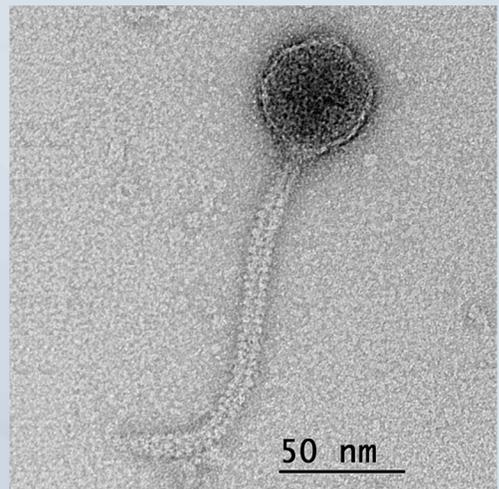
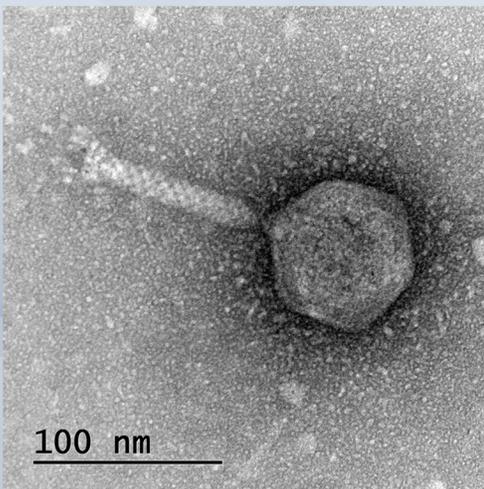
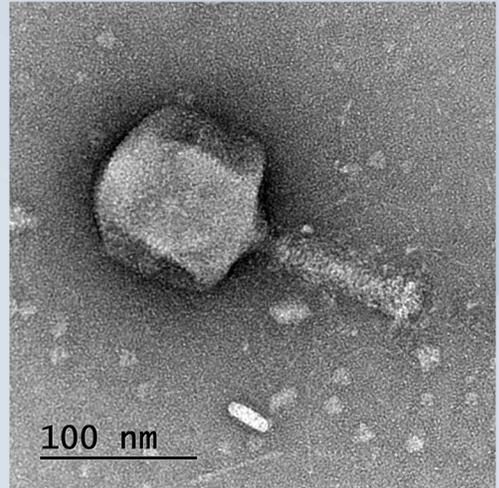
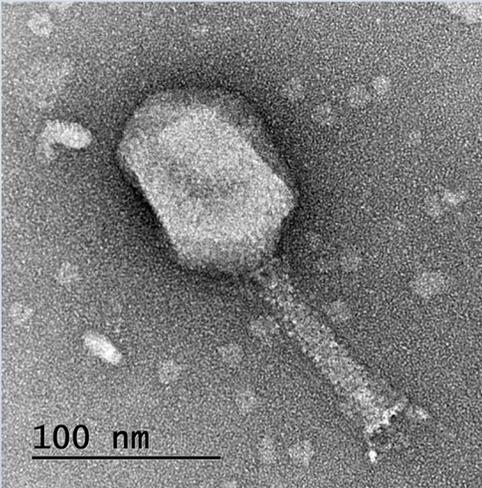


EXPLORANDO O UNIVERSO VIRAL DOS PREDADORES BACTERIANOS: procedimentos laboratoriais básicos



Victor M. Balcão
Marta M. D. C. Vila

EXPLORANDO O UNIVERSO VIRAL DOS PREDADORES BACTERIANOS:

procedimentos laboratoriais básicos

Reitor: Rogério Augusto Profeta

Pró-Reitoria de Graduação e Assuntos Estudantis – Prograd: Fernando de Sá Del Fiol

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa, Extensão e Inovação – Propein: José Martins de Oliveira Jr.

Direção Editorial: Rafael Ângelo Bunhi Pinto

Editoras Assistentes: Silmara Pereira da Silva Martins; Vilma Franzoni

Conselho Editorial

Adilson Rocha

Daniel Bertoli Gonçalves

Denise Lemos Gomes Luz

Filipe Moreira Vasconcelos

José Ferreira Neto

José Martins de Oliveira Junior

Marcos Vinicius Chaud

Maria Ogécia Drigo

Rafael Ângelo Bunhi Pinto

Editora da Universidade de Sorocaba - Eduniso

Biblioteca "Aluísio de Almeida"

Rodovia Raposo Tavares KM 92,5

18023-000 – Jardim Novo Eldorado

Sorocaba | SP | Brasil

Fone: 15 – 21017018

E-mail: eduniso@uniso.br

Site: <https://editora.uniso.br>

Victor M. Balcão
Marta M. D. C. Vila

**EXPLORANDO O UNIVERSO VIRAL
DOS PREDADORES BACTERIANOS:**
procedimentos laboratoriais básicos

Sorocaba/SP
Eduniso
2023

Explorando o universo viral dos predadores bacterianos: procedimentos laboratoriais básicos.

Copyright: Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão; Marta Maria Duarte Carvalho Vila © 2023.

Qualquer parte desta publicação pode ser reproduzida, desde que citada a fonte. Todos os direitos desta edição estão reservados aos autores.

Ficha técnica

Capa, projeto gráfico e diagramação: Eliezer Silva Proença

Normalização: Vilma Franzoni

Produção Editorial: Silmara Pereira da Silva Martins

Colaboração Técnica: Erica Cristina Santos Silva; Bianca Gianola Belline Silva

Ficha Catalográfica

Balcão, Victor Manuel

B145e Explorando o universo viral dos predadores bacterianos :
procedimentos laboratoriais básicos / Victor M. Balcão, Marta M. D.
C. Vila. – Sorocaba, SP : Eduniso, 2023.
181 p. : il.

Bibliografia: p. 171-179
e-ISBN: 978-65-89550-15-0

1. Bacteriófagos. 2. Terapia por fagos. 3. Infecções bacterianas. 4.
Laboratórios de biotecnologia. I. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho. I.
Título.

CDD 21 – 660.6078

Elaborada por: Regina Célia Ferreira Boaventura – CRB-8/6179

SIGLAS & ABREVIATURAS

Abs	Absorvância
ATCC	American Type Culture Collection
Atm	Atmosfera
BF-B	Bactéria Mais Fago, Concentração de Bactéria
BF-F	Bactéria Mais Fago, Concentração de Fago
bp	Pares de Bases (<i>base pair</i>)
°C	Graus Centígrados
CB	Controle de Bactéria
CF	Controle de Fago
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz Laser
dsDNA	Ácido Desoxirribonucleico de Dupla Fita (<i>double stranded DNA</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetraacético
EOP	Eficiência de Plaqueamento
EPI	Equipamentos de Proteção Individual
ϵ	Coefficiente de Extinção Molar
g	Aceleração da Gravidade ($m\ s^{-2}$)
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Arrestance</i> , filtro de alta eficiência na retenção de partículas, considerado filtro absoluto

kDa	QuiloDalton
keV	Quiloelétron Volt
L	Litro
λ	Comprimento de Onda
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
MOI	Multiplicidade de Infecção
MTA-TSB	<i>Molten Top Agar - TSB</i>
MWCO	<i>Molecular Weight CutOff</i> (limite de corte de peso molecular)
MWM	<i>Molecular Weight Markers</i> (marcadores de peso molecular)
nm	Nanômetro
OD	Densidade Óptica
OSGC	Curva de um só Ciclo de Crescimento Síncrono (<i>One Step Growth Curve</i>)
PEG	Polietilenoglicol
PES	Poliétersulfonato

PSA	Persulfato de Amônia
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (<i>Restriction Fragment Length Polimorfism</i>)
RNA	Ácido Ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotação por Minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio
SM (tampão fágico)	O tampão fágico SM é uma mistura de cloreto de S ódio, sulfato de M agnésio e gelatina.
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TBE	Tampão Borato EDTA
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UE	Unidades de Endotoxina (<i>Endotoxin units</i>)
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFP	Unidade Formadora de Placas
UNISO	Universidade de Sorocaba
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VAPGH	Hidrolases de Peptidoglicano Associadas aos Vírions (<i>Virion-Associated Peptidoglycan Hydrolase</i>)
VBlab	Laboratório de Vírus Bacterianos da Uniso

Aos nossos alunos.

Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.

Antoine de Saint-Exupéry (29 de jan. de 1900 - 31 de jun. de 1944)

*Remember to look up at the stars and not down at your feet.
Try to make sense of what you see
and wonder about what makes the universe exist.
Be curious. And however difficult life may seem,
there is always something you can do and succeed at.*

Stephen William Hawking (8 de jan. de 1942 - 14 de mar. de 2018)

PREFÁCIO

O mundo, como o conhecemos, mudou radicalmente após a pandemia de um novo Coronavírus em 2019. Um desafio nunca antes visto pela humanidade. Foi capaz de mudar nossos hábitos, nossos costumes afetivos e, especialmente, nos afastou de pessoas queridas, algumas delas para sempre.

Essa pandemia nos mostrou que microrganismos podem e se adaptam muito rapidamente, podendo colocar em risco a vida humana e animal conforme ela existe hoje. Os seres humanos, como os conhecemos, habitam esse planeta há cerca de 200 mil anos e, durante todo esse tempo, têm travado batalhas contra os microrganismos, tentando, de alguma forma, vencê-los, subjugar-los ou eliminá-los.

Nossa última grande tentativa deu-se no final do mês de setembro de 1928, quando criamos uma substância química (derivada de um fungo) que acreditava-se ter resolvido o problema das infecções. A nova “arma” era tão boa que o United States Surgeon General, Dr. William H. Stewart (1965-1969) disse no Congresso Americano sobre a descoberta da penicilina: “É hora de fecharmos os livros de doenças infecciosas e declarar que vencemos a guerra contra as epidemias”.

Ledo engano.

A partir desse momento, com o uso inadequado e desmedido de antibióticos começamos, por força de pressão seletiva

de antibióticos, a criar bactérias multirresistentes que não respondem a nenhum tipo de tratamento. Esse modelo de usar uma substância química (antibiótico) para acabar com uma infecção salvou milhões de vidas e talvez tenha sido a maior descoberta da medicina em todos os tempos, porém o problema é que nossas fontes estão se esgotando.

Em vista disso, faz-se urgente e necessário que estabeleçamos uma nova forma de relação com bactérias resistentes, evitando-as (higiene e contato), protegendo-nos (vacinação) e, quando precisarmos, enfrentá-las de uma forma mais específica, mais eficaz e menos invasora de nossa microbiota.

Essa é a proposta da terapia bacteriofágica apresentada nesta obra. Usaremos “predadores” naturais contra microrganismos patogênicos. Uma forma mais inteligente e menos agressiva de lidar com as infecções bacterianas. O livro traz a experiência de anos na área da virologia do Prof. Dr. Victor Balcão e da Profa. Dra. Marta Vila e tem o sentido de encurtar o trabalho de pesquisadores que certamente se utilizarão dessa obra de caráter científico-pedagógico para conduzirem seus experimentos.

Espero que essa valiosa referência possa auxiliar e principalmente inspirar novos pesquisadores na busca de uma terapia que nos proteja das infecções bacterianas de modo seletivo e eficaz.

Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol
Universidade de Sorocaba

APRESENTAÇÃO

A fagoterapia, ou terapia bacteriofágica, tem ressurgido como uma alternativa para o combate de infecções bacterianas. As perspectivas são promissoras quanto ao uso de bacteriófagos (ou fagos) para o combate de doenças infecciosas em humanos, animais e espécies vegetais, bem como para o controle de contaminação ambiental por patógenos bacterianos. No entanto, muito ainda há a fazer para a comprovação da sua eficácia e segurança.

Nesta perspectiva, almejou-se, com este manual, contribuir para a viabilização de resultados confiáveis e promissores visando aplicações futuras de fagos na medicina humana e veterinária, meio ambiente, agricultura e indústria alimentícia. A obra aqui apresentada foi motivada pela necessidade de padronização de protocolos e técnicas para a manipulação de fagos isolados/utilizados no Laboratório de Vírus Bacterianos (VBlab) da Universidade de Sorocaba (Uniso) desde 2015.

A ordenação dos protocolos objetivou uma sequência lógica para o isolamento, purificação, propagação e caracterização dos fagos isolados. Os procedimentos são simples e, em cada um, são apresentados, além do ensaio em si, todos os reagentes e materiais necessários para sua execução, além de um conjunto de explicações de determinadas etapas (os “bio-

porquês”). Este manual prático destina-se a estudantes e pesquisadores que se dedicam ao estudo dos bacteriófagos e suas possíveis aplicações num contexto de aumento generalizado das resistências bacterianas aos antibióticos.

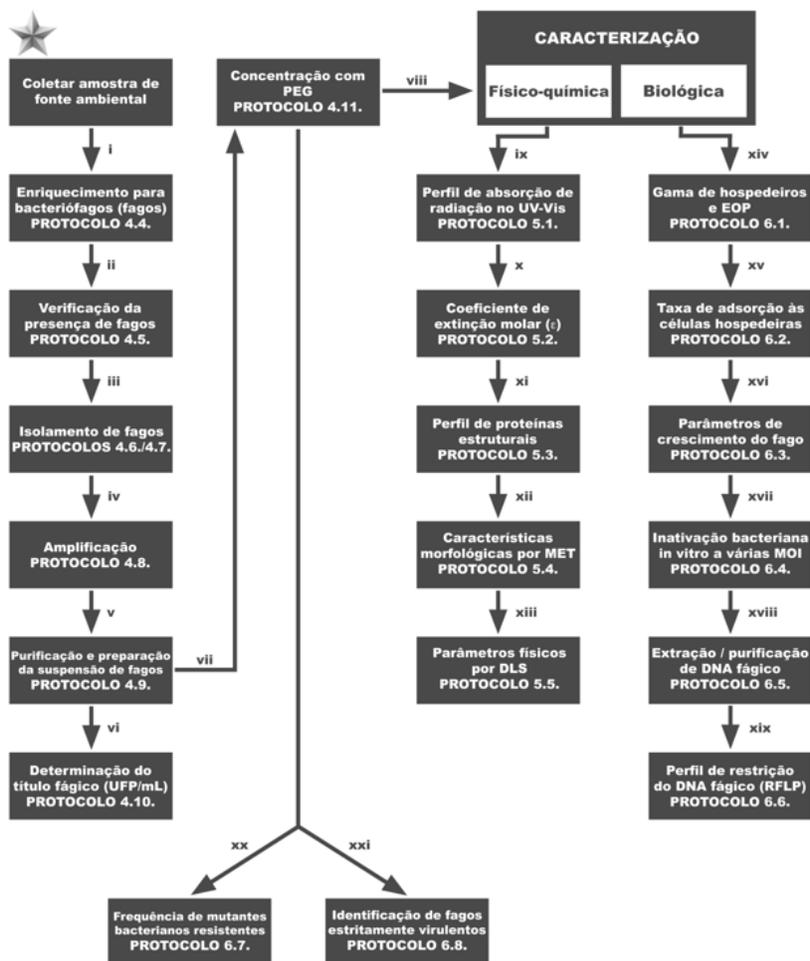
Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão

Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Quero iniciar pesquisa com bacteriófagos... Por onde começo?

Para responder a esta pergunta, apresenta-se abaixo (Esquema 1) um esquema com uma sequência lógica de atividades a serem feitas em pesquisa com bacteriófagos.

Esquema 1 - Sequência lógica de procedimentos para trabalhos de pesquisa com bacteriófagos



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	PROCEDIMENTOS BÁSICOS NUM LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA / MICROBIOLOGIA	32
2.1	Limpeza de materiais de laboratório	34
2.2	Descontaminação do local de trabalho	36
2.3	Descontaminação de cabines de segurança biológica	37
2.4	Lavagem e/ou descontaminação das mãos	37
2.5	Desinfecção e esterilização pelo calor	38
2.6	Esterilização em autoclave	38
2.7	Manipulação de amostras biológicas	38
2.8	Descarte	39
3	PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA, TAMPÕES, SOLUÇÕES E CONGELADOS DE MICRORGANISMOS	40
3.1	Meio Molten Top-Agar TSB (MTA-TSB)	40
3.2	Meio sólido Tryptic Soy Agar (TSA)	40
3.3	Caldo Tryptic Soy Broth (TSB).....	41
3.4	Caldo Tryptic Soy Broth Double Concentration (TSB 2x)	41
3.5	Tampão fágico SM	41
3.6	Tampão SM com gelatina	42
3.7	Tampão Phosphate Buffer Saline (PBS) concentrado [10x] e tampão PBS [1x]	42
3.8	Tampão Borato-EDTA (TBE)	43
3.9	Solução de EDTA 0,5 mol L ⁻¹ (pH 8,0)	43
3.10	Solução salina 0,9% (m/m)	43

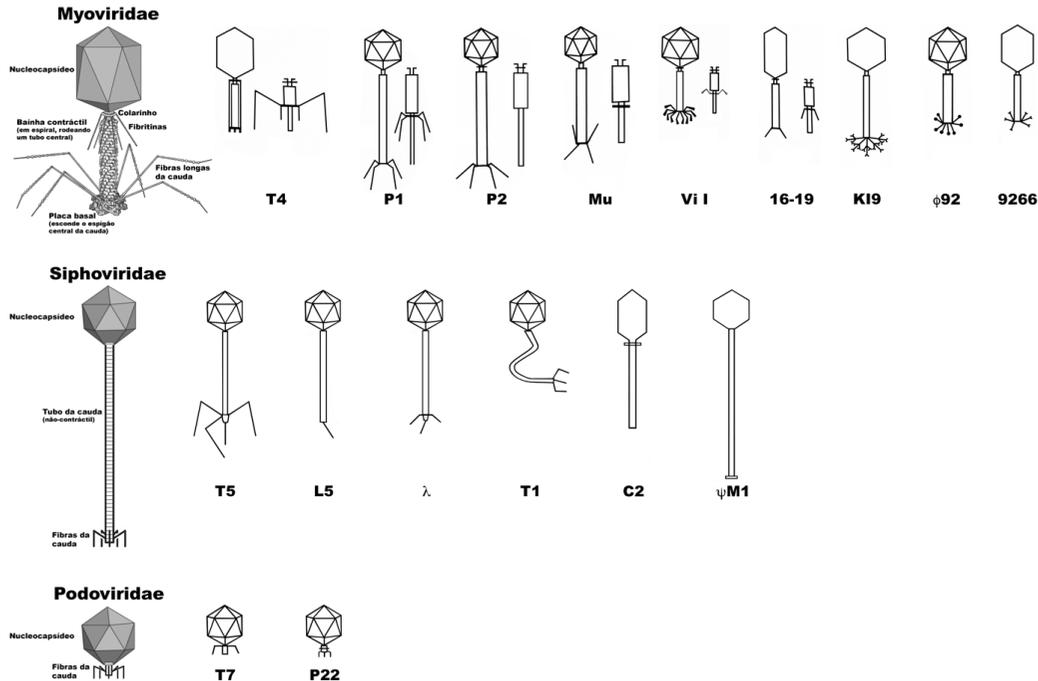
3.11 Congelados de microrganismos	44
3.12 Congelados de bacteriófagos	45
3.13 Solução estoque de PEG/NaCl (5x)	45
4 TRABALHANDO COM BACTERIÓFAGOS: ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO	46
4.1 Reativação de cultura de célula hospedeira	47
4.2 Curva de crescimento bacteriano	50
4.3 Preparação de tapete bacteriano pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada	53
4.4 Enriquecimento de amostras ambientais	55
4.5 Verificação da presença de bacteriófagos na amostra ambiental enriquecida, pelo Teste da gota (Spot Test)	58
4.6 Isolamento de placas bacteriofágicas: Método I	60
4.7 Isolamento de placas bacteriofágicas: Método II	64
4.8 Preparação da suspensão estoque de bacteriófagos: Amplificação	68
4.9 Preparação da suspensão estoque de bacteriófagos: Purificação	71
4.10 Determinação do título fágico	75
4.11 Concentração das partículas fágicas com polietilenoglicol	77
4.12 Preservação de bacteriófagos em glicerol para armazenamento de longo prazo	78
4.13 Remoção de endotoxinas bacterianas	79
5 TRABALHANDO COM BACTERIÓFAGOS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	83
5.1 Determinação do perfil de absorção das partículas fágicas por varredura espectral UV-Vis	84
5.2 Determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ)	87

5.3	Análise do perfil de proteínas estruturais das partículas bacteriofágicas isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	91
5.4	Determinação das características morfológicas das partículas fágicas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	96
5.5	Determinação dos parâmetros físicos das partículas fágicas por espalhamento dinâmico de luz laser (DLS)	99
6	TRABALHANDO COM BACTERÍOFAGOS: CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA	102
6.1	Determinação da gama de hospedeiros (Host Range) e da eficiência de plaqueamento (EOP)	103
6.2	Curva de adsorção às células bacterianas hospedeiras	107
6.3	Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)	112
6.4	Curva de inativação bacteriana <i>in vitro</i> a vários valores de MOI .	117
6.5	Extração e purificação de DNA fágico para sequenciamento	122
6.6	Determinação do perfil de restrição do DNA fágico (RFLP)	130
6.7	Determinação da frequência de mutantes bacterianos espontâneos resistentes aos fagos	140
6.8	Identificação de fagos estritamente virulentos	144
7	BIOPORQUÊS	146
8	BIOGLOSSÁRIO	150
9	EQUIPAMENTOS	169
	REFERÊNCIAS	171
	SOBRE OS AUTORES	180
	COLABORADORAS TÉCNICAS	181

1 INTRODUÇÃO

Bacteriófagos (ou fagos) são vírus que parasitam obrigatoriamente bactérias, possuindo capacidade de penetração em diferentes órgãos e tecidos. A classificação dos bacteriófagos é baseada em características como morfologia, tipo de ácido nucleico, modo de replicação e organismo hospedeiro alvo (White; Orlova, 2019). São encontrados em uma variedade de morfologias, sendo que, na mais comum, da ordem Caudovirales, apresentam uma cabeça de proteína (capsídeo) com forma icosaédrica envolvendo o material genético (ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) de fita simples ou dupla) (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Representação esquemática genérica dos bacteriófagos da ordem Caudovirales (com cauda)



Fonte: Adaptado de Ackermann (1998); Maniloff e Ackermann (1998); Yap e Rossmann (2014); Harada et al. (2018).

Família Myoviridae. Cauda contrátil permanente, mais ou menos rígida, longa e relativamente grossa, consistindo em um tubo central circundado por uma bainha helicoidal contrátil, que é separada da cápside por um pescoço. Durante a contração, as subunidades que constituem a bainha deslizam umas sobre as outras e a bainha fica mais curta e grossa, o que promove o contato entre o tubo central da cauda e a membrana plasmática da célula susceptível, atuando como uma seringa que perfura a parede celular com o tubo central e injeta o material genético no hospedeiro. São fagos não-envelopados, com genomas lineares de DNA de dupla cadeia (dsDNA). Uma vez dentro do hospedeiro, o material genético do fago assume o controle da sua maquinaria para a transcrição e inicia a tradução ribossomal começando a produção de novos vírions. A replicação segue o modelo de transposição replicativa. O método de transcrição usa o DNA como molde. Os novos vírions (progenia vírica) deixam a célula hospedeira por lise (*lysis from within*) mediada por proteínas como holinas, endolisinas e spaninas.

Família Siphoviridae. Caudas não-contráteis, finas, geralmente flexíveis, possuindo uma fibra terminal curta. O DNA infectante circulariza e se replica ou se integra ao genoma do hospedeiro. São fagos não-envelopados, com genomas lineares de DNA de dupla cadeia (dsDNA), com cápside icosaédrica. A replicação viral é citoplasmática. A replicação segue o modelo de transposição replicativa. O método de transcrição usa o DNA como molde. Os novos vírions (progenia

vírica) deixam a célula hospedeira por lise (*lysis from within*) mediada por proteínas como holinas, endolisinas e spaninas.

Família *Podoviridae*. São fagos não-envelopados, com cápside icosaédrica. A cauda é curta, não-contrátil, grossa e constituída por discos empilhados. O genoma é linear de DNA de dupla cadeia (dsDNA). A replicação viral é citoplasmática e segue o modelo de deslocamento da fita de DNA. O método de transcrição usa o DNA como molde. Os novos vírions (progenia vírica) deixam a célula hospedeira por lise (*lysis from within*) mediada por proteínas como holinas, endolisinas e spaninas.

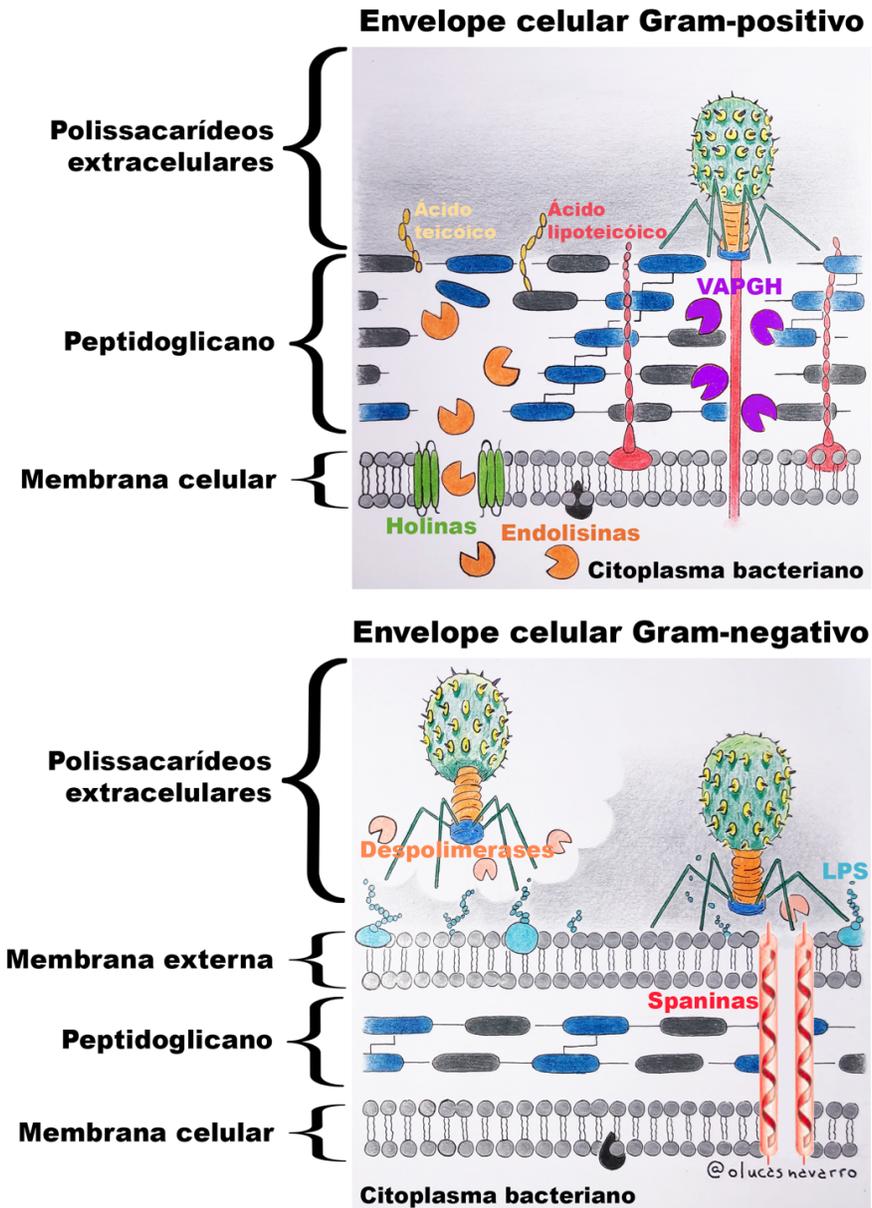
O capsídeo se liga à bainha contrátil que apresenta na extremidade a placa distal que coordena o movimento das fímbrias da cauda. As fímbrias ancoram em receptores específicos na superfície do hospedeiro bacteriano e, no caso dos fagos da família *Myoviridae*, a bainha contrátil contrai, injetando o DNA no citoplasma do hospedeiro bacteriano (Harada *et al.*, 2018, 2022).

Na Figura 1.1 podem observar-se os vários morfotipos descritos na literatura, dentre as várias famílias de fagos caudados: *Myoviridae* T4 (*Escherichia coli*, virulento, membro mais estudado da família *Myoviridae*), *Myoviridae* P1 (*Escherichia coli*, temperado), *Myoviridae* P2 (*Escherichia coli*, temperado), *Myoviridae* Mu (*Escherichia coli*, temperado), *Myoviridae* Vil (*Salmonella enterica* serovar *Typhi*), *Myoviridae* 16-19 (*Enterobacteria*), *Myoviridae* K19 (*Klebsiella pneumoniae*), *Myoviridae* ϕ 92 (*Escherichia coli*, virulento), *Myoviridae* 9266

(*Enterobacteria*), *Siphoviridae* T5 (*Escherichia coli*, virulento), *Siphoviridae* L5 (*Mycobacterium*), *Siphoviridae* λ (*Escherichia coli*, virulento), *Siphoviridae* T1 (*Enterobacteria*, virulento), *Siphoviridae* C2 (*Lactococcus*, virulento), *Siphoviridae* ψ M1 (*Bacillus subtilis*, virulento), *Podoviridae* T7 (*Escherichia coli*, virulento), e *Podoviridae* P22 (*Salmonella typhimurium*, temperado). Para alguns dos morfotipos da família *Myoviridae*, podem ainda ser visualizadas de forma esquemática as estruturas fágicas após a contração da bainha (T4, P1, P2, Mu, Vil, 16-19 e K19).

A Figura 1.2 ilustra o processo de translocação do material genético do fago em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Figura 1.2 - Representação esquemática de uma partícula fágica injetando material genético em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo



Fonte: Ilustração, Lucas Navarro.

No início do ciclo de infecção pelas partículas fágicas da ordem Caudovirales, família *Myoviridae*, os vírions fágicos perfuram mecanicamente a parede celular das células bacterianas susceptíveis utilizando as suas estruturas da cauda. Este processo pode ser auxiliado por hidrolases de peptidoglicano associadas aos vírions (VAPGH, Figura 1.2), que hidrolizam o peptidoglicano bacteriano. No final do ciclo de infecção, com mecanismos de translocação dependentes de proteínas holinas, as holinas são distribuídas na membrana celular criando agregados bidimensionais e provocando a perfuração da membrana celular (Figura 1.2). As endolisinas podem então passar através desses canais e acessar a camada de peptidoglicano, degradando as suas ligações transversas. Adicionalmente, outras proteínas chamadas spaninas (Figura 1.2) são necessárias para provocarem a ruptura da membrana externa na lise de células bacterianas Gram-negativo, unindo-a à membrana celular. Só então ocorre a lise da parede celular bacteriana. As hidrolases do peptidoglicano (endolisinas ou VAPGH) incluem N-acetil- β -D-muramidases, endo- β -N-acetilglucosaminidases, N-acetilmuramoil-L-alanina amidases, endopeptidases, L-alanoil-D-glutamato endopeptidases e transglicosilases (Rios *et al.*, 2016).

Os fagos foram descobertos no início do século XX pelo microbiólogo britânico Frederick Twort, que observou, em 1915, zonas de lise em placas de cultivo de vírus contaminadas com bactérias, postulando então a existência de agentes capazes de lisarem ou destruir as bactérias. No entanto, a descoberta oficial ocorreu em 1917, pelo microbiólogo Félix D' Herelle que utilizou vírus líticos de *Shigella dysenteriae* em aplicação única para tratar casos de disenteria, iniciando a fagoterapia ou terapia fágica.

Também, pela primeira vez, utilizou-se a denominação de bacteriófago, que une os termos bactéria e “phagein”, literalmente “comedor de bactérias” (Wittebole *et al.*, 2014).

A terapia fágica movimentou alguns estudos, sobretudo na Europa, no começo do século XX, com relativas taxas de sucesso. Porém, com a introdução das sulfonamidas na década de 1930 e, depois, da penicilina na década de 1940, houve desmotivação para pesquisas com fagos (Lin *et al.*, 2017; Wittebole *et al.*, 2014). Entretanto, o uso indiscriminado dos antibióticos, ao longo dos anos, favoreceu a seleção das chamadas “superbactérias” resultando em infecções cada vez mais difíceis de tratar, implicando em terapias de custo elevado e maior toxicidade para o paciente. O surgimento das bactérias multirresistentes, que são cepas resistentes a praticamente todos os antibióticos (antibacterianos), associado à limitação das opções terapêuticas, tem levado à busca por alternativas para o combate às infecções bacterianas, fazendo ressurgir assim o interesse pela terapia fágica (Rios *et al.*, 2016; Harada *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2020).

Dessa forma, os fagos ressurgem como potenciais alternativas no combate à resistência bacteriana aos antibióticos convencionais, pois são vírus extremamente específicos para determinados hospedeiros bacterianos ao mesmo tempo que são incapazes de infectar células humanas ou animais (Harada *et al.*, 2018; Rios *et al.*, 2016). Outra abordagem interessante é o uso de fagos como desinfetantes, especialmente em áreas médicas ou dispositivos clínicos (Harada *et al.*, 2018; Domingo-Calap; Delgado-Martínez, 2018). Adicionalmente, os bacteriófagos têm sido aplicados na agricultura para controle de infecções por

bactérias fitopatogênicas, em diagnósticos de doenças, no biocontrole de infecções bacterianas em medicina veterinária e no biocontrole bacteriano por forma a assegurar a segurança dos alimentos (García *et al.*, 2008).

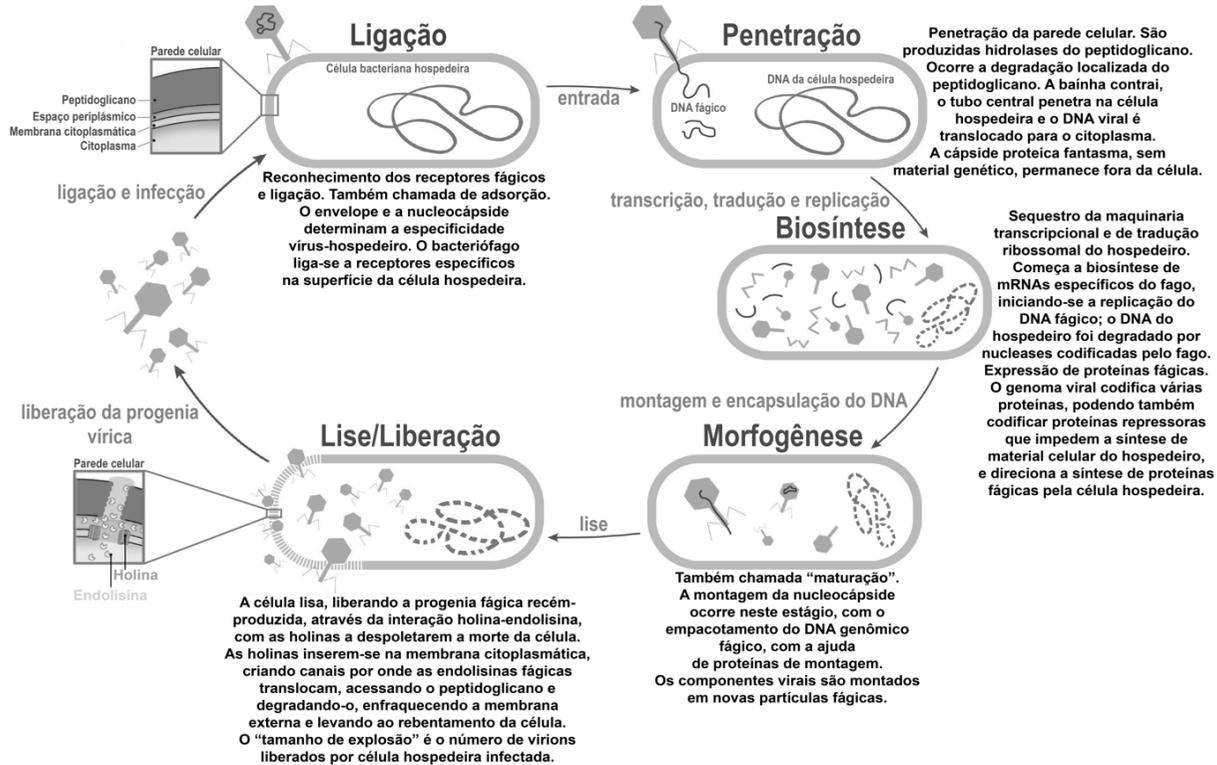
O fago se liga ao hospedeiro bacteriano especificamente em receptores encontrados na superfície da bactéria, e promove a translocação do seu material genético para o citoplasma da célula, com a replicação do material genético a iniciar na sequência de origem de replicação e onde genes precoces, genes tardios e genes estruturais do genoma fágico passam a ser transcritos pela maquinaria de transcrição da célula hospedeira. A célula hospedeira fornece os blocos de construção molecular e as enzimas necessárias para replicar o material genético do fago e produzir a progenia fágica.

O fago pode passar por dois ciclos de vida diferentes, o ciclo lítico e o ciclo lisogênico. No ciclo lisogênico, os fagos não lisam imediatamente a célula hospedeira; em vez disso, seu genoma (DNA ou RNA) é inserido no cromossomo hospedeiro em locais específicos, e a célula passa a ser designada por lisogênio. O DNA ou RNA no genoma do hospedeiro é chamado de profago. O profago é replicado juntamente com o genoma do hospedeiro bacteriano, estabelecendo uma relação estável (Doss *et al.*, 2017). Já no ciclo de vida lítico, cinco fases distintas culminam na liberação da progenia vírica (ligação, penetração, biossíntese, morfogênese, lise/liberação) (Figura 1.3), tornando-se fundamental conhecer tais fases para compreender os mecanismos envolvidos na fagoterapia e suas implicações (Rios *et al.*, 2016; Harada *et al.*, 2018).

A infecção de uma célula bacteriana hospedeira suscetível, por uma partícula bacteriofágica que reconhece receptores específicos na superfície dessa célula, pode ser classificada como infecção latente, infecção produtiva, infecção redutiva, infecção restritiva, infecção abortiva ou infecção destrutiva, dependendo, respectivamente, se não existe liberação nem maturação de progenia fágica envolvendo no entanto a replicação intracelular do genoma fágico, se resulta diretamente na liberação da progenia fágica (bacteriolítica), se o fago permanece viável mas não produz vírions, se o fago é inativado por algum tipo de sistema de defesa bacteriana com a bactéria infectada a permanecer viável, se a infecção fágica termina com a morte da célula mas não ocorre liberação de vírions ou são produzidos vírions em número insuficiente (bacteriolítica), ou se ocorre perda de viabilidade do fago após a sua ligação a uma célula bacteriana.

Na etapa de adsorção, ocorre ligação entre estruturas do bacteriófago e receptores na superfície bacteriana, indicando sua especificidade, ou seja, a afinidade do fago por determinada bactéria. Na sequência, o bacteriófago injeta seu material genético e assume o controle da maquinaria metabólica da célula (neste momento, a célula passa a ser designada por “virocélula”), fazendo-a transcrever o seu conteúdo genético (Doss *et al.*, 2017) com produção de todas as proteínas fágicas, empacotamento das cópias genômicas fágicas nos procapsídeos, e induzindo a mesma a produzir novos vírions no seu citoplasma, que serão liberados após enfraquecimento enzimático da membrana celular a partir de dentro da célula infectada, com ajuda do sistema bienzimático holina/lisina, e culminando na lise da célula, em oposição à liberação crônica, que ocorre essencialmente com fagos filamentosos.

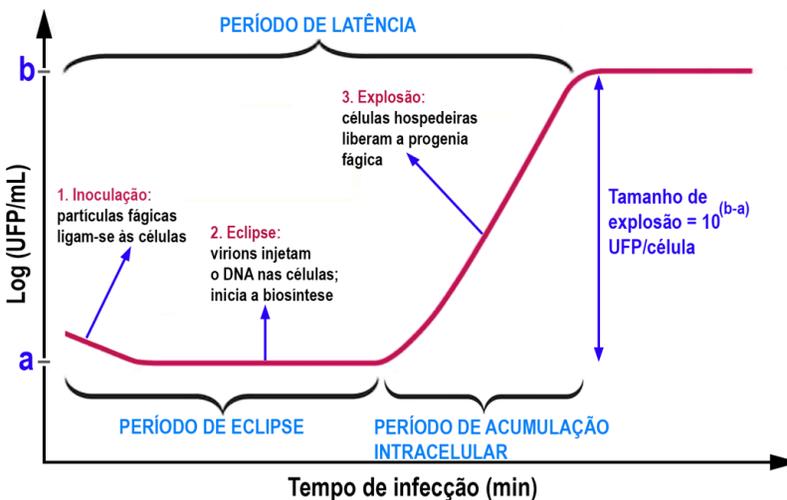
Figura 1.3 - Ciclo lítico (bactericida) de replicação de um bacteriófago, mostrando as várias fases do processo de autoamplificação fágica em células bacterianas hospedeiras susceptíveis



Enquanto a literatura sugere que cada bacteriófago tem capacidade de produzir, em média, cerca de 200 novos vírions (Carlton, 1999), excedendo largamente o número de células bacterianas presentes não apenas pela alta taxa de replicação fágica, mas também por provocar a lise e conseqüentemente a morte das células bacterianas (Matsuzaki *et al.*, 2005), estudos mais recentes (Balcão *et al.*, 2022a,b,c; Harada *et al.*, 2022) sugerem uma correlação putativa entre a flexibilidade do genoma fágico e o rendimento da morfogênese vírica, com um genoma fágico mais flexível a levar a tamanhos de explosão (*burst size*) mais elevados e um genoma fágico mais rígido a levar a tamanhos de explosão menores.

A Figura 1.4 ilustra uma curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) mostrando as várias fases do processo de autoamplificação fágica.

Figura 1.4 - Ilustração de uma curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC) mostrando as várias fases do processo de autoamplificação fágica



Os bacteriófagos são o mecanismo desenvolvido pela natureza para o controle da população bacteriana e, embora sendo altamente específicos para os seus alvos bacterianos, cada bacteriófago lítico tem um objetivo: assegurar que a sua bactéria-alvo não se torne dominante num determinado ambiente. Dadas as oportunidades e condições adequadas, as bactérias multiplicar-se-ão naturalmente, mas a superpopulação bacteriana causará um desequilíbrio nesse ambiente. Essa população bacteriana superampliada aumenta as chances das células bacterianas colidirem com, e enfrentarem, uma partícula bacteriofágica que visa especificamente essa bactéria. O processo de replicação lítica do fago é rápido, e um surto bacteriano pode ser eliminado em poucas horas.

O uso maciço de antibióticos na saúde humana e animal e na produção industrial de alimentos é um dos grandes impulsionadores da resistência bacteriana a esses antibióticos. Todos os estudos científicos com bacteriófagos comprovam que estes predadores bacterianos podem ser extremamente eficientes contra bactérias patogênicas, exibindo assim um tremendo potencial para ajudar a reduzir a necessidade de uso desses antibióticos.

Os trabalhos desenvolvidos pela comunidade acadêmica, pelo potencial que os fagos apresentam, têm tido como foco a aplicação de bacteriófagos para o controle de bactérias patogênicas nas áreas da saúde humana, segurança dos alimentos, agricultura, meio ambiente, entre outras, visando a melhoria da qualidade de vida do ser humano. Neste sentido, os protocolos a seguir apresentados visam colaborar com o aprimoramento de técnicas voltadas para as etapas iniciais do processo de isolamento, purificação, propagação e caracterização de partículas fágicas.

2 PROCEDIMENTOS BÁSICOS NUM LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA / MICROBIOLOGIA

Em um laboratório de biotecnologia/microbiologia, particularmente num laboratório onde são realizados testes com microrganismos, as condições de higiene e limpeza devem ser rigorosas, evitando-se possíveis fontes de contaminações que constituam um risco em potencial para todos os que trabalham no local (Andrade, 2008).

Torna-se, assim, necessária a observação de algumas regras básicas (Balcão; Amorim, 2012), as quais se detalham em seguida.

- [i].** Não iniciar qualquer trabalho no laboratório antes de se compreender bem o que se vai fazer. Pergunte, quando subsistirem dúvidas. Antes de iniciar o(s) ensaio(s), leia atentamente todos os procedimentos e/ou protocolos descritos. Verificar se tem disponível todo o material necessário;
- [ii].** Tenha o máximo cuidado em todas as atividades que desenvolver no laboratório. Se possível, deve manter o celular desligado para evitar distrações;
- [iii].** Objetos pessoais como bolsas, sacolas, pacotes, mochilas, etc., não devem permanecer na bancada. Existem armários à disposição destinados a guardar esses objetos;

- [iv].** O uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) é obrigatório. O pesquisador deve paramentar-se com jaleco (branco, de preferência) de manga comprida, calçado fechado, óculos de proteção e máscara (quando for manusear reagentes potencialmente perigosos). Cabelos compridos devem estar presos. Evitar a utilização de adornos como anéis, colares, brincos;
- [v].** Não comer, não beber e não fumar no laboratório, em situação alguma;
- [vi].** O material de laboratório utilizado deve ser mantido em ordem e limpo. Verificar a limpeza das balanças, vidrarias, etc., após o final de cada atividade de pesquisa;
- [vii].** Qualquer manipulação envolvendo microrganismos (vírus, bactérias, fungos filamentosos, leveduras) deve ser realizada em cabine de segurança biológica (fluxo laminar);
- [viii].** Para o descarte de material contaminado deve-se, inicialmente, fazer a descontaminação em autoclave durante 30 min a uma temperatura de 121 °C;
- [ix].** Evite trabalhar sozinho(a) no laboratório;
- [x].** Qualquer acidente que ocorra deve ser comunicado imediatamente ao responsável pelo laboratório (por ex., queima-

duras, cortes, quebra de vidrarias, danos a equipamentos científicos, etc.) e tomadas as medidas necessárias. Cortes ou ferimentos, mesmo leves, devem ser desinfetados e cobertos; queimaduras produzidas por fogo ou material quente, devem ser tratadas com pomadas apropriadas ou vaselina esterilizada; para o combate a incêndios nas roupas ou no ambiente do laboratório deve-se usar o chuveiro existente no local ou os extintores disponíveis no ambiente laboratorial, respectivamente.

2.1. Limpeza de materiais de laboratório

Para se conseguir uma desinfecção ou esterilização adequada, é necessário proceder a uma limpeza prévia do material que irá ser utilizado, uma vez que muitos produtos germicidas só são ativos em materiais previamente limpos. Existem muitos tipos de produtos químicos que podem ser usados como desinfetantes e/ou antissépticos, assim, devem ser selecionados, armazenados, manipulados, utilizados e eliminados com cuidado, respeitando as instruções dos fabricantes.

Para proteção pessoal, recomenda-se a utilização de luvas de nitrilo, jaleco de cor branca (cor que permite observar algum derrame acidental de líquido) e proteções oculares durante a preparação de diluições de germicidas químicos. Apresentam-se em seguida algumas classes de germicidas químicos comumente utilizados num laboratório de biotecnologia/microbiologia.

[i] Cloro (hipoclorito de sódio)

O cloro é um germicida químico facilmente disponível e com vasto campo de ação. Para ação desinfetante de uso geral, deve ter uma concentração de cloro ativo de 1 g L^{-1} . Para o caso de derrames que representem riscos biológicos e na presença de grandes quantidades de matéria orgânica, recomenda-se uma solução mais forte contendo 5 g L^{-1} de cloro ativo. As soluções de hipoclorito de sódio, como a lixívia doméstica, contêm 50 g L^{-1} de cloro ativo e devem, por isso, ser diluídas a 1:50 ou 1:10 para se obterem concentrações finais de 1 g L^{-1} e 5 g L^{-1} , respectivamente. Os grânulos de hipoclorito de cálcio, $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, contêm cerca de 70% de cloro ativo, pelo que soluções preparadas com estes grânulos, contendo $1,4 \text{ g L}^{-1}$ e $7,0 \text{ g L}^{-1}$, contêm respectivamente 1 g L^{-1} e 5 g L^{-1} de cloro ativo. A lixívia pode ser utilizada como desinfetante universal e para mergulhar materiais contaminados que não contenham partes metálicas.

[ii] Álcoois

O etanol (álcool etílico, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) e o 2-propanol (álcool isopropílico, $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$) são bastante utilizados e apresentam propriedades desinfetantes similares. São ativos contra bactérias vegetativas, fungos filamentosos e vírus lipídicos, mas não contra esporos. Para maior eficácia, devem ser utilizados em concentrações próximas de 70 % (v/v) em água desionizada. Uma vantagem importante das soluções aquosas de álcoois é não deixarem resíduos nos objetos tratados. Misturas com outros agentes são mais eficazes do que unicamente álcool, por exemplo álcool a 70% (v/v) com 100 g L^{-1} de formaldeído, e álcool

contendo 2 g L⁻¹ de cloro ativo. Os álcoois são voláteis e inflamáveis e não devem ser utilizados perto de chamas. As soluções de trabalho devem ser armazenadas em recipientes apropriados para evitar a evaporação.

[iii] Peróxido de hidrogênio e perácidos

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e os perácidos são fortes oxidantes e têm amplo campo de ação como germicidas. O peróxido de hidrogênio é fornecido como solução a 3% (v/v) ou como solução aquosa a 30% (v/v), necessitando ser diluído em 5-10 vezes o seu volume com água desionizada esterilizada. Contudo, soluções a 3-6% (v/v) de peróxido de hidrogênio são limitadas como germicidas. Peróxido de hidrogênio e perácidos podem ser corrosivos sobre metais como alumínio, cobre, latão e zinco, e também podem descolorar tecidos, cabelos, pele e mucosas. Artigos tratados com estes produtos devem, por isso, ser abundantemente enxaguados com água antes de qualquer contato com olhos e mucosas. Devem ser sempre armazenados longe de fontes de calor e protegidos da luz.

2.2 Descontaminação do local de trabalho

A descontaminação do ambiente e de mobiliário e equipamentos de laboratório, que devem ser assépticos, exige uma combinação de desinfetantes líquidos e gasosos. Para superfícies pode utilizar-se uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) contendo 1 g L⁻¹ de cloro ativo, mas para situações de

grande risco recomendam-se soluções mais fortes (5 g L⁻¹). Para descontaminação do meio ambiente, soluções contendo 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) também podem ser utilizadas.

2.3 Descontaminação de cabines de segurança biológica

A descontaminação de câmaras de fluxo laminar (cabines de segurança biológica) de Classe I e Classe II pode ser feita por aquecimento de formaldeído (concentração final de 0,8% (v/v) de *p*-formaldeído no ar).

Para uso rotineiro, 15 min antes de se iniciarem quaisquer procedimentos experimentais, deve ligar-se a luz ultravioleta (lâmpada UV) e, na sequência, descontaminar a superfície da cabine de segurança biológica com gaze embebida em álcool etílico ou isopropílico a 70% (v/v).

2.4 Lavagem e/ou descontaminação das mãos

Para manipular materiais que apresentam riscos biológicos, deve utilizar-se luvas apropriadas (nitrilo). Contudo, isto não elimina a necessidade de lavar as mãos regularmente. Na maioria dos casos, lavar as mãos com água e sabão é suficiente para as descontaminar, mas em situações de grande risco biológico recomenda-se a utilização de sabões germicidas. As mãos devem ser completamente cobertas de espuma de sabão e esfregadas durante pelo menos 10 s, passadas por água limpa e secas utilizando papel ou toalha limpos. Pode também esfregar-se produtos à base de álcool.

2.5 Desinfecção e esterilização pelo calor

O calor “seco”, que é totalmente não corrosivo, é utilizado para tratar objetos de laboratório que podem suportar temperaturas de 160 °C ou superiores durante 2-4 h. O calor “úmido” é muito eficaz quando utilizado em autoclave. O aquecimento a 100 °C não mata necessariamente todos os microrganismos e/ou agentes patogênicos, mas pode ser utilizado como tratamento para desinfecção quando outros métodos (desinfecção química ou desinfecção em autoclave) não forem aplicáveis ou não estiverem disponíveis.

2.6 Esterilização em autoclave

A esterilização por vapor saturado sob pressão (autoclave) é o meio mais eficaz e seguro de esterilizar materiais de laboratório. Ciclos de:

[i] 3 min a 134 °C;

[ii] 10 min a 126 °C;

[iii] 30 min a 121 °C;

[iv] 25 min a 115 °C, assegurarão a esterilização de materiais carregados em autoclave.

2.7 Manipulação de amostras biológicas

A coleta, o transporte e a manipulação de forma inadequada de amostras biológicas em laboratório representam um risco de contaminação para as pessoas envolvidas. Os recipientes de

amostras devem ser de vidro ou, de preferência, de plástico resistente, devendo ser corretamente lacrados e identificados (com nome da amostra, data, nome da pessoa que obteve a amostra e, se possível, coordenadas geográficas do local de amostragem).

Os recipientes contendo amostras biológicas devem ser abertos em cabine de segurança biológica, tendo à disposição desinfetantes. O uso de luvas de nitrilo e jaleco é obrigatório. Também se recomenda o uso de óculos de proteção.

2.8 Descarte

A eliminação de resíduos de laboratório é regida por vários regulamentos regionais, nacionais e internacionais, que devem ser devidamente consultados antes de se elaborar e implementar um programa de manuseamento, transporte e eliminação de resíduos que apresentem riscos biológicos.

3 PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA, TAMPÕES, SOLUÇÕES E CONGELADOS DE MICRORGANISMOS

Para a preparação de meios de cultura, deve-se seguir a orientação dos fabricantes e usar técnicas assépticas (Sanders, 2012). Todos os meios de cultura e soluções, e material diverso como tubos Eppendorf®, tubos de ensaio, tubos tipo Falcon, pinças, ponteiros de micropipetas, tiras de papel de filtro, papel de filtro, frascos Schott®, entre outros, devem ser esterilizados em autoclave durante 30 min a 121 °C sob 1 atm de pressão.

3.1 Meio *Molten Top-Agar TSB (MTA-TSB)*

Adicionar 15 g de meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) desidratado e 3 g de ágar bacteriológico em um frasco Schott® de 500 mL de volume. Completar com água ultrapura para volume final de 500 mL. O meio de cultura deve ser autoclavado e, posteriormente, armazenado em estufa a 47 °C para se manter no estado líquido.

3.2 Meio sólido *Tryptic Soy Agar (TSA)*

Pesar 24 g de meio TSB e 9,6 g de ágar bacteriológico e adicionar 800 mL de água ultrapura em um frasco Schott® de 1 L. Após esterilização em autoclave, o meio de cultura deve ser vertido em placas de Petri descartáveis de 9 cm (ou 6 cm) de diâmetro. Uma vez solidificado o meio, as placas devem ser armazenadas invertidas a 4 °C até utilização.

3.3 Caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB)

Dissolver 24 g de meio de cultura TSB em 800 mL de água ultrapura em um frasco Schott® de 1 L. O caldo deve ser esterilizado em autoclave e armazenado a 4 °C até utilização.

3.4 Caldo *Tryptic Soy Broth Double Concentration* (TSB 2x)

Dissolver 48 g de meio de cultura TSB em 800 mL de água ultrapura em um frasco Schott® de 1 L. O caldo deve ser esterilizado em autoclave e armazenado a 4 °C até utilização.

3.5 Tampão fágico SM

Pesar 6,06 g de Trizma-Base em um béquer de 100 mL e adicionar 50 mL de água ultrapura. Ajustar o pH desta solução para 7,5 com auxílio de milivoltímetro digital, por adição de ácido clorídrico (HCl) 1 mol L⁻¹.

Posteriormente, adicionar em um balão volumétrico de 1000 mL, 5,8 g de cloreto de **S**ódio (NaCl), 2 g de sulfato de **M**agnésio heptahidratado (MgSO₄•7H₂O) e 50 mL da solução preparada de Trizma-Base a pH 7,5. Completar com água ultrapura para volume final de 1000 mL. Após esterilização em autoclave, o tampão fágico deve ser mantido armazenado a 4 °C.

3.6 Tampão fágico SM com gelatina

Para preparar 1 L de tampão SM com gelatina, num balão volumétrico de 1000 mL adicionar 5,8 g de NaCl (concentração final de 100 mM) e 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (concentração final de 8 mM) em 800 mL de água ultrapura. Adicionar 50 mL de Tris-Cl (1 mol L^{-1} , pH 7,5) (concentração final de 50 mM) e 5 mL de solução aquosa de gelatina (2%, m/v) (concentração final de 0,01%, m/v). Ajustar o volume para 1000 mL com água ultrapura. Esterilizar o tampão por autoclavagem durante 20 min a 15 psi ($1,05 \text{ kg cm}^{-2}$) no ciclo de líquidos.

Após arrefecimento da solução, dispensar alíquotas de 50 mL em frascos estéreis. O tampão SM com gelatina pode ser armazenado indefinidamente à temperatura ambiente. Descartar cada alíquota após uso, para minimizar a possibilidade de contaminação.

3.7 Tampão *Phosphate Buffer Saline* (PBS) concentrado [10×] e tampão PBS [1×]

Pesar 82 g de cloreto de sódio (NaCl), 10,5 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e 3,55 g de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4). Transferir para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água ultrapura. Para preparação do tampão PBS [1×], transferir 100 mL do tampão PBS [10 ×] para balão volumétrico de 1000 mL de capacidade e completar o volume com água ultrapura.

3.8 Tampão Borato-EDTA (TBE)

Pesar 21,6 g de Tris-Base e 11 g de ácido bórico em um béquer. Dissolver com uma pequena quantidade de água ultrapura (aproximadamente 100 mL). Adicionar 40 mL de EDTA 0,5 mol L⁻¹ pH 8,0, transferir para balão volumétrico de 2000 mL de capacidade e completar o volume com água ultrapura. Autoclavar.

3.9 Solução de EDTA 0,5 mol L⁻¹ (pH 8,0)

Para preparar 50 mL desta solução, pesar 9,305 g de EDTA (MM = 372,22 g mol⁻¹), ajustar o pH a 8,0 com NaOH em *pellet* ou concentrado até dissolver. Após dissolução, terminar de ajustar o pH com NaOH concentrado até pH 8,0, transferir para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água ultrapura. Autoclavar e dividir em alíquotas. Alternativamente, num béquer, adicionar 18,6 g de EDTA a 80 mL de água ultrapura, adicionar uma barra magnética e agitar a solução com agitador magnético. Ajustar o pH a 8,0 usando NaOH concentrado. Transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água ultrapura.

3.10 Solução salina 0,9% (m/m)

Pesar 3,6 g de cloreto de sódio (NaCl) e dissolver em 400 mL de água ultrapura. A solução resultante deve ser transferida para frasco Schott® de 500 mL de capacidade e esterilizada em autoclave. Esta solução deverá ser armazenada a 4 °C até utilização.

3.11 Congelados de microrganismos

Protocolo 1:

Preparar uma solução de glicerol a 10% (m/m) em água ultrapura. Para isso, dissolver 10 g de glicerol em 90 mL de água ultrapura e autoclavar a solução resultante.

Num criotubo, adicionar 20% de glicerol a 10% (m/m) e 80% de suspensão de bactéria revivificada, e congelar posteriormente a -86 °C em biofreezer.

Para 800 µL de congelado, adicionar em criotubo 160 µL de solução de glicerol a 10% (m/m) e 640 µL de suspensão de bactéria revivificada. Congelar posteriormente a -86 °C em biofreezer.

Protocolo 2:

Preparar solução de glicerol a 50% (m/m) em TSB. Para isso, dissolver 50 g de glicerol em 50 mL de TSB e autoclavar a solução resultante.

Num criotubo, adicionar 1 volume de glicerol a 50% (m/m) e 1 volume de suspensão de bactéria revivificada, e congelar posteriormente a -86 °C em biofreezer.

Para 800 µL de congelado, adicionar em criotubo 400 µL de solução de glicerol a 50% (m/m) e 400 µL de suspensão de bactéria revivificada. Congelar posteriormente a -86 °C em biofreezer.

3.12 Congelados de bacteriófagos

Num criotubo, adicionar 1 volume de glicerol (autoclavado) e 1 volume de suspensão fágica (mistura 1:1, v/v), e congelar posteriormente a -86 °C em biofreezer.

Para 2000 µL de congelado, adicionar em criotubo 1000 µL de glicerol (autoclavado) e 1000 µL de suspensão fágica. Congelar posteriormente a -86 °C em biofreezer.

3.13 Solução estoque de PEG/NaCl (5×)

Para preparar a solução de PEG 8000 a 20% (m/v) contendo NaCl a 2,5 mol L⁻¹, dissolver 100 g de PEG 8000 e 75 g de NaCl em 400 mL de água ultrapura, e completar para volume final de 500 mL em balão volumétrico utilizando água ultrapura, com agitação à temperatura ambiente. A solução resultante pode ser esterilizada por autoclavagem (opcional), mas será necessário misturar bem a solução durante o período de resfriamento pós-esterilização para evitar a separação de fases. A solução deverá ser armazenada à temperatura ambiente.

4 TRABALHANDO COM BACTERIÓFAGOS: ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO

Todos os ensaios devem ser realizados seguindo rigorosamente a técnica asséptica (Sanders, 2012) e em cabine de segurança biológica, obedecendo às normas de segurança e conduta num laboratório de microbiologia, pois este equipamento ajuda a proteger reagentes e culturas biológicas de contaminação, assim como o pesquisador. Usado corretamente, fornece espaço de trabalho com ar limpo e ultrafiltrado removendo contaminantes transportados pelo ar. Também evita que o ar do ambiente externo entre na área de trabalho, contaminando-o. A parte mais importante de uma cabine de segurança biológica consiste num sistema de retenção de bactérias de alta eficiência, um filtro HEPA (*high efficiency particulate arrest*). Um filtro HEPA pode reter um mínimo de 99,97% de poeira, pólen, fungos, bactérias e quaisquer partículas transportadas pelo ar que tenham um tamanho superior a 0,3 μm , a um fluxo de 85 litros por min (Bykowski *et al.*, 2012).

É importante ter um ambiente de trabalho completamente limpo, quando se pretende trabalhar com bacteriófagos de forma eficaz. Microrganismos estão presentes em todas as superfícies inanimadas, criando fontes onipresentes de possível contaminação no laboratório. O sucesso dos ensaios experimentais depende, por isso, da capacidade do pesquisador de esterilizar superfícies e equipamentos de trabalho, bem como de evitar a contaminação do material já esterilizado.

4.1 Reativação de cultura de célula hospedeira

Os fagos interagem com, e infectam, bactérias hospedeiras específicas, sem afetarem outras bactérias ou linhagens celulares de outros organismos. Pela especificidade das interações fago-hospedeiro, para trabalhos de pesquisa com fagos torna-se necessária a busca e manutenção de cepas bacterianas específicas para cada fago (Stone *et al.*, 2019).

As estirpes ou cepas bacterianas utilizadas como células hospedeiras podem ser adquiridas de coleções de culturas reconhecidas nacional e/ou internacionalmente (p. ex.: ATCC, DSMZ), com especificações fenotípicas e genotípicas, sendo fundamentais para a qualidade dos ensaios (Brumano *et al.*, 2011).

Normalmente, tais estirpes de coleção são obtidas na forma liofilizada, sendo reativadas seguindo as indicações do fornecedor. Deve-se armazenar a cultura liofilizada a uma temperatura igual ou inferior a 4 °C, ou em biofreezer (-86 °C), caso não seja imediatamente reidratada para a realização de ensaios laboratoriais. Após a reidratação do microrganismo é comum realizarem-se repicagens frequentes, no entanto, não se pode utilizar esta técnica de manutenção para além de mais de cinco passagens do cultivo original, para conservação de suas características originais (ATCC, 2022; DSMZ, 2022).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Banho termostaticado	Etanol a 70% (v/v)
Tubos de ensaio estéreis com tampa de alumínio	Cepa bacteriana de coleção
Micropipeta de 1000 µL	Caldo de cultura TSB ou LB (Luria Bertani)
Ponteiras de 1000 µL (azuis)	
Alça metálica ou descartável	
Lamparina ou bico de Bunsen (fixo ou portátil)	
Placas de Petri com meio sólido TSA	
Estufa de incubação microbiológica	

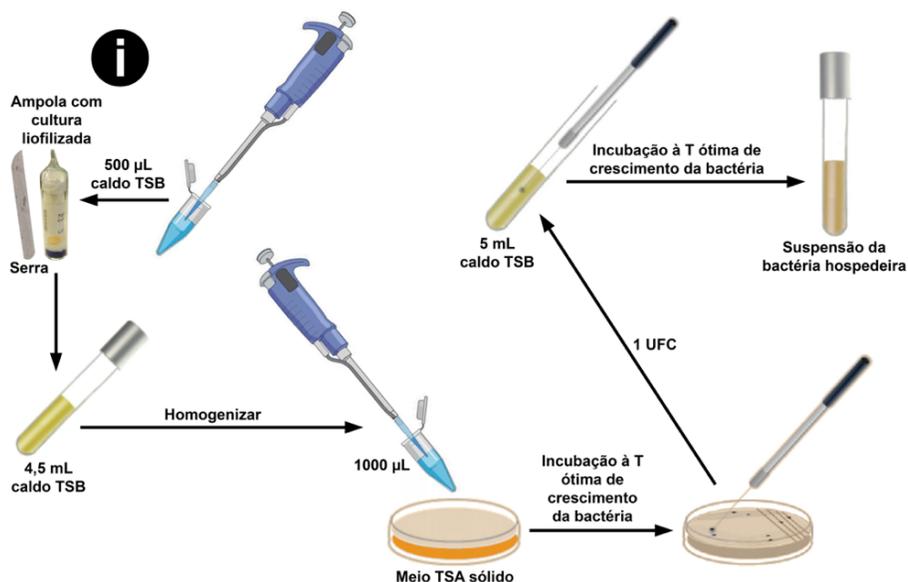
Procedimento experimental

Cepas de coleção liofilizadas

- [a]** Usando uma pequena serra, fragilizar o colo da parte superior da ampola de vidro e quebrá-la, introduzindo de seguida 500 µL de caldo TSB estéril. [bp-4.1-1](#)
- [b]** Dissolver o *pellet* com a ajuda da ponteira da micropipeta, e transferir todo o conteúdo para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL de caldo TSB estéril.
- [c]** Homogeneizar, e plaquear 1000 µL em meio TSA sólido.
- [d]** Incubar à temperatura ótima de crescimento da bactéria durante 24 h.
- [e]** Com o auxílio de uma alça metálica flamejada ao rubro (ou alsa descartável), transferir uma única colônia (UFC) para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo TSB estéril.
- [f]** Incubar à temperatura ótima de crescimento da bactéria durante 24 h.

O procedimento experimental acima descrito pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 4.1.1.

Figura 4.1.1 - Esquema geral do processo de revivificação de cepas bacterianas de coleção adquiridas na forma liofilizada



Cepas de coleção congeladas

- [a]** Descongelar o frasco da amostra por meio de agitação suave em um banho termostatizado com temperatura ajustada para a temperatura normal de crescimento dessa cepa. O descongelamento ocorre em cerca de 2 min ou até que todos os cristais de gelo tenham fundido.
- [b]** Retirar o frasco do banho termostatizado e descontaminar a superfície externa com etanol a 70% (v/v). A partir deste ponto, seguir rigorosamente a técnica asséptica em uma cabine de segurança biológica para todas as manipulações posteriores.

- [c]** Transferir todo o conteúdo do frasco para um tubo de ensaio estéril contendo 4,5 mL de caldo de crescimento apropriado (TSB ou LB). Tubos de ensaio estéreis adicionais contendo 4,5 mL de caldo de crescimento podem ser inoculados transferindo 500 μ L da cultura bacteriana primária para a produção de culturas secundárias adicionais.
- [d]** Incubar as culturas sob condições atmosféricas e de temperatura apropriadas, conforme recomendado para o produto (ATCC, 2022).
- [e]** Utilizar a cultura líquida da bactéria hospedeira assim obtida para os ensaios posteriores, ou armazenar em temperatura de 4 °C até o momento da sua utilização.

4.2 Curva de crescimento bacteriano

O conhecimento das características de crescimento de uma dada bactéria são fundamentais nos estudos com bacteriófagos. Conhecer o período de crescimento exponencial da bactéria hospedeira permite estabelecer o período temporal de contato que melhor favorece a interação fago/bactéria. Pode-se compreender, dessa forma, as etapas de infecção da célula bacteriana hospedeira pelo bacteriófago lítico que culminam com a lise da célula e concomitante liberação da progenia vírica que, à semelhança das partículas que lhes deram origem, irão infectar novas células hospedeiras com a consequente autoamplificação do número de partículas bacteriofágicas (Harada *et al.*, 2018, 2022; Nabergoj *et al.*, 2018; Rios *et al.*, 2016).

Material e reagentes

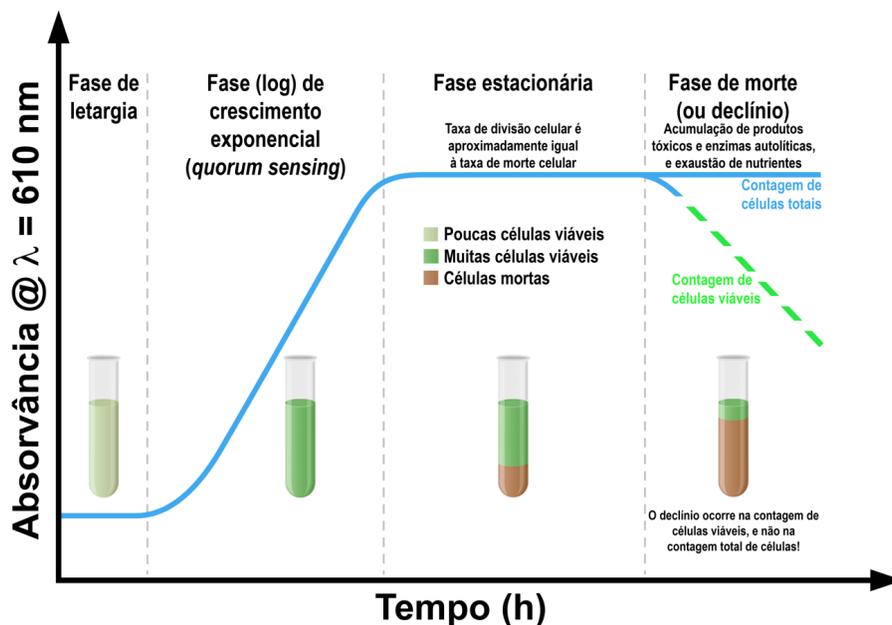
Material	Reagentes
Espectrofotômetro UV-Vis	Cultura líquida da bactéria hospedeira
Cubetas de plástico descartáveis de 1,5 mL ou 3,0 mL, com 1 cm de percurso ótico	Meio de cultura líquido TSB
Cubetas de quartzo de 3,0 mL com 1 cm de percurso ótico	
Frascos Schott® de 125 mL	
Micropipeta de 1000 µL	
Ponteiras de 1000 µL (azuis)	

Procedimento experimental

- [a]** Para obtenção da curva de crescimento da bactéria hospedeira, deve-se preparar um inóculo de 125 mL de meio TSB da cepa bacteriana hospedeira e, em cubetas de plástico descartáveis, realizar leituras em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 610 nm. [bp-4.2-1](#)
- [b]** As primeiras leituras devem ser feitas a cada 30 min até completar 5 h de crescimento. Em seguida, as amostras devem ser coletadas para leitura a cada 60 min até completar 12 h de crescimento, e depois após 24 h de crescimento. Os resultados de densidade ótica (OD) deverão ser convertidos em concentração de biomassa (UFC mL⁻¹). [bp-4.2-2](#)
- [c]** Com os dados obtidos de concentração de biomassa ao longo do tempo de crescimento, pode-se traçar a curva de crescimento do microrganismo e identificar a fase de crescimento exponencial.

Na Figura 4.2.1 pode observar-se de forma esquemática uma curva de crescimento bacteriano típica com todas as suas fases.

Figura 4.2.1 - Curva típica de crescimento bacteriano



4.3 Preparação de tapete bacteriano pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada

Os fagos são vírus específicos de bactérias, sequestrando a maquinaria metabólica das células bacterianas para se autorreplicarem, o que, no caso de fagos estritamente líticos, leva concomitantemente à morte da célula hospedeira e liberação da progenia fágica (Stone *et al.*, 2019; Harada *et al.*, 2018). Assim, na grande maioria dos ensaios envolvendo fagos, é necessário ter disponível a bactéria hospedeira viável e com crescimento uniforme.

Para isto, promove-se o crescimento bacteriano “em tapete” pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada. Adicionalmente, quando uma alíquota da suspensão fágica é incorporada na mistura de MTA-TSB juntamente com suspensão bacteriana, esta técnica permite a visualização das placas de lise fágicas formadas indicando lise celular bacteriana promovida pela ação das partículas fágicas (Cormier; Janes, 2014).

Material e reagentes

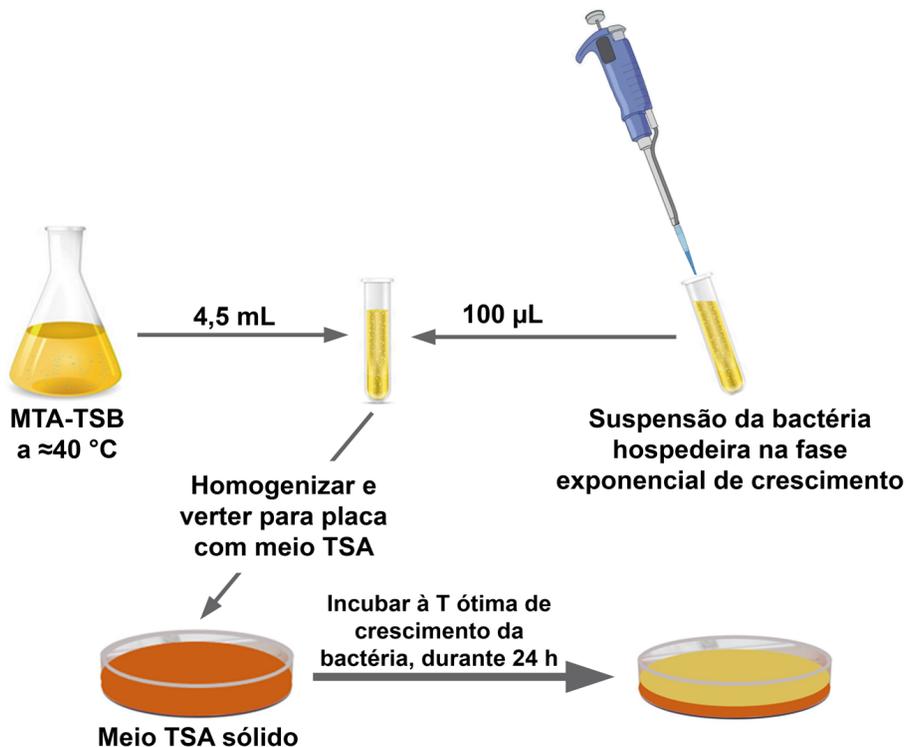
Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Cultura líquida da bactéria hospedeira
Tubos de ensaio estéreis com tampa de alumínio	Placas de Petri descartáveis contendo meio TSA sólido estéril
Micropipeta de 1000 µL	MTA-TSB, mantido a ≈40 °C
Ponteiras de 1000 µL (azuis)	

Procedimento experimental

- [a]** Em um tubo de ensaio estéril, adicionar uma alíquota homogênea de 100 µL da suspensão bacteriana em fase de crescimento exponencial ($OD_{600\text{ nm}} \approx 0,5$) e 4,5 mL de MTA-TSB (mantido a ≈40 °C).
- [b]** Homogenizar suavemente, verter a mistura resultante sobre meio TSA sólido em placa de Petri e deixar em repouso por cerca de 10 min para solidificação do meio MTA-TSB.
- [c]** Incubar por 24 h em estufa microbiológica à temperatura adequada para crescimento da bactéria hospedeira.

O procedimento experimental acima descrito pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 4.3.1.

Figura 4.3.1 - Esquema geral do processo de preparação de tapete bacteriano pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada



4.4 Enriquecimento de amostras ambientais

As primeiras etapas para o desenvolvimento de uma terapia fágica consistem no isolamento, purificação e amplificação de bacteriófagos estritamente líticos. O isolamento de bacteriófagos é feito a partir de amostras ambientais (solo, água de rio, água do mar, esgoto doméstico, esgoto hospitalar (humano, veterinário), entre outras fontes).

Os fagos são as entidades mais abundantes no nosso planeta, acreditando-se que existam entre 10^{31} a 10^{32} partículas fágicas na biosfera (Mushegian, 2020; Harada *et al.*, 2018; Domingo-Calap; Delgado-Martínez, 2018; Hatfull, 2015). Os bacteriófagos podem ser encontrados onde as bactérias prosperam, como por exemplo esgotos, rios, urina ou fezes de humanos ou animais, etc. (Pirnay, 2020). Contudo, para seu uso em terapias antibacterianas é necessário o isolamento de um fago específico para cada bactéria-alvo causadora de infecção.

Para investigação de fontes ambientais com potencial para isolamento de bacteriófagos líticos, sugere-se coletar amostras de águas residuais de esgoto, de indústrias de alimentos e hospitais, visto que os fagos estão no local onde seus hospedeiros bacterianos também se encontram. Águas residuais oriundas de esgoto hospitalar ou de clínicas veterinárias têm exposição constante a pressões de seleção com antibióticos e desinfetantes, favorecendo a presença e desenvolvimento de cepas bacterianas diversas e, conseqüentemente, de fagos líticos para elas.

Faz-se necessário o enriquecimento das amostras de águas residuais por adição de um pequeno volume de cultura da bactéria hospedeira, objetivando aumentar a concentração de eventuais partículas bacteriofágicas líticas existentes na amostra e facilitar o seu isolamento, purificação e amplificação. Isto é de extrema relevância, visto que para se isolar fagos a partir de amostras ambientais exige-se uma concentração relativamente alta dessas partículas, o que nem sempre é viável, pois apenas um volume limitado de amostra ambiental pode ser usado em uma placa de Petri sendo, portanto, fundamental a etapa de enriquecimento (Hyman, 2019).

Material e reagentes

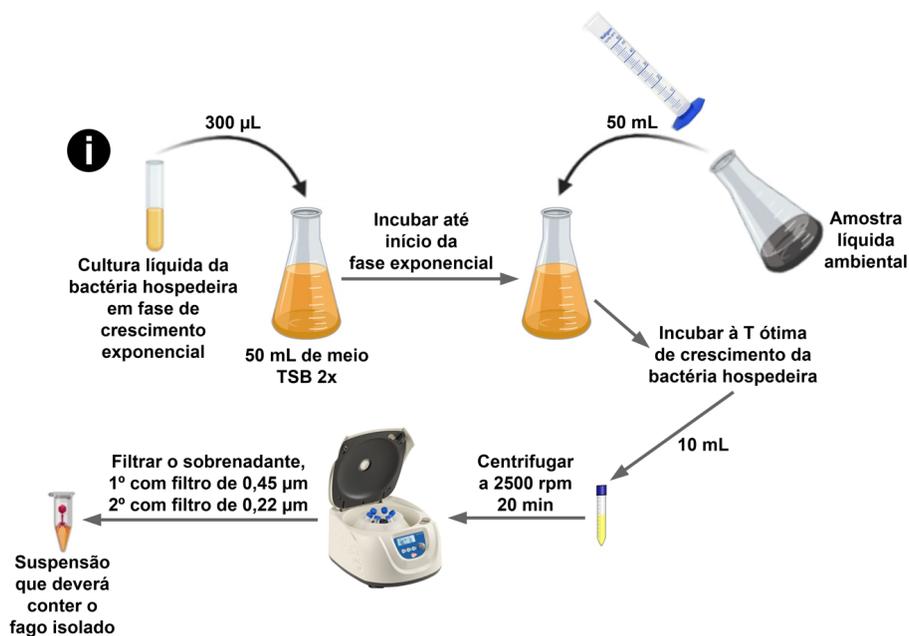
Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Cultura líquida da bactéria hospedeira em fase de crescimento exponencial
Erlenmeyer de 250 mL	Amostras ambientais (líquidas, de águas residuais)
Centrífuga refrigerada	Meio de cultura líquido TSB 2×
Proveta de 50 mL	
Tubos tipo Falcon de 50 mL	
Tubos tipo Falcon de 15 mL	
Micropipeta de 100 µL	
Micropipeta de 1000 µL	
Ponteiras de 1000 µL (azuis)	
Ponteiras de 200 µL (amarelas)	
Tubos Eppendorf® de 2 mL, estéreis	
Filtros descartáveis Milipore® de 0,45 µm e 0,22 µm de tamanho de poro	
Seringa estéril descartável de 5 mL	

Procedimento experimental

- [a]** Inocular a bactéria alvo em 50 mL de meio TSB 2× em um frasco Erlenmeyer estéril de 250 mL de capacidade e incubar até ao início do crescimento exponencial da bactéria, conforme curva de crescimento bacteriano previamente obtida (protocolo 4.2), à temperatura ideal para o crescimento da bactéria hospedeira.
- [b]** Em seguida, com auxílio de uma proveta, adicionar 50 mL da amostra líquida ambiental coletada (caso a amostra seja sólida (solo, por exemplo), pesar 10 g de solo e completar com tampão fágico SM até volume final de 50 mL; adicionar de seguida 50 mL de meio TSB 2× já inoculado com a bactéria em fase exponencial de crescimento), homogenizar suavemente e incubar a mistura durante 24 h à temperatura ideal para crescimento da bactéria hospedeira.
- [c]** Após esse período, retirar 10 mL do enriquecimento, colocar em tubo tipo Falcon de 15 mL de capacidade e centrifugar a 2500 rpm por 20 min.
- [d]** O sobrenadante deve ser cuidadosamente removido com o auxílio de uma seringa de 5 mL e filtrado sequencialmente com filtro descartável Milipore® de 0,45 µm de tamanho de poro e, posteriormente, com filtro de 0,22 µm de tamanho de poro. O filtrado final, estéril, deve ser recolhido em tubos Eppendorf® de 2 mL estéreis. Esta suspensão deverá conter o(s) fago(s) isolado(s). [bp-4.4-1](#)

O procedimento experimental acima descrito pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 4.4.1.

Figura 4.4.1 - Esquema geral do processo de enriquecimento de amostras líquidas ambientais para potenciais bacteriófagos nelas existentes



4.5 Verificação da presença de bacteriófagos na amostra ambiental enriquecida, pelo Teste da gota (*Spot Test*)

Para demonstrar visualmente a potencial presença de bacteriófagos no filtrado obtido no procedimento de enriquecimento de amostras ambientais (protocolo 4.4), adiciona-se uma gota da suspensão sobre o tapete de célula bacteriana hospedeira susceptível ao fago em uma placa de Petri.

As bactérias infectadas sofrem lise após a infecção viral, com formação de placas de lise translúcidas no meio de cultura *top-agar*, indicando a presença de fagos líticos na amostra ambiental. Bacteriófagos isolados produzem zonas claras (trans-

lúcidas) indicativas de lise das respectivas células bacterianas hospedeiras, resultado típico de fagos líticos (virulentos) (Harada *et al.*, 2018; Martins; Martins, 2014).

Material e reagentes

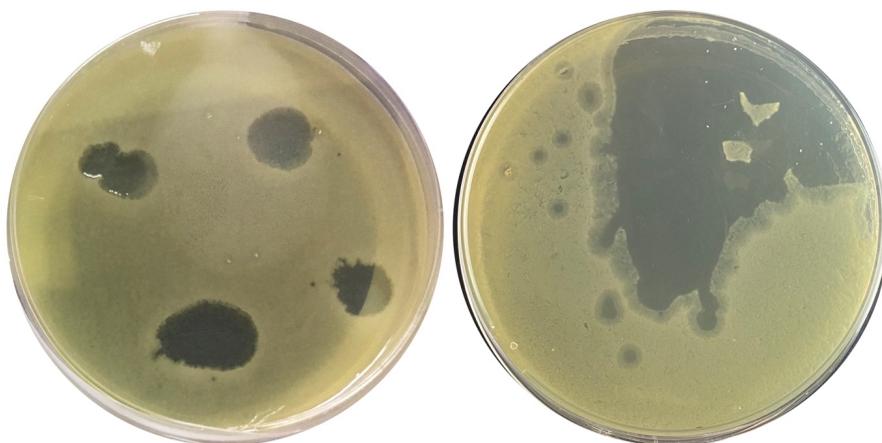
Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Amostras líquidas de águas residuais
Placas de Petri descartáveis com meio TSA sólido estéril	Cultura líquida da bactéria hospedeira
Micropipetas de 10 μ L, 100 μ L e 5000 μ L	Meio de cultura TSA
Ponteiras de 100 μ L (brancas), 200 μ L (amarelas) e 5000 μ L (brancas)	Meio de cultura líquido TSB
	MTA-TSB, mantido a ≈ 40 °C

Procedimento experimental

- [a]** Preparar placas de Petri com tapete bacteriano da bactéria hospedeira (protocolo 4.3), pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada, e deixar solidificar durante 10 min mantendo as placas de Petri abertas em cabine de segurança biológica.
- [b]** Após secagem do meio de cultura nas placas de Petri, usar uma micropipeta semiautomática para adicionar um volume de 5 μ L do filtrado obtido no procedimento descrito no protocolo 4.4. em pontos distintos das placas de Petri contendo o tapete da bactéria hospedeira.
- [c]** Na sequência, incubar as placas de Petri à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira durante 24 h.

[d] A formação de halo translúcido de inibição de crescimento bacteriano confirmará a presença de bacteriófagos líticos na suspensão proveniente do isolamento a partir de fontes ambientais. A Figura 4.5.1 apresenta um exemplo de como o resultado deverá aparecer.

Figura 4.5.1 - Aspecto do resultado que deverá ser obtido no teste da gota efetuado com a amostra ambiental enriquecida para bacteriófagos



4.6 Isolamento de placas bacteriofágicas: Método I

Ao adicionar bacteriófagos líticos sobre uma camada uniforme de células bacterianas (tapete bacteriano) ocorrerá lise e morte das células, formando-se as placas de lise, que são visualizadas como círculos transparentes/translúcidos, turvos, ou mais claros, sobre o meio de cultura MTA-TSB. O vírus sequestra a maquinaria metabólica da bactéria hospedeira, fazendo-a funcionar em favor da sua própria replicação. Nesse ciclo de vida, conhecido como lítico, o acúmulo de partículas virais no citoplasma da bactéria resulta no rompi-

mento da membrana citoplasmática (induzido por enzimas holinas e lisinas fágicas) e liberação da progenia vírica para o meio exterior.

Cada placa fágica de lise é formada pela progenia de um fago que se autorreplicou e causou lise da bactéria hospedeira presente naquela área. Isso ocorre pela produção de partículas virais em grande quantidade (Balcão; Amorim, 2012). O procedimento de isolamento com repetição sequencial (3×) garante que não haja mistura de diferentes fagos.

Material e reagentes

Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Cultura líquida da bactéria hospedeira
Tiras de papel de filtro estéreis, com dimensões de 5 cm × 1 cm (C × L)	Suspensão fágica
Pinça em aço inox	Meio de cultura líquido TSB
Tubos Eppendorf® estéreis de 2 mL	Placas de Petri descartáveis com meio TSA sólido estéril
Palitos de madeira estéreis	MTA-TSB, mantido a ≈40 °C

Procedimento experimental

- [a]** Umedecer uma fita de papel de filtro estéril (1 cm de largura) na suspensão fágica previamente filtrada (obtida no protocolo 4.4).
- [b]** Deslizar a fita umedecida sobre o tapete bacteriano (formado pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada), começando no topo da placa de Petri, e esgotando todo o conteúdo da fita em uma fileira (Figura 4.6.1a).

- [c]** Utilizar uma outra fita de papel de filtro estéril e, sem umedecer na suspensão fágica, arrastar cobrindo metade da camada anterior, da esquerda para a direita, repetindo este procedimento de cima para baixo, sempre arrastando a cobrir metade da fileira anterior, até cobrir a totalidade do meio de cultura. Este procedimento visa diluir a suspensão fágica no meio de cultura, permitindo o aparecimento de placas fágicas isoladas (Figura 4.6.1b).
- [d]** Em seguida, incubar a placa de Petri à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 24 h.
- [e]** Após o período de incubação, observar a placa de Petri e inspecionar cuidadosamente cada placa bacteriofágica isolada, identificando diferentes tamanhos dos halos de inibição formados e a presença de halos secundários. bp-4.6-1
- [f]** Escolher uma única placa bacteriofágica isolada no tapete bacteriano, picando-a com um palito de madeira estéril (Figura 4.6.1c).
- [g]** Transferir o bacteriófago isolado (com o palito de madeira) para uma nova placa de Petri com tapete bacteriano (técnica de dupla camada), picando várias vezes com o palito da esquerda para a direita, em pontos diferentes, na parte superior da placa de Petri, formando uma linha horizontal (Figura 4.6.1d).
- [h]** Deslizar uma fita de papel de filtro estéril sobre os pontos picados (com o palito de madeira) e, sem trocar a fita de papel de filtro, arrastar sobre metade da faixa de arrasto anterior, da esquerda

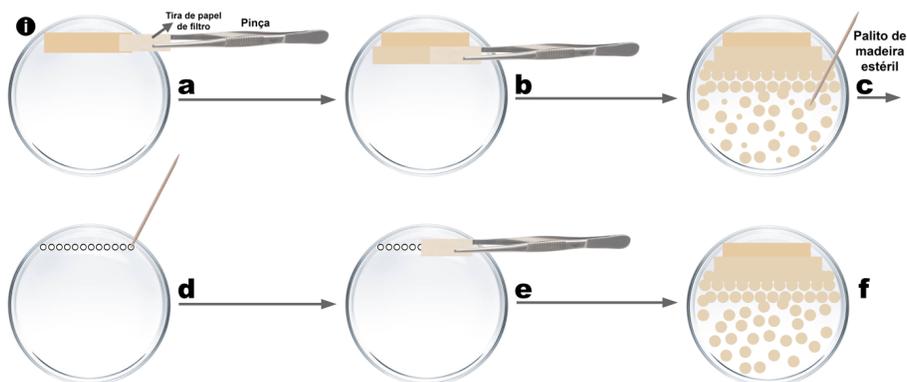
para a direita, e repetir este procedimento de cima para baixo até completa cobertura do tapete bacteriano (Figura 4.6.1e).

[i] Incubar à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 24 h (Figura 4.6.1f).

A repetição das etapas **[f]-[i]**, no mínimo três vezes, com o isolamento de placas de lise individuais em cada repetição, é necessária para garantir o isolamento de um único bacteriófago (Silva *et al.*, 2021; Balcão *et al.*, 2022b,c; Harada *et al.*, 2022).

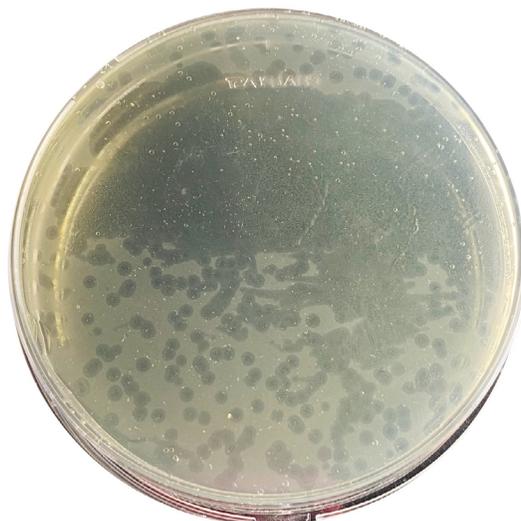
O procedimento experimental acima descrito pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 4.6.1.

Figura 4.6.1 - Esquema geral do processo de isolamento de placas bacteriofágicas pelo método I



A Figura 4.6.2 apresenta um exemplo de como o resultado deverá aparecer na etapa **f** da Figura 4.6.1.

Figura 4.6.2 - Aspecto do resultado que deverá ser obtido no isolamento de placas bacteriofágicas utilizando a técnica de espalhamento com fita de papel de filtro (método I)



4.7 Isolamento de placas bacteriofágicas: Método II

Material e reagentes

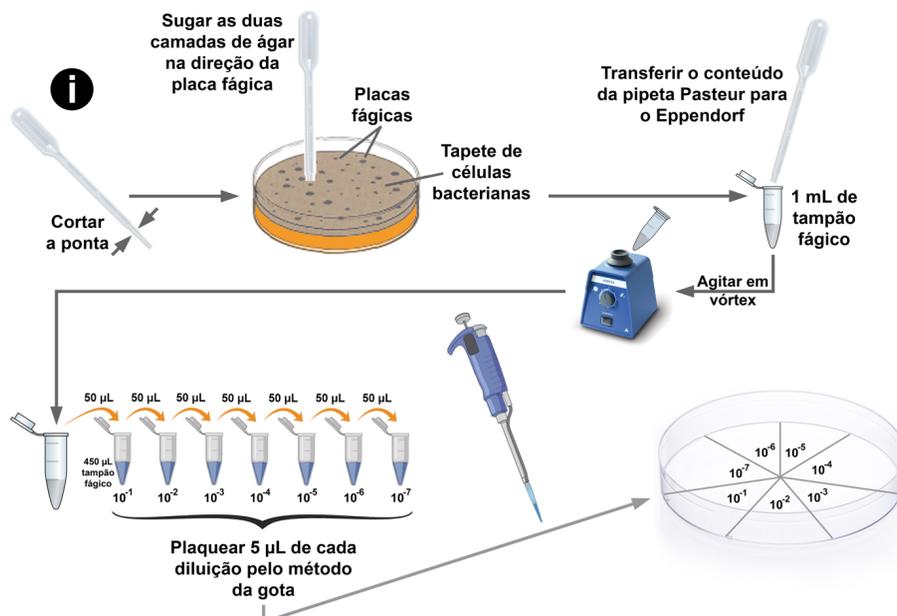
Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Meio de cultura líquido TSB
Micropipetas de 1000 μL e 100 μL	Placas de Petri descartáveis com meio TSA sólido estéril
Ponteiras de 1000 μL (azuis) e 200 μL (amarelas)	MTA-TSB, mantido a $\approx 40^\circ\text{C}$
Pipetas Pasteur de plástico, descartáveis	Tampão fágico SM
Tubo de ensaio	Placas de Petri com tapete bacteriano
Tubos Eppendorf® estéreis de 2 mL	
Vortex	

Procedimento experimental

- [a]** Utilizando uma pipeta Pasteur de plástico estéril com a ponta previamente cortada, perfurar o meio MTA-TSB e o meio TSA sólido e sugar uma placa fágica isolada.
- [b]** Transferir o ágar recortado para um tubo Eppendorf® estéril contendo 1 mL de tampão fágico estéril.
- [c]** Agitar o tubo Eppendorf® não muito violentamente (utilizar um vórtex) para destruir os pedacinhos de ágar e liberar os fagos para o sobrenadante.
- [d]** Preparar diluições seriadas do sobrenadante (10^0) (10^{-1} a 10^{-7}) em tubos Eppendorf® estéreis. Em um primeiro tubo Eppendorf® estéril, colocar 450 μ L de tampão fágico estéril e 50 μ L do sobrenadante. Homogenizar suavemente. Deste primeiro tubo Eppendorf® (10^{-1}), retirar 50 μ L para outro tubo Eppendorf® contendo 450 μ L de tampão fágico (10^{-2}), e assim sucessivamente até à diluição 10^{-7} .
- [e]** Preparar placas de Petri com tapete da bactéria hospedeira (pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada), e dividir na base em 7 partes utilizando uma caneta de acetato.
- [f]** Em cada parte da placa, colocar uma gota de 5 μ L de cada diluição.
- [g]** Incubar à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 24 h.
- [h]** Observar e contar as placas de lise, contabilizando o número de partículas fágicas considerando a diluição utilizada. Fazer o experimento em triplicata.

O procedimento experimental acima descrito pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 4.7.1.

Figura 4.7.1 - Esquema geral do processo de isolamento de placas bacteriofágicas pelo método II



A Figura 4.7.2 apresenta um exemplo de como o resultado deverá ficar após a etapa de agitação em vórtex na Figura 4.7.1, enquanto a Figura 4.7.3 apresenta um exemplo de como o resultado deverá aparecer após o plaqueamento das diluições realizadas no final da Figura 4.7.1.

Figura 4.7.2 - Aspecto de como o resultado deverá ficar após a etapa de agitação em vórtex na Figura 4.7.1, isto é, a obtenção de placas fágicas homogêneas (método II)

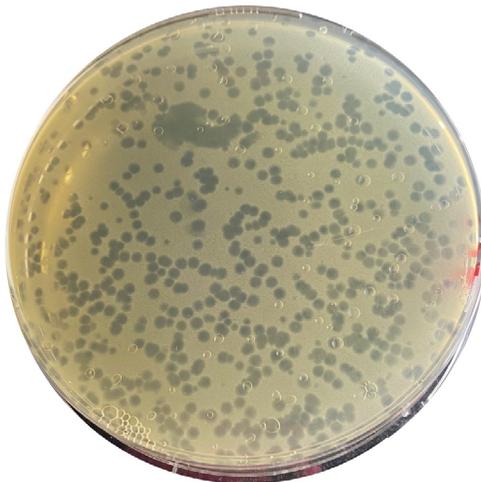
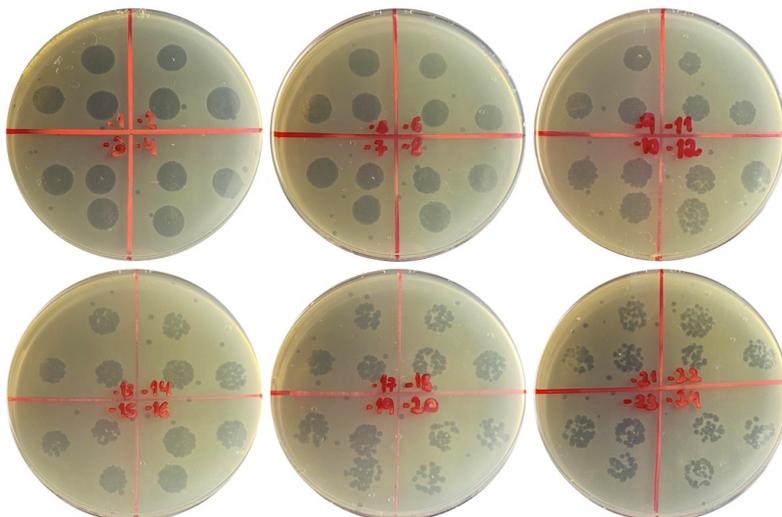


Figura 4.7.3 - Aspecto do resultado que deverá ser obtido após o plaqueamento das diluições realizadas no final da Figura 4.7.1 (método II)



4.8 Preparação da suspensão estoque de bacteriófagos: Amplificação

Após a etapa de isolamento de uma placa fágica é necessário proceder à amplificação dos fagos e, assim, obter uma suspensão concentrada em partículas fágicas. O sucesso da fagoterapia depende, entre outros fatores, da especificidade do fago para a bactéria hospedeira causadora da infecção e da concentração adequada de partículas fágicas no local da infecção/contaminação, para permitir o biocontrole de bactérias patogênicas (Qadir *et al.*, 2018). Assim, a etapa de amplificação das partículas fágicas isoladas e purificadas é fundamental para a obtenção de uma suspensão fágica concentrada.

Material e reagentes

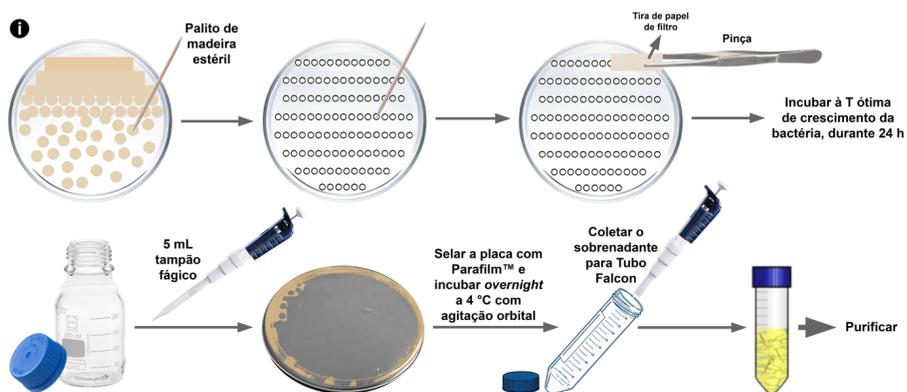
Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Cultura líquida da bactéria hospedeira
Tiras de papel filtro estéreis com dimensões de 5 cm × 1 cm (C × L)	Suspensão fágica
Placas de Petri com meio TSA sólido	Meio de cultura líquido TSB
Tubos Eppendorf® estéreis de 2 mL	Placas de Petri descartáveis com meio TSA sólido estéril
Palitos de madeira estéreis	MTA-TSB, mantido a ≈40 °C
Micropipeta de 5000 µL	Tampão fágico SM
Ponteiras de 5000 µL (brancas)	

Procedimento experimental

- [a]** Picar com palito de madeira estéril (protocolo 4.6, resultado da Figura 4.6.1f) uma placa fágica isolada (pura) e, em seguida, picar em uma placa de Petri com tapete da bactéria hospedeira em diferentes pontos; repetir este procedimento em 10 (dez) placas de Petri (todas com o tapete da bactéria hospedeira previamente formado).
- [b]** Passar uma única fita de papel estéril por cada placa, em zigue-zague, até cobrir toda a superfície do tapete bacteriano.
- [c]** Incubar as placas de Petri à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 24 h.
- [d]** Após o período de incubação, e verificando que ocorreu lise completa nos tapetes bacterianos, adicionar 5 mL de tampão fágico a cada placa de Petri, com o auxílio de uma micropipeta de 5 mL; selar todas as placas com Parafilm™ para evitar a desidratação do meio de cultura e evaporação do tampão fágico.
- [e]** Incubar as placas de Petri seladas a 4 °C durante a noite, com agitação orbital (100 rpm), para permitir que os bacteriófagos passem do meio MTA-TSB para o tampão fágico.
- [f]** Remover os sobrenadantes com uma pipeta de 5 mL, transferir para tubos Falcon de 50 mL e descartar as placas de Petri.
- [g]** Proceder à purificação do bacteriófago (protocolo 4.9).

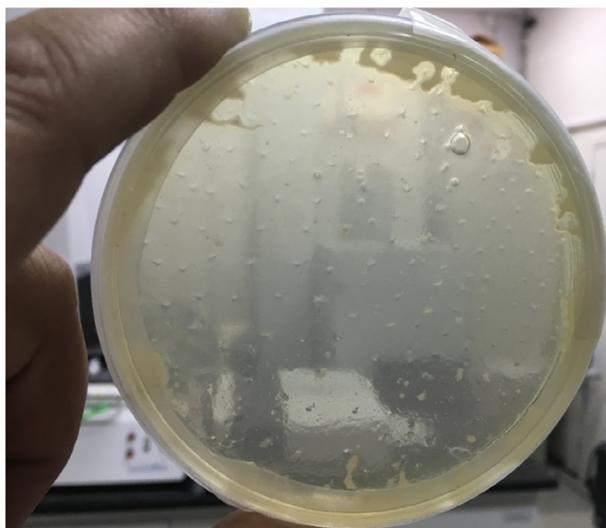
O procedimento experimental acima descrito pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 4.8.1.

Figura 4.8.1 - Esquema geral do processo de preparação da suspensão estoque de fagos (amplificação)



A Figura 4.8.2 apresenta um exemplo de como o resultado deverá aparecer.

Figura 4.8.2 - Aspecto do resultado que deverá ser obtido no processo de preparação da suspensão estoque de fagos (amplificação)



4.9 Preparação da suspensão estoque de bacteriófagos: Purificação

Por se tratar de um parasita intracelular bacteriano obrigatório, no processo de amplificação (protocolo 4.8) do fago selecionado exige-se a sua incubação com células bacterianas hospedeiras susceptíveis. Neste processo obtêm-se não apenas partículas bacteriofágicas, mas também *debris* celulares bacterianos, partículas fágicas incompletas, metabólitos bacterianos secundários, células bacterianas não-infectadas, resíduos do meio de cultura e outros compostos não desejados. Assim, os fagos devem ser separados da mistura de células bacterianas não lisadas e *debris* de parede celular das bactérias lisadas, assim como de outros componentes do meio.

A recuperação do fago pode ser realizada através da indução da lise das células hospedeiras não-infectadas, recorrendo-se para isso ao auxílio de solventes orgânicos como o clorofórmio, para onde os *debris* celulares e outros contaminantes particionam. A purificação das partículas bacteriofágicas pode então ser efetuada por filtração esterilizante em sistema filtrante Stericup® (com membrana de poliétersulfona (PES) de 0,22 µm de tamanho de poro), contudo o sistema filtrante pode deixar passar endotoxinas que, eventualmente, possam estar presentes no lisado bacteriano (Loba, 2014).

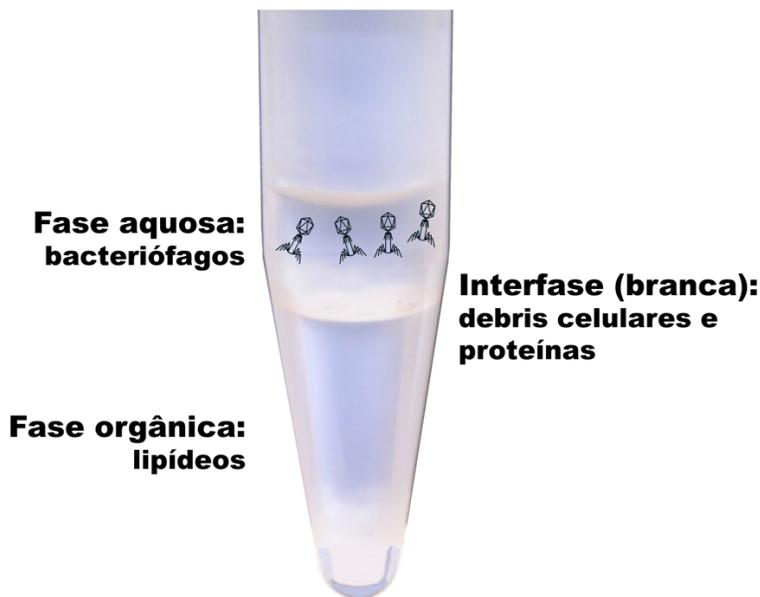
Material e reagentes

Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Cultura líquida da bactéria hospedeira
Bomba de vácuo	Suspensão fágica obtida no protocolo 4.8
Micropipeta de 5000 µL	Tampão fágico SM
Ponteiras de 5000 µL (brancas)	Meio de cultura líquido TSB
Centrífuga refrigerada	Meio de cultura TSA
Tubos Eppendorf®	MTA-TSB, mantido a ≈40 °C
Tubos tipo Falcon de 50 mL	Clorofórmio
Sistema de filtração Stericup®	Placas de Petri com meio TSA sólido e tapete bacteriano (em meio MTA-TSB)

Procedimento experimental

[a] Adicionar clorofórmio ao tampão fágico contendo os fagos eluídos (protocolo 4.8), em uma proporção de 10% do volume total de tampão fágico [bp-4.9-1](#), e centrifugar a 2500 rpm por 20 min para remover as bactérias e *debris* da parede celular. A Figura 4.9.1 mostra a separação de fases que ocorre após a adição de clorofórmio e centrifugação.

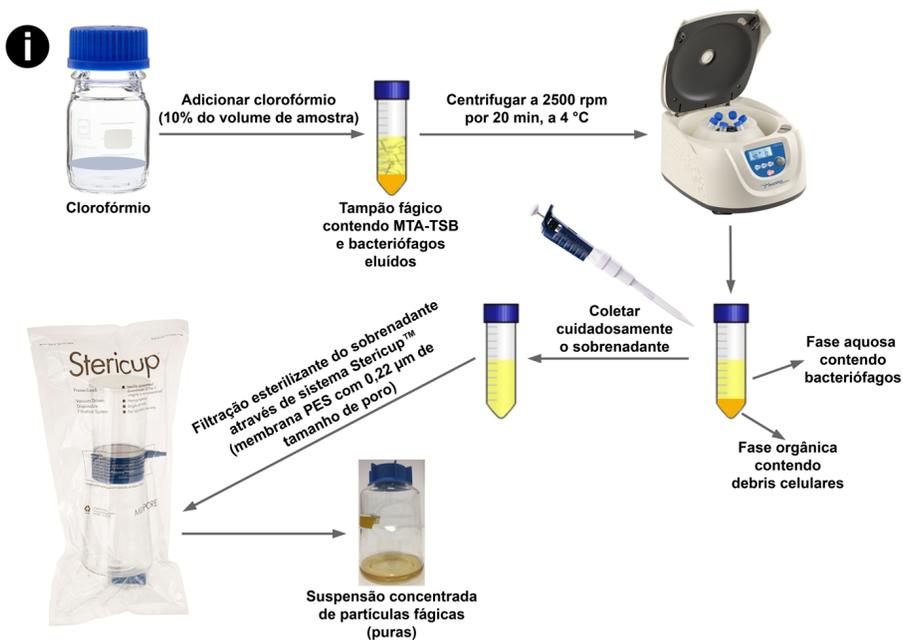
Figura 4.9.1 - Separação de fases que ocorre após a adição de clorofórmio e centrifugação



- [b]** Remover cuidadosamente o sobrenadante (fase aquosa contendo as partículas fágicas), com auxílio de uma seringa estéril, sem tocar na interfase, transferir para tubo Falcon de 50 mL e filtrar com membrana esterilizante (0,22 μm) em sistema de filtração Stericup®.
- [c]** Armazenar o filtrado no frasco Stericup® a 4 °C; este filtrado constitui a suspensão estoque concentrada de bacteriófago.

O procedimento experimental acima descrito pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 4.9.2.

Figura 4.9.2 - Esquema geral do processo de preparação da suspensão estoque concentrada de fagos (purificação)



A Figura 4.9.3 apresenta um exemplo de como o resultado deverá ficar.

Figura 4.9.3 - Aspecto da suspensão estoque concentrada (purificada) de partículas bacteriófágicas que deverá ser obtida após o processo de purificação



4.10 Determinação do título fágico

A determinação do título fágico visa obter a quantidade de partículas bacteriofágicas presentes por unidade de volume na suspensão estoque concentrada (purificada), sendo necessária para todas as etapas subseqüentes envolvendo bacteriófagos.

A concentração de partículas fágicas infectantes (título fágico) presentes em uma suspensão estoque concentrada de fagos (ou em uma dada amostra) pode ser estabelecida realizando diluições decimais de uma alíquota da amostra e subseqüente plaqueamento em ágar de dupla camada contendo tapete da bactéria hospedeira.

A concentração de partículas fágicas é expressa como unidades formadoras de placas por mililitro de suspensão (UFP mL⁻¹) (Manikantha *et al.*, 2020; Balcão *et al.*, 2022b,c; Harada *et al.*, 2022).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Cultura líquida da bactéria hospedeira
Tubos Eppendorf® de 2 mL estéreis	Suspensão estoque concentrada de fagos
Micropipeta de 1000 µL	Meio de cultura líquido TSB
Micropipeta de 100 µL	Tampão fágico SM
Ponteiras de 1000 µL (azuis)	Placas de Petri com meio TSA sólido e tapete bacteriano produzido por plaqueamento em ágar de dupla camada
Ponteiras de 200 µL (amarelas)	MTA-TSB, mantido a ≈40 °C

Procedimento experimental

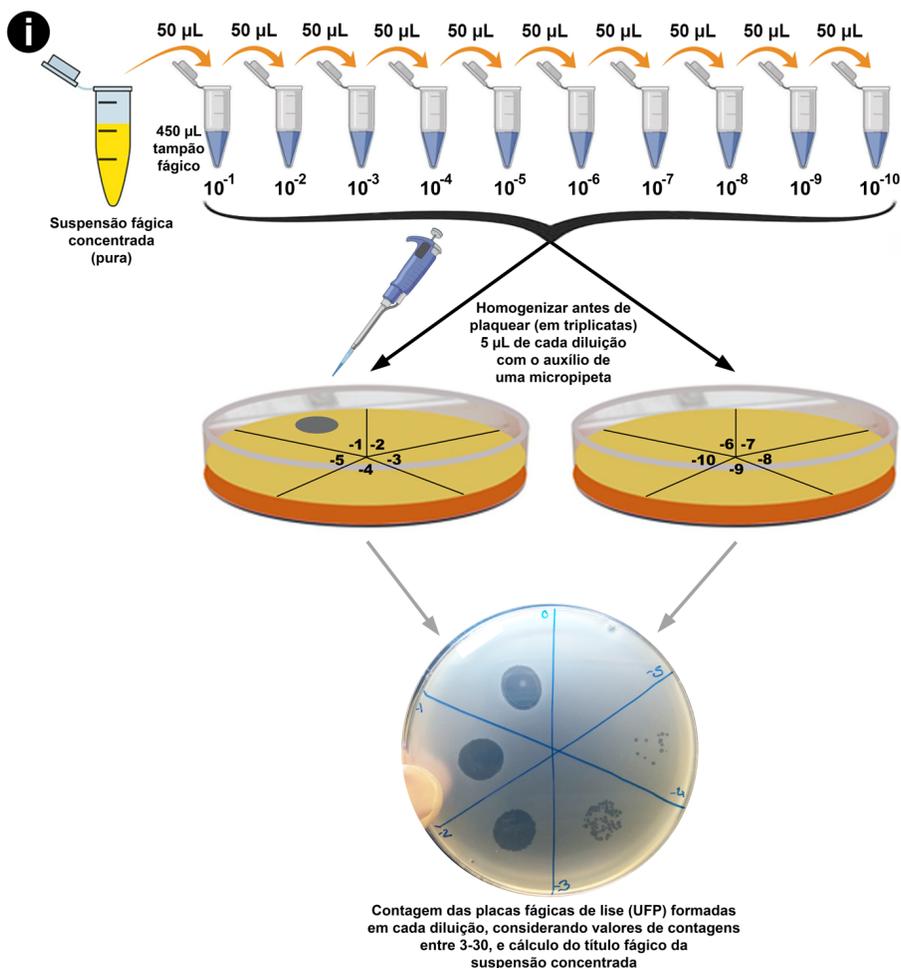
- [a]** Partindo de 50 μL de suspensão estoque concentrada de bacteriófagos, preparar diluições decimais em microtubos Eppendorf® de 2 mL contendo 450 μL de tampão fágico, desde 10^{-1} a 10^{-10} .
- [b]** Em seguida, plaquear alíquotas de 5 μL de cada diluição (em triplicata) pelo método da gota nas placas de Petri já com tapete bacteriano (protocolo 4.3) e demarcadas, previamente, com divisões de cinco diluições, desde 10^{-1} a 10^{-10} .
- [c]** Depois das gotas solidificarem, incubar as placas de Petri em estufa de incubação à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 24 h.
- [d]** Após o período de incubação, inspecionar as placas de Petri e contar as placas bacteriofágicas produzidas em todas as diluições, considerando apenas valores de contagens na faixa entre 3 - 30 placas fágicas.
- [e]** Calcular o título bacteriofágico da suspensão estoque concentrada de bacteriófagos, utilizando a Equação (1).

$$\text{Título fágico} \left(\frac{\text{UFP}}{\text{mL}} \right) = \text{UFP} \times \frac{1}{\text{Diluição}} \times \frac{1}{V_{\text{inóculo}}(\text{mL})} \quad (1)$$

em que UFP representa o número de unidades formadoras de placas e $V_{\text{inóculo}}$ é o volume de inóculo (mL).

O procedimento experimental acima descrito pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 4.10.1.

Figura 4.10.1 - Esquema geral do processo de determinação do título fágico da suspensão estoque concentrada de fagos (purificada)



4.11 Concentração das partículas fágicas com polietilenoglicol

Para obter o máximo rendimento de partículas bacteriofágicas, em alto título, torna-se necessária a concentração das partículas fágicas com polietilenoglicol (PEG). Este procedimento é aconselhável antes da análise das partículas fágicas por

eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Centrífuga refrigerada	Suspensão fágica concentrada (purificada)
Tubos Falcon de 50 mL, estéreis	Solução aquosa de PEG 8000 (20%, m/m)
Micropipetas de 5000 µL	NaCl, 2,5 mol L ⁻¹
Ponteiras de 5000 µL (brancas)	MgSO ₄ , 5 mmol L ⁻¹

Procedimento experimental

[a] Adicionar à suspensão fágica concentrada (purificada), com título igual ou superior a 10¹⁰ UFP mL⁻¹, uma mistura esterilizada de PEG 8000 (20%, m/m) e NaCl (2,5 mol L⁻¹), numa proporção volumétrica de 2:1, respectivamente. bp-4.11-1

[b] A suspensão resultante deverá ser incubada durante a noite a 4 °C e depois centrifugada a 11.000 rpm (4 °C, 45 min).

[c] Descartar o sobrenadante, e ressuspender o *pellet* em MgSO₄ 5 mmol L⁻¹, homogenizando suavemente.

4.12 Preservação de bacteriófagos em glicerol para armazenamento de longo prazo

Este protocolo foi adaptado a partir do trabalho de Su-rekhamol *et al.* (2013), sendo utilizado para a preparação de estoques de fagos em glicerol a 50% para armazenamento por longos períodos de tempo.

Material e reagentes

Material	Reagentes
Biofreezer (a -86 °C)	Suspensão fágica concentrada (purificada)
Criotubos de 3 mL, estéreis	Glicerol esterilizado
Micropipeta de 1000 µL	
Ponteiras de 1000 µL (azuis)	

Procedimento experimental

- [a]** Adicionar 1 mL de suspensão fágica concentrada (purificada) e 1 mL de glicerol em um criotubo estéril de 3 mL de capacidade.
- [b]** Armazenar a -86 °C como estoques em glicerol a 50%, para armazenamento de longo prazo.

4.13 Remoção de endotoxinas bacterianas

As preparações fágicas estão geralmente contaminadas por macromoléculas derivadas da bactéria hospedeira, sendo o lipídeo A dos lipopolissacarídeos (endotoxina) da membrana externa de bactérias Gram-negativas o principal pirogênio (Raetz *et al.*, 2007).

As endotoxinas são moléculas anfipáticas; a componente lipídica está ligada a um polissacarídeo nuclear e, como resultado, podem formar grandes agregados (superiores a 1000 kDa em solução). As endotoxinas provocam uma ampla variedade de efeitos fisiopatológicos no corpo. A exposição mesmo em pequenas quantidades pode resultar em choque tóxico, lesão celular, produção de citocinas e ativação de respostas imunes (Raetz *et al.*, 2007; Bonilla *et al.*, 2016). Devido a estes efeitos, é importante

que as endotoxinas sejam removidas das preparações de fagos ao estudar ou aplicar fagos no contexto de sistemas eucarióticos.

A quantidade de endotoxina é definida como uma unidade de endotoxina (UE), que corresponde à atividade de 100 pg de lipopolissacarídeo de *E. coli*. O teor de endotoxina da água destilada é estimado em 20 UE mL⁻¹, com o limite permitido para administração intravenosa e oral fixado em 5 UE kg hr⁻¹ e <20 UE mL⁻¹, respectivamente (Gorbet; Sefton, 2005; Abedon *et al.*, 2011).

O protocolo aqui descrito foi adaptado a partir dos trabalhos de Szermer-Olearnik e Boratyński (2015) e Bonilla *et al.* (2016).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Filtros de membrana com tamanho de poro de 0,22 µm	Suspensão fágica concentrada (purificada)
Geladeira	Solução aquosa de MgCl ₂ , 0,2 mol L ⁻¹
Micropipeta de 1000 µL	1-octanol
Ponteiras de 1000 µL (azuis)	1-butanol
Tubos Falcon de 50 mL, estéreis	Solução aquosa de etanol a 25% (v/v)
Centrífuga para tubos Falcon	Solução aquosa estéril de NaCl 0,15 mol L ⁻¹
Fita de dupla-face	Kit cromogênico LAL (<i>Limulus Amebocyte Lysate test</i> , LAL R-160) para quantificação de endotoxinas bacterianas
Seringa estéril com agulha hipodérmica	
Membranas de diálise com <i>molecular weight cutoff</i> (MWCO) de 12-14 kDa	
Membrana Pellicon (1000 kDa, compósito de celulose regenerada, EMD Millipore)	

Procedimento experimental

- [a]** Filtrar 5-20 mL da suspensão estoque concentrada de bacteriófagos através de membrana com 0,22 μm de tamanho de poro.
- [b]** Suplementar o filtrado, adicionando solução de MgCl_2 0,2 M até uma concentração final de 0,02 M.
- [c]** Incubar o filtrado a 4 °C durante 3-24 h.
- [d]** Extração de endotoxinas bacterianas. Adicionar o solvente orgânico (1-octanol ou 1-butanol, Sigma-Aldrich) (cerca de 40%, v/v) ao filtrado e agitar suavemente durante 1-3 h à temperatura ambiente.
- [e]** Arrefecer a mistura de duas fases a 4°C durante 1-3h, e separar por centrifugação a 4000 \times g durante 10 min. [bp-4.13-1](#)
- [f]** Colocar um pedacinho de fita de dupla-face na parte lateral inferior do tubo e, usando uma seringa com agulha hipodérmica, perfurar a parte inferior lateral do tubo através da fita de dupla-face [bp-4.13-2](#) e coletar a fase aquosa (fase inferior) que contém as partículas bacteriofágicas [bp-4.13-3](#), transferindo-a para um tubo Falcon estéril de 50 mL.
- [g]** Dialisar a fase aquosa recolhida (membrana de diálise com MWCO 12-14 kDa) contra uma solução aquosa de etanol a 25% (v/v) (5 \times 4 h). [bp-4.13-4](#)
- [h]** Realizar nova diálise (membrana de diálise com MWCO 12-14 kDa) contra uma solução aquosa estéril de NaCl 0,15 M (4 \times 4 h). [bp-4.13-5](#)

- [i] Após a diálise, passar o concentrado de bacteriófagos através de uma membrana Pellicon (1000 kDa, compósito de celulose regenerada, EMD Millipore). bp-4.13-6
- [j] Caso seja necessário, o teor em endotoxinas residuais eventualmente presentes no concentrado de partículas bacteriofágicas poderá ser determinado pelo teste LAL (teste cromogênico *Limulus Amebocyte Lysate*, LAL R-160), como unidades de endotoxina (UE).

5 TRABALHANDO COM BACTERIÓFAGOS: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A biosfera do nosso planeta constitui um reservatório de considerável diversidade biológica, fornecendo um recurso valioso para o desenvolvimento da biotecnologia moderna (Akhwale *et al.*, 2019). Desde a descoberta dos bacteriófagos (ou fagos) no início do século XX, os mesmos têm sido estudados visando o controle de infecções bacterianas. Os fagos são pequenos vírus que exibem a capacidade de matar especificamente bactérias, mas não afetam linhagens celulares de outros organismos (Wittebole *et al.*, 2014), geralmente infectando e matando apenas uma única cepa ou linhagem bacteriana sendo, portanto, altamente específicos no processo de infecção e lise bacteriana (Harada *et al.*, 2018; Balcão *et al.*, 2022b,c; Harada *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2020).

Os fagos são considerados as entidades mais abundantes no nosso planeta, estando presentes em toda a biosfera, até mesmo em *habitats* hostis como fontes termais vulcânicas (Ackermann, 2011). Contudo, a eficiência e a extensão dos impactos virais dependem de características próprias de cada vírus (Howard-Varona *et al.*, 2017). Neste sentido, fagos com potencial para fagoterapia (humana, animal ou vegetal), para biocontrole e aplicações biomédicas, necessitam ser previamente caracterizados do ponto de vista físico-químico,

biológico e genômico, visando garantir a segurança na sua utilização. Cerca de 70 propriedades dos bacteriófagos são utilizadas com fins taxonômicos, porém, as mais importantes são a natureza dos ácidos nucleicos, morfologia da partícula viral, propriedades físico-químicas e biológicas, e características genômicas (Ackermann, 2011).

5.1 Determinação do perfil de absorção das partículas fágicas por varredura espectral UV-Vis

A curva de absorção por varredura espectral UV-Vis em espectrofotômetro é produzida visando observar o perfil de absorção das partículas fágicas na suspensão, com o objetivo de se determinar o coeficiente de extinção molar (ϵ) das partículas bacteriofágicas isoladas (inteiras). No espectro de varredura UV-Vis das partículas bacteriofágicas, um mínimo de absorção deverá ser observado em torno de 245 nm. Quando este mínimo está ausente do espectro de absorção, muito provavelmente estão presentes contaminantes oriundos das células bacterianas hospedeiras (*debris* celulares e proteínas intracitoplasmáticas liberadas por lise celular bacteriana) nas suspensões fágicas, o que normalmente ocorre quando estas contêm poucos vírions (Rios *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021; Balcão *et al.*, 2022b,c; Harada *et al.*, 2022).

Os fagos são entidades baseadas em proteínas, com sua estrutura abrangendo proteínas principais do capsídeo, cauda, placa basal, fibrilas e proteína espigão. Na faixa de comprimento de onda UV, as proteínas absorvem radiação com uma absorção

máxima em torno de 278-280 nm devido às contribuições de quatro cromóforos: cadeias laterais dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina e pontes dissulfeto de cisteínas. A lei de Beer-Lambert assume que uma fração da luz que passa por uma amostra é absorvida e a luz restante é transmitida. Para moléculas grandes, como proteínas e partículas inteiras de vírus, a extinção da luz devido à absorção e ao espalhamento resulta em um desvio da lei de Beer-Lambert (Vekshin, 1999; Kaur, 2017; Balcão *et al.*, 2022c).

Assim, a atenuação da quantidade de luz que atinge o detector devido à absorção por cromóforos de proteínas e o espalhamento subtraída da atenuação da luz devido apenas à presença de cromóforos, produz a absorção característica para uma determinada partícula de fago em uma determinada concentração (Kaur, 2017). As proteínas estruturais do fago são, portanto, as principais contribuidoras para o espectro de absorção na faixa UV.

Em um comprimento de onda de 320 nm, os cromóforos das proteínas do fago têm absorção virtualmente nula (embora diferente de zero), e essa absorção é usada para corrigir a dispersão de luz de partículas de fago e contaminantes particulados não-fagos. A densidade óptica em 320 nm é, portanto, totalmente devida ao espalhamento (Vekshin, 1999). Os fagos isolados são partículas aproximadamente esféricas, tendo proporções mássicas aproximadamente iguais de proteína para DNA; suas proteínas estruturais, portanto, contribuem substancialmente para o espectro de absorção, sendo responsáveis pelo amplo platô (raso) entre 250-280 nm.

Material e reagentes

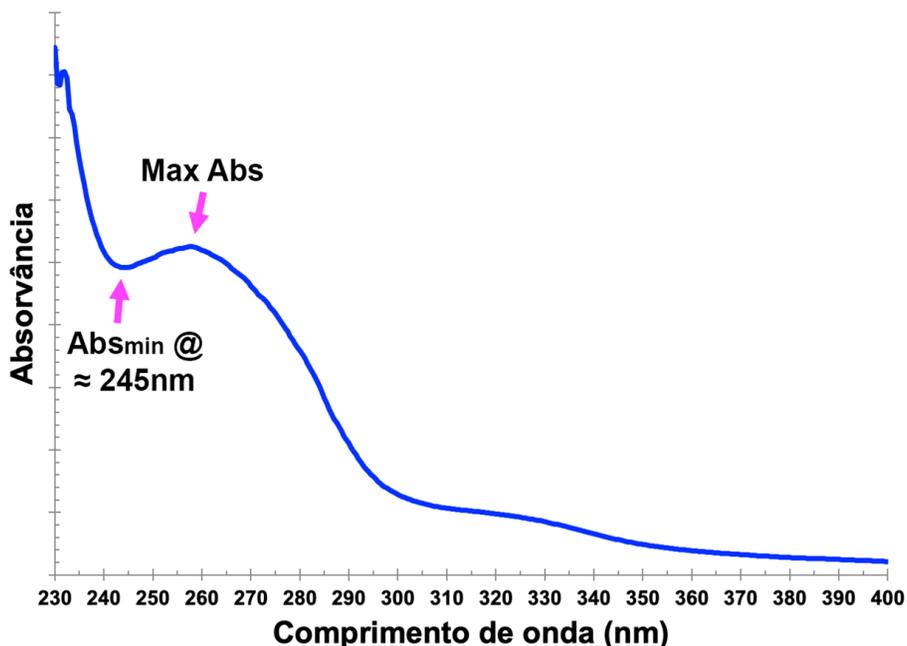
Material	Reagentes
Espectrofotômetro UV-Vis	Suspensão estoque de partículas fágicas (concentrada com PEG)
Cubetas de quartzo	Tampão fágico SM
Micropipeta de 1000 μL	
Micropipeta de 5000 μL	
Ponteiras de 1000 μL (azuis) e 5000 μL (brancas)	

Procedimento experimental

- [a]** Introduzir em uma cubeta de quartzo, 3000 μL de tampão fágico (este será o branco), transferir a cubeta para o compartimento de leitura no espectrofotômetro e fazer auto-zero da linha de base entre 190 nm – 1100 nm.
- [b]** Preparar uma (01) diluição da suspensão fágica diretamente na cubeta de quartzo, diluindo 200 μL de suspensão em 2800 μL de tampão fágico.
- [c]** Introduzir a cubeta de quartzo no compartimento do espectrofotômetro e realizar uma varredura espectral na gama de comprimentos de onda 190 nm – 1100 nm, no modo de aquisição de dados “lento” (para aquisição de um maior número de dados por segundo).

A Figura 5.1.1 apresenta um exemplo de como o espectro de absorção deverá resultar.

Figura 5.1.1 - Aspecto de um espectro de varredura UV-Vis de diluição de suspensão concentrada de bacteriófagos



5.2 Determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ)

O termo coeficiente de extinção molar (ϵ) é uma medida do quão fortemente uma substância absorve luz em um determinado comprimento de onda. É uma propriedade intrínseca das substâncias, relacionada com a sua composição química e estrutura, sendo independente da concentração (Vinadé; Vinadé, 2005).

O coeficiente de extinção molar é uma característica físico-química de cada bacteriófago isolado (Rios *et al.*, 2018; Pinheiro *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021; Balcão *et al.*, 2022b,c;

Harada *et al.*, 2022), podendo numa primeira análise servir para diferenciar entre vários fagos (diferentes) isolados para um mesmo hospedeiro.

Material e reagentes

Material	Reagentes
Espectrofotômetro UV-Vis	Suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG)
Cubetas de quartzo	Tampão fágico SM
Micropipeta de 1000 μL	
Micropipeta de 5000 μL	
Ponteiras de 1000 μL (azuis) e 5000 μL (brancas)	

Procedimento

- [a]** Preparar sete (07) diluições da suspensão fágica concentrada em tampão fágico (com volumes totais de 3000 μL), usando diferentes volumes de suspensão fágica concentrada: 10 μL , 25 μL , 50 μL , 100 μL , 150 μL , 200 μL e 500 μL .
- [b]** Ler a absorvância das diluições resultantes ao comprimento de onda que produziu a máxima absorção na varredura espectral UV-Vis (fazendo previamente o auto-zero a este comprimento de onda), e a 320 nm (comprimento de onda ao qual os cromóforos das partículas fágicas produzem pouca absorção de luz) (fazendo previamente o auto-zero a este comprimento de onda).

[c] Utilizar o título fágico obtido (protocolo 4.10) para realizar os cálculos do número de partículas fágicas (UFP) nas amostras de suspensão concentrada de fagos e da concentração de partículas fágicas nas diluições (UFP mL⁻¹). Preencher o Quadro 5.2.1 previamente à realização do ajuste linear da Equação de Beer-Lambert (Equação (2)) aos dados experimentais,

$$Abs = \varepsilon \times L \times C \quad (2)$$

onde *Abs* é a absorvância, ε é o coeficiente de extinção molar ((UFP mL⁻¹)⁻¹ cm⁻¹), *L* é o percurso ótico da cubeta (1 cm) e *C* é a concentração (UFP mL⁻¹).

Quadro 5.2.1 - Dados utilizados para preparar a curva de calibração visando determinar o coeficiente de extinção molar das partículas fágicas inteiras

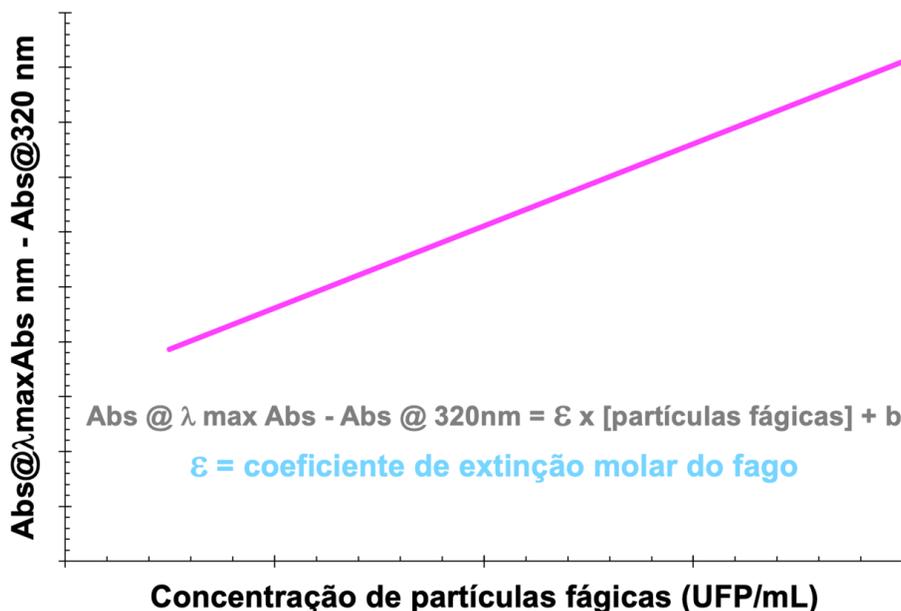
Volume de suspensão fágica concentrada (µL)	Volume final da diluição (µL)	Nº de UFP na alíquota de suspensão fágica concentrada	Concentração de partículas fágicas (UFP mL ⁻¹)	Abs _{λ=maxAbs nm}	Abs _{320 nm}	Abs _{λ=maxAbs nm} - Abs _{320 nm}
10	3000					
25	3000					
50	3000					
100	3000					
150	3000					
200	3000					
500	3000					

[d] Realizar um ajuste linear da equação de Beer-Lambert (Equação (2)) aos dados experimentais do Quadro 5.2.1 (Abs_{λ=maxAbs nm} - Abs_{320nm} = f (concentração de partículas fágicas, UFP mL⁻¹)), para obtenção do coeficiente de extinção molar das partículas fágicas (ε [ε]) (UFP mL⁻¹)⁻¹ cm⁻¹).

A subtração de Abs_{320nm} , um comprimento de onda onde existe pouca absorção de luz pelos cromóforos das partículas fágicas, tem como objetivo corrigir grosseiramente para o espalhamento de luz das partículas fágicas e contaminantes particulados não-fágicos (Rios *et al.*, 2018; Pinheiro *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2021; Balcão *et al.*, 2022b,c; Harada *et al.*, 2022).

A Figura 5.2.1 apresenta um exemplo de como a curva de calibração deverá resultar.

Figura 5.2.1 - Aspecto de uma curva de calibração relacionando a absorvância corrigida das partículas fágicas com a sua concentração



5.3 Análise do perfil de proteínas estruturais das partículas bacteriofágicas isoladas por eletroforese em gel de poli-acrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

As proteínas estruturais das partículas fágicas são vulgarmente analisadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), permitindo descrever as bandas proteicas não apenas em termos de sua mobilidade eletroforética relativa entre si, mas também em termos de seu tamanho molecular, caracterizando e diferenciando os fagos (García *et al.*, 2008).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Equipamento analítico para análises de eletroforese SDS-PAGE	Suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG)
Banho seco para microtubos	Butanol
Tubos Eppendorf® de 2 mL estéreis	Tampão de separação
Micropipeta de 1000 µL	Acrilamida
Micropipeta de 100 µL	Bisacrilamida
Micropipeta de 20 µL	N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina (TEMED)
Ponteiras de 1000 µL (azuis)	Persulfato de amônia (PSA)
Ponteiras de 200 µL (amarelas)	Tampão de Laemmli (glicerol, β-mercaptoetanol, SDS, Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, azul de bromofenol)
Ponteiras de 20 µL (brancas)	β-mercaptanol
Pipetas Pasteur de plástico	Gel de concentração (tampão de concentração, acrilamida, PSA, TEMED)
Tiras de papel de filtro	Corante Coomassie Brilliant Blue R-250
Tubos Falcon de 50 mL	Gel de separação (tampão de concentração, acrilamida, PSA, TEMED)

Procedimento experimental

- [a]** Utilizar o equipamento *Mini-PROTEAN® Tetra Cell 4-gel system* para eletroforese vertical da Bio-RAD (Califórnia CA, EUA) acoplado à unidade de fornecimento de energia *PowerPac™ HC* (Bio-RAD, Califórnia CA, EUA) e a um banho seco digital também da Bio-RAD, ou equipamento similar, para realização da análise de eletroforese SDS-PAGE.
- [b]** Montar os suportes com os vidros e os vedantes, de forma a poder introduzir o gel de separação para polimerização.
- [c]** Para a preparação dos géis de separação (12% acrilamida-bisacrilamida) (2 x gel S), em um tubo tipo Falcon de 50 mL, introduzir sequencialmente 2,50 mL de tampão de separação (S), 4,00 mL de acrilamida/bisacrilamida, 3,44 mL de água ultrapura, adicionar 50 µL de PSA a 10% (0,050 g PSA + 500 µL água ultrapura) e 14 µL de TEMED.
- [d]** Com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico estéril, introduzir rapidamente o gel de separação (S) entre os dois vidros dos suportes montados, observando o limite indicado.
- [e]** Com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico estéril, adicionar butanol sobre a parte superior dos géis de separação (S) até ao limite superior dos vidros, para compactar melhor o gel durante o processo de polimerização, e aguardar 45 min.
- [f]** Para a preparação da amostra de fagos, deve-se perfurar previamente a tampa de um tubo Eppendorf® (usando uma agulha flamejada). Nesse tubo Eppendorf®, adicionar 1000 µL de suspensão fágica concentrada e 1000 µL do tampão

de ruptura (950 μL de tampão de amostra Laemmli (1,51% (w/v) Tris-Base, 0,5% (v/v) β -mercaptoetanol, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, e 0,012% (m/v) azul de bromofenol) e 50 μL de β -mercaptoetanol).

- [g]** Colocar o tubo Eppendorf® no banho seco (ou em água fervente, usando um pequeno quadrado de isopor para suportar o tubo Eppendorf® na posição vertical) a 100 °C durante 10 min.
- [h]** Remover o butanol dos géis de separação polimerizados, vertendo simplesmente para o frasco de resíduos; com a ajuda de pequenas fitas de papel de filtro, remover o excesso de butanol à superfície dos géis de separação tocando suavemente neles e nas laterais dos vidros com a fita.
- [i]** Para a preparação dos géis de concentração (5% acrilamida-bisacrilamida) (2 x gel C), em um tubo tipo Falcon de 50 mL, introduzir sequencialmente 1,50 mL de tampão de concentração (C), 1,00 mL de acrilamida/bisacrilamida, 3,46 mL de água ultrapura, adicionar 30 μL de PSA a 10% (0,050 g PSA + 500 μL água ultrapura) e 10 μL de TEMED.
- [j]** Com o auxílio de uma outra pipeta Pasteur de plástico, adicionar o gel de concentração (gel C) até ao limite vertical indicado entre os vidros. Em seguida, introduzir o pente para modelar os pocinhos que irão receber as amostras, e aguardar 15-20 min para polimerização do gel C.
- [k]** Após polimerização do gel C, retirar cuidadosamente o pente puxando-o na vertical, retirar os vidros contendo o gel S e gel C, e inserir na cassete, com os vidros pequenos orientados

para o interior, introduzir a cassete na cuba, e adicionar o tampão de corrida enchendo completamente o espaço interno da cassete; verificar se não existem fugas de tampão da cassete para a cuba e, em caso negativo, adicionar tampão de corrida na cuba até ao limite indicado para dois géis.

- [l] Com uma micropipeta de 10 μL , aplicar cuidadosamente 5 μL de marcadores de peso molecular (marcadores pré-corados *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* da Bio-RAD, com padrões de proteína entre 10 kDa e 250 kDa) em um dos pocinhos pré-modelados, tendo o cuidado de não deixar sair marcador para os pocinhos laterais. Em seguida, aplicar 20 μL da amostra desnaturada a analisar em outro pocinho, deixando sempre, pelo menos, um pocinho de intervalo, e os pocinhos das extremidades do gel livres.
- [m] Programar a corrida dos géis na fonte de energia, de acordo com as instruções do equipamento, e utilizando os seguintes parâmetros: 20 mA por gel, 200 V, 20 W. A corrida deve ser realizada até que a frente de separação chegue à base inferior limite da placa, a cerca de 3 mm do final dos géis, desligando em seguida a fonte de energia.
- [n] Os dois conjuntos de vidros devem ser removidos cuidadosamente da cassete, e separados lentamente com a ajuda de uma espátula de plástico disponível para o efeito; os géis devem ser removidos cuidadosamente para não romperem, e mergulhados numa solução corante contendo Coomassie Brilliant Blue R-250 por pelo menos 24 h. Após este período de tempo, o corante deve ser removido para

o frasco de corante e os géis devem ser lavados com água ultrapura para remoção de vestígios do corante e deixados por pelo menos 24 h imersos em água ultrapura. Após esta etapa, as bandas proteicas poderão ser visualizadas e os géis deverão ser fotografados em alta resolução para análise.

A Figura 5.3.1 apresenta um exemplo de como o resultado deverá ficar.

Figura 5.3.1 - Aspecto de um gel de eletroforese SDS-PAGE após coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250, mostrando as bandas proteicas das proteínas estruturais de duas partículas fágicas (MWM – marcadores de peso molecular)



5.4 Determinação das características morfológicas das partículas fágicas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os bacteriófagos têm características morfológicas diferenciadas, existindo partículas fágicas sem cauda e partículas fágicas com cauda (Ackermann, 1998, 2011; Harada *et al.*, 2018; Balcão *et al.*, 2022a,b,c). Assim, a microscopia eletrônica de transmissão é considerada a técnica mais fácil para a identificação putativa de fagos, bem como para atribuir um determinado fago desconhecido a uma família (García *et al.*, 2008).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) usa um feixe de elétrons (com energia entre 60 keV e 120 keV) que atravessam a amostra para produzir imagens de altíssima resolução, sendo, desta forma, possível a visualização de vírus.

Para a **Coloração Negativa (NS)**, as amostras de suspensão de fagos concentradas em PEG são preparadas em grades de cobre de 3 mm de diâmetro (camada de carbono ultrafina em uma grade de cobre Lacey Carbon Tipo A 400 mesh, Ted Pella Inc., Redding CA, EUA), que foram previamente submetidas ao procedimento de *Glow Discharge*. Este procedimento visa dotar as grades de cobre (de natureza hidrofóbica) de carga superficial negativa, de forma a promover a adesão e espalhamento da amostra (3 μ L) em sua superfície. A coloração das amostras é então realizada aplicando 3 μ L de uma solução aquosa de acetato de uranila a 2% (m/m) na grade de cobre contendo a amostra e deixando secar ao

ar, ou mergulhando a grade de cobre contendo a amostra em uma gota de acetato de uranila a 2% (m/m).

Para **criocongelamento em gelo amorfo**, as amostras são preparadas em grades de cobre Lacey Carbon Tipo A 300 mesh (Ted Pella Inc., Redding CA, EUA), que foram previamente submetidas a um processo de *Glow Discharge*. As grades sofrem então um procedimento de *blotting* por 3 s e são vitrificadas por imersão rápida em etano líquido a $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$. Etano líquido é usado para vitrificar as amostras de suspensão de fago para criomicroscopia eletrônica de transmissão (crio-TEM), uma vez que uma fina película de água rapidamente imersa em etano líquido a $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$ congela demasiado rapidamente para que a água cristalize. Este congelamento rápido não rompe a estrutura proteica das partículas fágicas presentes no estado líquido, como pode fazer a formação de cristais de gelo. Após imersão em etano líquido, as grades são mantidas em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise no microscópio e mantidas a $-173\text{ }^{\circ}\text{C}$ na câmara do microscópio durante todo o tempo de análise.

Apresentamos aqui o procedimento utilizado para **Coloração Negativa (NS)** das partículas fágicas, dado ser bem mais rápido e simples, embora provoque uma ligeira deformação dos capsídeos dos vírions fágicos.

Material e reagentes

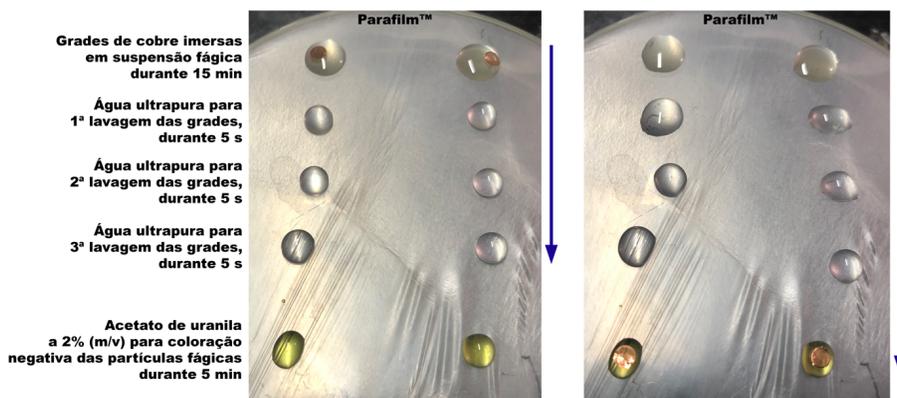
Material	Reagentes
Microscópio eletrônico de transmissão (MET)	Suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG)
Grades de carbono e cobre de 3 mm de diâmetro e 300 mesh	Água ultrapura
Micropipeta de 20 μ L	Solução aquosa de acetato de uranila a 2% (m/v)
Ponteiras de 50 μ L (brancas)	
Papel de filtro	
Pinça metálica desmagnetizada	
Suportes para grades de carbono e cobre	
Parafilm™	

Procedimento experimental

- [a]** Mergulhar as grades de cobre^{bp-5.4-1} na suspensão fágica concentrada com PEG, durante 15 min.
- [b]** Após este período de tempo, retirar as grades de cobre cuidadosamente com o auxílio de uma pinça em aço inox desmagnetizada, e realizar três lavagens sequenciais por simples imersão das grades em gotas de água ultrapura.
- [c]** Mergulhar as grades na solução aquosa de acetato de uranila a 2% (m/m) durante 5 min. Aguardar secagem ao ar por 30 s e colocar as grades nos suportes até análise no microscópio eletrônico de transmissão.^{bp-5.4-2}

O procedimento experimental acima descrito pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 5.4.1.

Figura 5.4.1 - Esquema geral do processo de coloração negativa das partículas fágicas para análise por microscopia eletrônica de transmissão



Um exemplo de resultado de como as partículas fágicas coradas negativamente aparecem quando observadas ao microscópio eletrônico de transmissão, pode ser encontrado na capa deste Manual (cantos superior esquerdo, superior direito e inferior esquerdo: fago da família *Myoviridae*; canto inferior direito: fago da família *Siphoviridae*).

5.5 Determinação dos parâmetros físicos das partículas fágicas por espalhamento dinâmico de luz laser (DLS)

O espalhamento dinâmico de luz laser (DLS) é uma técnica utilizada rotineiramente para obter informações sobre as características físicas de partículas submicrométricas, tais como tamanho hidrodinâmico de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta.

O movimento Browniano das partículas causa mudanças no sinal de luz laser espalhada ao longo do tempo, as quais são analisadas para extrair informações sobre a distribuição de tamanho das partículas suspensas em um líquido (Falke; Betzel, 2019). Neste sentido, o espalhamento dinâmico da luz laser tem sido aplicado na avaliação das características físico-químicas de partículas bacteriófágicas (Rios *et al.*, 2018; Balcão *et al.*, 2022c; Harada *et al.*, 2022). Esta técnica de análise também permite a visualização em tempo real das, e enumeração das, partículas virais, em poucos minutos. No entanto, exige-se concentração de amostra relativamente alta (10^7 - 10^9 UFP mL⁻¹) e uma suspensão fágica o mais límpida possível (Ács *et al.*, 2020).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Equipamento analisador de partículas, do tipo ZetaPALS system (model NanoBrook 90PlusPALS, Brookhaven Instruments, Holtsville NY, EUA).	Suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG)
	Suspensão da bactéria hospedeira em fase de crescimento exponencial
	Água ultrapura

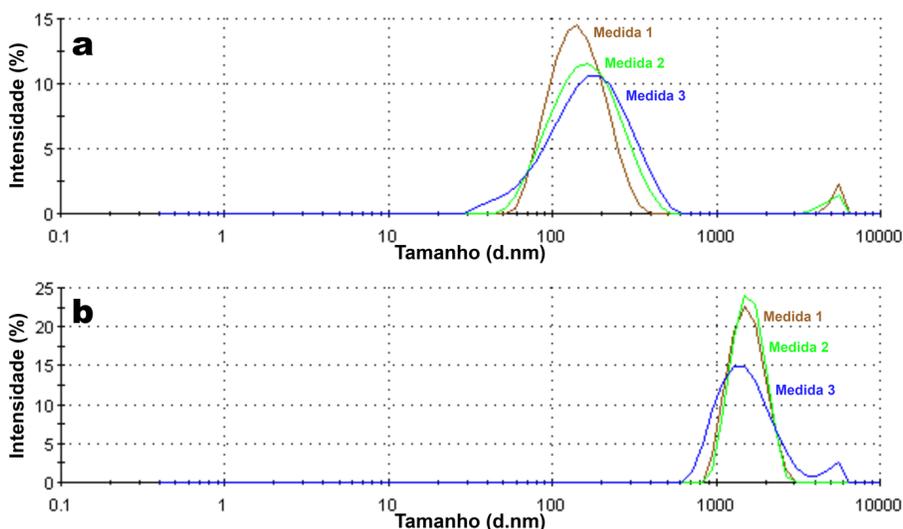
Procedimento experimental

[a] Preparar diluições da suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG) em água ultrapura, em relações de 1:10 e 1:100.

- [b]** Introduzir as diluições na cubeta específica do equipamento e realizar a leitura.
- [c]** Preparar diluições da suspensão da bactéria hospedeira em fase de crescimento exponencial, em água ultrapura, em relações de 1:10 e 1:100.
- [d]** Introduzir as diluições na cubeta específica do equipamento e realizar a leitura.

A Figura 5.5.1 apresenta um exemplo de como os resultados deverão aparecer.

Figura 5.5.1 - Aspecto de como os resultados de determinação de tamanho hidrodinâmico de partícula (determinações em triplicata) deverão aparecer, no caso de partículas fágicas **(a)** e de células da bactéria hospedeira em fase exponencial de crescimento **(b)**



6 TRABALHANDO COM BACTERIÓFAGOS: CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

A pesquisa sobre bacteriófagos (fagos) para fins clínicos ou aplicações biotecnológicas ganhou cada vez mais atenção após os anos 2000, especialmente com o isolamento de fagos para o tratamento de infecções bacterianas.

Quando os bacteriófagos foram descobertos pela primeira vez, seu potencial no combate às infecções bacterianas foi rapidamente apreciado. No entanto, estudos iniciais produziram resultados insatisfatórios. Este fato, combinado com a descoberta dos antibióticos, levou a um declínio do interesse no uso de fagos para terapia antibacteriana na medicina ocidental. No entanto, a crescente expansão da resistência bacteriana aos antibióticos culminou no renascimento do interesse pela terapia fágica (Martins *et al.*, 2020).

Embora os fagos e suas enzimas tenham uma infinidade de aplicações potenciais em diferentes áreas do conhecimento, estes predadores bacterianos devem ser caracterizados em detalhe sob os pontos de vista biológico e genômico com o objetivo de garantir a segurança na sua utilização (Manohar *et al.*, 2021).

Assim, a compreensão da biologia dos fagos pode ser explorada para gerar um amplo espectro de aplicações, onde se incluem novas terapias antibacterianas (humanas (Rios *et al.*,

2018; Harada *et al.*, 2022), animais (Silva *et al.*, 2021; Balcão *et al.*, 2022c) e vegetais (Pinheiro *et al.*, 2019, 2020)), nanotecnologias, diferentes estratégias de detecção bacteriana (Harada *et al.*, 2021), assim como diversas formas de controle biológico de bactérias patogênicas em escala industrial, entre outros usos (Harada *et al.*, 2018; Akhwale *et al.*, 2019). O impacto biológico da pesquisa com fagos neste século tem sido, assim, significativo, com perspectivas comerciais virtualmente incalculáveis (Salmond; Fineran, 2015).

6.1 Determinação da gama de hospedeiros (*Host Range*) e da eficiência de plaqueamento (EOP)

A gama de hospedeiros de um bacteriófago é uma propriedade crítica para permitir decidir a utilidade de um fago em particular para uso em terapia fágica. Idealmente, um fago não infectará outras espécies de bactérias para além da sua bactéria hospedeira, infectando apenas uma espécie bacteriana ou um sorotipo dentro de uma espécie.

A vantagem da elevada especificidade dos fagos evita que microrganismos não-patogênicos (da flora normal, por exemplo) sejam afetados durante a aplicação de fagos. Adicionalmente, a não-especificidade de um fago pode diluir a concentração efetiva de atividade lítica em direção à bactéria-alvo. No entanto, nem todos os bacteriófagos são estritamente específicos para um dado hospedeiro bacteriano (Hyman, 2019; García *et al.*, 2008).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG)
Placas de Petri estéreis, descartáveis	Suspensão da bactéria hospedeira em fase de crescimento exponencial
Micropipeta de 20 μL	Suspensões de várias bactérias de coleção
Ponteiras de 50 μL (brancas)	Placas de Petri descartáveis contendo meio TSA sólido estéril
	Meio de cultura líquido TSB
	MTA-TSB, mantido a $\approx 40\text{ }^{\circ}\text{C}$

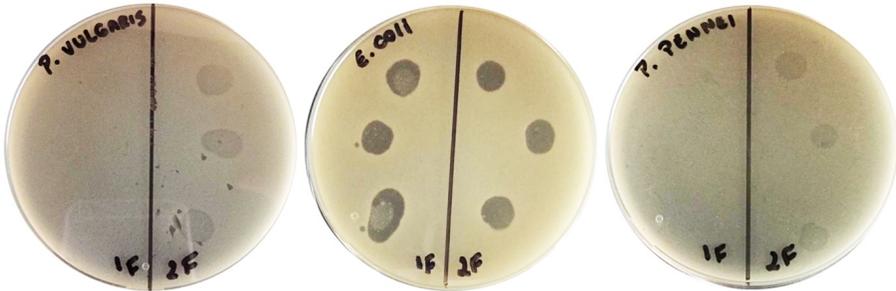
Procedimento experimental

- [a]** Utilizar várias bactérias de coleção para determinação da gama de hospedeiros dos bacteriófagos isolados, usando a técnica de *spot test* já descrita anteriormente (protocolo 4.5).
- [b]** Preparar um tapete bacteriano de cada bactéria, pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada (descrita no protocolo 4.3) e deixar secar as placas em cabine de segurança biológica.
- [c]** Em seguida, adicionar uma gota de 5 μL de cada diluição decimal da suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG) do fago isolado, em um tapete bacteriano de uma dada bactéria de coleção.
- [d]** Incubar as placas de Petri à temperatura ótima de crescimento de cada bactéria por 24 h.

[e] Após o período de incubação, verificar se houve formação de halos de lise nos tapetes bacterianos.

A Figura 6.1.1 apresenta um exemplo de como os resultados deverão aparecer.

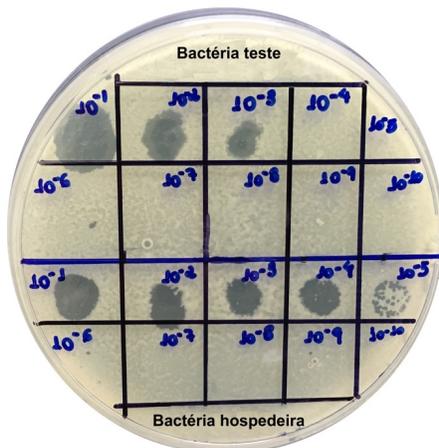
Figura 6.1.1 - Aspecto de como os resultados de determinação de gama de hospedeiros dos fagos deverão aparecer, ilustrados nesta figura no caso dos fagos ph001F e ph002F (UNISO) e das bactérias *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* e *Proteus pennei*



Para aquelas bactérias onde houve produção de halo de lise no tapete, deverá ser determinada a Eficiência de Plaqueamento (EOP).

A Figura 6.1.2 apresenta um exemplo de como os resultados deverão aparecer.

Figura 6.1.2 - Tipo de resultado obtido na determinação da Eficiência de Plaqueamento (EOP) de um bacteriófago em uma cepa bacteriana susceptível (com resultado positivo no *spot-test*).



A EOP do fago em estudo para cada bactéria alvo susceptível deve ser calculada por divisão entre o título alcançado na infecção de cada bactéria alvo e o título alcançado na infecção da cepa hospedeira de isolamento ($EOP_{\text{hospedeiro de isolamento}} = 100\%$), utilizando a Equação (3) (Melo *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2019; Balcão *et al.*, 2022b,c; Harada *et al.*, 2022).

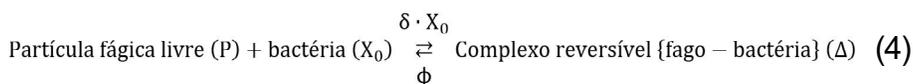
$$EOP = \frac{\text{Média das UFP}_{\text{bactéria alvo}}}{\text{Média das UFP}_{\text{bactéria hospedeira}}} \times 100 \quad (3)$$

Os valores de EOP devem ser apresentados como a média de três ensaios independentes, e serem ranqueados como elevado ($\geq 50\%$), moderado (10%-0,1%), baixo (0,1%-0,001%) ou ineficiente ($\leq 0,001\%$), em relação ao hospedeiro de isolamento (100%) (Khan Mirzaei; Nilsson, 2015).

6.2 Curva de adsorção às células bacterianas hospedeiras

O primeiro passo para a infecção de uma célula bacteriana susceptível por uma partícula bacteriofágica consiste na ligação/ ancoragem do bacteriófago a receptores específicos existentes na superfície da célula hospedeira susceptível (Jin *et al.*, 2012). O contato inicial é caracterizado pela chegada da partícula fágica à bactéria, através de movimentos Brownianos e efeitos de difusão, seguido da atuação de enzimas hidrolíticas codificadas pelo fago (despolimerases e hidrolases de peptidoglicano) que facilitam a translocação do genoma fágico através da parede celular da célula bacteriana. O DNA do fago então assume o controle da maquinaria transcripcional da célula bacteriana em seu favor, promovendo assim a replicação do seu material genético e concomitante síntese de proteínas virais, culminando na replicação intracelular do vírus em larga escala e levando à lise e conseqüente morte da bactéria (Rios *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2019; Harada *et al.*, 2018, 2022; Balcão *et al.*, 2022a,b,c). Sabe-se que esta etapa varia bastante com o estado fisiológico da célula hospedeira. Um aumento na superfície celular bacteriana, um grande número e densidade de receptores na superfície da célula hospedeira, e uma maior mobilidade das células bacterianas, terão uma influência considerável na taxa de adsorção das partículas fágicas às células bacterianas susceptíveis (Santos *et al.*, 2014; Harada *et al.*, 2018). É por isso fundamental determinar a taxa de adsorção (e a constante cinética de desorção) dos fagos isolados, pois estes parâmetros podem ser utilizados como um indicativo da capacidade dos bacteriófagos para infectarem a célula bacteriana hospedeira susceptível e causar sua morte celular (Shao; Wang, 2008).

O modelo postulado por Watanabe *et al.* (1982) e Moldovan *et al.* (2007), com pequenas alterações, em que uma partícula fágica livre adsorve a uma célula bacteriana susceptível formando um complexo reversível que pode levar ou à infecção produtiva da célula ou à simples desorção do fago de volta ao meio, na forma da Equação (4),



conduz ao conjunto de equações representado na Equação (5),

$$\begin{cases} \frac{dP}{dt} = -\delta \cdot P \cdot X_0 + \phi \cdot \Delta \\ P + \Delta = 1.0 \end{cases} \quad (5)$$

cuja solução produz o modelo matemático representado como Equação (6),

$$\frac{P_t}{P_0} = \frac{\phi + \{\delta \times X_0 \times e^{-(\delta \times X_0 + \phi) \times t}\}}{\delta \times X_0 + \phi} \quad (6)$$

o qual poderá ser utilizado para estimar tanto a taxa de adsorção das partículas fágicas às células bacterianas hospedeiras susceptíveis, como a constante cinética de desorção das partículas fágicas a partir de complexos reversíveis fago-bactéria, por ajuste não-linear aos dados experimentais, onde P_t e P_0 representam a concentração de fago (UFP mL⁻¹) aos tempos t e 0 , respectivamente, δ representa a taxa de adsorção (de primeira ordem) das partículas fágicas às células bacterianas hospedeiras susceptíveis (UFC⁻¹ mL min⁻¹), ϕ representa a taxa de desorção (de primeira ordem) das partículas fágicas dos complexos reversíveis

fago-bactéria (mL min^{-1}), X_0 representa a concentração inicial de células bacterianas não infectadas (susceptíveis) (UFC mL^{-1}) e t é o tempo de infecção (h).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Cepas bacterianas em cultura líquida
Erlenmeyer de 100 mL	Suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG)
Tubos Eppendorf® de 2 mL estéreis e suportes para tubos Eppendorf®	Meio de cultura líquido TSB
Micropipetas de 5000 μL , 1000 μL , 100 μL e 5 μL	Clorofórmio
Ponteiras de 5000 μL (brancas), 1000 μL (azuis), 100 μL (amarelas) e 50 μL (brancas)	Placas de Petri com meio TSA sólido e tapete bacteriano em MTA-TSB
Espectrofotômetro UV-Vis	MTA-TSB, mantido a $\approx 40^\circ\text{C}$
Tubos tipo Falcon de 50 mL	
Cronômetro digital	

Procedimento experimental

[a] Utilizar suspensão bacteriana previamente preparada em 25 mL de meio líquido TSB e incubada à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira, até ao crescimento exponencial (suspensão bacteriana com $\text{OD} = 0,5$ a 610 nm), por forma a obter um valor de Multiplicidade de Infecção (MOI) de 0,001 (Stuer-Lauridsen *et al.*, 2003; Balcão *et al.*, 2022b,c; Harada *et al.*, 2022), garantindo dessa forma que todas as partículas fágicas tenham uma célula bacteriana

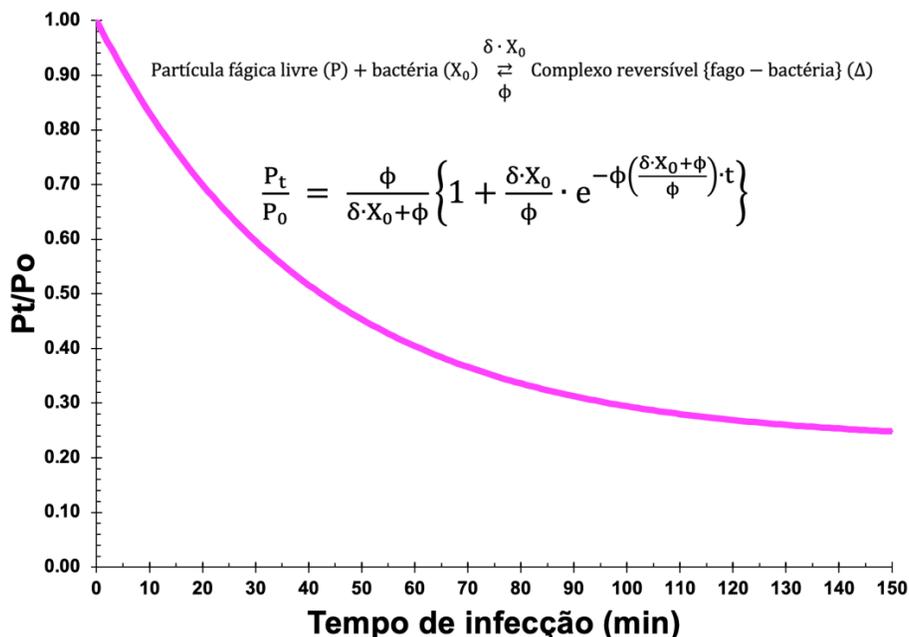
disponível. Por exemplo, preparar um volume de diluição da suspensão fágica para obter 8×10^5 UFP mL⁻¹ e adicionar 2 mL de suspensão da bactéria hospedeira (8×10^8 UFC mL⁻¹) em um tubo tipo Falcon de 15 mL, homogenizando delicadamente com o auxílio de uma micropipeta.

- [b]** Aguardar 30 s e coletar o tempo 0, retirando uma alíquota de 50 µL da amostra e realizando diluições seriadas até 10^{-5} . Repetir o procedimento de coleta de alíquotas de igual volume, a cada 5 min, durante os próximos 30 min e, então, espaçar os intervalos de tempo entre as coletas para cada 10 min até completar 150 min de ensaio. As alíquotas de 50 µL coletadas devem ser imediatamente misturadas com 400 µL de meio TSB suplementado com 50 µL de clorofórmio.^{bp-6.2-1} Nas diluições seguintes (10^{-2} a 10^{-5}) não é necessário adicionar clorofórmio.
- [c]** Plaquear as diluições obtidas em três gotas de 5 µL (triplicatas), em cada espaço pré-determinado nas placas de Petri indicando as diluições correspondentes, sobre o tapete bacteriano previamente preparado nas placas de Petri (100 µL de bactéria hospedeira em 4,5 mL de meio MTA-TSB, vertido em placas de Petri contendo meio TSA solidificado).
- [d]** Incubar as placas de Petri à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 24 h para contagem posterior das placas fágicas formadas, devendo-se considerar apenas valores de contagens entre 3-30 placas fágicas.
- [e]** Realizar três ensaios independentes, repetindo as etapas **[a]**-**[d]**.

[f] Ajustar o modelo não-linear da Equação (6) ao conjunto de dados experimentais, utilizando por exemplo um dos softwares GraphPad Prism v. 9.0 (GraphPad Software, San Diego CA, EUA), KaleidaGraph v. 5.0 (Synergy Software, Reading PA, EUA), ou a função Solver do Microsoft Excel (Microsoft, Redmond WA, EUA).

A Figura 6.2.1 apresenta um exemplo de como o ajuste do modelo não-linear da Equação (6) deverá resultar.

Figura 6.2.1 - Aspecto de como deverá ficar o ajuste não-linear do modelo representado na Equação (6) aos dados experimentais de concentração fágica normalizada ao longo do tempo



6.3 Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)

A produção da curva de um só ciclo de crescimento síncrono (*one-step growth curve*, OSGC) objetiva permitir determinar os parâmetros de crescimento do bacteriófago (períodos de eclipse, latente e de acumulação intracelular, e o tamanho de explosão (*burst size*) ou rendimento da morfogênese) na cepa bacteriana hospedeira. Na curva OSGC, o período de eclipse representa o tempo após a penetração e injeção do genoma fágico no citoplasma da bactéria hospedeira, com biossíntese e montagem dos vírions maduros. O período latente representa o tempo após a penetração e injeção do genoma fágico no citoplasma da bactéria hospedeira, para a liberação dos vírions maduros decorrente da lise das células bacterianas. O número de vírions produzidos por célula infectada (progenia fágica) representa o tamanho de explosão, ou *burst size*. A diferença entre o período latente e o período de eclipse representa a fase de acumulação intracelular.

Os dados experimentais poderão então ser representados graficamente e ajustados por ajuste não-linear a um modelo matemático de uma curva sigmoideal típica (4-PL, ou modelo de regressão logística de 4-parâmetros), isto é, o modelo representado na Equação (7),

$$\text{Log}(P_t) = P_\infty + \frac{P_0 - P_\infty}{1 + \left(\frac{t}{\psi}\right)^\xi} \quad (7)$$

por forma a determinar os parâmetros de crescimento do fago (Balcão *et al.*, 2022b,c; Harada *et al.*, 2022; Pinheiro *et al.*, 2019), onde P_t representa a concentração de partículas fágicas

(UFP mL⁻¹) no tempo t , P_0 representa a concentração de partículas fágicas no tempo $t = 0$, P_∞ representa a concentração de partículas fágicas no tempo $t = \infty$, ψ é o ponto de inflexão da curva, ξ é o declive de Hill que define a inclinação da curva, e t é o tempo (min).

Valores muito elevados de concentração fágica podem resultar num processo conhecido como “*lysis from without*”, no qual um número muito elevado de partículas fágicas adsorvem à célula hospedeira e perfuram a membrana celular, matando a célula sem que esta tenha tido oportunidade de replicar os vírions fágicos no seu interior e lisar após enfraquecimento enzimático da membrana celular a partir de dentro (*lysis from within*). Um fenômeno contrário ocorre quando a suspensão fágica contém um grande número de endolisinas bacterianas que permaneceram após a lise das células hospedeiras durante o processo de amplificação com produção da progenia fágica. Tais endolisinas podem provocar igualmente a lise das células hospedeiras durante o ensaio na produção da curva de um só ciclo de crescimento síncrono, levando à formação de placas de lise que não têm origem em ciclos líticos de infecção e que, por isso, podem ser erroneamente contabilizadas como tal.

Adicionalmente, após algumas rodadas de infecção a valores de MOI mais elevados (com o início da infecção totalmente assíncronizado porque a infecção de células hospedeiras continuou, à medida que mais fagos são liberados), altos níveis de lise celular podem levar a concentrações aumentadas de lisinas no meio as quais podem causar mais lise mimetizando placas fágicas.

Material e reagentes

Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG)
Erlenmeyer de 100 mL	
Banho termostaticado	Meio de cultura líquido TSB
Micropipetas de 5000 μ L, 1000 μ L, 100 μ L e 5 μ L	Placas de Petri com meio TSA sólido e tapete bacteriano em MTA-TSB
Ponteiras de 5000 μ L (brancas), 1000 μ L (azuis), 100 μ L (amarelas) e 50 μ L (brancas)	Meio de cultura MTA-TSB
Espectrofotômetro UV-Vis	Suspensão da cepa bacteriana hospedeira de isolamento
Tubos tipo Falcon de 50 mL	
Tubos Eppendorf® de 2 mL estéreis e suportes para tubos Eppendorf®	
Cronômetro digital	
Centrífuga refrigerada	

Procedimento experimental

- [a]** Preparar previamente um inóculo da bactéria hospedeira em 25 mL de meio líquido TSB, em um Erlenmeyer de 100 mL, e incubar à temperatura ótima de crescimento da bactéria até à fase exponencial, observada em função da sua curva de crescimento.
- [b]** Centrifugar 10 mL da suspensão bacteriana obtida em **[a]** em um tubo tipo Falcon de 15 mL estéril, a 2500 rpm e 4 °C por 20 min, desprezar o sobrenadante e ressuspender

o precipitado em 5 mL de meio líquido TSB, com auxílio de uma micropipeta. Confirmar a concentração de células bacterianas em torno de 8×10^5 UFC mL⁻¹.

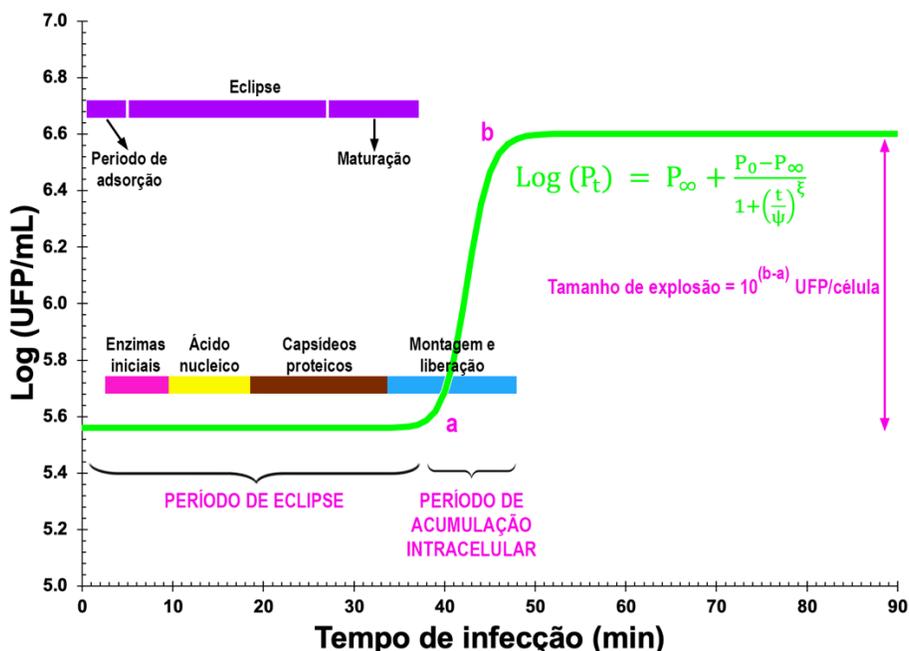
- [c]** Preparar 5 mL de uma solução de tampão fágico contendo uma concentração de partículas fágicas de 1×10^5 UFP mL⁻¹ a partir da suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG) cujo título foi determinado anteriormente.
- [d]** Adicionar a suspensão de partículas fágicas preparada ao tubo Falcon de 15 mL contendo a suspensão de bactéria, produzindo um valor de MOI $\leq 0,001$, e incubar à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 5 min com agitação orbital, para permitir às partículas fágicas adsorverem às células bacterianas hospedeiras.
- [e]** Centrifugar o tubo Falcon novamente a 2500 rpm (20 min, 4 °C), desprezar o sobrenadante formado e ressuspender com 10 mL de meio TSB líquido fresco, homogenizando suavemente com a micropipeta.
- [f]** Retirar uma alíquota de 50 μ L, que corresponderá ao tempo 0, e realizar diluições seriadas com 450 μ L de tampão fágico até à quinta diluição. A partir desse momento, a suspensão original deve ser incubada à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira e, a cada 5 min (durante 30 min) retirar uma alíquota de 50 μ L e diluir seriadamente, até à quinta diluição. Após 30 min, espaçar as coletas a cada 10 min até completar 150 min de ensaio,

sempre repetindo os passos anteriores. Todas as diluições de todas as amostras deverão ser tituladas pelo método de plaqueamento em ágar de dupla camada.

- [g]** Plaquear 3 gotas de 5 μL de cada diluição em cada espaço pré-determinado nas placas de Petri, indicando as diluições correspondentes sobre as placas previamente preparadas com o tapete bacteriano (100 μL de suspensão da bactéria hospedeira em 5,0 mL de meio de cultura MTA-TSB vertidos em placas de Petri contendo meio TSA solidificado).
- [h]** Incubar as placas de Petri à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 24 h, para contagem posterior das placas fágicas formadas, devendo-se considerar apenas valores de contagens entre 3-30 placas fágicas em cada gota.
- [i]** Realizar três ensaios independentes, repetindo as etapas **[a]**-**[h]**.
- [j]** Ajustar o modelo não-linear da Equação (7) ao conjunto de dados experimentais, utilizando por exemplo um dos softwares GraphPad Prism v. 9.0 (GraphPad Software, San Diego CA, EUA), KaleidaGraph v. 5.0 (Synergy Software, Reading PA, EUA), ou a função Solver do Microsoft Excel (Microsoft, Redmond WA, EUA).

A Figura 6.3.1 apresenta um exemplo de como o modelo não linear da Equação (7) deverá ficar, uma vez ajustado aos dados experimentais.

Figura 6.3.1 - Aspecto de como deverá ficar o ajuste não-linear do modelo representado na Equação (7) aos dados experimentais de crescimento do fago na célula bacteriana hospedeira ao longo do tempo



6.4 Curva de inativação bacteriana *in vitro* a vários valores de MOI

Por intermédio de ensaios de terapia fágica *in vitro* é possível determinar a taxa de inativação da bactéria, utilizando diferentes valores de MOI (multiplicidade de infecção, ou seja, razão concentração de vírus / concentração de bactéria). O valor de MOI indicará a proporção de partículas fágicas com melhor eficiência no biocontrole das células bacterianas hospedeiras susceptíveis.

A eficiência da fagoterapia depende da quantidade de fagos administrados, sendo neste sentido importante determinar a melhor razão vírus/bactéria para a eficiente inativação da bactéria pelo fago (Qadir *et al.*, 2018).

Material e reagentes

Material	Reagentes
Estufa de incubação microbiológica	Suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG)
Tubos Eppendorf® de 2 mL estéreis e suportes para tubos Eppendorf® de 2 mL	Meio de cultura líquido TSB
Micropipetas de 5000 µL, 1000 µL, 100 µL e 5 µL	Placas de Petri com meio TSA sólido e tapete bacteriano em MTA-TSB
Ponteiras de 5000 µL (brancas), 1000 µL (azuis), 100 µL (amarelas) e 5 µL (brancas)	MTA-TSB, mantido a ≈ 40 °C
Espectrofotômetro UV-Vis	Tampão PBS
Tubos de ensaio estéreis	Cultura líquida da bactéria hospedeira em fase exponencial de crescimento

Procedimento experimental

[a] Para obter um valor de MOI 1, deve-se ter uma concentração da bactéria hospedeira em fase exponencial de crescimento de 1×10^5 UFC mL⁻¹ (concentração final) e uma concentração de fago de 1×10^5 UFP mL⁻¹ (concentração final) em 10 mL de

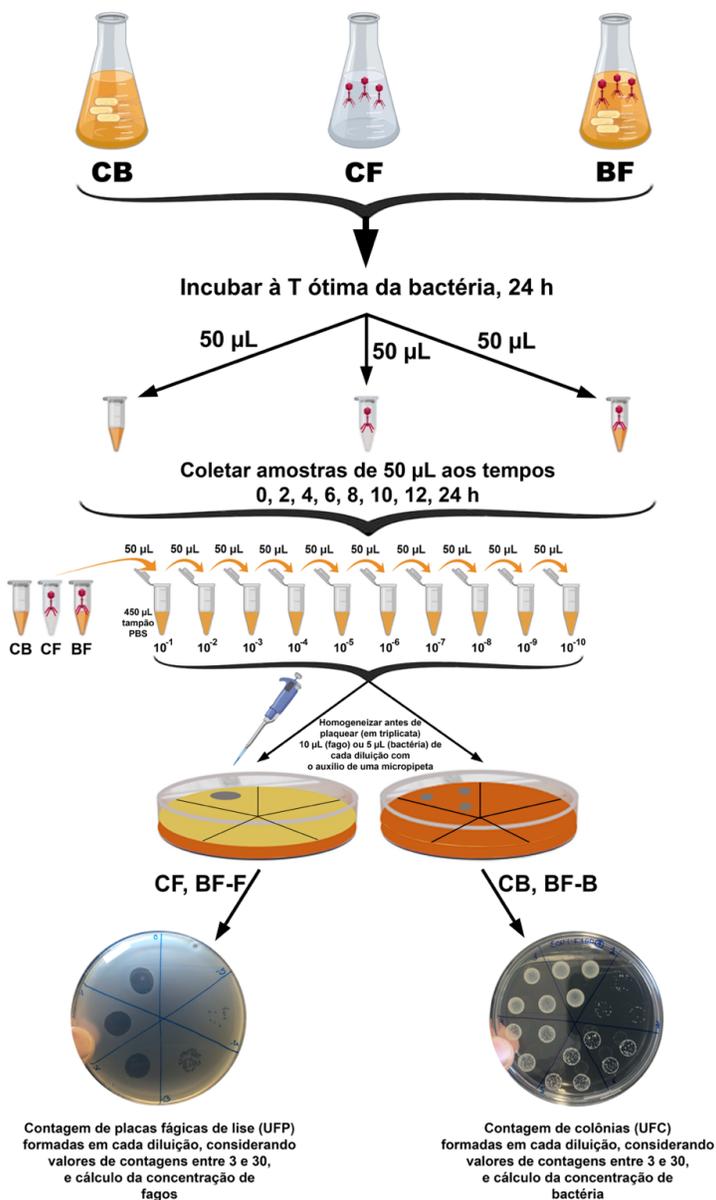
meio de cultura líquido TSB em um tubo Falcon de 15 mL. O tubo deve ser incubado à temperatura ótima de crescimento da bactéria por 24 h, sem agitação, sendo esse tratamento intitulado BF1 (bactéria mais fago em MOI 1).

- [b]** Para obter um valor de MOI 1000, deve-se ter uma concentração da bactéria hospedeira em fase exponencial de crescimento de 1×10^5 UFC mL⁻¹ (concentração final) e uma concentração de fago de 1×10^8 UFP mL⁻¹ (concentração final) em 10 mL de meio de cultura líquido TSB num tubo Falcon de 15 mL. O tubo deve ser incubado à temperatura ótima de crescimento da bactéria por 24 h, sem agitação, sendo esse tratamento intitulado BF1000 (bactéria mais fago em MOI 1000).
- [c]** Preparar também, para cada ensaio, duas amostras de controle: um controle de bactéria (CB) e um controle de fago (CF). O controle de bactéria deve ser inoculado apenas com a cepa bacteriana hospedeira e o controle de fago inoculado apenas com fago. Os controles (CB, CF) e os tratamentos (BF1 ou BF1000) devem ser incubados à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 24 h.
- [d]** Retirar alíquotas de 50 µL dos tratamentos e controles nos tempos 0 (imediatamente após o início do ensaio) e após 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h de incubação, diluídas em série em 450 µL de tampão PBS em tubos Eppendorf® estéreis, até dez diluições decimais consecutivas.

- [e]** No controle de fago (CF) e no tratamento (BF-F, bactéria mais fago, concentração de fago), a concentração de partículas fágicas determinar em triplicata pelo método de plaqueamento de gota ($3 \times 5 \mu\text{L}$ de cada diluição) em ágar de dupla camada contendo tapete da bactéria hospedeira (cultura em fase exponencial, $\text{OD}_{610\text{nm}} \approx 0,5$), após um período de incubação de 12 h à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira.
- [f]** No controle de bactéria (CB) e no tratamento (BF-B, bactéria mais fago, concentração de bactéria), a concentração de células bacterianas viáveis determinar em triplicata pelo método de plaqueamento de gota ($3 \times 5 \mu\text{L}$ de cada diluição) em meio TSA sólido, após um período de incubação de 12 h à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira.
- [g]** Realizar três ensaios independentes, repetindo as etapas **[a]**-**[f]**.

O procedimento experimental acima descrito pode ser visualizado de forma esquemática na Figura 6.4.1.

Figura 6.4.1 - Esquema geral do processo de obtenção da curva de inativação bacteriana *in vitro* a vários valores de MOI. Legenda: CB – controle de bactéria; CF – controle de fago; BF – bactéria mais fago (tratamento); BF-F – bactéria mais fago, concentração de fago; BF-B – bactéria mais fago, concentração de bactéria



6.5 Extração e purificação de DNA fágico para sequenciamento

As comunidades naturais de fagos são reservatórios de considerável diversidade genética e fornecem um recurso valioso para o desenvolvimento da biotecnologia moderna. Contudo, poucos fagos são caracterizados genômicamente. Os genomas completos dos fagos facilitam o estudo da história e das relações evolutivas dos fagos, biodiversidade, biogeografia, assim como a identificação de novos vírus.

A compreensão da biologia dos fagos pode ser explorada para gerar um amplo espectro de aplicações em diferentes áreas do conhecimento (Akhwale *et al.*, 2019). Nesta perspectiva, o sequenciamento do genoma dos fagos é fundamental e pode fornecer vastas informações para a potencial utilização destes vírus. Para se poder realizar o sequenciamento do genoma fágico, diversas etapas iniciais estão envolvidas na extração e purificação do DNA fágico, as quais serão detalhadas neste protocolo.

Material e reagentes

Material	Reagentes
Centrífuga refrigerada	Suspensão estoque concentrada de partículas fágicas (concentrada com PEG)
Banho termostático	Proteinase K
Sistema de espectrofotometria NanoDrop™ para quantificação de DNA	Tampão da DNase
Tubos Eppendorf® de 2 mL estéreis	DNase
Balança analítica	RNase
Geladeira	Solução aquosa de etanol a 70% (v/v)
Micropipetas de 1000 µL, 100 µL, 10 µL, 5 µL	Água ultrapura
Ponteiras de 1000 µL (azuis), 200 µL (amarelas), 50 µL (brancas)	PEG 8000
Equipamento eletroforese em gel de agarose	NaCl
Biofreezer	SDS a 10% (m/v)
Transiluminador	Água isenta de nuclease
	EDTA 0,5 M, pH 8
	Tampão fágico
	Fenol
	Clorofórmio
	Acetato de sódio
	Álcool isopropílico absoluto
	Agarose (<i>low melting</i>)
	Tampão TBE [1×]

Procedimento experimental

O processo será realizado em diferentes etapas, sendo: **[i]** tratamento da suspensão fágica concentrada com PEG, utilizando DNase (para eliminação de DNA bacteriano); **[ii]** extração do DNA; **[iii]** precipitação do DNA e; **[iv]** determinação do perfil de restrição (*Restriction Fragment Length Polimorfism*, RFLP) do DNA fágico extraído e verificação da quantidade e qualidade do DNA extraído por eletroforese em gel de agarose.

[i] Tratamento com DNase e RNase

[i.1] Preparar uma mistura com a suspensão fágica, de acordo com o Quadro 6.5.1, considerando a concentração de partículas fágicas na suspensão estoque concentrada com PEG (título fágico). A suspensão estoque de fago deve ser previamente concentrada com PEG 8000 (concentração final de 20%, m/v) mais NaCl (concentração final de 2,5 mol L⁻¹), centrifugada e ressuspendida em um volume pequeno de tampão fágico (em torno de 1 mL).

Quadro 6.5.1 - Reagentes e suas concentrações a utilizar no tratamento da suspensão estoque concentrada (com PEG) de partículas fágicas com DNase, considerando o título da suspensão fágica

Título fágico < 10 ¹⁰ UFP mL ⁻¹		Título fágico ≥ 10 ¹⁰ UFP mL ⁻¹	
Suspensão estoque de partículas fágicas	630 µL	Suspensão estoque de partículas fágicas	88 µL
Tampão da DNase	70 µL	Tampão da DNase	10 µL
DNase I (Promega)	1,25 µL	DNase I (Promega)	1,25 µL
RNase I (Promega)	1,25 µL	RNase I (Promega)	1,25 µL
Volume final do digerido com DNase e RNase: 702,5 µL		Volume final do digerido com DNase e RNase: 100,5 µL	

[i.2] Incubar durante 1-2 h a 37 °C.

[i.3] Incubar durante 15 min a 25 °C.

[ii] Extração de DNA

[ii.1] Adicionar à solução contendo DNA bacteriano digerido em [i] os reagentes apresentados no Quadro 6.5.2.

Quadro 6.5.2 - Reagentes e suas concentrações a utilizar no tratamento da suspensão estoque concentrada de partículas fágicas tratada com DNase, considerando o título da suspensão fágica

Título fágico < 10 ¹⁰ UFP mL ⁻¹		Título fágico ≥ 10 ¹⁰ UFP mL ⁻¹	
Digerido com DNase	700 µL	Digerido com DNase	100 µL, que deve ser avolumado a 500 µL com tampão SM
Proteinase K	1,25 µL	Proteinase K	1,25 µL
SDS a 10% (m/v)	25 µL	SDS a 10% (m/v)	25 µL
EDTA 0,5 M, pH 8	20 µL	EDTA 0,5 M, pH 8	20 µL

[ii.2] Incubar a mistura a 60 °C por 1 a 2h.

[ii.3] Fazer um choque térmico durante 5 min, colocando o Eppendorf no freezer (-20 °C).

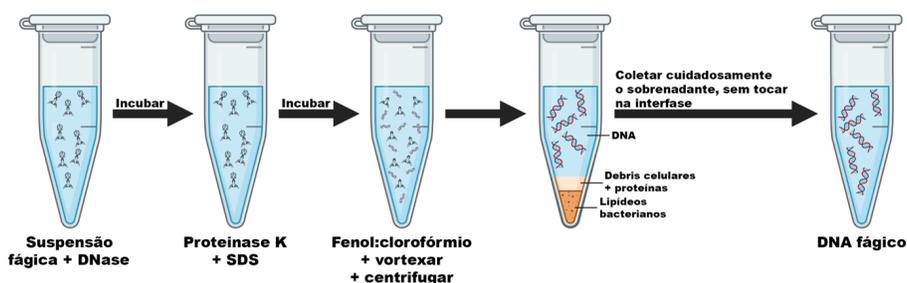
[ii.4] Adicionar igual volume de fenol:clorofórmio (1:2) (equilibrado em Tris.EDTA, adaptado a partir de Maniatis *et al.* (1982)) e inverter por seis (6) vezes. [bp-6.5-1](#)

[ii.5] Fazer um *spin* a 3000 × *g* durante 15 min, à temperatura ambiente.

[ii.6] Transferir com cuidado o sobrenadante (90% do volume) para um tubo limpo, deixando uma margem de segurança e não tocando na interface de separação entre as duas fases.

Na Figura 6.5.1 pode visualizar-se de forma esquemática o processo de extração do DNA fágico pelo método do fenol:clorofórmio, realizado até este ponto.

Figura 6.5.1 - Representação esquemática do processo de extração do DNA fágico pelo método do fenol:clorofórmio



Repetir esta extração.

[ii.7] Adicionar 1 volume de clorofórmio e inverter por seis (6) vezes.

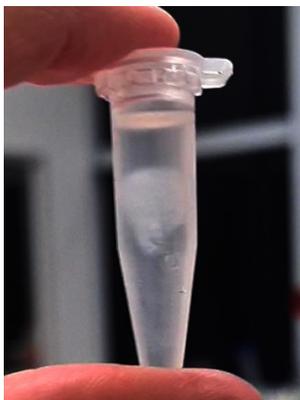
[ii.8] Centrifugar a $1600 \times g$ por 15 min à temperatura ambiente.

[ii.9] Coletar cuidadosamente o sobrenadante, transferindo-o para um tubo Eppendorf® de 2 mL limpo e esterilizado.

[ii.10] Adicionar 0,1 volumes de acetato de sódio 3 mol L^{-1} (pH 7,5) e 2,5 volumes de álcool isopropílico absoluto gelado

(mantido a 4 °C). Misturar bem e incubar durante 30 min a -86 °C (nesta etapa consegue visualizar-se um “novelo de lã”, que é o DNA, na parte superior da solução)^{bp-6.52}. Na Figura 6.5.2 pode visualizar-se o aspecto do DNA extraído.

Figura 6.5.2 - Aspecto do “novelo de lã” que pode ser visualizado na parte superior da mistura, que corresponde ao DNA fágico extraído



[ii.11] Incubar durante 30 min. a -86 °C.

III. Precipitação do DNA

[iii.1] Centrifugar a 13.000 × g em centrífuga refrigerada (4 °C) durante 10 min.

[iii.2] Lavar o precipitado com álcool isopropílico (50 µL) a 70% (v/v) por uma a duas vezes.

[iii.3] Secar o precipitado à temperatura ambiente durante no mínimo 30 min.

[iii.4] Ressuspender o precipitado em 60 μL de água ultrapura (ou Tris 10 mM, pH 7,5) num tubo Eppendorf® de 2 mL estéril. Se necessário, pode-se incubar a 65 °C durante 10 min, para ajudar a dissolver. Na Figura 6.5.3 pode visualizar-se o aspecto do DNA extraído e ressuspendido.

Figura 6.5.3 - DNA fágico precipitado e ressuspendido em 50 μL de água isenta de nuclease



[iii.5] Estocar a -20 °C até à análise por sequenciamento. **bp-6.5-3**

IV. Verificação da qualidade e quantidade do DNA fágico extraído

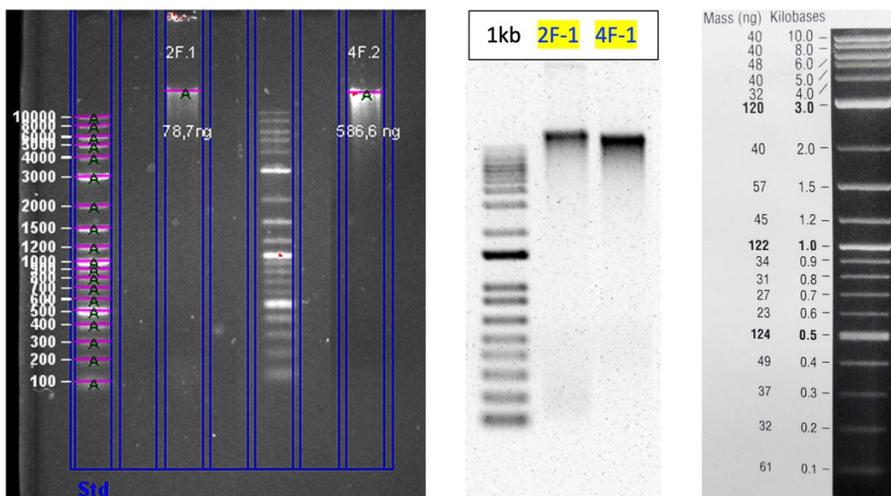
[iv.1] Medir no NanoDrop a quantidade de DNA extraído, e sua qualidade, através da análise das razões $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$ (deve estar entre 1,8 a 2) e $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{230\text{nm}}$ (ideal entre 1,8 a 2,0; aceitável entre 1,0 e 2,2). **bp-6.5-4**

[iv.2] Quantificar utilizando um dos kits Quant-iT™ PicoGreen™ (Invitrogen) ou Qubit™ (Invitrogen) para quantificação de dsDNA.

[iv.3] Analisar por eletroforese em gel de agarose (0,8-1,0%), para verificar a integridade do DNA fágico extraído. **bp-6.5-5**

A Figura 6.5.4 apresenta um exemplo de como os resultados de análise por eletroforese em gel de agarose a 0,8% do DNA fágico extraído deverão aparecer.

Figura 6.5.4 - Tipo de resultado obtido na análise por eletroforese em gel de agarose a 0,8% do DNA fágico extraído (quantificação dos DNAs extraídos de dois fagos isolados na UNISO, ph002F e ph004F), com aplicação de 1µL de amostra de DNA extraído num gel de agarose a 0,8%, junto com 1 µL de marcadores de pares de bases (1 kb) de DNA, com as concentrações de DNA a serem dadas em ng/µL



A Figura 6.5.5 apresenta um exemplo de como os resultados de quantificação de DNA fágico no NanoDrop™ deverão aparecer.

Figura 6.5.5 - Tipo de resultado obtido na quantificação de DNA fágico, mostrando os parâmetros dos raios Abs_{260nm}/Abs_{280nm} e Abs_{260nm}/Abs_{230nm} dentro de valores considerados ideais



6.6 Determinação do perfil de restrição do DNA fágico (RFLP)

Após extração do DNA fágico e verificação do seu grau de pureza, a determinação do perfil de restrição (RFLP) do genoma fágico extraído assume especial relevância, visando a comparação de padrões de fragmentos de restrição (RFLP) entre fagos diferentes, através da hidrólise enzimática de DNA genômico dos fagos com diferentes endonucleases de restrição.

Material e reagentes

Material	Reagentes
Micropipetas de 1 µL e 10 µL	Gel de agarose de 0,8% a 1,0%
Ponteiras de 1 µL e 10 µL	Etanol a 70% (v/v)
Termociclador	Água ultrapura
Tubos Eppendorf® de 2 mL estéreis e suportes para tubos Eppendorf® de 2 mL	PEG 8000
Proveta de 50 mL	NaCl
Equipamento para eletroforese em gel de agarose	SDS a 10% (m/v)
Transiluminador	EDTA 0,5 mol L ⁻¹ , pH 8
Banho seco digital	Água isenta de nuclease
Microtubos estéreis de 200 µL, para PCR, isentos de DNA, DNase e RNase (BRAND GmbH, Wertheim, Alemanha)	Tampão fágico
Balança analítica	Tampão da enzima EcoRI
	Fenol
	Clorofórmio
	Acetato de sódio
	Etanol absoluto
	RNase
	Amostras de DNA extraídos dos bacteriófagos de interesse
	Brometo de etídio a 3% (m/v)
	Tampão TBE [1×]
	<i>Blue Green Loading</i> (corante para ácidos nucléicos)
	Enzimas de restrição EcoRI, EcoRV e HlnIII (New England Biolabs, Ipswich MA, EUA)
	Agarose

Procedimento experimental

Verificação do grau de pureza do DNA extraído

- [a]** Em um microtubo de 200 μL , estéril, adicionar 5 μL do DNA fágico extraído e ressuspendido (seção 6.5.iii.5).
- [b]** Adicionar 1 μL de RNase.
- [c]** Completar o volume para 10 μL utilizando água isenta de nucleases.
- [d]** Incubar a 37 °C no termociclador, durante 3 h.
- [e]** Após a incubação, aquecer a 65 °C durante 5 min para inativar a enzima.
- [f]** Preparar um gel de agarose a 1% contendo 3 μL de brometo de etídio e colocar no anteparo da cuba de eletroforese até solidificação do gel com formação dos pocinhos.
- [g]** Em um dos pocinhos, colocar 5 μL da mistura produzida após a etapa **[e]** e 3 μL de *Blue Green Loading* (corante para ácidos nucleicos) (total a ser aplicado: 8 μL de amostra).
- [h]** Iniciar a análise eletroforética (parâmetros: 80 V, 200 mA, 009 W) e interromper a corrida antes que a frente atinja o final do gel de agarose.
- [i]** Remover o gel e observar no transiluminador com irradiação UV. Se o DNA extraído estiver puro, aparecerá uma banda bem definida (sem arrastamento). A Figura 6.6.1 ilustra um tipo de resultado obtido na análise do grau de pureza do DNA fágico extraído.

- [j] Caso o material seja degradado pela enzima, não aparecerá nenhuma banda. Nesse caso, o material extraído não era DNA

Figura 6.6.1 - Tipo de resultado obtido na análise do grau de pureza do DNA fágico extraído



Digestão com endonucleases de restrição

- [k] Caso obtenha uma banda bem definida no gel de agarose, adicionar às amostras de DNA extraídas dos fagos de

interesse as enzimas de restrição. Identificar devidamente cada amostra nos respectivos microtubos.

[l] Para cada amostra de DNA (5 μL), adicionar 12 μL de água isenta de nucleases, 1 μL da enzima EcoRI, e 2 μL de tampão para EcoRI.

[m] Repetir em tubos Eppendorf® diferentes para diferentes enzimas de restrição (EcoRV, HindIII). Adicionar para cada amostra de DNA (5 μL), 12 μL de água isenta de nucleases, 1 μL de enzima de restrição, e 2 μL do correspondente tampão.

Configurar a reação da forma indicada no Quadro 6.6.1.

Quadro 6.6.1 - Configuração da reação de restrição, dependendo do tipo de enzima de restrição a utilizar (aqui ilustrado para as enzimas de restrição adquiridas da New England Biolabs, Ipswich MA, EUA)

Componente		Quantidade (para um volume total de 50 μL)
DNA fágico		1 μg
Para enzima EcoRI	Tampão da enzima EcoRI [10x], EcoRI/Sspl	5 μL [1x]
Para enzima HindIII	Tampão rCutSmart [10x]	
Enzima de restrição	EcoRI	1 μL (20 unidades)
	HindIII-HF	
Água isenta de nuclease		q.s.p. 50 μL
Incubar a 37 °C durante 15 min.		

[n] Ligar e programar o termociclador, incubando as amostras à temperatura de 37 °C durante 16 h. Caso existam bolhas dentro dos microtubos, será necessário retirá-las dando leves

“petelecos” com os dedos nos tubos. Com os microtubos no termociclador, iniciar as reações de restrição com as várias enzimas de restrição.

- [o] Os procedimentos a seguir referem-se à preparação do gel de agarose a uma concentração de 1%, contendo brometo de etídio.

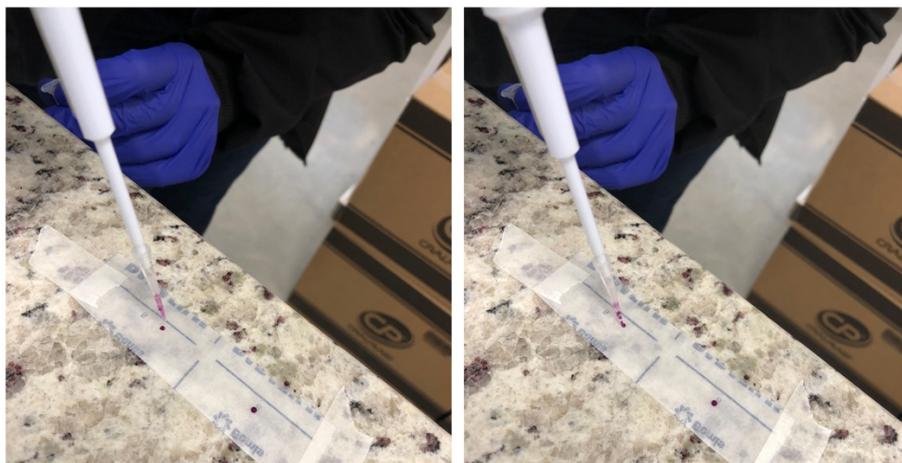
Análise por eletroforese em gel de agarose

- [p] Pesar numa balança analítica, 0,4 g de agarose.
- [q] Medir numa proveta, 40 mL de tampão TBE 1× (Tampão Borato-EDTA).
- [r] Em um Erlenmeyer de 150 mL, misturar 0,4 g de agarose e 40 mL de tampão TBE 1×. Realizar movimentos circulares até dissolução completa.
- [s] Colocar o Erlenmeyer no forno micro-ondas em potência média por aproximadamente 30 s. Retirar do forno micro-ondas e, novamente, fazer movimentos circulares. Aquecer por mais 30 s, aproximadamente (observar para não deixar o conteúdo transbordar do Erlenmeyer). Repetir novamente o aquecimento, completando 3x de 30 s.
- [t] No Erlenmeyer contendo a agarose dissolvida, adicionar 3 µL de brometo de etídio e realizar movimentos circulares suaves até completa diluição do brometo de etídio.^{bp-6.6-1}
- [u] Colocar lentamente a mistura do Erlenmeyer dentro do recipiente apropriado na cuba de eletroforese, certificando-se de que ela esteja bem nivelada, e observar para que não se formem bolhas de ar.

- [v]** Deixar o recipiente em *standby* por cerca de 30 min, até completa polimerização do gel de agarose.
- [w]** Após completa solidificação do gel, retirar as fitas e o pente com cuidado, assim como ao retirar o gel do recipiente onde polimerizou.
- [x]** Antes de adicionar as amostras no gel de agarose, esboçar em papel um esquema com a disposição das amostras assim como dos controles e marcadores, para posterior identificação das amostras no gel após a corrida e revelação.
- [y]** Colocar a solução de TBE 1× na cuba do sistema de eletroforese, o suficiente para apenas cobrir o gel de agarose.
- [z]** Levantar o gel até à cuba, com muito cuidado, mergulhando-o lentamente.
- [aa]** Para cada amostra, adicionar 3 µL de *loading buffer* na placa de preparação da amostra, fazendo pequenos pontinhos. Descartar a ponteira no recipiente de descarte.
- [bb]** Com uma nova ponteira, coletar 5 µL de amostra pura (sem restrição enzimática) do microtubo e homogeneizar com *Blue Green Loading* (corante) por 3 vezes.
- [cc]** Coletar 13 µL de cada amostra incubada com enzima de restrição (etapas **[l]**/**[m]**) e adicionar 3 µL de *Blue Green Loading*.
- [dd]** Ajustar o volume da micropipeta para 8 µL (3 µL de *Blue Green Loading* (corante) + 5 µL de amostra) e homogeneizar

novamente. A Figura 6.6.2 ilustra o procedimento a seguir para mistura da amostra incubada com enzima de restrição (etapa [n]) com *Blue Green Loading* (corante) e homogeneização da mistura antes da aplicação nos pocinhos do gel de agarose.

Figura 6.6.2 - Ilustração do procedimento de mistura da amostra incubada com enzima de restrição (etapa [n]) com *Blue Green Loading* (corante) e homogeneização da mistura antes da aplicação nos pocinhos do gel de agarose



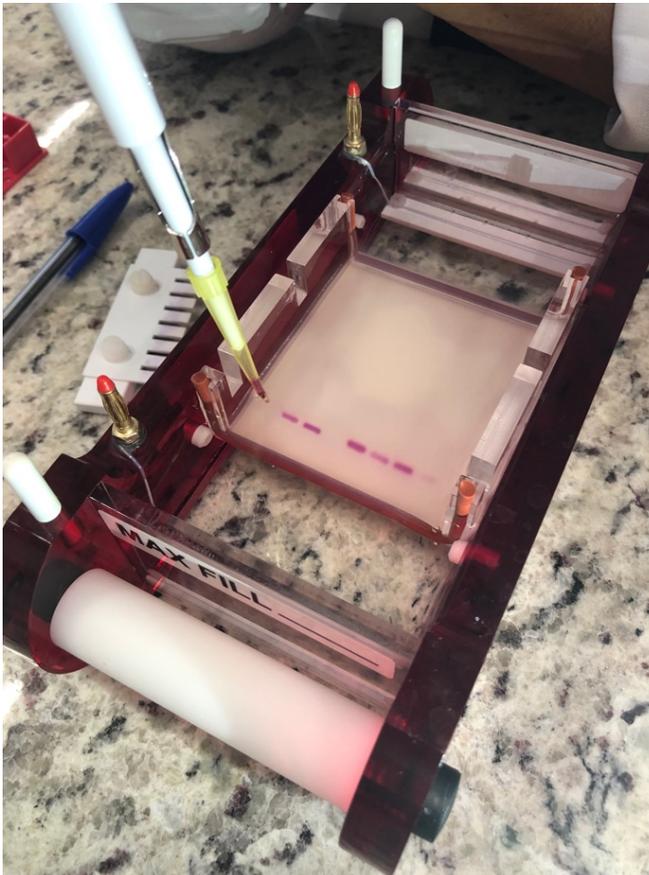
[ee] Depois disso, depositar o volume pipetado no segundo poço do gel de agarose (no primeiro poço estará o marcador de 1 kb), e descartar a ponteira. Sempre trocar a ponteira a cada amostra diferente.

[ff] Repetir o processo a partir da etapa [o], de acordo com a quantidade de amostras a analisar.

[gg] Adicionar o marcador de pares de bases (3 μL). Para isso, utilizar os poços do início, meio, e final do gel (lembrando de deixar esses espaços reservados para os marcadores na hora da adição das amostras de DNA fágico digerido).

A Figura 6.6.3 ilustra o procedimento de aplicação das amostras nos pocinhos do gel de agarose.

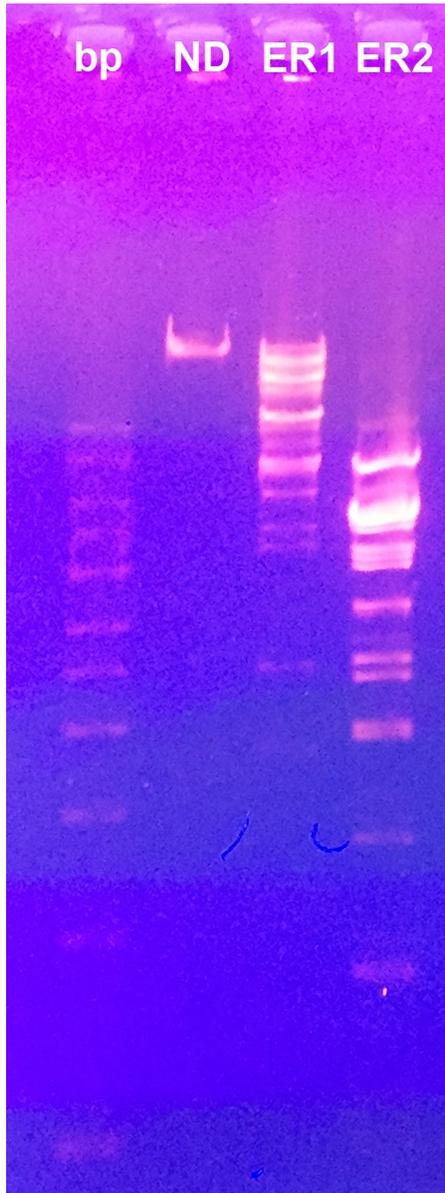
Figura 6.6.3 - Ilustração do procedimento de aplicação das amostras nos pocinhos do gel de agarose



- [hh]** Após a adição das amostras no gel de agarose, ajustar a fonte de eletroforese para 80 V, 200 mA, 009 W. Observar a correta posição da cuba e conectar os cabos em seus respectivos pontos na fonte de alimentação, assim como na cuba de eletroforese: cabo preto (negativo) no lado esquerdo e cabo vermelho (positivo) no lado direito. Ajustar os parâmetros de corrida do gel na fonte de energia (parâmetros: 80 V, 200 mA, 009 W). Iniciar a análise de eletroforese apertando o botão “Run” (ou “Start”, ou ainda outro, dependendo do modelo da fonte).
- [ii]** Após a corrida das amostras, retirar cuidadosamente o gel da cuba de eletroforese e colocar em uma bandeja de plástico. Esta irá ser colocada no transiluminador, equipamento com luz ultravioleta que revelará as bandas de DNA e fragmentos produzidos. Ligar o equipamento e o computador, abrindo seu respectivo *software*. Ligar a luz ultravioleta do equipamento e, no *software* do equipamento, ajustar a imagem conforme desejado, alterando o foco e a intensidade da luz.
- [jj]** Capturar a imagem em alta resolução e salvá-la. Descartar o gel como material com risco tóxico/biológico. bp-6.6-2

A Figura 6.6.4 apresenta um exemplo de como os resultados do perfil de restrição do DNA fágico (RFLP) deverão aparecer.

Figura 6.6.4 - Tipo de resultado obtido na determinação do perfil de restrição do DNA fágico (bp, marcadores de pares de bases; ND, DNA não-digerido; ER1, DNA + enzima de restrição 1; ER2, DNA + enzima de restrição 2)



6.7 Determinação da frequência de mutantes bacterianos espontâneos resistentes aos fagos

O desenvolvimento de mutantes de bactérias hospedeiras resistentes ao fago é uma realidade em ensaios de biocontrole bacteriano utilizando bacteriófagos. Para determinar a frequência de bactérias resistentes a fagos, 10 colônias isoladas de uma placa com bactérias sensíveis são selecionadas e inoculadas em 10 tubos de ensaio com 5 mL de TSB, e cultivadas à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 18 h com agitação orbital de 120 rpm.

Alíquotas de 100 μL das diluições de 10^{-1} a 10^{-4} da cultura bacteriana e alíquotas de 100 μL do fago de uma solução estoque de 10^8 UFP mL^{-1} são inoculadas em tubos de ensaio contendo ágar MTA-TSB, semeadas em placas de TSA sólido, e incubados à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 48 h. Simultaneamente, alíquotas de 100 μL de diluições de 10^{-5} a 10^{-7} da cultura bacteriana são plaqueadas por incorporação em placas de TSA sem fago e incubadas à temperatura ótima de crescimento da bactéria hospedeira por 48 h.

Material e reagentes

Material	Reagentes
Micropipeta de 5000 μL	Meio líquido TSB
Ponteiras de 5000 μL	Placas de Petri com meio TSA sólido
Estufa de incubação microbiológica	MTA-TSB, mantido a ≈ 40 °C
Tubos Eppendorf® de 2 mL estéreis	Suspensão concentrada de fagos
Micropipeta de 1000 μL	Suspensão da bactéria hospedeira
Ponteiras de 1000 μL (azuis)	
Placas de Petri descartáveis	

Procedimento experimental

- [a] Selecionar 10 colônias isoladas a partir de uma placa de Petri com bactéria sensível ao fago (1 colônia por tubo contendo 5 mL de meio líquido TSB).
- [b] Incubar à temperatura ótima de crescimento da bactéria durante 18 h.
- [c] De cada tubo, fazer diluições seriadas até 10^{-7} (150 μL da suspensão bacteriana + 1350 μL de PBS).
- [d] Semear por incorporação (*pour-plate*) as diluições 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . bp-6.7-1
- [e] Semear em ágar de dupla camada as diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} (colocar em MTA-TSA 100 μL de cada diluição bacteriana e 200 μL de suspensão fágica, homogenizar e verter sobre ágar TSA sólido em placa de Petri). bp-6.7-2
- [f] Incubar à temperatura ótima de crescimento da bactéria durante 24 h (para as placas de dupla camada, é necessário mais tempo de incubação).
- [g] Semear todas as placas em duplicado.
- [h] Proceder à contagem de colônias.
- [i] O cálculo da frequência de mutantes espontâneos do hospedeiro bacteriano resistentes aos fagos é feito dividindo-se o número de bactérias resistentes (obtidas das bactérias que emergem na presença de partículas de fagos) pelo número total de bactérias sensíveis (preparadas a partir da cultura sem fagos). Três ensaios independentes devem ser realizados.

A Figura 6.7.1 apresenta um exemplo de como os cálculos da frequência de mutantes bacterianos espontâneos resistentes aos fagos deverão ser realizados utilizando o Microsoft Excel.

Figura 6.7.1 - Exemplo de cálculo na determinação da frequência de emergência de mutantes bacterianos resistentes ao fago, utilizando o Microsoft Excel

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
3		Bactéria	Incorporação	Média	Diluição	Log		Dupla camada	Média	Diluição	Log
4		1	150	AVERAGE(D4:D5)	-5	D4*(10^5)*10		179	AVERAGE(I4:I5)	-2	I4*(10^2)*10
5			153			D5*(10^5)*10		167			I5*(10^2)*10
6		2	135	137	-5	135000000		189	180.5	-2	189000
7			139			139000000		172			172000
8		3	157	160	-5	157000000		167	169	-2	167000
9			163			163000000		171			171000
10		4	152	153.5	-5	152000000		183	186.5	-2	183000
11			155			155000000		190			190000
12		5	127	131.5	-5	127000000		173	177.5	-2	173000
13	CB		136			136000000	Fago	182			182000
14		6	114	125	-5	114000000		190	189	-2	190000
15			136			136000000		188			188000
16		7	172	167.5	-5	172000000		162	166	-2	162000
17			163			163000000		170			170000
18		8	192	181	-5	192000000		170	163	-2	170000
19			170			170000000		156			156000
20		9	138	136.5	-5	138000000		153	154.5	-2	153000
21			135			135000000		156			156000
22		10	114	121.5	-5	114000000		189	192.5	-2	189000
23			129			129000000		196			196000
		N			O			P			
6					Sem fago (controle, CB)			Com fago			
7		Média de colónias total			AVERAGE(E4:E23)			AVERAGE(J4:J23)			
8		UFC/mL			O7*(10^5)*10			P7*(10^2)*10			
9		Taxa de mutantes			P8/O8						
10											
11					Sem fago (controle, CB)			Com fago			
12		Média de colónias total			146.5			175.15			
13		UFC/mL			146500000			175150			
14		Taxa de mutantes			0.001195563						

6.8. Identificação de fagos estritamente virulentos

A identificação de fagos estritamente virulentos com perto de 100% de certeza é extremamente difícil, mesmo quando estão disponíveis sequências genômicas (só podemos varrer genomas fágicos para sequências de assinaturas conhecidas).

O protocolo descrito em seguida foi sugerido pelo Prof. Dr. Jean-Paul Pirnay e sua colega Georgiana, Prof. Dra. Maya Merabishvili (Hospital Militar “Queen Astrid”, LabMCT, Bruxelas, Bélgica), como procedimento putativo para a identificação de bacteriófagos estritamente virulentos.

Material e reagentes

Material	Reagentes
Micropipeta de 5000 µL	Meio líquido TSB
Ponteiras de 5000 µL	Placas de Petri com meio TSA sólido
Estufa de incubação microbiológica	MTA-TSB, mantido a ≈40 °C
Tubos Eppendorf® de 2 mL estéreis	Mitomicina C
Micropipeta de 1000 µL	Suspensão estoque concentrada do fago isolado (concentrada com PEG)
Ponteiras de 1000 µL	Suspensão da cepa bacteriana hospedeira
Placas de Petri descartáveis	

Procedimento experimental

- [a]** Encontrar uma cepa hospedeira livre de fagos temperados (induzir fagos potencialmente presentes com mitomicina C, por exemplo).

- [b]** Propagar o nosso fago junto com este hospedeiro livre de fagos temperados.
- [c]** Isolar algumas células bacterianas resistentes ao fago, que irão inevitavelmente emergir.
- [d]** Tentar induzir fagos nestas células bacterianas mutantes (usando por exemplo mitomicina C). Se o nosso fago for temperado, alguns mutantes resistentes liberá-lo-ão. Se nenhum dos mutantes resistentes liberar fagos, a possibilidade de que o nosso fago seja virulento é muito alta.

7 BIOPORQUÊS

bp-4.1-1 Este procedimento deve ser efetuado com o máximo cuidado, dentro da cabine de segurança biológica, e utilizando uma pequena serra para a abertura da ampola de vidro.

bp-4.2-1 Densidade ótica não deve ser confundida com absorvância. Com a absorvância, os fótons são absorvidos e desaparecem do sistema, daí a lei de Beer-Lambert: absorvância ($\log I/I_0$) é estritamente proporcional à concentração. Em contraste, a densidade ótica reflete a perda de fótons que atingem o fotodetector devido ao espalhamento da luz por objetos refrativos (células bacterianas), que os deflete para longe do detector. No entanto, quando a densidade de células se torna suficientemente elevada, existe uma probabilidade crescente que os fótons defletidos sofram um segundo espalhamento que os deflete de novo em direção ao detector. É por esta razão que é aconselhável diluir as amostras antes de efetuar medidas de densidade ótica se a densidade ótica exceder 0,4-0,5.

bp-4.2-2 Para a conversão de densidade ótica em concentração de biomassa celular, deve ser utilizada a relação empírica $OD_{610nm} = 1,0 \Leftrightarrow [\text{biomassa}] \approx 1 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$.

bp-4.4-1 Pode usar-se a fonte de isolamento (águas residuais ou outras) e igual volume de bactéria-alvo do fago a isolar com meio TSB 2× concentrado, e incuba-se para enriquecer. Poderá existir o problema das bactérias presentes na fonte de isolamento crescerem mais rapidamente que a bactéria-alvo, o que poderá mascarar o fago. Nesse caso pode-se remover a bactéria da fonte de isolamento antes do enriquecimento da amostra ambiental. Isto pode ser feito através do seguinte procedimento: (i) adição de clorofórmio a 1:10 (v/v) (clorofórmio : fonte de isolamento), (ii) agitar em vortex, (iii) centrifugar a 9000g durante 10 min, (iv) recolher a fase superior para filtrar com filtro de tamanho de poro de 0,20 μm , (v) usar como fonte de isolamento, (vi) adicionar à bactéria e fazer o enriquecimento (1:1 (v/v), fonte de isolamento : bactéria em fase exponencial em meio TSB 2× concentrado).

Após enriquecimento deverá fazer-se o mesmo procedimento antes de colocar a gota no lawn de bactéria, ou seja: (i) adição de clorofórmio 1:10 (v/v) (clorofórmio : fonte de isolamento), (ii) agitar em vortex, (iii) centrifugar a 9000 ×g durante 10 min, (iv) recolher a fase superior para filtrar com filtro de 0,20 µm de tamanho de poro, (v) adicionar gota ao lawn de bactéria. Desta forma evita-se a adição de bactéria na gota, que poderá crescer sobre o halo produzido pelo fago e mascarar a sua presença.

bp-4.6-1 Os halos secundários rodeando as placas de lise fágica são indicativos da formação de enzimas despolimerases fágicas.

bp-4.9-1 O clorofórmio é utilizado para matar as células bacterianas usadas para produzir os fagos, causando a disrupção da membrana celular. Ao adicionar clorofórmio, ocorrerá a separação de fases: camada aquosa superior, camada intermédia contendo os debris celulares e a fase orgânica inferior contendo clorofórmio e lipídeos. Os fagos estarão presentes na fase aquosa apenas. Os debris celulares e outros contaminantes particionam para a interfase, fase intermédia. Assim, deve-se separar cuidadosamente a fase superior com uma micropipeta e evitar tocar na camada intermédia que pode conter vestígios de clorofórmio.

bp-4.11-1 O PEG é normalmente adicionado para agregar as partículas fágicas em grandes flocos, para permitir a sua peletização por centrifugação.

bp-4.13-1 A fase orgânica (fase inferior) conterá os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, e a fase aquosa (fase superior) conterá as partículas bacteriofágicas.

bp-4.13-2 Isto evita que saia conteúdo do tubo ao redor da agulha.

bp-4.13-3 Não coletar a fase orgânica (camada superior) ou a interface, que contém endotoxinas. É melhor deixar de coletar uma pequena quantidade residual de fago concentrado para reduzir a transferência de endotoxinas contaminantes. Se a remoção de endotoxinas não for suficiente, o método pode ser repetido para reduzir ainda mais a quantidade de endotoxinas.

bp-4.13-4 Esta etapa remove o solvente orgânico residual da mistura.

bp-4.13-5 Esta etapa remove o etanol da mistura.

bp-4.13-6 A fração que não passou através da membrana é o concentrado de partículas bacteriofágicas.

bp-5.4-1 As grades de cobre devem ser previamente sujeitas ao procedimento de glow-discharge, sendo que este procedimento visa dotar as grades de cobre (hidrofóbico por natureza) com carga superficial negativa, de forma a promover a aderência e espalhamento da amostra (cerca de 3 µL) na sua superfície.

bp-5.4-2 O processo de coloração negativa das partículas fágicas envolve uma secagem suave das amostras ao ar e, ainda que muito suave, essa secagem é suficiente para promover uma ligeira deformação das partículas fágicas.

bp-6.2-1 Adição de clorofórmio serve para destruir as células bacterianas das diluições 10⁻¹ em todos os tempos de amostragem.

bp-6.5-1 Para a escolha dos solventes deve-se considerar a solubilidade dos compostos a extrair nos solventes a utilizar, bem como a solubilidade de possíveis impurezas. É também uma propriedade essencial no método de extração de DNA genômico por fenol-clorofórmio, dado que a aplicação de fenol leva a uma exposição dos resíduos de aminoácidos mais hidrofóbicos das proteínas, fazendo com que estas fiquem na fase orgânica (clorofórmio) e o DNA, polar, se mantenha na fase aquosa (fenol).

bp-6.5-2 O “novelo de lã” que pode ser visualizado na parte superior da mistura, é o DNA fágico extraído.

bp-6.5-3 O DNA recém extraído e precipitado com etanol solubiliza melhor quando feito um ciclo de aquecimento a 65 °C e resfriamento, dando uns "petelecos". Pode medir-se logo o DNA no Nanodrop. Depois de armazenado e descongelado deve conferir-se novamente antes de usar.

bp-6.5-4

Rácio	Valor	Indicação de pureza
Abs _{260nm} /Abs _{280nm}	1.8	DNA puro
	< 1.8	Presença de proteínas
Abs _{260nm} /Abs _{230nm}	1.8 – 2.2	DNA puro
	< 1.8	Contaminantes co-purificados (orgânicos, sais, solventes)

bp-6.5-5 O DNA fágico íntegro aparecerá como uma banda bem definida. Já se o DNA estiver degradado ou contaminado com DNA bacteriano, aparecerá uma banda de arraste extensa na faixa correspondente no gel de agarose.

bp-6.6-1 É indispensável o uso de jaleco, luvas de nitrilo e óculos de proteção, a fim de minimizar a exposição ao brometo de etídio que é cancerígeno e mutagênico quando volátil.

bp-6.6-2 Os padrões de restrição dos genomas fágicos digeridos com diferentes endonucleases de restrição tendem a ser diferentes para fagos diferentes. As endonucleases de restrição EcoRI, EcoRV produzem vários fragmentos, mas alguns fagos mostram insensibilidade a algumas endonucleases de restrição, sendo que as endonucleases de restrição que não cortam o DNA produzem apenas uma banda de alto peso molecular no gel de agarose após eletroforese dos digeridos. Endonucleases cortadoras fracas produzem algumas (poucas) bandas, as endonucleases boas cortadoras produzem cinco ou mais bandas e as endonucleases que cortam todo o genoma causam a completa digestão do DNA. Os perfis de restrição permitem confirmar se os fagos são vírus de DNA de cadeia dupla (dsDNA).

bp-6.7-1 As bactérias semeadas por incorporação (*pour-plate*) são as bactérias sensíveis ao fago.

bp-6.7-2 As bactérias que crescem nas placas semeadas em ágar de dupla camada são as bactérias resistentes ao fago.

8 BIOGLOSSÁRIO

Absorvância	Absorvância (Abs), também conhecida como densidade ótica (OD), é a quantidade de luz absorvida por uma solução. É adimensional.
Ácido teicóico	Copolímeros bacterianos de fosfato de glicerol ou fosfato de ribitol e carboidratos, ligados por ligações fosfodiéster. Encontram-se na parede celular de bactérias Gram-positivo e estão envolvidos, entre outras funções, na regulação da morfologia celular, bem como na divisão celular.
Ácido lipoteicóico	O ácido lipoteicóico é um anfifílico de adesão associado à superfície de bactérias Gram-positivo e regulador de enzimas autolíticas da parede celular (muramidases). É liberado das células bacterianas principalmente após bacteriólise induzida por lisozima ou antibióticos beta-lactâmicos.
Adsorção	A adsorção do bacteriófago (fago) à célula hospedeira susceptível inicia o processo de infecção. Através de uma série de interações entre proteínas de ligação do bacteriófago e receptores na superfície da célula bacteriana, a partícula fágica reconhece um hospedeiro potencialmente sensível e, então, se posiciona para injetar o seu DNA no citoplasma da célula.
Ágar	Ágar, ou ágar-ágar, é uma substância gelatinosa constituída por polissacarídeos obtidos das paredes celulares de algumas espécies de algas vermelhas, principalmente de “ogonori” e “tengusa”. O ágar é uma mistura de dois componentes, o polissacarídeo linear agarose e uma mistura heterogênea de moléculas menores chamadas agarpectina.

Água ultrapura	Água ultrapura é a água que foi purificada com especificações muito rigorosas, contendo por definição apenas H ₂ O e íons H ⁺ e OH ⁻ em equilíbrio. A condutividade da água ultrapura é de cerca de 0,055 µS/cm a 25 °C, também expressa como resistividade de 18,2 MOhm.
Antibacteriano	Agente que mata bactérias ou impede o seu desenvolvimento e multiplicação.
Antisséptico	Substância que interrompe ou retarda o crescimento de microrganismos.
Asséptico	Ausência de microrganismos.
Bacteriófago	Bacteriófagos (ou, simplesmente, fagos) são vírus que infectam única e exclusivamente células bacterianas susceptíveis. Os fagos foram descobertos independentemente por Frederick Twort em 1915 e por Félix D'Herelle em 1917. Alguns fagos são virulentos (lisando a célula hospedeira susceptível e liberando a nova progenia vírica), enquanto outros são temperados (integrando o seu material genético no DNA cromossômico da bactéria hospedeira, entrando assim num estado de lisogenia). Como os bacteriófagos funcionam é em parte devido à sua estrutura distintiva. Muitos têm uma cápside icosaédrica, um pouco como um dado com 20 faces, que contém o seu DNA, sobre uma cauda que possui fibras que parecem pernas. Estas fibras ligam-se a receptores na superfície das células e são diferentes para cada fago. Uma vez que o fago se ligue à bactéria, ele injeta o seu próprio DNA no citoplasma da bactéria e sequestra a maquinaria celular bacteriana por forma a se replicar no seu interior, até que a célula bacteriana atinja a capacidade máxima. Neste ponto, a célula rebenta e morre, e os fagos no seu interior são liberados para o meio exterior onde continuam a matar mais células da mesma bactéria. Se não encontrarem mais células bacterianas do hospedeiro, simplesmente desaparecem.
Bactéria Gram-positiva	Bactéria que possui parede celular espessa composta basicamente por peptidoglicano.

Bactéria Gram-negativa	Bactéria que possui parede celular formada por uma delgada camada de peptidoglicano sobre a qual se encontra outra camada composta por lipoproteínas, fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos, denominada de membrana externa.
Bactéria multirresistente	Quando uma bactéria é resistente a mais de um antibiótico.
Bactericida	Refere-se aqui a infecções fágicas que terminam com a morte da bactéria infectada, seja associada a uma infecção fágica lítica ou, em vez disso, a uma infecção fágica abortiva.
Bacteriolítico	Refere-se aqui a infecções fágicas que terminam com a lise da bactéria alvo. Todas as infecções bacteriolíticas também são bactericidas, mas nem todos os processos bacteriolíticos são produtivos de vírions. Por exemplo, infecções abortivas podem ser bacteriolíticas, mas não resultam na liberação de vírions de fagos, e a lise externa (<i>lysis from without</i>) é bacteriolítica bem antes do início da produção de vírions durante uma infecção por fagos.
Biocontrole	Método de controle de um microrganismo por outra entidade. Baseia-se na predação, parasitismo, ou outros mecanismos naturais.
Biomassa	Quantidade de células bacterianas (viáveis ou não) presentes num determinado volume de suspensão.
Biossíntese	Sequestro da maquinaria transcripcional e de tradução ribossomal do hospedeiro. Dá-se a biossíntese de mRNAs específicos do fago, iniciando-se a replicação do DNA fágico. O DNA do hospedeiro foi degradado por nucleases codificadas pelo fago. Ocorre a expressão de proteínas fágicas. O genoma viral codifica várias proteínas, podendo também codificar proteínas repressoras que impedem a síntese de material celular do hospedeiro, e direciona a síntese de proteínas fágicas pela célula hospedeira.

Capsídeo	Um capsídeo é o invólucro de proteína de um vírus, envolvendo e protegendo o seu material genético. Consiste em várias subunidades estruturais oligoméricas feitas de proteínas chamadas protômeros.
Cauda contrátil	As caudas da família de fagos <i>Myoviridae</i> são essencialmente máquinas moleculares que podem sofrer alterações conformacionais após ligação irreversível à célula bacteriana hospedeira susceptível. Essas mudanças conformacionais incluem uma contração ou encurtamento da cauda do fago, resultando na translocação/injeção do DNA do fago no citoplasma do hospedeiro.
Cepa bacteriana	Uma cepa bacteriana é uma variante genética, um sub-tipo ou uma cultura dentro de uma espécie biológica.
Ciclo lisogênico	Tipo de infecção latente do fago durante o qual a célula hospedeira continua a crescer e se dividir, e o genoma do fago é replicado como um profago junto com o genoma do hospedeiro, mas não ocorre produção nem liberação de vírions. Os ciclos lisogênicos podem transformar-se em infecções produtivas por meio de um processo conhecido como indução. Assim, os ciclos líticos podem começar com a translocação do genoma do fago para o citoplasma do hospedeiro bacteriano ou após a indução de um ciclo lisogênico do fago.

Ciclo lítico

Ciclo lítico é um ciclo de replicação fágica em que uma partícula fágica insere o seu material genético na célula bacteriana hospedeira assumindo o controle da sua maquinaria metabólica e fazendo com que ela passe a trabalhar para o vírus, produzindo as proteínas fágicas. No final desse processo, os vírions são liberados e a célula hospedeira é destruída por lise celular, sendo que a replicação de novas partículas fágicas no citoplasma da célula hospedeira provoca a sua explosão. Este processo libera os novos vírions, para que possam infectar mais células. Depois que o vírus injeta o seu genoma nas células bacterianas hospedeiras, o DNA viral é expresso pelo organismo hospedeiro e o vírus passa a controlar os mecanismos celulares, com os genes virais a utilizarem as proteínas dentro da célula para se replicarem e produzirem proteínas virais. Essas proteínas e cópias do DNA se tornarão novos vírions. A célula, tornada impotente pelo vírus invasor, simplesmente espera até que a pressão desses novos vírions seja muito alta e, com a ajuda de enzimas holinas e lisinas, ela se rompa a partir do interior. Quando a membrana celular se rompe, a célula libera os vírions produzidos no ciclo lítico. O destino final de cada novo vírion é uma nova célula bacteriana, na qual o ciclo lítico pode ser reiniciado.

Citoplasma bacteriano

O citoplasma, ou protoplasma, das células bacterianas é onde as funções para o crescimento celular, metabolismo e replicação são realizadas. É uma matriz semelhante a um gel, composta por água, enzimas, nutrientes, metabolitos e gases, contendo estruturas celulares como ribossomos, um cromossomo e plasmídeos.

Coefficiente de extinção molar (ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$)

O termo coeficiente de extinção molar (ϵ) é uma medida de quão fortemente uma espécie química ou substância absorve e, portanto, atenua a luz em um determinado comprimento de onda. É uma propriedade intrínseca das espécies químicas que depende de sua composição química e estrutura.

Coleção de culturas	As culturas das coleções são usadas por pesquisadores que precisam garantir a si mesmos e aos outros que os materiais que estão usando são autênticos, para que as conclusões de seus estudos sejam válidas e relevantes. A título de exemplo, ATCC (EUA) e DSMZ (Alemanha) são entidades que se responsabilizam pelos depósitos de biomateriais e o desenvolvimento de suas tecnologias para preservação e manutenção.
----------------------------	---

Cromóforos	Os cromóforos são partes de moléculas em um determinado material que absorvem determinados comprimentos de onda da luz visível e, ao fazê-lo, conferem cor ao material. Os fagos são entidades baseadas em proteínas, com sua estrutura abrangendo proteínas principais do capsídeo, cauda, placa basal e proteína espigão. Na faixa de comprimento de onda UV, as proteínas absorvem radiação com uma absorção máxima em torno de 278-280 nm devido às contribuições de quatro cromóforos: cadeias laterais dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina e pontes dissulfeto de cisteínas.
-------------------	--

Cromossomo bacteriano	O cromossomo bacteriano (ou nucleóide) é a região onde se encontra o DNA bacteriano, apresentando-se geralmente como uma única molécula de DNA de dupla fita circular.
------------------------------	--

Cultura bacteriana	Crescimento e multiplicação de células bacterianas num meio de cultura específico, em condições assépticas e com temperatura controlada.
---------------------------	--

Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (<i>One Step Growth Curve</i>)	Abordagem experimental em que os fagos podem passar por apenas uma única rodada de adsorção, infecção e liberação, sob condições em que predominantemente apenas fagos únicos (em vez de múltiplos fagos) infectam cada célula bacteriana ($MOI \leq 0,001$). Esta abordagem experimental permite determinar os parâmetros de crescimento do fago, nomeadamente os períodos latente, de eclipse e de acumulação intracelular, e tamanho de explosão (<i>burst size</i>).
--	--

Debris celulares	<i>Debris</i> (ou detritos) celulares são resíduos orgânicos que sobraram após a morte de uma célula (p.ex. fragmentos da membrana/parede celular), que sofreu apoptose ou lise, que é uma consequência inevitável do ciclo de vida da célula.
Densidade ótica	A densidade óptica (OD) ou absorvância de um material é uma razão logarítmica de intensidade da luz que incide sobre o material, para a luz transmitida através do material. A densidade óptica é um método de quantificar o crescimento microbiano em relação à turbidez de um inóculo, ou seja, sua densidade óptica.
Descontaminação	Processo de eliminação de microrganismos.
Desinfecção	Processos físicos ou químicos que permitem matar microrganismos.
Despolimerase	O termo despolimerase pode se referir a qualquer enzima genérica (não lítica) capaz de degradar polímeros, indicando que a unidade repetitiva de um polissacarídeo é clivada e desintegrada. Uma despolimerase é um componente estrutural da maquinaria de adsorção do fago, que facilita a ligação e a hidrólise das cápsulas bacterianas.
Desorção	Dissociação do fago do complexo reversível fago-bactéria.
Eletroforese	Processo de separação de proteínas ou DNA, que migram numa fase estacionária semissólida (poliacrilamida, no caso da separação de proteínas; agarose, no caso da separação de DNA) sob influência de uma corrente eléctrica.
Empacotamento	Processo pelo qual o genoma de um vírion intracelular fica encapsulado dentro do capsídeo que passará a fazer parte de uma partícula fágica. O empacotamento ocorre no decorrer da montagem/maturação dos vírions.

Endolisina	Enzima do fago que hidrolisa as ligações transversas da camada de peptodoglicano das paredes celulares das células bacterianas, a partir do seu interior.
Enzima de restrição	Uma enzima endonuclease que reconhece sequências-alvo de nucleotídeos (sequências palindrômicas), quebrando a cadeia de DNA nestes pontos; várias destas enzimas são conhecidas e são extensamente usadas em análises genômicas, por exemplo EcoRI, EcoRV e HindIII.
Esterilização	Processo que mata e/ou elimina todas as classes de microrganismos e esporos.
Estritamente lítico	Refere-se a um tipo de fago que não infecta cronicamente e não é temperado, ou seja, que apresenta como infecções produtivas apenas ciclos líticos e não é capaz de exibir ciclos lisogênicos. Também conhecido como obrigatoriamente lítico ou virulento.
Fago (bacteriófago) lisogênico (temperado)	Um inimigo de um inimigo não é sempre um amigo! Alguns fagos aumentam a virulência das bactérias que infectam. Assim, um inimigo de uma bactéria não é necessariamente nosso amigo. Fagos lisogênicos (ou temperados) são aqueles fagos que podem replicar-se pela via do ciclo lítico ou podem entrar num estado quiescente na célula. Nesse estado, a maior parte dos genes não são transcritos; o genoma do fago existe num estado reprimido chamado de profago, porque não é um fago, mas tem o potencial de produzir um fago. Na maioria dos casos, o DNA do fago se integra no cromossoma da célula bacteriana hospedeira sendo replicado junto com o cromossoma e transmitido às células-filhas. A célula bacteriana que contém o profago não é afetada pela presença do profago, sendo que este estado lisogênico pode persistir indefinidamente. A célula que abriga o profago é chamada de lisógeno.
Fago (bacteriófago) lítico (virulento)	Fago que se replica unicamente através de ciclo lítico, culminando na lise da célula hospedeira.

Fago (partícula fágica) livre	Vírião de fago maduro que é encontrado no ambiente extracelular e ainda não está irreversivelmente ligado a uma célula bacteriana hospedeira.
Fagoterapia	A fagoterapia, ou terapia fágica, é o uso terapêutico de bacteriófagos para o combate de bactérias patogênicas causadoras de infecções.
Fase exponencial de crescimento	Após um período de tempo durante o qual a taxa de crescimento das células aumenta gradualmente, as células crescem a uma taxa máxima constante e esse período é conhecido como fase log, ou exponencial, e o aumento na concentração de biomassa será proporcional à concentração inicial de biomassa.
Fibritina	A fibritina é uma proteína estrutural fibrosa do bacteriófago.
Gene precoce	Genes de fagos que são expressos logo após o início de infecções produtivas e estão frequentemente envolvidos na aquisição do controle do hospedeiro.
Gene tardio	Genes de fagos que são expressos tardiamente no decorrer de infecções produtivas, por exemplo, genes envolvidos na produção de vírions que não serão necessários até que a replicação do ácido nucleico tenha ocorrido.
Genes estruturais	Genes que dão origem a proteínas envolvidas na estrutura e morfogênese do vírião.
<i>Glow Discharge</i>	O procedimento de <i>Glow Discharge</i> envolve a formação de um plasma formado pela passagem de corrente elétrica através de um gás e é usado para alterar as propriedades de molhamento de superfícies e uniformizar a carga da superfície. Isso ajuda na dispersão homogênea da amostra na superfície e também pode direcionar a orientação das moléculas no suporte.
Hidrólise enzimática	Reação química na qual uma molécula de enzima quebra uma molécula de substrato em outras menores, utilizando água.

Holina	Proteína do fago envolvida na definição do momento da lise bacteriana induzida pelo fago a partir de dentro (<i>lysis from within</i>), inserindo-se na membrana celular e criando canais através dos quais as endolisinas fágicas passam e acessam o peptidoglicano, hidrolisando-o e enfraquecendo assim a parede celular bacteriana.
Icosaédrico (forma icosaédrica)	Forma geométrica poliédrica que se apresenta em três dimensões com vinte (20) faces.
Incubação	Manutenção de culturas de microrganismos em condições de temperatura favoráveis ao seu crescimento.
Indução	Conversão de um ciclo lisogênico de fago num ciclo produtivo (lítico), por exemplo, devido a um hospedeiro bacteriano que sofre danos no DNA por irradiação UV ou exposição ao agente químico mitomicina C.
Infecção	Processo que um bacteriófago realiza no interior de uma célula bacteriana após a injeção do genoma fágico no citoplasma do hospedeiro bacteriano e, para ciclos líticos, antes da liberação dos vírions. A infecção por fagos produzirá placas fágicas em baixas concentrações.
Infecção abortiva	Infecção fágica de uma célula bacteriana que termina com a morte da célula, mas sem vírions liberados ou com número insuficiente de vírions liberados para apoiar cumulativamente a formação de placas de fagos. As infecções abortivas são sempre bactericidas e frequentemente bacteriolíticas.
Infecção destrutiva	Perda da viabilidade do fago após a sua ligação a uma célula bacteriana, por exemplo, como aquela envolvendo infecções restritivas ou abortivas. O termo "destrutivo" aqui é uma referência especialmente a um possível impacto da bactéria no fago, particularmente devido à exibição pela bactéria de mecanismos de resistência ao fago que agem após a fixação do vírion.

Infecção latente	Infecção por fagos que não resulta diretamente na liberação nem na maturação da progenia fágica, mas, no entanto, envolve a replicação intracelular do genoma fágico. Estas são descritas como infecções lisogênicas, ou ciclos lisogênicos, contrastando especialmente com a infecção produtiva.
Infecção produtiva	Infecção por fago que resulta diretamente na liberação da progenia fágica, contrastando com a infecção latente.
Infecção redutiva	Uma infecção em que o fago permanece viável mas, no entanto, não produz vírions. Mais comumente, tratam-se de infecções latentes, ou seja, ciclos lisogênicos, com o termo “redutivo” a significar um fago sendo “reduzido” a um estado de profago. Esta infecção descreve não apenas os ciclos lisogênicos, mas também várias infecções produtivas temporariamente paradas que podem ser descritas como pseudolisogénias.
Infecção restritiva	Infecção na qual o fago é inativado, mas a bactéria infectada pelo fago permanece viável. Pode ser explicada tanto pelo impacto bem sucedido das endonucleases de restrição na infecção bacteriana por fagos, como pelo mecanismo de funcionamento do sistema CRISPR-Cas. Contrasta com a infecção abortiva, ou seja, onde o hospedeiro morre apesar da inativação do fago.
Inóculo	Material contendo microrganismos utilizado para inoculação de meio de cultura líquido e para semear em meios de cultura sólidos.
Liberação	Processo de transição de um vírion de um estado intracelular para um estado extracelular. Para fagos líticos, por definição, isso envolve lise, enquanto que para fagos liberados cronicamente, a liberação por definição não envolve lise.

Liberção crônica	A progenia fágica transita de um estado intracelular para extracelular não envolvendo lise bacteriana. Em vez disso, ocorre um processo de extrusão dos vírions através do envelope da célula bacteriana intacta. Ocorre essencialmente com bacteriófagos filamentosos.
-------------------------	---

Ligação	Interações específicas da partícula fágica com receptores existentes na superfície de uma célula bacteriana hospedeira, permitindo assim o início do processo de infecção.
----------------	--

Lipopolissacarídeo	O lipopolissacarídeo (LPS) é um glicolípido e o principal componente da membrana externa das bactérias Gram-negativo. O lipopolissacarídeo está localizado na camada externa da membrana e está, em cepas não encapsuladas, exposto na superfície celular. Os lipopolissacarídeos normalmente consistem em um domínio hidrofóbico conhecido como lipídeo A (ou endotoxina), um oligossacarídeo nuclear não repetido e um polissacarídeo distal (ou antígeno O).
---------------------------	---

Lise	Processo de destruição do envelope celular com que terminam infecções produtivas líticas, resultando na liberação de vírions e solubilizando parcialmente a bactéria hospedeira. A lise bacteriana é causada pelas ações de proteínas específicas do fago (holinas, endolisinas e spaninas). A lise fágica de células bacterianas está sempre associada a infecções fágicas produtivas, podendo também estar associada a infecções fágicas abortivas.
-------------	---

Lise a partir de dentro (<i>Lysis from within</i>)	Lise bacteriana induzida por fagos que é iniciada a partir de células bacterianas infectadas por fagos, e que serve para definir o fim do período latente do fago. A lise fágica a partir de dentro é a lise normal observada no final do ciclo lítico do fago.
---	---

Lise a partir de fora (*Lysis from without*)

Lise bacteriana induzida por fagos causada pela desintegração das paredes celulares bacterianas devido à ligação irreversível de um grande número de partículas fágicas que perfuram totalmente a parede celular e que não está associada à produção de novos fagos. A lise a partir de fora também descreve a ação de endolisinas purificadas aplicadas a culturas bacterianas como agentes antibacterianos. A lise a partir de fora produzirá uma zona que se dilui e não produzirá placas fágicas. Quando se isolam bacteriófagos de uma amostra ambiental, o *spot test* da amostra enriquecida por vezes mostra lise completa no tapete do hospedeiro bacteriano, mas quando se realiza o ensaio de placas com o mesmo fago e hospedeiro por vezes não aparecem nenhuma placa fágica. A explicação mais provável para isto é a ocorrência de *lysis from without*. Se se utilizar um título fágico muito alto, os fagos atacam as células bacterianas a partir do seu exterior e provocam a sua lise. Assim, observa-se lise no *spot test* mesmo que a bactéria utilizada não seja a hospedeira. Pelo contrário, no ensaio de placas usam-se diluições do fago pelo que se a bactéria não for um hospedeiro possível o fago não pode adsorver e causar infecção subsequente. Assim, deve-se efetuar o *spot test* com diferentes diluições da suspensão estoque de fago.

Lisogênio

Uma célula bacteriana que abriga um ciclo lisogênico.

Maturação

Montagem de um vírion fágico funcional, ou seja, aquele que é capaz em seu estado extracelular de adsorver a uma célula bacteriana susceptível para iniciar uma nova infecção. Os vírions de fagos maduros, no entanto, não são também fagos livres até que sejam liberados de uma célula.

Meio de cultura

Conjunto de substâncias e nutrientes necessários para o crescimento e multiplicação de microrganismos *in vitro*.

MOI	Abreviatura de Multiplicidade de Infecção. O conceito de multiplicidade de infecção foi desenvolvido antes do entendimento de que a infecção pelo fago nem sempre necessariamente decorre da adsorção do fago, por exemplo, um MOI de X nem sempre significa que os genomas de X fagos entraram na mesma célula bacteriana. Uma definição comumente usada de MOI é a razão do número de partículas de fago adicionadas a um determinado número de células bacterianas suscetíveis. Por exemplo, um MOI de 10 significa que temos 10 vezes mais partículas fágicas do que células bacterianas suscetíveis.
Montagem	Processo de formação intracelular da progenia fágica, envolvendo proteínas que compõem os capsídeos e outros componentes fágicos se unindo (automontagem) e também empacotando o genoma no capsídeo em maturação.
Morfogênese	Processo de geração de uma partícula fágica, envolvendo uma combinação de montagem e maturação.
mRNA	O RNA mensageiro (abreviado como mRNA) é um tipo de RNA de fita simples envolvido na síntese de proteínas. O mRNA é produzido a partir de um molde de DNA durante o processo de transcrição pela RNA-polimerase, corresponde à sequência genética de um (ou mais) gene(s) e é lido por um ribossomo no processo de síntese de uma proteína.
Nuclease	Enzima capaz de clivar as ligações fosfodiéster entre nucleotídeos de ácidos nucleicos.
Origem de replicação	Localização nos genomas em que a replicação do DNA é iniciada.
Parâmetros de crescimento do bacteriófago	Aspectos quantificáveis dos ciclos de vida das partículas fágicas, incluindo a constante da taxa de adsorção e a constante de dessorção, duração dos períodos de eclipse, latente e de acumulação intracelular, e tamanho de explosão (<i>Burt size</i>).

Parede celular	Invólucro rígido externo à membrana citoplasmática bacteriana.
Patógeno bacteriano	Bactérias patogênicas são bactérias que podem causar doenças.
Penicilina	As penicilinas são um grupo de antibióticos β -lactâmicos originalmente obtidos a partir de fungos filamentosos <i>Penicillium</i> , principalmente <i>Penicillium chrysogenum</i> .
Penetração	Penetração da parede celular com produção de hidrolases do peptidoglicano que promovem a sua degradação localizada. A bainha da partícula fágica contrai, o tubo central penetra na célula hospedeira e o DNA fágico é translocado para o citoplasma. A cápside proteica fantasma, sem material genético, permanece fora da célula.
Peptidoglicano	A parede celular Gram-negativo é uma fina camada de peptidoglicano – também chamado de mureína – composto por N-acetilglucosamina (NAG) alternada com açúcares aminados de ácido N-acetilmurâmico (NAM) unidos por ligações β -1,4 com um peptídeo curto composto por L-alanina, ácido D-glutâmico, ácido L-meso-diaminopalmérico e D-alanina ligados ao grupo carboxilo do ácido murâmico. Fitas lineares de peptidoglicano são ligadas por ligações amida a fitas adjacentes, com a lipoproteína mureína ancorando a camada à parte interna da membrana externa. Pensa-se que a camada de peptidoglicano de cada bactéria compreende uma única molécula contígua que envelopa o organismo, sendo responsável pela forma e estabilidade osmótica, mas sofrendo constante remodelação à medida que o organismo se alonga e divide. O peptidoglicano fornece integridade estrutural e rigidez à parede celular bacteriana.
Período de acumulação intracelular	O período de tempo pós-eclipse de um período latente do fago. A diferença entre o período latente e o período de eclipse representa a fase de acumulação intracelular de vírions fágicos.

Período de eclipse	Período de infecções produtivas durante o qual a maturação de pelo menos uma progenia de vírions ainda não ocorreu. O período de eclipse consiste em parte num período de “equipamento” para a montagem da progenia fágica, representando o tempo após a penetração através da biossíntese e montagem de vírions fágicos maduros.
Período latente	Duração durante uma infecção produtiva que abranja todo o período de infecção. Esta definição assume que a transição da ligação reversível para a ligação irreversível é suficientemente rápida para ser ignorada e que a infecção começa com o processo de translocação do genoma do fago para o citoplasma bacteriano. O período latente representa o tempo após a penetração através da liberação de vírions maduros, englobando a lise da célula bacteriana.
Membrana de Polietersulfona (PES)	A membrana PES é inerentemente hidrofílica e molha rápida e completamente, resultando numa filtração rápida com taxas de fluxo superiores e altas taxas de transferência. A membrana PES também possui uma ligação proteica extremamente baixa, minimizando a probabilidade de ligação das partículas fágicas.
Procapsídeo	Antes da conclusão do processo de maturação dos vírions e, portanto, servindo como um intermediário na montagem dos vírions, os capsídeos podem existir como procapsídeos. A conversão de procapsídeos em capsídeos é tipicamente associada ao empacotamento do DNA.
Profago	O estado do genoma fágico durante o ciclo lisogênico. Pode existir, dependendo do fago ou das circunstâncias, integrado ao DNA do hospedeiro ou como um plasmídeo não integrado. Designação do genoma fágico após ser integrado no genoma bacteriano durante o ciclo lisogênico.
Progenia (ou progênie) fágica	Progênie significa "prole" ou "filhos". Após a indução do ciclo de vida lítico, o DNA do fago é empacotado em vírions e a progênie do fago é liberada pela lise da célula hospedeira.

Proteinase K

Uma protease serínica de amplo espectro. Extrai proteínas citoplasmáticas, nucleares e de membrana de forma eficaz. A proteinase K, produzida pelo fungo *Tritirachium album* Limber, apresenta ampla atividade de clivagem, hidrolizando ligações peptídicas adjacentes ao grupo carboxílico de aminoácidos alifáticos e aromáticos, sendo útil para a digestão geral de proteínas em amostras biológicas.

Quorum sensing

Quorum sensing (QS) é um mecanismo de comunicação (sinalização celular) entre bactérias, regulando a expressão gênica em resposta a flutuações na densidade da população celular. As bactérias que utilizam o mecanismo QS produzem e liberam moléculas sinalizadoras químicas chamadas autoindutores que aumentam em concentração em função da densidade celular. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usam circuitos de comunicação QS para regular uma gama diversificada de atividades fisiológicas. Para que as bactérias usem o mecanismo de comunicação QS constitutivamente, elas devem possuir três habilidades: secreção de uma molécula sinalizadora, secreção de um autoindutor (para detectar a mudança na concentração de moléculas sinalizadoras) e regulação da transcrição gênica como resposta. Este processo é altamente dependente do mecanismo de difusão das moléculas de sinalização. Moléculas de sinalização QS são geralmente secretadas em um nível baixo por bactérias individuais. A baixa densidade celular, as moléculas podem simplesmente se difundir e afastar mas, a alta densidade celular, a concentração local de moléculas sinalizadoras pode exceder o seu limiar de detecção e desencadear alterações na expressão gênica (Miller; Bassler, 2001).

Tampão SM

O tampão SM é uma mistura de cloreto de sódio, sulfato de magnésio e gelatina. O tampão SM buffer é utilizado para a manipulação de rotina de suspensões fágicas. A gelatina no tampão SM estabiliza as partículas fágicas durante o armazenamento.

Spanina	Spaninas são proteínas fusogênicas do fago envolvidas na ruptura da membrana externa de bactérias Gram-negativo, a última etapa do processo de lise a partir de dentro (<i>lysis from within</i>). Os fagos utilizam spaninas de dois componentes ou spaninas unimoleculares nesta etapa final da lise do hospedeiro Gram-negativo.
Sulfonamida	A sulfonamida é um grupo funcional que está na base de vários grupos de fármacos (designados sulfonamidas ou sulfas). As sulfonamidas antibacterianas originais são agentes antimicrobianos sintéticos que contêm o grupo sulfonamida, representando uma classe de antibióticos que atuam inibindo a síntese do ácido fólico em bactérias patogênicas.
Tamanho de explosão (<i>Burst size</i>)	Dimensão da progenia fágica produzida por célula bacteriana infectada por unidade de partícula fágica, ou número de vírions produzidos por célula infectada, ou rendimento viral.
Tampão	Mistura química que permite que uma solução resista a variações de pH.
Técnica asséptica	Procedimento usado em microbiologia para prevenir a introdução de microrganismos ou vírus em culturas celulares e de tecidos, ou prevenir contaminação cruzada.
Transcrição	Processo em que, a partir de um molde de DNA, é sintetizado RNA mensageiro (mRNA) por ação da enzima RNA polimerase.
Translocação	Movimento do genoma de um fago, após sua ligação à célula bacteriana, de fora da célula para o citoplasma bacteriano.
Transposição replicativa	Uma cópia da sequência é inserida em outro local do genoma, sem que a original seja perdida.

Unidades formadoras de placas (UFP)	Entidade capaz de formar uma placa. Os títulos de fagos são frequentemente designados como UFPs em vez de números reais de fagos, uma vez que os experimentos normalmente medem diretamente o primeiro (número de placas formadas) em vez do último (número de vírions de fago realmente presentes). Podem surgir, no entanto, discrepâncias se os vírions se aglomerarem (reduzindo assim o número de UFPs em relação ao número de vírions viáveis).
VAPGH (virion-associated peptidoglycan hydrolase)	As hidrolases de peptidoglicano associadas a vírions (VAPGH) são enzimas líticas codificadas por fagos que degradam localmente o peptidoglicano da parede celular bacteriana durante a infecção. Em contraste com as endolisinas, as hidrolases de peptidoglicano que mediam a lise das bactérias hospedeiras no final do ciclo lítico para liberar a progenia fágica, a ação das VAPGHs gera no envelope celular um pequeno orifício através do qual o tubo da cauda do fago penetra o envelope celular para ejetar o material genético do fago no início do ciclo de infecção.
Virion	Estado viral encapsulado não-metabolizante. Uma partícula bacteriofágica madura encontrada não-ligada e fora de uma célula hospedeira, chamada de fago livre.
Virocélula	Descrição de uma célula que está sofrendo infecção por vírus, indicando que esse estado representa uma “parceria” metabólica entre um vírus infectante e a célula infectada.
Virulento	Descrição de um fago que é estritamente lítico.
Vírus	Partículas essencialmente proteicas que não possuem maquinaria metabólica para a replicação, necessitando obrigatoriamente de parasitar uma célula hospedeira susceptível e assumir o controle da sua maquinaria transcricional e transducional para completar o seu ciclo replicativo.

9 EQUIPAMENTOS

Protocolo 5.1.:

- [c]** Espectrofotômetro UV-Vis da Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA).

Protocolo 5.2.:

- [b]** Espectrofotômetro UV-Vis da Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA).

Protocolo 5.3.:

- [a]** equipamento Mini-PROTEAN® TetraCell 4-gel system para eletroforese vertical da Bio-RAD (Califórnia CA, EUA) acoplado à unidade de fornecimento de energia PowerPac™ HC (Bio-RAD, Califórnia CA, EUA) e a um banho seco digital também da Bio-RAD.

Protocolo 5.4.:

- [c]** Microscópio Eletrônico de Transmissão da JEOL (modelo JEM 2100, Tokyo, Japão), integrando um filamento LaB₆, operando a 200 kV e com uma resolução de 0.23 nm; uma câmera digital de alta resolução CCD da GATAN Inc. (modelo ORIUS™ 832. J4850 SC1000B, Pleasanton CA, EUA) com resolução de 11 MP (4.0 x 2.7 k pixels / 9x9 μm²) para aquisição de imagens digitais, via software Gatan Microscopy Suite (DigitalMicrograph da Gatan Inc., versão 2.11.1404.0). As dimensões do capsídeo viral e da cauda são determinadas usando o software de domínio público ImageJ (versão 1.52a) do National Institute of Health (EUA).

Protocolo 5.5.:

[b] ZetaSizer modelo HSA 300 da Malvern Instruments, Inc. (Worcestershire, Reino Unido).

Protocolo 6.5.:

[iv.1] Espectrofotômetro / Fluorímetro DeNovix, modelo DS-11FX (DeNovix Inc., Wilmington DE, EUA).

[iv.3] Equipamento Mini Submarine Unit system para eletroforese horizontal da Hoefer Inc. (modelo SUB6, Hoefer Inc., Richmond CA, EUA) acoplado à unidade de fornecimento de energia Power Supply (modelo PS300B, Hoefer Inc., Richmond CA, EUA).

Protocolo 6.6.:

[n] Real-Time PCR (modelo 7300, Applied Biosystems, Singapura).

[y] Equipamento Mini Submarine Unit para eletroforese horizontal da Hoefer Inc. (modelo SUB6, Hoefer Inc., Richmond CA, EUA) acoplado à unidade de fornecimento de energia Power Supply (modelo PS300B, Hoefer Inc., Richmond CA, EUA).

REFERÊNCIAS

ABEDON, S.T.; KUHL, S. J.; BLASDEL, B. G.; KUTTER, E. M. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 66-85, 2011. doi: 10.4161/bact.1.2.15845.

ACKERMANN, H. W. Bacteriophage taxonomy. **Microbiology Australia**, v. 32, n. 2, p. 90-94, 2011. doi: 10.1071/MA11090.

ACKERMANN, H.-W. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. **Advances in Virus Research**, v. 51, p. 135-201, 1998. doi: 10.1016/s0065-3527(08)60785-x.

ÁCS, N.; GAMBINO, M.; BRØNDSTED, L. Bacteriophage enumeration and detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 594868, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.594868.

AKHWALE, J. K.; ROHDE, M.; ROHDE, C.; BUNK, B.; SPRÖER, C.; BOGA, H. I.; KLENK, H.-P.; WITTMANN, J. Isolation, characterization and analysis of bacteriophages from the haloalkaline lake Elmenteita, Kenya. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215734, 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0215734.

ANDRADE, M. Z. **Segurança em laboratórios químicos e biotecnológicos**. Caxias do Sul: EDUCS, 2008.

ATCC. American Type Culture Collection. **Bacteriology Culture Guide**. Manassas, Virginia: ATCC, 2022. Disponível em: <https://www.atcc.org/-/media/resources/culture-guides/bacterial-culture-guide.pdf?rev=fb6c6948fbea49a08fd1836cb0bdbbc0>. Acesso em: 19 maio 2022.

BALCÃO, V. M.; AMORIM, L. R. **Biotecnologia – Protocolos Laboratoriais para Ciências da Saúde**. Porto: Fundação Fernando Pessoa Publishers, 2012.

BALCÃO, V. M.; BASU, A.; CIEZA, B.; ROSSI, F. N.; PEREIRA, C.; VILA, M. M. D. C.; SETUBAL, J. C.; HA, T.; DA SILVA, A. M. Pseudomonas-tailed lytic phages: genome mechanical analysis and putative correlation with virion morphogenesis yield. **Future Microbiology**, v. 17, n. 13, p. 1009-1026, 2022a; doi: 10.2217/fmb-2021-0293.

BALCÃO, V. M.; MORELI, F. C.; SILVA, E. C.; BELLINE, B. G.; MARTINS, L. F.; ROSSI, F. P. N.; PEREIRA, C.; VILA, M. M. D. C.; DA SILVA, A. M. Isolation and molecular characterization of a novel lytic bacteriophage that inactivates MDR *Klebsiella pneumoniae* strains. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 7, p. 1421, 2022b. doi: 10.3390/pharmaceutics14071421.

BALCÃO, V.M.; BELLINE, B.G.; SILVA, E.C.; ALMEIDA, P.F.F.B.; BALDO, D.Â.; AMORIM, L.R.P.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.M.; VILA, M.M.D.C.; DEL FIOL, F.S. Isolation and molecular characterization of two novel lytic bacteriophages for the biocontrol of *Escherichia coli* in uterine infections: in vitro and ex vivo preliminary studies in veterinary medicine. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 2344, 2022c. doi: 10.3390/pharmaceutics14112344.

BONILLA, N.; ROJAS, M. I.; CRUZ, G. N. F.; HUNG, S.-H.; ROHWER, F.; BARR, J. J. Phage on tap – a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. **PeerJ**, v. 4, p. e2261, 2016. doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.2261>.

BRUMANO, L. P.; ÂNGELO, F. F.; AMARAL, L. H.; PINTO, C. L. O.; ALMEIDA, J. A.; PINTO, M. A. O. Estirpes bacterianas-padrão, formas de obtenção de doação e sua manutenção em laboratórios de ensino e pesquisa. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 3, p. 21-26, 2011.

BYKOWSKI, T.; VERMA, A.; BRISSETTE, C. A.; STEVENSON, B. Aseptic technique. UNIT 4.1 In: **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/280947477_Aseptic_techniques. doi: 10.1002/9780470089941.et0401s00. Acesso em: 12 oct. 2022.

CARLTON, R. M. Phage therapy: past history and future prospects. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 47, n. 5, p. 267-274, 1999, PMID: 10604231.

CORMIER, J.; JANES, M. A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS2. **Journal of Virological Methods**, v. 196, p. 86-92, 2014. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.10.034.

COSTA, P.; PEREIRA, C.; GOMES, A. T. P. C.; ALMEIDA, A. Efficiency of single phage suspensions and phage cocktail in the inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: an in vitro preliminary study. **Microorganisms**, v. 7, n. 4, p. 94, 2019. doi: 10.3390/microorganisms7040094.

DOMINGO-CALAP, P.; DELGADO-MARTÍNEZ, J. Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. **Antibiotics**, v. 7, n. 66, p. 1-16, 2018. doi: 10.3390/antibiotics7030066.

DOSS, J.; CULBERTSON, K.; HAHN, D.; CAMACHO, J.; BAREKZI, N. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. **Viruses**, v. 9, n. 50, p. 1-10, 2017. doi: 10.3390/v9030050.

DSMZ. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Handling of cultures and opening of ampoules with freeze-dried material, 2022. Disponível em: https://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/Microbiology/Dateien/Kultivierungshinweise/Kultivierungshinweise_neu_CD/Opening_17new.pdf. Acesso em: 19 abr. 2022.

FALKE, S.; BETZEL, C. Dynamic Light Scattering (DLS): principles, perspectives, applications to biological samples. **Radiation in Bioanalysis: Spectroscopic Techniques and Theoretical Methods**, v. 8, p. 173-193, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-28247-9_6.

GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; OBESO, J. M.; RODRÍGUEZ, A. Bacteriophages and their application in food safety. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 479-485, 2008. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02458.x.

GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. Endotoxin: the uninvited guest. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6811-6817, 2005. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.063.

HARADA, L. K.; SILVA, E. C.; CAMPOS, W. F.; DEL FIOL, F. S.; VILA, M.; DĄBROWSKA, K.; KRYLOV, V. N.; BALCÃO, V. M. Biotechnological applications of bacteriophages: state of the art. **Microbiological Research**, v. 212-213, p. 38-58, 2018. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.007.

HARADA, L. K.; BONVENTI JÚNIOR, W.; SILVA, E. C.; OLIVEIRA, T. J.; MORELI, F. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. M.; TUBINO, M.; VILA, M. M. D. C.; BALCÃO, V. M. Bacteriophage-based biosensing of *Pseudomonas aeruginosa*: an integrated approach for the putative real-time detection of multi-drug-resistant strains. **Biosensors**, v. 11, n. 4, p. 124, 2021. doi: 10.3390/bios11040124.

HARADA, L. K.; SILVA, E. C.; ROSSI, F. P. N.; CIEZA, B.; OLIVEIRA, T. J.; PEREIRA, C.; TOMAZETTO, G.; SILVA, B. B.; SQUINA, F. M.; VILA, M. M. D. C.; SETUBAL, J. C.; HA, T.; SILVA, A. M.; BALCÃO, V. M. Characterization and in vitro testing of newly isolated lytic bacteriophages for biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa*. **Future Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 111-141, 2022. doi: 10.2217/fmb-2021-0027.

HATFULL, G. F. Dark Matter of the Biosphere: the Amazing World of Bacteriophage Diversity. **Journal of Virology**, v. 89, n. 16, p. 8107-8110, 2015. doi: 10.1128/JVI.01340-15.

HOWARD-VARONA, C.; ROUX, S.; DORE, H.; SOLONENKO, N. E.; HOLMFELDT, K.; MARKILLIE, L. M.; ORR, G.; SULLIVAN, M. B. Regulation of infection efficiency in a globally abundant marine Bacteriodes virus. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 11, n. 1, p. 284-295, 2017. doi: 10.1038/ismej.2016.81; Erratum in: ISME J. v. 11, n. 8, p. 1942, 2017.

HYMAN, P. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 35, p. 1-23, 2019. doi: 10.3390/ph12010035.

JIN, J.; LI, Z. J.; WANG, S. W.; WANG, S. M.; HUANG, D. H.; LI, Y. H.; MA, Y. Y.; WANG, J.; LIU, F.; CHEN, X. D.; LI, G. X.; WANG, X. T.; WANG, Z. Q.; ZHAO, G. Q. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 156, p. 1-8, 2012. doi: 10.1186/1471-2180-12-156.

KAUR, J. **Application of UV Light Scattering to Detect Reversible Self-association and Aggregation of Proteins in Solution**, Doctoral Dissertations, v. 1386, University of Connecticut, 2017. Disponível em: <https://opencommons.uconn.edu/dissertations/1386>, Acesso em 02 jan. 2023.

KHAN MIRZAEI, M.; NILSSON, A. S. Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. **PLoS One**, v. 10, p. e0118557, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0118557.

LIN, D. M.; KOSKELLA, B.; LIN, H. C. Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, n. 3, p. 162-173, 2017. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.

LOBA, A. F. F. R. **Fagoterapia como alternativa ao uso dos antibióticos convencionais**, 2014. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014, Disponível em: <http://hdl.handle.net/10437/4704>, Acesso em 02 jan. 2023.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROCK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 545 p. ISBN-10: 0879691360.

MANIKANTHA, B.; KARTHIKA, R.; MURUGADAS, V.; VISNUVINAYAGAM, S.; MADHUSUDANA RAO, B. Comparison of the single agar and double agar layer methods for enumeration of bacteriophages. **Fishery Technology**, v. 59, n. 1, p. 60-63; 2022. Disponível em: <https://epubs.icar.org.in/index.php/FT/article/view/120865>, Acesso em 02 jan. 2023.

MANILOFF, J.; ACKERMANN, H.-W. Taxonomy of bacterial viruses: Establishment of tailed virus genera and the order Caudovirales. **Archives of Virology**, v. 143, n. 10, p. 2051-2063, 1998. doi: 10.1007/s007050050442.

MANOHAR, P.; ENIYAN, K.; ARCHANA, L.; MADHAV, M. R.; LEPTIHN, S.; RAMESH, N. Morphological characterization techniques for the isolation of virulent bacteriophages from environmental sources. **International Journal of Bacteriophage Research**, v. 1, p. 1-9, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/349392833_MORPHOLOGICAL_CHARACTERIZATION_TECHNIQUES_FOR_THE_ISOLATION_OF_VIRULENT_BACTERIOPHAGES_FROM_ENVIRONMENTAL_SOURCES. Acesso em: 25 maio 2023.

MARTINS, W. M. B. S.; TOLEMAN, M. A.; GALES, A. C. Clinical utilization of bacteriophages: a new perspective to combat the antimicrobial resistance in Brazil. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v. 24, n. 3, p. 239-246, 2020. doi: 10.1016/j.bjid.2020.04.010.

MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Bacteriófagos: ferramenta para controle de bactérias patogênicas. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 10, n. 18, p. 3180-3190, 2014.

MATSUZAKI, S.; RASHEL, M.; UCHIYAMA, J.; SAKURAI, S.; UJIHARA, T.; KURODA, M.; IKEUCHI, M.; TANI, T.; FUJIEDA, M.; WAKIGUCHI, H.; IMAI, S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 211-219, 2005. doi: 10.1007/s10156-005-0408-9.

MELO, L. D. R.; SILLANKORVA, S.; ACKERMANN, H. W.; KROPINSKI, A. M.; AZEREDO, J.; CERCA, N. Isolation and characterization of a new *Staphylococcus epidermidis* broad-spectrum bacteriophage. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 506-515, 2014. doi: 10.1099/vir.0.060590-0.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Reviews Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 2001. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165.

MOLDOVAN, R.; CHAPMAN-MCQUISTON, E.; WU, X. L. On kinetics of phage adsorption. **Biophysical Journal**, v. 93, p. 303-315, 2007. doi: 10.1529/biophysj.106.102962.

MUSHEGIAN, A. R. Are There 10^{31} Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? **Journal of Bacteriology**, v. 202, n. 9, p. e00052-20, 2020. doi: 10.1128/JB.00052-20.

NABERGOJ, D.; MODIC, P.; PODGORNIK, A. Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. **MicrobiologyOpen**, v. 7, n. 2, p. e00558, 2018. doi: 10.1002/mbo3.558.

PINHEIRO, L. A. M.; PEREIRA, C.; FRAZÃO, C.; BALCÃO, V. M.; ALMEIDA, A. Efficiency of phage $\phi 6$ for biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: an in vitro preliminary study. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 286, 2019. doi: 10.3390/microorganisms7090286.

PINHEIRO, L. A. M.; PEREIRA, C.; BARREAL, M. E.; GALLEGO, P. P.; BALCÃO, V. M.; ALMEIDA, A. Use of phage $\phi 6$ to inactivate *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants: in vitro and ex vivo experiments, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 1319-1330, 2020. doi: 10.1007/s00253-019-10301-7.

PIRNAY, J. P. Phage therapy in the year 2035. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 1171, p. 1-8, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01171.

QADIR, M. I.; MOBEEN, T.; MASOOD, A. Phage therapy: progress in pharmacokinetics. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, p. e17093, 2018. doi: 10.1590/s2175-97902018000117093.

RAETZ, C. R. H.; REYNOLDS, C. M.; TRENT, M. S.; BISHOP, R. E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, n. 1, p. 295-329, 2007. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803.

RIOS, A. C.; MOUTINHO, C. G.; PINTO, F. C.; DEL FIOLE, F. S.; JOZALA, Â.; CHAUD, M. V.; VILA, M. M.; TEIXEIRA, J. A.; BALCÃO, V. M. Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. **Microbiological Research**, v. 191, p. 51-80, 2016. doi: 10.1016/j.micres.2016.04.008.

RIOS, A. C.; VILA, M. M. D. C.; LIMA, R.; DEL FIOL, F. S.; TUBINO, M.; TEIXEIRA, J. A.; BALCÃO, V. M. Structural and functional stabilization of bacteriophage particles within the aqueous core of a W/O/W multiple emulsion: a potential biotherapeutic system for the inhalational treatment of bacterial pneumonia. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 177-192, 2018. doi: 10.1016/j.procbio.2017.09.022.

SALMOND, G. P.; FINERAN, P. C. A century of the phage: past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 777-786, 2015. doi: 10.1038/nrmicro3564.

SANDERS, E. R. Aseptic laboratory techniques: plating methods. **Journal of Visualized Experiments**, v. 63, p. e3064, 2012. doi: 10.3791/3064.

SANTOS, S. B.; CARVALHO, C.; AZEREDO, J.; FERREIRA, E. C. Population dynamics of a Salmonella lytic phage and its host: implications of the host bacterial growth rate in modelling. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102507, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0102507.

SHAO, Y.; WANG, I. N. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. **Genetics**, v.180, n. 1, p. 471-482, 2008. doi: 10.1534/genetics.108.090100.

SILVA, E. C.; OLIVEIRA, T. J.; MORELI, F. C.; HARADA, L. K.; VILA, M. M. D. C.; BALCÃO, V. M. Newly isolated lytic bacteriophages for *Staphylococcus intermedius*, structurally and functionally stabilized in a hydroxyethylcellulose gel containing choline geranate: Potential for transdermal permeation in veterinary phage therapy. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 42-58, 2021. doi: 10.1534/genetics.108.090100.

STONE, E.; CAMPBELL, K.; GRANT, I.; MCAULIFFE, O. Understanding and exploiting phage-host interactions. **Viruses**, v. 11, n. 567, p. 1-26, 2019. doi: 10.3390/v11060567.

STUER-LAURIDSEN, B.; JANZEN, T.; SCHNABL, J.; JOHANSEN, E. Identification of the host determinant of two prolate-headed phages infecting *Lactococcus lactis*. **Virology**, v. 309, n. 1, p. 10-17, 2003. doi: 10.1016/s0042-6822(03)00012-6.

SUREKHAMOL, I. S.; DEEPA, G. D.; SOMNATH PAI, S.; SREELAKSHMI, B.; VARGHESE, S.; BRIGHT SINGH, I. S. Isolation and characterization of broad spectrum bacteriophages lytic to *Vibrio harveyi* from shrimp farms of Kerala, India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 197-204, 2013. doi: 10.1111/lam.12175.

SZERMER-OLEARNIK, B.; BORATYŃSKI, J. Removal of endotoxins from bacteriophage preparations by extraction with organic solvents. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0122672, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0122672.

VEKSHIN, N. L. Screening hypochromism of chromophores in macromolecular biostructures. **Biofizika**, v. 44, n. 1, p. 45-55, 1999.

VINADÉ, M. E. C; VINADÉ, E. R. C. **Métodos Espectroscópicos de Análise Quantitativa**, Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2005, 272 p.

WATANABE, K.; TAKESUE, S.; ISHIBASHI, K.; NAKAHARA, S. A computer simulation of the adsorption of *Lactobacillus* phage PL-1 to host cells: some factors affecting the process. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 46, p. 697-702, 1982. doi: 10.1080/00021369.1982.10865142.

WHITE, H. E.; ORLOVA, E. V. Bacteriophages: their structural organisation and function. *In*: SAVVA, R. (ed.) **Bacteriophages: Perspectives and Future**. London: IntechOpen, 2019. doi: 10.5772/intechopen.85484.

WITTEBOLE, X.; DE ROOCK, S.; OPAL, S. M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 226-235, 2014. doi: 10.4161/viru.25991.

YAP, M. L.; ROSSMANN, M. G. Structure and function of bacteriophage T4. **Future Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 1319-1327, 2014. doi: 10.2217/fmb.14.91.

SOBRE OS AUTORES



Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão é, desde Outubro de 2013, Professor Adjunto da Universidade de Sorocaba (UNISO, Sorocaba, Brasil), onde também lidera o laboratório de pesquisa VBlab (Laboratório de Vírus Bacterianos). É Bolsista de Produtividade em Pesquisa PQ-2 do CNPq (Brasil). É ainda pesquisador do CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar) da Universidade de Aveiro (Portugal). É Licenciado em Engenharia Alimentar pela Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa (ESB-UCP) e Doutor em Biotecnologia também pela ESB-UCP (grau de Doutor reconhecido pela FCF-USP (São Paulo, Brasil), certificado registrado sob o número 116247 nos termos do Artigo 48 da Lei 9394/96). Realizou dois Pós-Doutoramentos, em Engenharia Enzimática (visando coimobilização de duas enzimas multiméricas para o tratamento extracorpóreo de leucemia) e em Microbiologia Aplicada (visando o tratamento do cancro bacteriano da planta do kiwi utilizando bacteriófagos líticos contra *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). Os seus interesses de pesquisa incluem (i) biologia de bacteriófagos, (ii) aplicações biotecnológicas de bacteriófagos, (iii) estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas (com ênfase em partículas bacteriofágicas) e (iv) desenvolvimento de sistemas inovadores não-invasivos para entrega de entidades proteicas (com ênfase na via transdérmica).

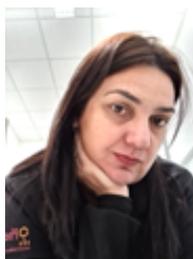


Marta Maria Duarte Carvalho Vila. Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (USP-RP) (1984); Graduação em Farmácia Industrial pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-CAMPINAS) (1985); Mestrado em Tecnologia de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos / Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)(1996) e Doutorado em Química Analítica pelo Instituto de Química / Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (2002). É Professora Titular da Universidade de Sorocaba (UNISO). Tem desenvolvido projetos de pesquisa relacionados com sistemas de liberação de fármacos e estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas, com ênfase em bacteriófagos.

COLABORADORAS TÉCNICAS



Erica Cristina Santos Silva. Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (1995), e graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade de Sorocaba (UNISO) (2017). Tem experiência na área de Farmácia com manipulação de fórmulas alopáticas. De Fevereiro de 2017 a Novembro de 2017 realizou atividades de pesquisa no âmbito do seu TCC no laboratório de pesquisa VBlab (Laboratório de Vírus Bacterianos). Concluiu o Mestrado em Ciências Farmacêuticas na UNISO (2020), com foco em terapia fágica e líquidos iônicos para permeação transdérmica. Presentemente, desenvolve trabalho de pesquisa no âmbito do seu Doutorado em Ciências Farmacêuticas, também na Uniso, com foco no biocontrole da mancha aureolada do cafeeiro utilizando bacteriófagos líticos para *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.



Bianca Gianola Belline Silva. Possui graduação em Medicina Veterinária, pela Universidade de Sorocaba (2020), tendo realizado Iniciações Científicas e desenvolvido projetos de extensão durante a graduação. Concluiu recentemente o Mestrado em Ciências Farmacêuticas no PPGCF-UNISO (2022), desenvolvendo pesquisas com foco no biocontrole da piometra em animais de pequeno porte utilizando bacteriófagos líticos para *Escherichia coli*. Tem experiência na área de reprodução de pequenos animais, obstetrícia e neonatologia canina. Atua ainda na clínica médica de cães e gatos com foco na Medicina Veterinária Preventiva.
