

8

BACTERIOFAGI ȘI BACTERIOCINE

8.1. BACTERIOFAGI ȘI BACTERIOFAGIE

8.1.1. Date generale

Bacteriofagii, numiți pe scurt fagi, sunt virusuri ale bacteriilor. Li găsim prezenți în mediile naturale de viață ale gazdelor lor, bacteriile: materii fecale, diferite produse patologice, apă etc. Deși numele lor aparent o sugerează, bacteriofagii nu sunt «măncători» de bacterii, ci le lizează. În rezumat, fagii se adsorb specific pe receptori de pe suprafața bacteriilor, genomul lor penetrează în citoplasma bacteriană, unde evoluează în una din două modalități posibile:

- fie ca *fag vegetativ*, când este replicat, transcris și tradus integral, iar componentele sintetizate sunt asamblate în numeroase copii de fagi maturi eliberați prin liza bacteriei gazdă;
- fie ca *profag*, când integrat liniar în cromozomul bacterian sau circularizat și atașat la membrana citoplasmatică, asemenea unui plasmid, se replică sincron cu diviziunea bacteriei gazdă și câte o copie se transmite la fiecare din bacteriile fiice.

Fagii virulenți există numai în stadiile de fag matur și de fag vegetativ.

Fagii temperați trec alternativ prin stadii de fag matur, profag sau fag vegetativ. Genomul lor este mai complex: un set suplimentar de gene controlează represia genelor «vegetative» și recombinarea fagului în genomul bacteriei gazdă.

Bacteriile lizosensibile adsorb specific un fag, îl replică și sunt lizate.

Bacteriile lizogene găzduiesc un profag și îl transmit la descendenți. Denumirea este sugestivă pentru că aceste bacterii generează spontan, cu o rată de la 10^{-2} până la 10^{-5} , prin derepresia genelor vegetative, fagul matur infecțios (figura 8.1).

Sub acțiunea unor agenți mutageni (doze subletale de radiații ultraviolete etc.) aproape în toate celulele culturii lizogene profagul evoluează în fag vegetativ, care generează fagi maturi. Acest fenomen, numit *inducție*, are la bază inactivitatea enzimatică a represorului fagic, declanșată de mecanismul reparării ADN lezat prin agentul mutagen.

Bacteriile lizorezistente rezistă acțiunii litice a unui fag:

- fie pentru că sunt nereceptive (lipsite de receptori);
- fie pentru că sunt lizogene (adsorb fagul, dar îi neutralizează genomul prin represorul produs sub controlul profagului găzduit).

8.1.2. Metode de izolare a bacteriofagilor

Bacteriofagii sunt căutați în mediile lor naturale de viață, unde coexistă cu bacteriile gazdă.

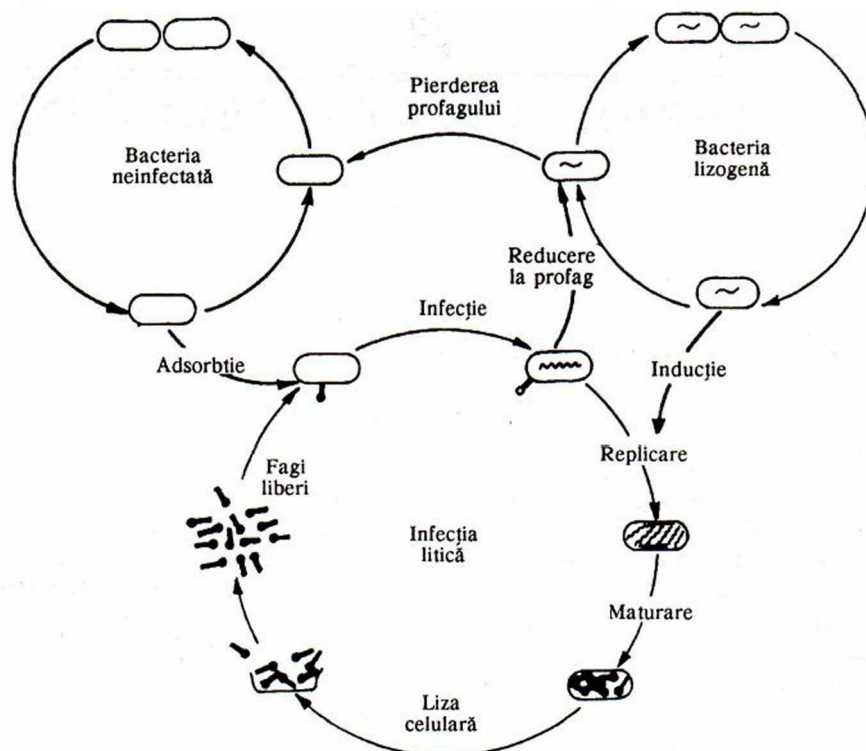


Fig. 8.1. Ciclurile fag—bacterie gazdă

Principiu: Bacteriofagii din probele de cercetat incubate în bulion nutritiv sunt replicați de bacteriile lizosensibile preexistente. Astfel înmulțiți, pot fi depistați în filtratul lizatului, folosind tulpini bacteriene indicatoare.

Probe: Materii fecale, urină, exsudate purulente, apă etc.

Necesar: Bulion nutritiv, incubator de 37°C, filtru care reține bacteriile, tulpini bacteriene indicatoare, plăci cu agar nutritiv, pipete, ansc.

Procedura:

1. Se însămânțează cca 1 g de materii fecale, 1 ml urină sau exsudat, 30 ml apă în 30 ml bulion nutritiv.
2. Se incubează 18—24 ore la 37°C.
3. Se filtrează lizatului pentru reținerea bacteriilor (membrane cu pori de 0,22 μm, bujii Chamberland L3 sau L5 etc.).
4. Se testează filtratul cu tulpini indicatoare pentru prezența de bacteriofag (vezi 8.1.3).

Sensibilitatea metodei de izolare crește mult dacă la bulionul însămânțat cu proba cercetată se adaugă câteva picături din cultura de 2—3 ore a unei tulpini indicatoare (*multiplicare monovalentă*) sau a unui amestec de mai multe tulpini indicatoare (*multiplicare polivalentă*). Multiplicarea poate fi *unică* sau *repetată* mai multe zile la rând înainte de filtrare și testare. Prin multiplicare repetată se realizează nu numai îmbogățirea, ci și adaptarea bacteriofagului la gazda bacteriană.

8.1.3. Metode de indicare a bacteriofagului.

Indicarea fagului virulent

Principiu: Fagii dintr-o picătură de suspensie depusă pe suprafața mediului agarizat, însămânțată cu o tulpină bacteriană indicatoare, lizează complet bacteriile care îi replică, determinând o arie lipsită de cultură, numită *plajă*.

Tulpinile bacteriene indicatoare sunt tulpini selectate pentru lizosensibilitatea lor la anumiți bacteriofagi și absența lizogeniei.

Probă: Suspensie fagică (revedi 8.1.2).

Necesar: Cultură în fază exponențială a tulpinilor bacteriene indicatoare, plăci cu geloză nutritivă, etalor de inoculum, ansă.

Procedura:

1. Se usucă suprafața gelozei nutritive și se însămânțează în pânză suspensia bacteriei indicatoare cu toate celulele viabile (cultura în fază exponențială). Se lasă placa cu capacul întredeschis la 37°C, până ce inoculumul este complet adsorbit în mediu.

2. Se depune, cu ansa, pe suprafața însămânțată cu tulpina indicatoare o picătură din suspensia fagică și se lasă placa pe masa de lucru până ce picătura fagică este complet adsorbită în mediu.

3. Se incubează plăcile 8—16 ore la temperatura optimă pentru cultivarea tulpinii indicatoare.

Interpretare: Plajele apar ca mici zone rotunde de mediu lipsit complet de creștere bacteriană. Ele semnaleză prezența în suspensie a fagului corespunzător tulpinii indicatoare.

Depistarea bacteriilor lizogene. Diluții ale culturii lizogene sunt amestecate cu un mare exces din cultura tulpinii indicatoare, iar amestecul este imediat etalat pe suprafața unei plăci cu agar nutritiv și inoculumul lăsat să se adsoarbă în mediu. După incubarea corespunzătoare, în cultura tulpinii indicatoare se observă plaje centrate de o colonie a bacteriei lizogene. Fiecare colonie a bacteriei lizogene în care au fost generați fagi maturi s-a înconjurat cu o plajă prin liza bacteriilor indicatoare. Ținând cont de numărul plajelor, diluția și volumul însămânțat, poate fi calculată rata cu care cultura lizogenă generează fag matur, infectant.

8.1.4. Titrarea bacteriofagului

Principiu: Într-o cultură confluentă pe mediu agarizat fagul lizează bacteria lizosensibilă care l-a replicat și infectează numai bacteriile învecinate, determinând o plajă. Asumând că dispersia fagilor din suspensie este ideală, există o corespondență între plajă și o particulă fagică. Această cantitate de fag infectant se măsoară în *unități formatoare de plaje*.

Probă: Suspensie de fag proaspăt izolat (revedi 8.1.2) sau suspensii fagice de colecție, care periodic trebuie propagate și titrate.

Propagarea fagilor: în 100 ml bulion nutritiv se însămânțează bacteria lizosensibilă corespunzătoare și 4—5 ml din suspensia fagului de propagat. Se incubează 5—6 ore la 37°C, apoi se menține cultura peste noapte la 4°C, după care se filtrează.

Necesar: Bulion nutritiv, pipete gradate, eprubete sterile, placă cu geloză nutritivă, etalor, ansă fină.

Procedura:

1. Se menține peste noapte la 37°C placa cu geloză nutritivă pentru uscarea suprafeței mediului și controlul sterilității.
2. Se desenează un caroiaj pe fundul plăcii cu agar nutritiv.
3. Se efectuează diluții decimale în bulion nutritiv ale suspensiei fagice, schimbând pipeta după fiecare diluție.
4. Se însămânțează în pânză pe placa cu geloză nutritivă tulpina lizosensibilă corespunzătoare fagului de titrat și se lasă să se adsoarbă inoculul în mediu.
5. Se însămânțează în pătratele caroiajului câte o ansă din fiecare diluție a suspensiei fagice.
6. Se incubează placa la 37°C.

Interpretare: Titrul suspensiei fagice este stabilit de ultima diluție capabilă să producă minimum o plajă.

Preparațiile fagice titrate sunt conservate la 4°C.

8.1.5. Aplicații practice ale bacteriofagiei

Lizotipia.

Principiu: Unele tulpini ale aceleiași specii bacteriene sunt lizate total de un bacteriofag dat, altele numai parțial, iar altele deloc. Utilizând mai mulți fagi convenabil selectați (prin antrenare repetată pe aceeași tulpină bacteriană — vezi 8.1.2) subdivizarea unei specii sau serovar bacterian în tulpini sensibile, parțial sensibile și rezistente devine precisă. Un lizovar reunește tulpinile care reacționează la fel și constant față de preparațiile fagice selecționate. *Lizovarul este un valoros marker epidemiologic.*

Probă: Bacteria testată din cultura de 24 ore în bulion nutritiv este subcultivată pentru 2—3 ore în bulion nutritiv la 37°C.

Necesar: Setul de preparații fagice titrate, placă cu geloză nutritivă, etalor, ansă fină.

Procedura:

1. Se usucă suprafața gelozei nutritive și se verifică sterilitatea plăcii.
2. Se desenează pe fundul plăcii caroiajul corespunzător numărului de preparații fagice.
3. Se însămânțează în pânză tulpina testată și se lasă inoculul să se adsoarbă în mediu.
4. Se depune câte o ansă din fiecare preparație fagică în pătratul corespunzător al caroiajului.
5. Se incubează placa însămânțată la temperatura convenabilă fiecărui sistem fag—bacterie (37°C pentru majoritatea speciilor și 30°C pentru stafilococ) pe durata necesară apariției culturii.

Interpretare: Dimensiunea și morfologia plajelor produse de fiecare fag sunt apreciate în raport cu schemele de lizotipie standardizate pentru diferitele bacterii testate. Lizotipia a fost standardizată pentru bacterii patogene cum sunt: *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, A, B, *S. typhimurium*, tulpinile enteropatogene de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* ș. a.

Alte aplicații.

■ *Indicatori sanitari*: distribuția bacteriofagilor în natură o reflectă pe cea a bacteriilor gazdă (revedi 8.1.2).

■ *Detecția substanțelor carcinogene prin urmărirea inducției pe care o produc acestea în sistemele lizogene* (revedi 8.1.3).

■ *Tratament adițional în infecțiile locale* (intestinale, urinare, cutanate) cu rezultate mai satisfăcătoare când fagul activ asupra bacteriei infectante poate fi aplicat direct în focarul infecțios.

8.2. BACTERIOCINE

Bacteriocinele sunt substanțe difuzibile, bactericide, codificate plasmidic și produse de anumite tulpini bacteriene.

În funcție de specia căreia îi aparțin, tulpinile producătoare, bacteriocinele pot avea denumiri particulare: colicine — cele produse de *E. coli*, piocine — cele produse de bacilul piocianic, megacine — cele produse de *Bacillus megatherium* etc.

Plasmidele care codifică bacteriocinele sunt numite factori *col*. Unele sunt conjugative (autotransferabile), altele neconjugative, dar pot fi cotransferate în prezența factorului de sex F sau transduse de către un bacteriofag.

Bacteriocinele se fixează pe receptori bacterieni specifici, sunt translocate prin învelișurile celulare (membrană externă, perete, membrană citoplasmatică) și acționează, cu efecte bactericide, asupra unor ținte celulare.

Spectrul antibacterian al bacteriocinelor este mult mai îngust decât cel al antibioticelor. Bacteriocinele produse de bacteriile gramnegative sunt active numai asupra unor tulpini ale speciei producătoare sau a unor specii ori genuri înrudite; cele produse de bacteriile grampozitive au spectru mai larg, extins și la bacterii taxonomic mai îndepărtate.

Implicații ecologice ale bacteriocinogeniei. Antagonismul exercitat de colicine (*E. coli* este bacteria facultativ anaerobă dominantă în colon — vezi tabelul 14.1) s-ar opune implantării în colon a unor patogeni ca bacilii dizenterici ș. a. Invers, bacteriocinele produse de tulpini patogene pot favoriza colonizarea și invazia intestinală, mai ales dacă flora rezidentă nu produce bacteriocine eficiente.

Aplicații practice. Specificitatea de receptor și țintă moleculară a bacteriocinelor poate diferenția bacteriile în funcție de:

■ Spectrul de activitate al bacteriocinei produse față de un set de tulpini indicatoare. Metoda se numește *bacteriocinogenotipie*.

■ Spectrul de sensibilitate al unei tulpini față de bacteriocine cunoscute. Metoda se numește *bacteriocinotipie*.

În general, caracterul producător este mai stabil decât sensibilitatea la bacteriocine. De aceea *bacteriocinogenotipia poate fi utilă în epidemiologie alături de lizotipie și serotipie*.

Pentru bacteriocinogenotipie, tulpina testată este însămânțată în striu de-a lungul diametrului unei plăci cu mediu agarizat 1,5%. După 48 ore de incubare la 37°C, cultura este raclată cu o lamă de sticlă sterilă, iar bacteriile restante sunt omorâte prin expunerea plăcii timp de o oră la vapori de cloroform. Pentru aceasta un pătrat de 5×5 cm din hârtie

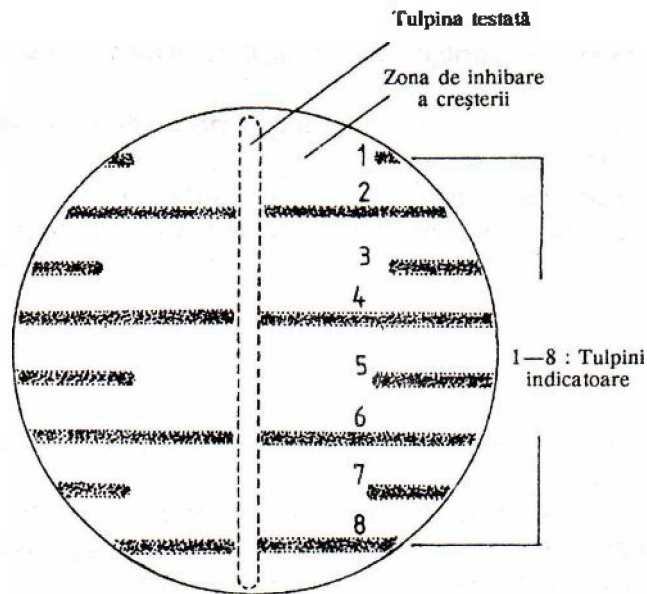


Fig. 8.2. Bacteriocinogenotipia prin metoda Abbott-Shannon

de filtru este plasat în capacul plăcii și imbibat cu 1 ml cloroform. Apoi plăcile sunt acrisite 20 minute la 37°C cu capacul întredeschis. Tulpinile indicatoare sunt însămânțate perpendicular pe urma striului de cultură a tulpinii testate, iar placa incubată peste noapte la 37°C. Sunt semnificative zonele de inhibiție mai lungi de 2 mm pe striul tulpinilor indicatoare (figura 8.2). Interpretarea spectrului de activitate bacteriocinogenă a tulpinii testate se face după scheme standardizate.

Acceași metodă poate fi utilizată și pentru bacteriocinotipic. În acest caz tulpina bacteriocinogenă, cunoscută, este însămânțată în lungul unui diametru al plăcii, iar tulpinile testate perpendicular pe acesta.