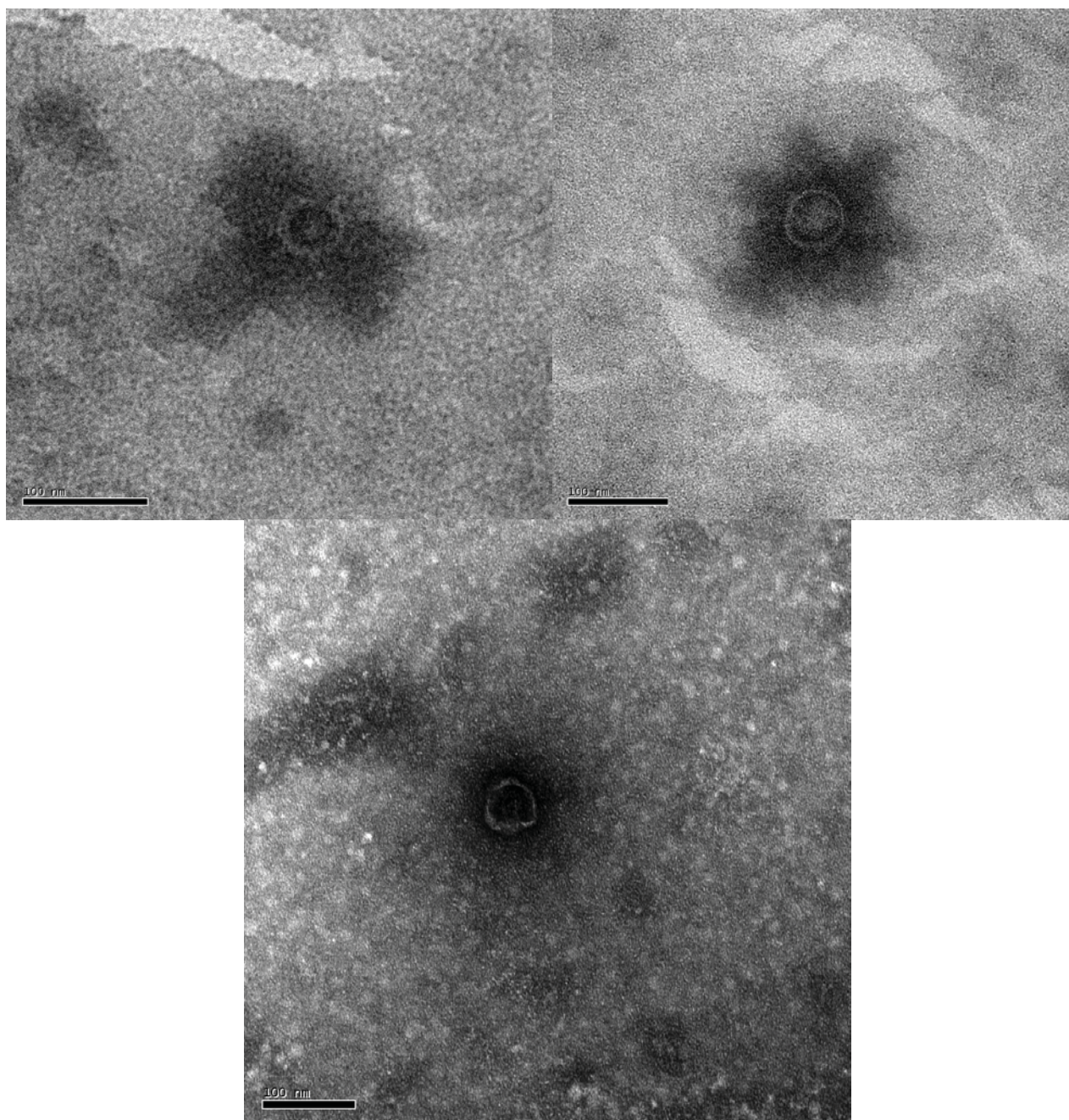
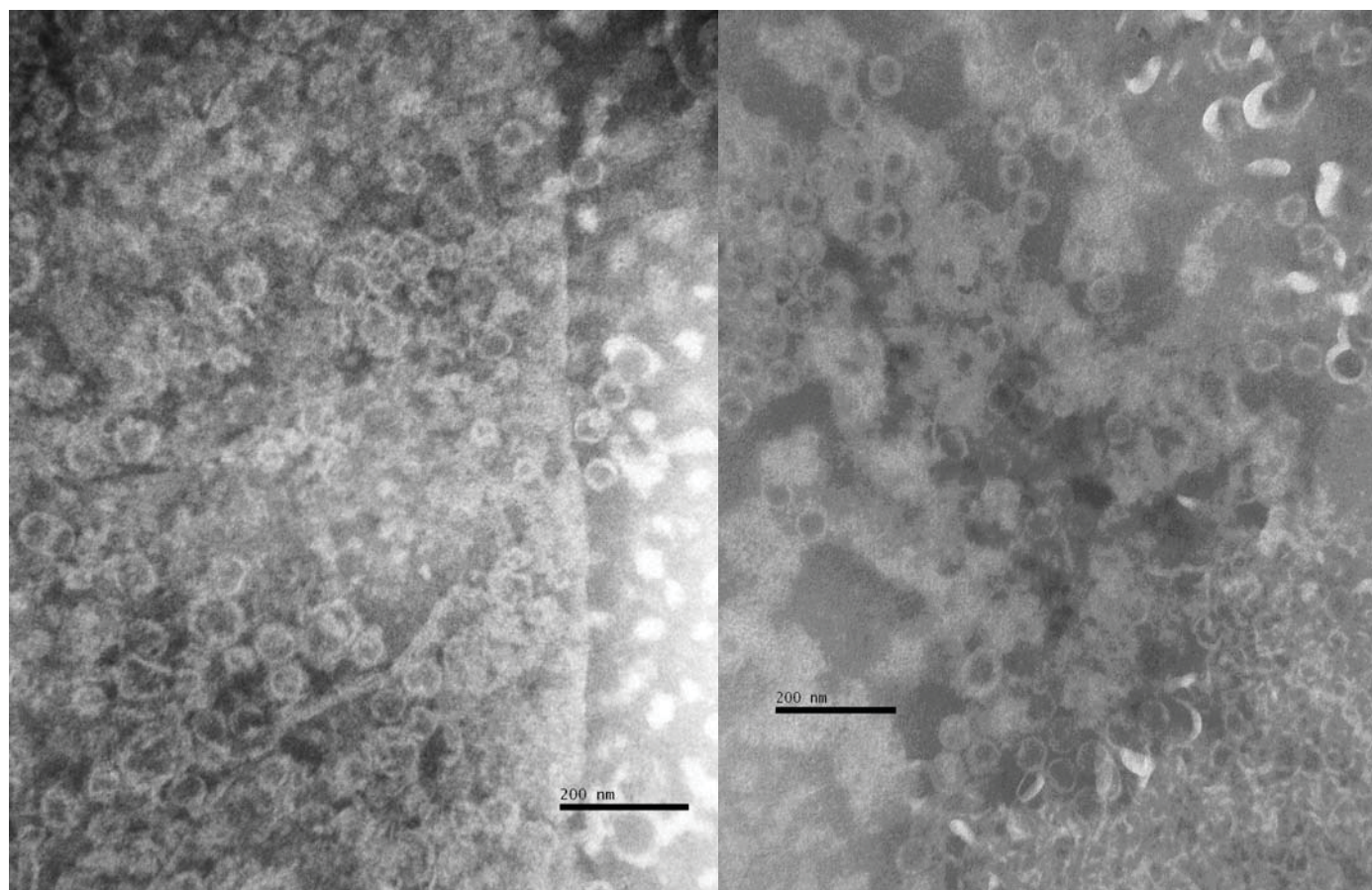


Figura 8: Fotografia de *P. aeruginosa* com suposta contaminação de microrganismo desconhecido (com técnica 1 de contrastação negativa; microscópio modelo JEOL 1200 EX, amplitude 60kV. A barra indica um µm).



Figuras 9 (direita), 10 (esquerda), 11 (abaixo): Fotografias de suposto bacteriófago extraído do isolado clínico P9583 do banco de microrganismo do LEMC (utilizando técnica um de contrastação negativa; microscópio modelo JEOL 1200 EX, amplitude 120Kv. A barra indica 100nm).

6.3.3. Fotografias obtidas no Centro de Microscopia do IAL.



Figuras 12 (direita) e 13 (esquerda): Fotografias da amostra controle de infecção de *E. coli* e fago lambda (através da técnica 3 de contaminação negativa; microscópio modelo JEOL JEM1011, amplitude de 80kV. A barra indica 200nm).

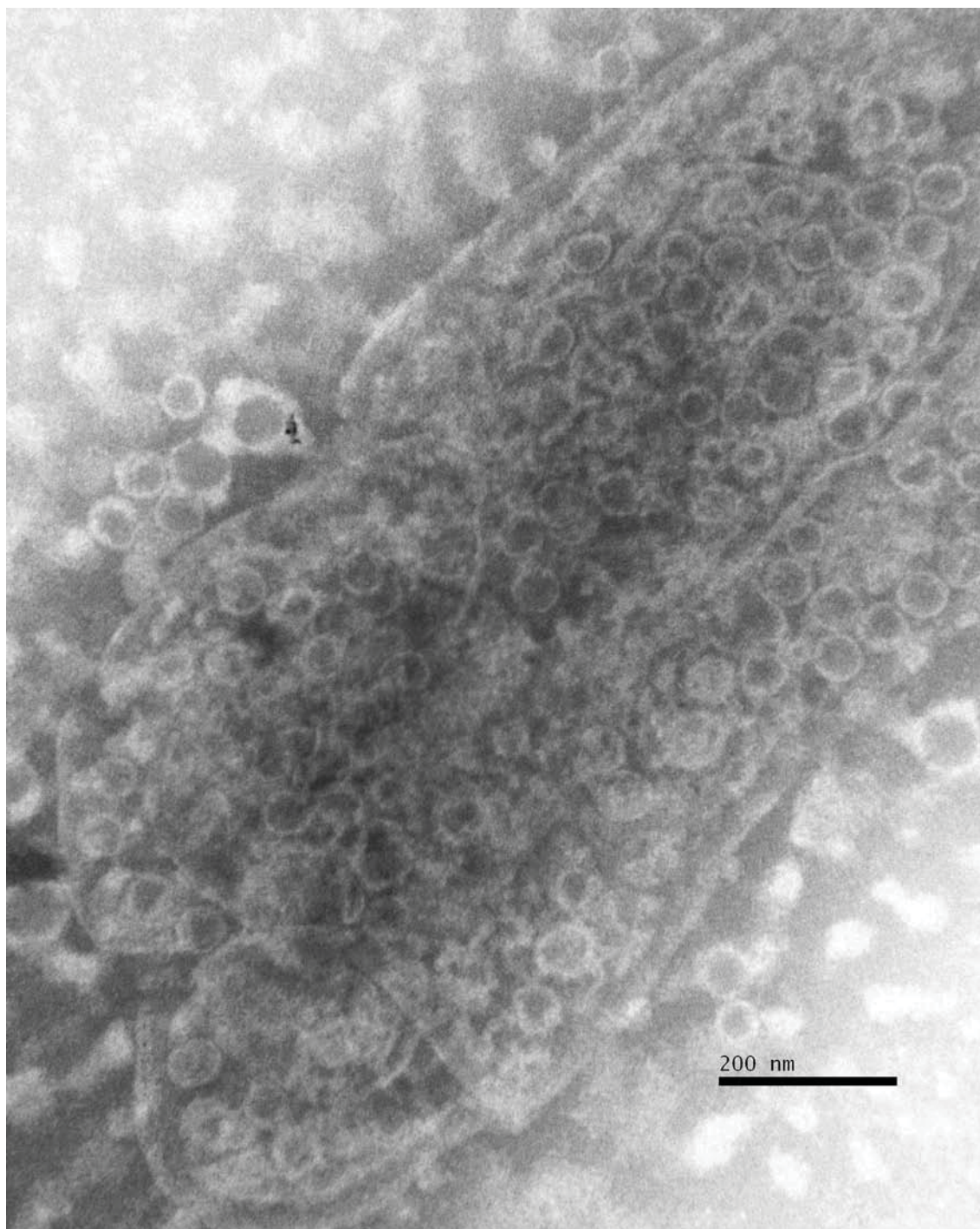


Figura 14: Fotografia obtida no momento de infecção do fago lambda na bactéria *E. coli* 7026 (com técnica 3; microscópio modelo JEOL JEM1011, amplitude de 80kV. A barra indica 200nm)

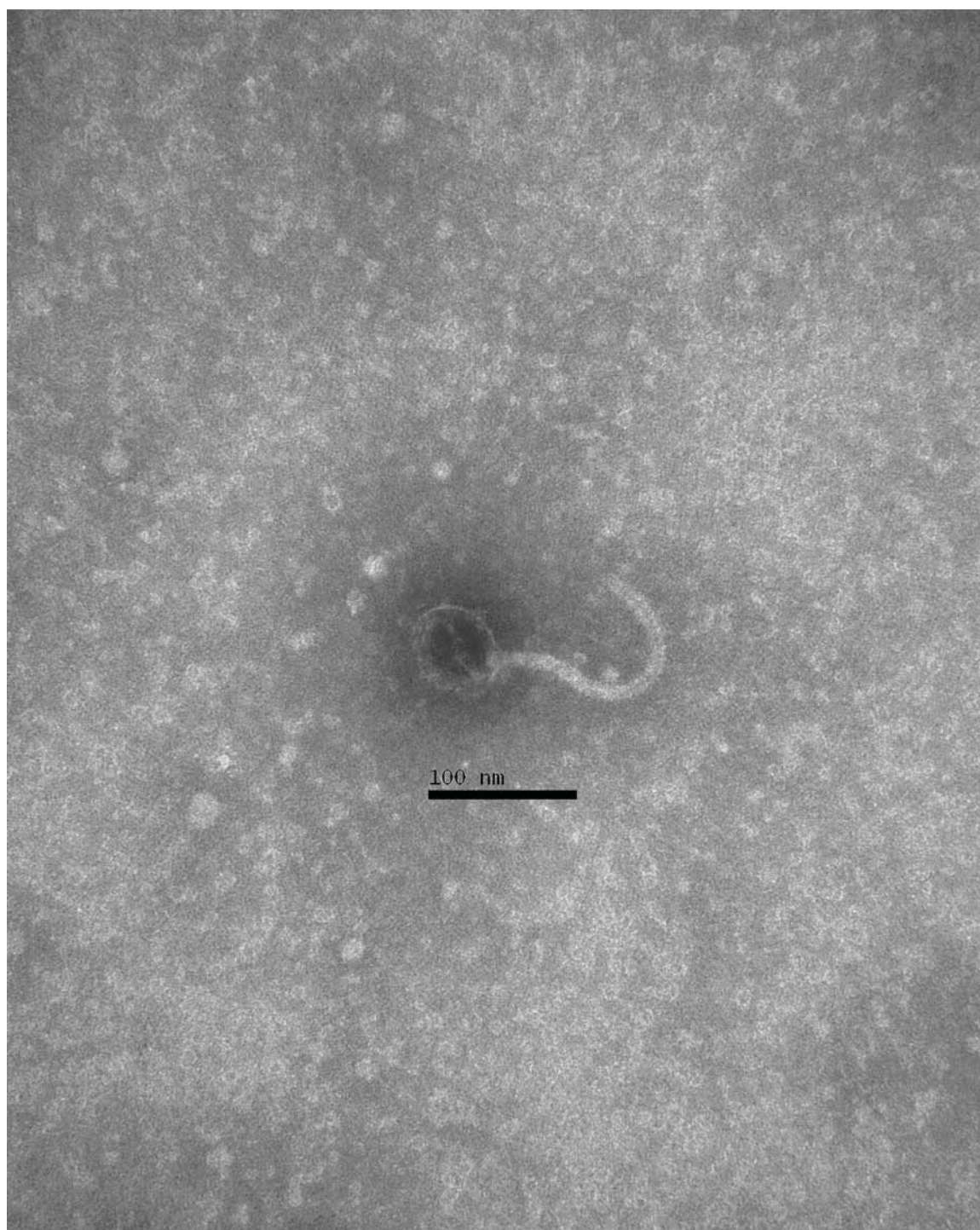


Figura 15: Fotografia do bacteriófago do isolado P9842 da coleção de cultura (com técnica 3; microscópio modelo JEOL JEM1011, amplitude de 80kV. A barra indica 100nm)

7. DISCUSSÃO

Este estudo evidenciou algumas dificuldades em relação à temperatura para formação do halo de lise causado por bacteriófagos, formulação da solução estoque, infecção de amostras negativas para os fagos, bem como a microscopia eletrônica, a qual possui escassez de material descritivo na literatura publicada. Essas dificuldades também foram relatadas por Sillankorva (2004).

Os bacteriófagos apresentam maior potencial lítico à 37°C, para conseguir infectar e provocar lise na *P. aeruginosa*. Outro aspecto refere-se as características da bactéria, as quais também ficam mais expressas nessa temperatura, um exemplo disso é a coloração, geralmente esverdeada que apareceu na maior parte das amostras em conjunto com a lise.

A extração dos fagos das amostras previamente selecionadas do banco de microorganismos, contam com uma etapa primordial no processo de formulação da solução estoque, que é a inoculação de 100 µL da bactéria infectada com o fago ao meio semi-sólido LB, que foi previamente fundido e mantido a 45°C. Acredita-se que essa temperatura é sugestiva para inibição do gene repressor do ciclo lítico presente no fago, o que pode ser comprovado no presente estudo, tendo como prova a produção de lise pelo fago, possibilitando sua extração, através de uma solução tampão de SM descrita por Sambrook, utilizada por Sillankorva (2004).

Quanto à solução estoque com a metodologia descrita por Tom Bergan (1978), esta pareceu mais efetiva para obter lise no experimento de infecção das possíveis amostras propagadoras de *P. aeruginosa* multirresistente, do que

a solução estoque obtida pela metodologia utilizada por Sillankorva (2004). Um dos motivos para a inadequação da metodologia de Sillankorva (2004), é que ao utilizar clorofórmio para eliminar resquícios de bactérias na solução fágica, o mesmo também pode ter causado a degradação dos fagos, pois como não sabemos se estes possuem ou não envelope, portanto não podemos prever a ação do clorofórmio no capsídeo de lipoproteínas.

Alguns autores citam a ultracentrifugação como metodologia para obter uma solução estoque mais concentrada e purificada, mas após tentativas ao longo do estudo, acreditamos que o choque mecânico de aproximadamente 40000g degrada os fagos, pois suas estruturas são muito sensíveis.

Os testes obtiveram resultados satisfatórios de infecção com algumas amostras, como: a P9808 que infectou três das quatro possíveis cepas propagadoras, sugerindo que este fago tenha uma porta de entrada comum entre as três cepas multirresistentes; as amostras P7960 e P9758 foram suscetíveis a maioria das soluções de fagos; nosso controle negativo de lise, a PA01, não foi infectada por nenhuma das 20 soluções, sugerindo que talvez fatores de virulência ou mecanismos de resistência possam facilitar a adesão dos fagos.

A microscopia eletrônica, por técnica de contrastação negativa, é padrão ouro para caracterização de fagos. Apesar de uma metodologia relativamente simples, possui muitos interferentes externos, como: grau de pureza da amostra, concentração da solução, tipo de corante e uso do fixador.

Um interferente externo importante refere-se à formação da película de Formvar®, pois um bom resultado se inicia com a preparação desta, que deve

estar o mais uniforme possível, sem fissuras, impedindo que o material depositado sobre ela não transpasse e possa ser visualizado ao microscópio.

Quanto ao grau de pureza e concentração a solução deve estar livre de contaminantes, sais ou partículas que podem interferir quando a amostra estiver corando. A solução deve estar concentrada para que os fagos possam ser observados em mais de um campo ao microscópio, comprovando a sua presença no isolado clínico bacteriano.

No que diz respeito à necessidade de fixação da amostra, após inúmeros testes, concluímos que o uso do fixador glutaraldeído 2% (p/v) não favorecia a obtenção de boa foto e não trazia nenhum outro benefício para as outras etapas de preparo da grade. A literatura também não relata a necessidade do uso de fixador nas amostras.

Já o corante tem função primordial para a nitidez e a riqueza de detalhes nas imagens. Nas dez amostras contaminadas com bacteriófagos do banco de microorganismos, foram testados três tipos de corantes diferentes, o acetato de uranila, o fosfotungstato de potássio (PTA) e o vanádio (Nanovan®).

Além disso, foram testadas duas concentrações diferentes de fosfotungstato de potássio 1% e 2%. Estas influenciaram o tempo de contato da amostra, o contraste e a nitidez da imagem a ser visualizada. Já a alterações de pH testadas mostraram influência na conservação da estrutura do bacteriófago, que, quanto mais alcalino o corante utilizado maior chance de deformação e desnaturação do capsídeo. O pH que apresentou melhor visualização foi 6,8.

Na literatura não foi encontrado estudo que descrevesse a técnica de contrastação negativa, bem como o protocolo da microscopia eletrônica, o que trouxe dificuldades para padronizar as etapas.

O uso de um controle positivo (o bacteriófago lambda) auxiliou na padronização da técnica (tempo de exposição do corante, pH ótimo, amplitude ideal do microscópio para a visualização, etc.), pois por possuir uma estrutura conhecida, permitiu sua fácil visualização ao microscópio e comparação das diferentes técnicas descritas.

A melhor e mais simples técnica de visualização dos fagos, consiste no preparo da grade diretamente do halo de lise, evidenciado na placa de meio de cultura, pois vários interferentes são eliminados.

A técnica de extração dos bacteriófagos direto do halo de lise da placa de cultura mostrou-se mais eficiente para a classificação morfológica dos fagos, após várias tentativas e fotografias obtidas ao longo do estudo. No departamento de microscopia eletrônica e virologia do IAL esta técnica é utilizada para a visualização e estudo de bacteriófagos provenientes de diversas linhas de pesquisa, técnica desenvolvida pelos pesquisadores desse Instituto. Esta foi efetiva não só para nosso controle positivo (bacteriófago lambda) como também para nosso isolado clínico P9842, que apresentou um bacteriófago com cauda flexível.

A necessidade de um profissional experiente, que domine o preparo ideal grade e possua habilidade para manuseio do microscópio, torna a localização e o reconhecimento do bacteriófago na grade mais fácil, resultando em melhores imagens.

Algumas possibilidades para futuras pesquisas podem ser indicadas por este estudo, como: testagem comparativa entre outras técnicas para extração e purificação de fagos; encontrar cepas propagadoras que permitam melhor propagação e titulação dos bacteriófagos, para que possamos realizar análise do material genético; analisar melhor a interação fago-hospedeiro com outras metodologias, para conseguir identificar a porta de entrada no hospedeiro; realizar uma eletroforese de campo pulsado das amostras infectadas com a solução estoque de fagos para analisar se amplifica alguma banda a mais que a bactéria não possuísse antes, e se essa banda for visível talvez possa eluir esta banda para estudar, seqüenciar o DNA ou RNA.

8. CONCLUSÃO

- Os bacteriófagos apresentaram lise utilizando duas metodologias distintas de formulação de solução estoque.
- A capacidade infectante dos bacteriófagos abrangeu principalmente as cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, como a P9758 e P7960, que obtiveram lise em aproximadamente 50% das amostras testadas.
- A melhor técnica de microscopia eletrônica, foi a extração do bacteriófago direto do halo de lise na placa de cultura, que obteve resultado favorável tanto para o controle positivo como para o isolado clínica da coleção de cultura.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, H.W., Bacteriophage observations and evolution. Res Microbiol. 2003;154 (4): 245-51.

_____ 5500 phages examined in the electron microscope. Arch Virol. 2007;152:227-243.

AKHVERDYAN, VZ, Khrenova EA, Bogush VG, Gerasimova TV, Kirsanov NB, Krylov VN. Wide distribution of transposable phages in natural populations of *Pseudomonas aeruginosa*. Genetica. 1984;20:1612-19.

BERGAN T. Methods in microbiology. V 10. Norris JR, editor. New York: Academic Press; 1978. p. 169-199.

BRAID MD, Silhavy JL, Kitts CL, Cano RJ, Howe MM. Complete Genomic Sequence of Bacteriophage B3, a Mu-Like Phage of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2004;186(19):6560-74.

BUDZIK JM, Rosche WA, Rietsch A, O'Toole GA. Isolation and Characterization of a Generalized Transducing Phage for *Pseudomonas aeruginosa* Strains PAO1 and PA14. J Bacteriol. 2004;186(10):3270-3.

CARMELI Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-

resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1379-82.

CORECH R, Rao A, Laxova A, Moss J, Rock MJ, Li Z, et al. Early immune response to the components of the type III system of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2005;43(8):3956-62.

DALY JA, Boshard R, Matsen JM. Differential primary plating medium for enhancement of pigment production by *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 1984;19(6):742-3.

FISCHETTI, V.A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. Microbiol. 2008; 11: 393-400.

FLUIT AC, Verhoef J, Schmitz FJ and the European SENTRY Participants. Antimicrobial resistance in European isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19:370-4.

FROBISHER, M, Brown J. Transmissible toxicogenicity of streptococci. Bull Johns Hopkins Hosp. 1927;41:167-73.

GALES AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct

Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. 2003;52:699-702.

GALES AC, Torres PL, Vilarinho DSO, Melo RS, Silva CFL, Cereda RF.

Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an Intensive Care Unit of a teaching hospital. 2004;8(4):267-71.

HAY ID, Remminghorst U, Rehm BH. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. 2009;75(4):1110-20.

JONES AK, Fulcher NB, Balzer GJ, Urbanowski ML, Pritchett CL, Schurr MJ, et al. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* AlgU regulon through *mucA* mutation inhibits cyclic AMP/Vfr signaling. J Bacteriol. 2010;192(21):5709-17.

KRYLOV, V, Pleteneva E, Bourkaltseva M, Shaburova O, Volkaert G, Sykilinda N, et al. *Myoviridae* bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a long and complex evolutionary pathway. Res Microbiol. 2003;154:269-75.

KWAN, T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J. Comparative Genomic Analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages. J Bacteriol. 2006;188(3):1184-7.

LINDBERG, AA. Bacteriophage receptors. Annu Rev Microbiol. 1973;27:205-41.

LIVERMORE DM. Penicillin-binding proteins, porins and outer-membrane permeability of carbenicillin-resistant and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 1984;18:261-70.

_____ Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. Scand. J.Infect. Dis. Suppl., 78:7-16, 1991.

_____ Cellular location of β -lactamases in relation to antibiotic resistance. In: Symposium: New horizons in β -lactamases. 6th *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Sevilha,. p.21; 1993.

_____ Livermore, D.M. - Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev., 8:557-584, 1995.

_____ Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother. 2001;47:247-50.

MENDES RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metallo- β -lactamases. J Bras Patol Med Lab. 2006;42(2):103-13

MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY ON-LINE. Columbia: University of South Carolina; c2000-06 [atualizada em 2007 July 11; acesso em 2009 Fev 12]. Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage.htm>

MCVAY CS, VELÁSQUEZ M, FRALICK JA. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):1934-8.

MOELLERING JR RC. Discovering new antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(1):2-9.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*.;67:593-656. 2003.

NORDMANN P, GUIBERT M. Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42:128-31.

PEARSON JP, FELDMAN M, IGLEWSKI BH, PRINCE A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun*. 2000;68:4331-4.

PITT TL. Biology of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to pulmonary infection in cystic fibrosis. *J R Soc Med*. 1986;79(12):13-8

QUALE J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(5):1633-41.

QUINN JP. Imipenem resistance among gram-negative bacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13:203-4.

RAMSEY DM, Wozniak DJ. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol*. 2005;56(2):309-22.

SAMBROOK J, Russel D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3^a ed. New York: CSHL Press;2001.

SADER, H.S.; Gales, A.C.; Pfaller, M.A.; Mendes, R.E.; Zoccoli, C.; Barth, A.; et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2001;5(4):200-14. Sader, H. S., Jones, R. N., Baiocchi, S. A., Biednbach, D. J. – Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 44:273-80, 2002.

SCHARMANN W. Cytotoxic effects of leukocidin from *Pseudomonas*

aeruginosa on polymorphonuclear leukocytes from cattle. Infect Immun. 1976;13(3):836-43.

SHAFFER , JJ, Jacobsen LM, Schrader JO, Lee KW, Martin EL, Kokjohn TA. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage UNL-1, a Bacterial Virus with a Novel UV-A-Inducible DNA Damage Reactivation Phenotype. Appl Environ Microbiol. 1999;65(6):2606-13.

SILLAKORVA.S.M, Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia do Ambiente intitulada Utilização de Bacteriófagos no Controlo de Células Suspensas e Biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* ,2004

STRATEVA T, YORDANOV D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol. 2009;58(9):1133-48. Review.

SULAKVELIDZE A, ALAVIDZE Z, MORRIS JR G. Bacteriophage therapy. Antimicrob Agents 'Chemother. 2001;45(3):649-59. Review.

WAGNER, PL, Waldor MK. Bacteriophage control of bacterial virulence [minireview]. Infect Immun. 2002;70(8):3985-93.

WANG, PW, Chu L, Guttman DS. Complete sequence and evolutionary genomic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* transposable

bacteriophage D3112. J Bacteriol. 2004;186(2): 400-10.

WATANABE R, MATSUMOTO T, SANO G, ISHII Y, TATEDA K, SUMIYAMA Y,
UCHIYAMA J, SAKURAI S, MATSUZAKI S, IMAI S, YAMAGUCHI K.

Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by
Pseudomonas aeruginosa in mice. Antimicrob Agents Chemother.

2007;51(2):446-52.

WEBER-DABROWSKA B, MULCZYK M, GÓRSKI A. Bacteriophage therapy of
bacterial infections: an update of our institute's experience. Arch Immunol
Ther Exp. 2000;48:547-51.

XAVIER DE, PICÃO RC, GIRARDELLO R, FEHLBERG LCC, GALES AC.

Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation
and b-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing
bloodstream infections in Brazil. BMC Microbiology. 2010;10:217.

10. Anexos

10.1. Análise da Tipagem molecular, por técnica de PFGE.

