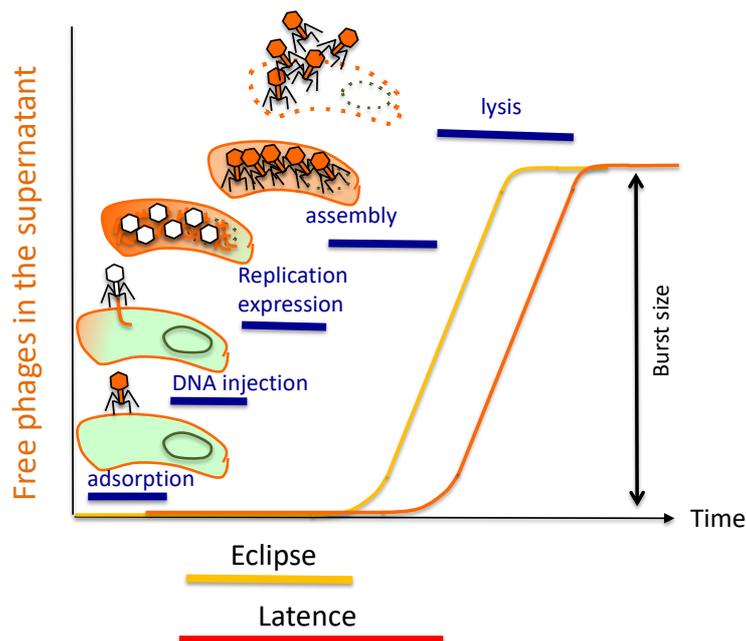


DINÁMICA DE LA INFECCIÓN Y EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DE LA PROGENIE

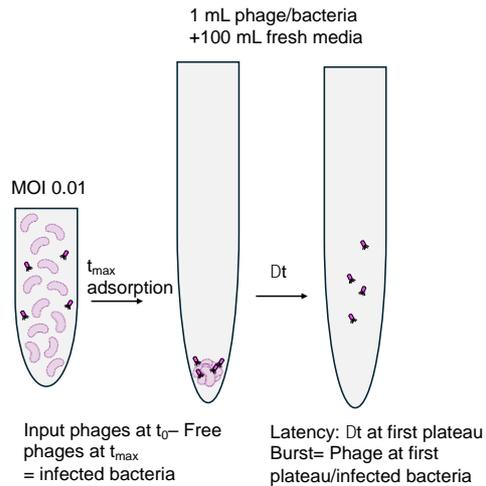
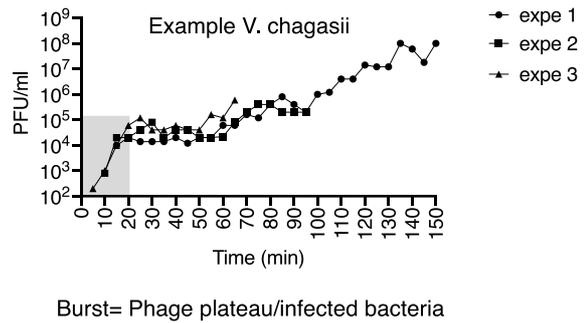
Introducción

La infección por fagos comprende una etapa extracelular (adsorción a un receptor específico) y una etapa intracelular (inyección de ADN en el citoplasma, secuestro de la maquinaria celular para la expresión génica viral y la replicación del ADN, encapsulación del ADN viral, ensamblaje de cabeza y cola, lisis de la célula para la liberación de progenie). El protocolo para determinar la dinámica de adsorción se presenta en una hoja de datos separada. Aquí utilizamos un método simplificado para evaluar el tiempo de latencia y el tamaño de la progenie liberada por una sola célula (tamaño del estallido) (Figura debajo).



El fago se coloca en presencia de bacterias a una baja MOI (0.01) para evitar la superinfección. El control de entrada (en PFU/mL) corresponde a la misma cantidad de fago en medio sin bacterias. Se incuba el tiempo requerido para la máxima adsorción (previamente determinado), y se cuantifica la presencia de fago libre, es decir, el control de fago libre (PFU/mL). Control de entrada - control de fago libre = concentración de fago adsorbido = concentración de bacterias infectadas (CFU/mL).

Las bacterias se centrifugan para eliminar el exceso de fago no adsorbido, y las células se resuspenden en un volumen grande de medio fresco (100X), esta vez incubado con agitación suave, y se toma una alícuota (1 mL) en intervalos de tiempo regulares. Cada alícuota se centrifuga, se recupera el sobrenadante y se filtra o se complementa con cloroformo al 10%. Luego se titulan los fagos libres. El número de partículas liberadas en el sobrenadante aumenta hasta alcanzar una fase de plateau inicial (= tiempo de latencia, 15 minutos en la figura). El número de PFU/mL obtenido en el plateau dividido por el número de células infectadas/mL = tamaño del estallido.

Método**Resultados****Materials**

- Bacteria hospedadora
- Fagos de interés
- Marine Broth (MB) filtrado con 0.2mM para eliminar agregados
- Erlenmeyers (control fago solo; bacteria+ fagos a una MOI de 0.01 teórica)
- Tubos Eppendorf 1.5mL etiquetados
- Placa de petri mediana con Marine agar (MA) para titular la bacteria hospedadora
- Placa de Petri grande con MA para titular los fagos
- Top agar en MB (0.2% para los fagos schizo; 0.4% para el resto de los fagos)
- Cloroformo

Método**Día -1**

- Lanzar un cultivo bacteriano en 5mL de Marine Broth (MB), ON, 20°C agitación suave (100 rpm).

Día 0

- Diluir el cultivo bacteriano inicial a 1/100 en 10 mL de MB en un Erlenmeyer.
- Cuando la suspensión bacteriana haya alcanzado una DO 0.3, tomar 100 ul del cultivo y hacer diluciones límite (10^{-1} a 10^{-8}) y poner una gota de 5ul de cada dilución en agar MA => esto te dará la confirmación de las CFU/mL.
- Poner 5 mL de la suspensión bacteriana a DO 0,3 en un Erlenmeyer pequeño or un tubo de vidrio.
- Para el control de input, poner 5mL de medio MB en el mismo tipo de contenedor.
- A la suspensión bacteriana, agregar X μ L del fago para tener una MOI 0.01.
- Poner el mismo volumen de los fagos en el control de input. Mezclar y dejar reposar a 20°C hasta el final del experimento.
- A t_{\max} absorción, tomar 1 mL de la suspensión bacteriana+fagos y centrifugar a 6000 rpm por 5 min.
- Obtener el sobrenadante=> este será el **control de los fagos libres** (del sobrenadante después de la adsorción), agregar 100 μ L de cloroformo, vortex y guardar a 4°C.
- Resuspender el pellet en 1mL de medio MB fresco y en un Erlenmeyer agregar MB fresco, cantidad necesaria para hacer 100ml, incubar en agitación suave (100 rpm) a 20°C.

- Cada 10 min, tomar 1 ml del cultivo, centrifugar, y obtener el sobrenadante en un tubo Eppendorf, agregar 100uL de cloroformo, vortex, y guardar a 4°C hasta la titulación del fago.
- Al final del experimento, tomar 1 mL del control de input, y agregar 100ul de cloroformo.
- Centrifugar los tubos del control de input, del control de los fagos libres y los tubos de la cinética por 5min a 13 000 rpm.
- Tomar 100 µl del sobrenadante para una dilución limite en una placa de 96 pocillos (pura a 10⁻⁷).
- Poner 5ul de cada dilución en un césped bacteriano en top agar.

Tips importantes!

- Existe la teoría y la realidad. Algunos fagos producen un excelente título utilizando el método de "alta concentración" y placas grandes, sin embargo, muestran un pequeño estallido (10) en la primera placa (por ejemplo, el fago P115 de *V. chagasii*). De hecho, parece que el crecimiento del fago ocurre en varios plateaus de infección mediante progenies sucesivas en células no infectadas, lo que permite obtener dos registros más de fagos después de unas pocas horas.

- Para algunos fagos, no se observa un plateau, y la multiplicación del fago requiere al menos 6 horas de infección.

- Aquí también, la noción de baja MOI varía de fago a fago. Algunos requieren trabajar con una MOI <0.001.

Referencias

Zurabov and Zhilenkov *Virology* (2021) 18:9 Characterization of four virulent *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation.

Para la técnica Gold, que es muy pesada (por lo tanto, no adecuada para un gran número de fagos): Martha R.J. Clokie et al. (eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 3, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1681, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_3, © Springer Science+Business Media LLC 2018