

## Bacteriofagul. Caractere morfobiologice. Utilizarea practică a bacteriofagilor



### Proprietatile biologice ale bacteriofagului

- *Bacteriofagi* sunt numite virusurile ce infectează bacteriile. Un virus este un organism (o unitate genetică) care nu are structură celulară, nu posedă metabolism propriu și este capabil să se reproducă doar în celula-gazdă.

- Bacteriofagii sunt paraziți intracelulari obligatorii ale celulelor bacteriene. Toate bacteriile pot fi infectate de către bacteriofagi. În majoritatea cazurilor, un fag anume infectează doar celulele unui singur gen, unei anumite specii sau a unei tulpini - *specificitatea* fagului. Această specificitate de infecție este determinată de prezența receptorilor pentru acest fag la suprafața bacteriei-gazdă.

### Structura bacteriofagului

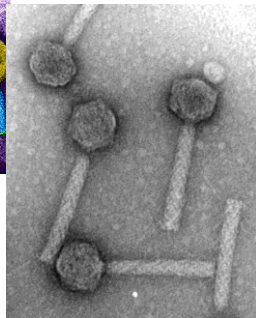
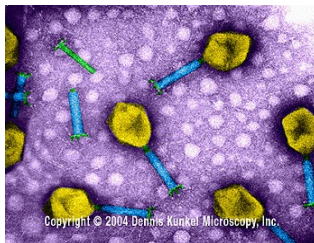
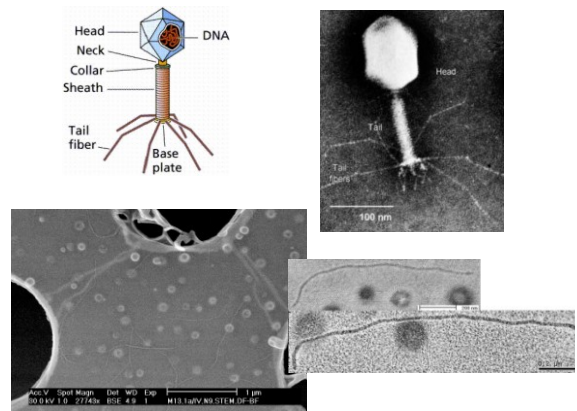
- Structura fagilor corespunde regulilor generale ce se referă la structura virusurilor.
1. *Acid nucleic* (ADN sau ARN, mai frecvent dublucatenar, linear sau circular).
  2. Inveliș proteic numit *capsidă*, cu rol de protecție a materialului genetic. Prin receptorii de la suprafață contribuie la infecția gazdei.
  3. Unii fagi pot conține și *enzime* (ex.: lizozim, endolizina).

- Capsida este constituită din subunități proteice, *capsomere*, aranjate simetric într-o ordine distinctă, conferind forma fagului.

Există 3 forme morfologice principale de fagi:

- *Fag icosaedric*: are formă sferică constituită din 20 fețe triunghiulare, 30 muchii și 12 vârfuri (simetrie cubică a capsidei).
- *Fag cilindric*: reprezintă bastonașe proteice formate din capsomere, asamblate într-o structură tubulară (simetrie helicoidală a capsidei).

- **Fag complex:** este constituit din *cap icosaedric* atașat la o *coadă helicoidală*. Coada este formată din două tuburi concentrice, un tub intern rigid - *canalul axial*, care este înconjurat de *teaca cozii*, un manșon contractil. *Gulerul cozii* (colul) se află la joncțiunea capului cu coada. La partea distală a cozii se află o placă hexagonală, *placa bazală*, la fiecare apex fiind ancorate câte un *croșet* și o *fibră*. Ele reprezintă sistemul de fixare a fagului pe bacteria receptoare și contribuie la injecția materialului genetic în celulă.
- Nu toți fagii au o astfel de morfologie. Unii au coadă lungă și non-contractilă, alții - coada scurtă, sau fără coadă. Există și fagi filamentoși.

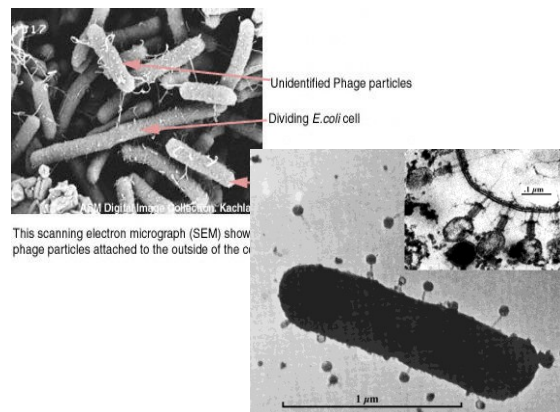
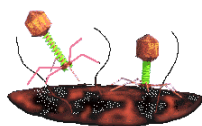


#### Interacțiunea dintre bacteriofag și celula-gazdă

- Bacteriofagii există în stare de **virioni** extracelulari, iar la infectarea unei bacterii ei pot duce la două tipuri de infecții:
  - **Infecție litică:** determinată de **fagii virulenți**. La finele ciclului de multiplicare bacteria infectată este lizată eliberând fagii nou-formați.
  - **Infecție nelitică sau lizogenă:** determinată de **fagii temperați (moderați)**. Ei infectează bacteriile fără a le distruge.

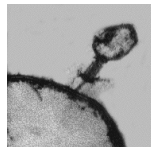
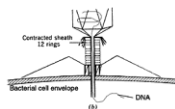
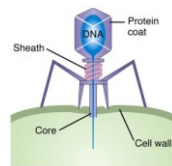
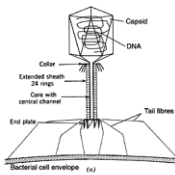
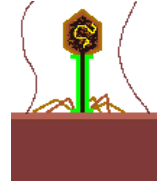
#### INFECTIA LITICĂ (ciclul biologic al fagului virulent)

- **Adsorbția.** După o ciocnire întâmplătoare, fagul se fixează prin intermediul plăcii bazale (la început prin fibrele sale, apoi prin croșete) de un receptor specific la nivelul peretelui celular bacterian (uneori flageli sau pili).



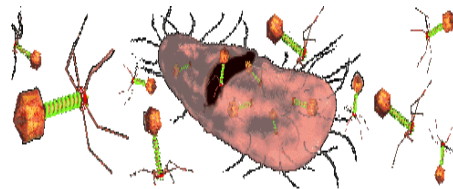


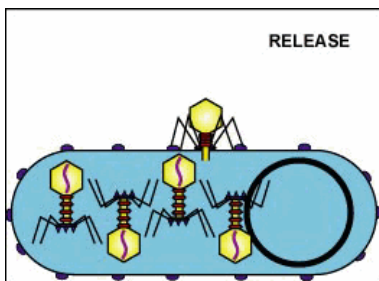
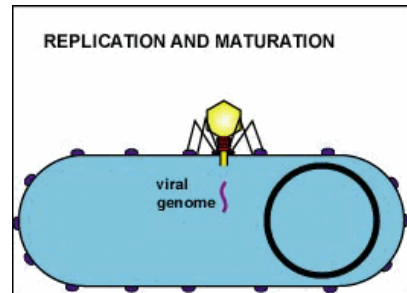
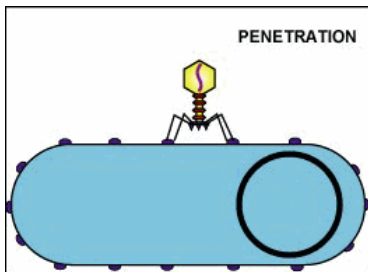
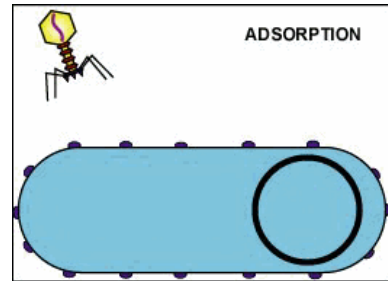
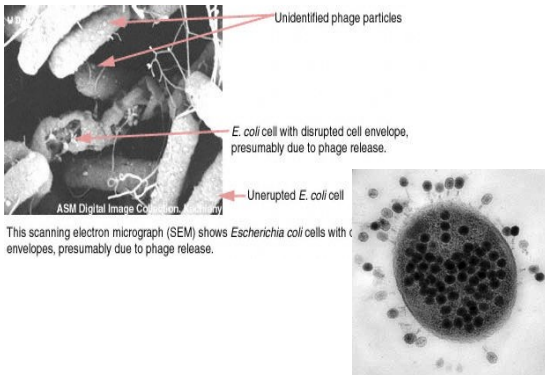
- **Penetrarea.** După fixarea ireversibilă a fagului pe peretele bacterian, în urma acțiunii unei enzime (ex. lizozim) care perforază peretele, are loc contracția manșonului care apropie capul de placa bazală, canalul axial penetrează membrana citoplasmică a bacteriei și ADN fagic este injectat în bacterie.



- **Expresia genomului viral (biosinteza componentelor fagice, maturizarea).** După penetrarea ADN viral în bacterie (**fag vegetativ**), timp de aproximativ 12 minute, virionul nu este depistat în bacteria infectată. Aceasta este *faza de eclipsă*. Ea coincide cu sinteza enzimelor virale care vor asigura ulterior:
  - replicarea ADN fagic;
  - sinteza proteinelor fagice;
  - asamblarea acestor elemente.

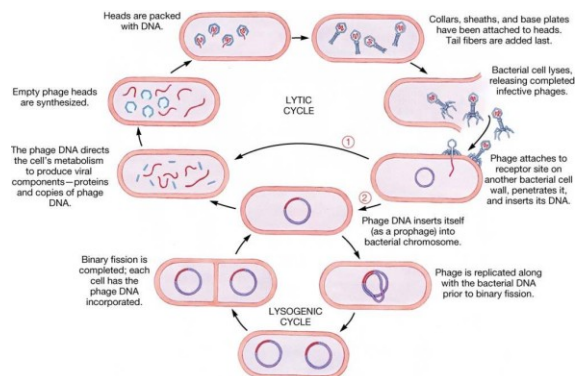
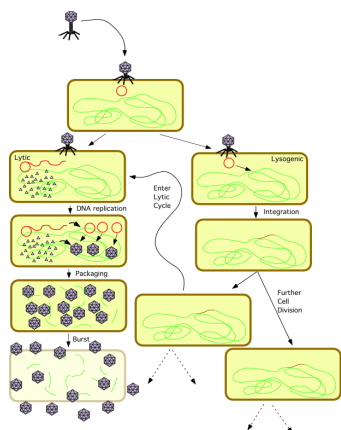
- **Asamblarea fagilor.** Odată ce compușii capsidici și acizii nucleici se sintetizează în cantități suficiente, are loc asamblarea spontană a particulelor noi de fagi, prin incorporarea acidului nucleic în capsidă.
- **Eliberarea.** Majoritatea fagilor, după maturizare, sunt eliberați în urma lizei peretelui bacterian cu enzime ale bacteriofagului (endolizina)
- Timpul dintre infecție și eliberare (*ciclul de reproducere*) este de 20-60 minute la 37°C, fagi sunt eliberați în valuri de 50-1000 fagi per celulă.





#### INFECTIA NON LITICĂ SAU LIZOGENĂ : FAGII TEMPERAȚI

- **Fagii temperați (moderați)** atunci când infectează o bacterie pot:
    - sau induce un ciclu complet de multiplicare, ce duce la *liza bacteriei*,
    - sau, mai frecvent, după injectarea ADN-ului, să integreze acest ADN în cromozomul bacterian prin recombinare specifică, formând un **profag** (lizogenizare)
    - sau să rămână în citoplasmă sub formă de *plasmidă*.
- În ultimele două cazuri bacteria nu moare și, multiplicându-se, replică genomul viral concomitent cu propriul său genom: bacteria (cultura) este numită *lizogenă*. Ea posedă și transmite descendenților capacitatea de a produce fagi în absența infecției.



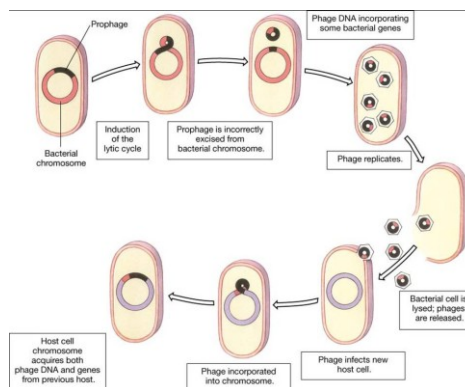
### Proprietățile culturilor lizogene

1. **Inducția ciclului litic.** Profagul păstrează virulența potențială. Menținerea stării de lizogenie implică sinteza unui represor proteic, codificat de fag. Dispariția lui duce la *inducția ciclului litic*. Inducția se poate declanșa spontan la un număr limitat de celule sau poate fi provocată la majoritatea celulelor, de ex., la acțiunea unor mutageni, ca razele ultraviolete sau mitomicina C.

Ca urmare, când sistemul SOS este activat, proteina **RecA** scindează represorul proteic al fagului, permițând expresia ciclului litic. Pentru aceasta profagul trebuie să fie *excizat* - operație inversă integrării. Excizia este efectuată de către proteina **xis**, codificată de fag. Urmează replicarea genomului, sinteza componentelor fagului și fagii asamblați sunt eliberați prin liza celulei (*profagul - genă potențial letală!*).

În timpul replicării fagului moderat fragmente de ADN bacterian pot fi introduse din eroare în particulele virale. Acești fagi pot în continuare introduce în cromosomul altor bacterii ADN bacterian capturat – proces de transfer genetic numit *transducție*.

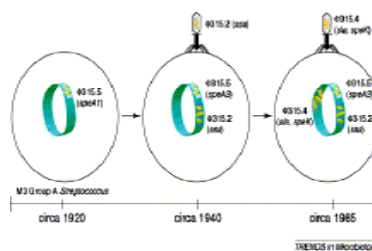
Natura genelor bacteriene transferate poate fi diferită: gene din apropierea locului de inserție a fagului (*transducție specifică*) sau fragmente de ADN bacterian introduse din întâmplare în capsida fagului (*transducție generalizată*)



2. **Imunitate contra suprainfectiei.** Bacteriile lizogene sunt imune la fagul virulent omolog profagului găzduit. Acest fag se adsoarbe, injectează ADNul, dar fără a se replica sau provoca liza.

3. **Conversie fagică** (modificarea fenotipului celulei cauzată de genele profagului).

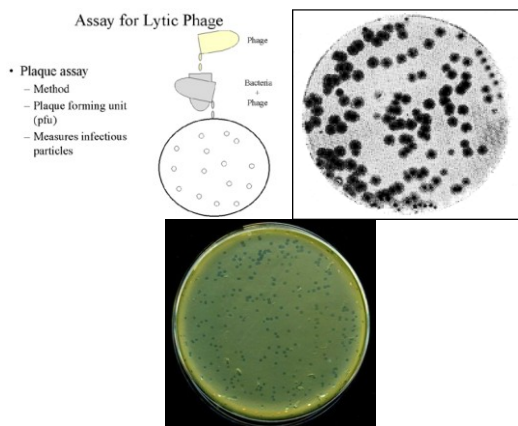
Bacteriile infectate cu un fag pot prezenta unele caractere absente la celulele neinfectate. Această *conversie fagică* poate fi cauzată de expresia unor gene ale fagului de către celule, sau de inactivarea unor gene cromozomale la integrarea profagului. De ex., tulpinile de *Corynebacterium diphtheriae* care provoacă difteria sunt lizogenizate de un anumit tip de fagi care codează și exprimă o toxină puternică; toxina eritrogenă a *Streptococcus pyogenes*, etc



#### Cultura și titrarea bacteriofagilor. Efectul fagilor virulenți asupra culturilor bacteriene

- Bacteriofagii sunt cultivați în laborator în mediu de cultură lichid sau solid în prezența bacteriilor omologe.
- Cultivarea în mediu lichid:** Bacteriile sensibile și fagii se introduc într-un bulion nutritiv (numărul de fagi este mult mai mic decât al bacteriilor). Amestecul este incubat pentru a permite bacteriilor să se multiplie și de a fi infectate de către fagi. În consecință, numărul fagilor crește mai rapid decât cel al bacteriilor până la un punct critic când numărul fagilor prezenți este suficient pentru a infecta toate bacteriile culturii. *Toate celulele bacteriene sunt lizate în același timp, ce duce la dispariția completă a turbidității culturii (clarificarea mediului).*

- Cultivarea fagilor în mediu solid:** Amestecul bacterii-fagi poate fi adăugat la geloză topită și răcită la 45 °C și apoi turnat în cutia Petri. Bacteriile cresc, se multiplică, formând o peliculă fină, iar fagii continuă să infecteze provocând liza confluentă a culturii bacteriene. Aceste "colonii" de fagi se manifestă sub forma unor pete sterile (*plaje*). Numărul plajelor indică numărul fagilor infecțioși în prelevat (fiecare colonie se formează pe contul multiplicării unui virion fagic).



- Bacteriofagii pot fi întâlniți în diferite prelevate umane sau din mediul extern. **Fagii indică prezența bacteriilor sensibile.**

#### IZOLAREA BACTERIOFAGILOR

Prelevate: apă, sol, materii fecale, puroi, etc

- Izolarea directă** – filtrarea prelevatelor prin filtre bacteriene, ultracentrifugare.
- Izolarea prin metoda de îmbogățire fără însămânțare** – materialul de examinat se inoculează într-un mediu nutritiv lichid (pentru multiplicarea bacteriilor omologe fagului căutat). Peste 10 ore de incubare la 37 °C bulionul este supus filtrării. În filtrat s-au acumulat fagii care s-au înmulțit pe contul bacteriilor omologe din prelevat.



**III. Izolare prin metoda de îmbogățire cu însămânțare** – inocularea prelevatului într-o suspensie bacteriană omologă fagului căutat. Cultura bacteriană asigură îmbogățirea fagilor. Peste 10 ore de incubare la 37 °C bulionul este supus filtrării.

## 2. Metoda FURT

Filtratul ce conține fagi se amestecă cu geloză topită și se toarnă în cutia Petri. Suprafața cutiei se împarte în 4 sectoare. În fiecare sector se însămânțează în striuri culturi cunoscute de diferite bacterii. Incubare la 37 °C 24 ore.

*Aprecierea:* lipsa creșterii bacteriilor într-un sector indică prezența fagului omolog.

## • TITRAREA BACTERIOFAGILOR

Este utilizată pentru determinarea numărului de fagi virulenți în prelevat sau cultură.

### Metodele de titrare a bacteriofagului

- I. Titrarea bacteriofagului în mediu lichid (metoda Appelman)
- II. Titrarea bacteriofagului în mediu solid (metoda Gratia)

## INDICAREA BACTERIOFAGILOR

1. **Metoda OTTO.** Pe placa de geloză din cutia Petri se însămânțează în gazon suspensia de bacterii omologe fagului. În continuare se aplică o picătură de filtrat care conține fag (cutia poate fi înclinată ca picătura să se prelingă). Cutia se incubează la 37 °C timp de 24 ore.

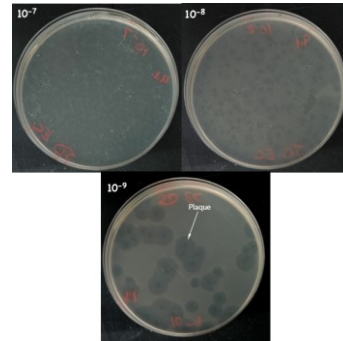
*Aprecierea:* dacă în filtrat se aflau fagi omologi culturii bacteriene, în locul aplicării filtratului se observă o zonă de liză (colonie negativă de fag).

## 3. Metoda FISHER

Similară cu metoda Furt, doar că suprafața cutiei se împarte în 10 cadrane, astfel pot fi însămânțate 10 culturi bacteriene și pot fi indicați concomitent mai mulți fagi.

- **APPELMAN** – la diluții logaritmice a culturii de fag ( $10^{-1}$ ..... $10^{-10}$ ) în bulion peptonat se adaugă suspensie bacteriană omologă fagului examinat. După 24 ore de incubare la 37 °C se apreciază **titrul fagului:** *diluția maximă a fagului care încă mai provoacă liza bacteriilor (mediu clar).*

- **GRATIA.** După diluția logaritmică a fagului și adăugarea culturii bacteriene, conținutul fiecărui tub se amestecă cu geloză topită și amestecul se toarnă în cutii Petri. După 24 ore de incubare la 37 °C se numără plajele formate (coloniile negative de fagi). Numărul plajelor corespunde cu nr de fagi virulenți din materialul de examinat.



#### APLICAREA PRACTICĂ A FAGILOR

##### În domeniul *terapeutic*

- Tratatamentul și profilaxia bolilor infecțioase

##### În domeniul *diagnostic*

- *Fago-identificarea* – identificarea tulpinilor bacteriene necunoscute cu ajutorul fagilor omologi (metoda Otto, Furt, etc)

- *Lizotipizarea* (fagotipajul). Permite diferențierea unor tulpini din cadrul aceleiași specii (subdivizarea speciei în lizotipuri/fagovaruri). Este utilizat pentru tulpini de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*, ș.a. Lizotipul reprezintă un marker epidemiologic.

**Fagii reprezintă un model de studiu pentru geneticieni, fagii temperați se utilizează în ingineria genetică (ei pot asigura transferul de material genetic prin transducție).**



#### Genetica bacteriană.

##### Variabilitatea genetică la bacterii

Materialul genetic al celulei bacteriene:

1. Cromosomul
2. Plasmidele

Modificarea patrimoniului genetic al bacteriilor are importanță majoră în bacteriologia medicală, deoarece ea poate cauza modificări în potențialul patogen al bacteriilor sau sensibilitatea lor la antibiotice.



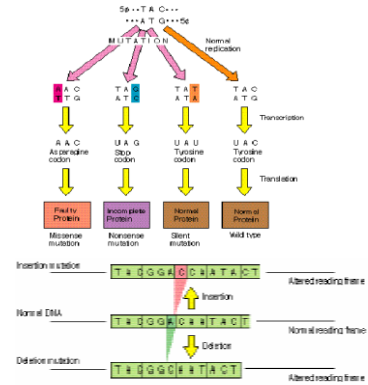
## Mecanismele variabilității genetice la bacterii:

### I. MUTAȚII

1. Substituiția unei nucleotide cu alta în timpul replicării ADN
2. Deleția, inserția sau inversarea unor nucleotide într-o genă

Frecvența mutațiilor –  $10^{-6}$  –  $10^{-10}$  pentru un caracter anumit.

Modificările determinate de mutații (ex.: rezistența la AB) se transmit la descendenți (transmitere verticală). Unele mutații pot fi reversibile



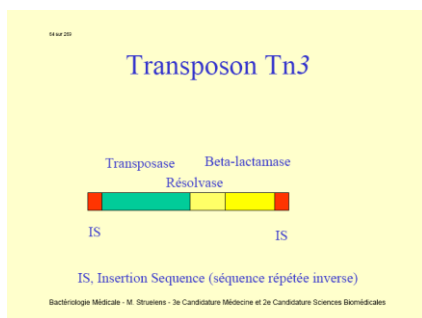
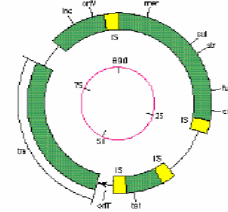
### II. RECOMBINAREA

1. Recombinarea generalizată (schimb de ADN între 2 secvențe corespunzătoare)
2. Recombinarea specifică (integrarea sau excizia unei secvențe de ADN, ex: plasmidă, bacteriofag)
3. Transpoziția

Elementele transpozabile reprezintă secvențe de ADN cu lungime variabilă, flancate de secvențe repetate inversate. Împerecherea acestor secvențe permite excizia lor și reînserarea în alt loc al cromosomului sau plasmidei. Unele elemente, numite transpozoni, conțin gene suplimentare (frecvent gene de rezistență la AB)

Transpoziția duce la rearanjamente genomice. Unii transpozoni, numiți conjugativi, au capacitatea de a trece de la o bacterie la alta.

**Importanța practică:** numeroase gene de rezistență la AB sunt situate pe transpozoni, ce permite răspândirea lor. Transpozonii pot trece de la cromosom la plasmidă și ulterior la alte bacterii prin conjugare. Transpozonii conjugativi pot trece direct la altă bacterie

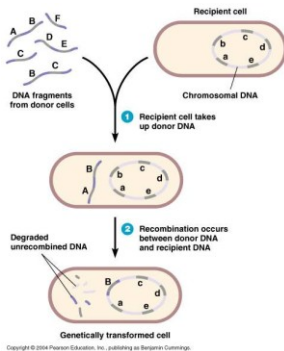
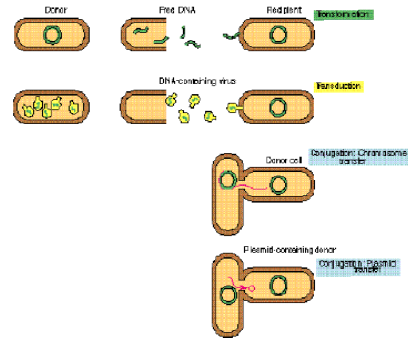
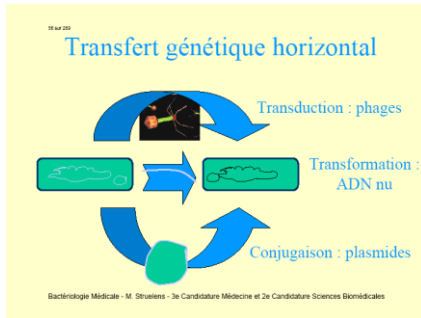


### III. TRANSFERUL DE MATERIAL GENETIC

Materialul genetic poate fi transferat de la o bacterie la alta (transmitere orizontală). Trei mecanisme de transfer sunt posibile:

#### A. Transformarea

Fragmente de ADN (eliberate în urma lizei bacteriene) pot penetra în alte bacterii și se pot integra prin recombinare în ADN-ul lor. Este necesar ca bacteria care acceptă materialul genetic să se afle într-o stare particulară, de competență. Transformarea se poate realiza doar în cadrul bacteriilor de aceeași specie sau din specii înrudite



### B. Transducția

Transferul de material genetic se realizează prin intermediul bacteriofagilor moderati. În momentul exciziei profagului din cromosomul bacterian el devine virulent, multiplicându-se și lizând bacteria gazdă. În cursul acestui proces fragmente de ADN bacterian pot fi introduse din eroare în particulele virale, care la rândul lor se pot integra prin recombinare în cromosomul altei bacterii – acest proces reprezintă transducția.

Transducția poate fi specializată și generalizată

### C. Conjugarea

Mecanismul cel mai frecvent în natură. Este un transfer de ADN (plasmide conjugative) de la o bacterie donor către o bacterie receptor. Bacteria donor exprimă pe suprafața sa structuri ce permit contactul dintre celule (pili F). În timpul conjugării plasmida se replică și o copie trece prin intermediul pilului F în bacteria receptor. Transferul se efectuează între bacteriile de aceeași specie, dar și între specii diferite. Multiple gene de rezistență la AB sunt localizate în plasmide și prin conjugare se asigură caracterul epidemic al rezistenței la AB.

Plasmida conjugativă poate asigura transferul unei plasmide neconjugative sau al unor gene cromosomale (prin integrarea plasmidei în cromosom)

