



**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Fernanda de Campos Moreli

**Isolamento, caracterização, estabilização
estrutural/funcional e avaliação *in vitro*, de um novo
bacteriófago contra *Klebsiella pneumoniae*
multirresistentes**

**Sorocaba/SP
2020**

Fernanda de Campos Moreli

**Isolamento, caracterização, estabilização
estrutural/funcional e avaliação *in vitro*, de um novo
bacteriófago contra *Klebsiella pneumoniae*
multirresistentes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão
Coorientadora: Prof.^a Doutora Marta Maria Duarte Carvalho Vila

**Sorocaba/SP
2020**

Ficha Catalográfica

M84i Moreli, Fernanda de Campos
Isolamento, caracterização, estabilização estrutural/funcional e avaliação *in vitro*, de um novo bacteriófago contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes / Fernanda de Campos Moreli. -- 2020.
123 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão.
Co-orientador: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2020.

1. Bacteriófagos. 2. Drogas - Resistência em micro-organismos. 3. Bactérias patogênicas. 4. Bactérias – Química. I. Balcão, Victor Manuel Cardoso Figueiredo, orient. II. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho, co-orient.. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Elaborada por Maria Carla P. F. Gonçalves – CRB-8/6721

Fernanda de Campos Moreli

**Isolamento, caracterização, estabilização
estrutural/funcional e avaliação *in vitro*, de um novo
bacteriófago contra *Klebsiella pneumoniae*
multirresistentes**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

Ass.

Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão
Universidade de Sorocaba

Ass.

Prof. Dr. Fernando Sá Del Fiol
Universidade de Sorocaba

Ass.

Prof. Dr. Fábio Márcio Squina
Universidade de Sorocaba

DEDICATÓRIA

“À minha mãe, Maria Teresa (*in memoriam*), a razão da minha paixão pela ciência.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade que colocou em meu caminho.

À minha família, por todo o apoio, obrigada a todos pelo carinho e paciência! Em especial ao meu irmão, Fernando de Campos Moreli, ao meu pai José Fernandes Moreli, muito disso só foi possível pelo apoio de todos.

À pessoa com quem escolhi dividir a minha vida, Evandro Vinicius Almeida, meu amor, pelo incentivo e admiração durante todo o processo.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Victor Manuel Balcão e coorientadora, Profa. Dra. Marta Maria Vila, pelo privilégio da orientação, bem como pela atenção e paciência dispensados a mim.

Às minhas amigas do PhageLab: Welida Campos, Liliam Harada, Erica dos Santos Silva, Thaís Jardim que compartilharam dessa experiência única com conselhos, críticas construtivas, otimismo, trabalho em equipe e confraternizações, mas que nos momentos de sufoco também souberam ser solidárias e companheiras. Aos colegas da UNISO, Denicésar Baldo (LaBNUS), Mestre Valéria Orsi, Rosenéia (Laboratório de Química), e a todos os demais que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho, mas que não foram nominalmente citados.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

À Universidade de Sorocaba, pela bolsa Auxílio Taxa escolar do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (Prosuc-Capes/Uniso). Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A todas as outras pessoas que não mencionei nominalmente, mas que deram a sua importante contribuição para o meu trabalho de pesquisa. Muito obrigada!

A Charles Darwin, à Marie Curie e a Felix d'Herelle.

“Seja um estudante enquanto você tiver algo a aprender, ou seja, por toda a vida.”

Henry L. Doherty, 15.05.1870 - 26.12.1939.

RESUMO

Os bacteriófagos são vírus que infectam única e especificamente bactérias, sendo totalmente desprovidos de atividade metabólica. Ao contrário dos agentes antibióticos de amplo espectro, que funcionam indiscriminadamente, os bacteriófagos visam especificamente apenas certas espécies/cepas de bactérias, e é precisamente esta especificidade que torna os bacteriófagos muito atrativos para o combate de infecções por bactérias multirresistentes aos antibióticos. O trabalho de pesquisa desenvolvido objetivou o isolamento (a partir de fontes ambientais) e caracterização de um novo bacteriófago com amplo espectro lítico capaz de infectar *Klebsiella pneumoniae*. Foram utilizadas fontes de esgoto hospitalar na região de Sorocaba (Brasil), para a pesquisa e isolamento de bacteriófagos líticos. A caracterização físico-química das partículas bacteriofágicas isoladas incluiu análises via verificação de lise bacteriana (em cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos, provenientes de isolados clínicos), varredura espectral UV-Vis para determinação do coeficiente de extinção molar das partículas fágicas, DRX, eletroforese SDS-PAGE e MET, enquanto a caracterização biológica abrangeu a avaliação da sua gama de hospedeiros usando culturas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* tanto provenientes de coleção como de 26 isolados clínicos (humanos) assim como de outras espécies bacterianas provenientes de coleção, determinação da eficiência de plaqueamento (EOP), determinação da curva de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC) para cálculo do período latente, período de eclipse, período de acumulação intracelular e tamanho de explosão, determinação da curva de adsorção para cálculo da taxa de adsorção das partículas bacteriofágicas em sua célula hospedeira bacteriana, e avaliação da capacidade de inativação bacteriana *in vitro* pelas partículas fágicas utilizando valores de MOI de 1 e 1000. As partículas do bacteriófago isolado exibiram um amplo espectro lítico contra as cepas multirresistentes da bactéria em estudo. O uso do bacteriófago isolado possui vantagens inerentes pelo fato de ser um predador bacteriano natural, específico e estritamente lítico, que reconhece rápida e especificamente seu hospedeiro bacteriano, o que leva a um resultado cada vez mais difícil de obter com os antibióticos químicos atuais.

Palavras-chave: bacteriófagos, resistência bacteriana aos antibióticos, caracterização de bacteriófagos, bactérias patogênicas ESKAPE

ABSTRACT

Bacteriophages are viruses that solely and specifically infect bacteria and are completely devoid of metabolic activity. Unlike broad-spectrum antimicrobial agents, which work indiscriminately, bacteriophages specifically target only certain species / strains of bacteria, and it is precisely this specificity that makes bacteriophages very attractive for combating infections by multi-drug resistant bacteria. In the research effort entertained herein, the isolation (from environmental sources) and characterization of a novel bacteriophage with broad lytic spectrum capable of infecting *Klebsiella pneumoniae* was entailed, departing from Hospital sewage in the region of Sorocaba (Brazil). Physicochemical characterization of the isolated bacteriophage particles included analysis via verification of (antibiotic-resistant) bacterial lysis, UV-Vis spectral scanning's for molar extinction coefficient determination, XRD, SDS-PAGE electrophoresis and TEM, whereas biological characterization encompassed evaluation of its host range using both a collection strain of *Klebsiella pneumoniae* and 26 strains originating from (human) clinical isolates, efficiency of plating assays, determination of the one-step growth curve (OSGC) for latent period, eclipse period, intracellular accumulation period and burst size determinations, determination of the adsorption curve for calculation of the bacteriophage adsorption rate onto its bacterial host cell, and evaluation of the *in vitro* bacterial inactivation ability of the phage particles at two different MOI values, viz. 1 and 1000. The isolated bacteriophage particles exhibited a broad lytic spectrum against the multidrug-resistant strains tested. The use of the isolated bacteriophage in Hospital settings would possess inherent advantages in that specific and strictly lytic bacteriophages are natural self-replicating predators of bacteria that quickly and specifically recognize their particular bacterial hosts and lead to their death, an outcome more and more difficult to achieve with current chemical antibiotics.

Keywords: bacteriophages, bacterial resistance to antibiotics, bacteriophage characterization, pathogenic ESKAPE bacteria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido.	23
Figura 2.	Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos, ilustrados numa bactéria Gram-negativa.	27
Figura 3.	Representação esquemática de uma partícula bacteriófágica (a) , e fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão de um bacteriófago prototípico para fins de observação de estrutura geral (b) .	34
Figura 4.	Classificação dos bacteriófagos de acordo com a sua morfologia, material genético e principais características.	35
Figura 5.	Ciclos lítico, lisogênico e pseudolisogênico de replicação bacteriófágica (a) , e detalhe do ciclo lítico e seu sistema enzimático (b) .	37
Figura 6.	Fenômenos que ocorrem durante o espaço temporal de um ciclo lítico de replicação de uma partícula bacteriófágica numa célula bacteriana hospedeira.	39
Figura 7.	Curva de crescimento da bactéria <i>Klebsiella pneumoniae</i> de coleção (CEFAR CCCD-K001).	66
Figura 8.	Resultados obtidos no ensaio de <i>spot test</i> da amostra ambiental (água residual do Hospital UNIMED "Miguel Soeiro" em Sorocaba/SP) enriquecida num tapete bacteriano de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de coleção (CEFAR CCCD-K001), para verificação da presença de bacteriófagos.	68
Figura 9.	Resultados obtidos a partir da estriagem da amostra de esgoto Hospitalar (Hospital UNIMED "Miguel Soeiro", Sorocaba/SP, Brasil) enriquecida em bacteriófagos, mostrando a morfologia das placas fágicas produzidas. A partir da estriagem, foi selecionada uma placa fágica isolada e	69

designada como PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031.

- Figura 10. Varredura espectral na zona UV-Vis do espectro, da suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031. 71
- Figura 11. Curva de calibração produzida para a relação entre a concentração de partículas bacteriofágicas inteiras em suspensão e a absorção da suspensão a 255 nm corrigida para debris celulares e outras proteínas intracitoplasmáticas ao comprimento de onda de 320 nm, para o fago isolado PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, permitindo determinar o seu coeficiente de extinção molar. 73
- Figura 12. Resultados da análise proteômica efetuada ao fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031. As proteínas estruturais do bacteriófago foram separadas por eletroforese SDS-PAGE e visualizadas com Coomassie Brilliant Blue G-250 (lane Ph31). Os marcadores de peso molecular (lane M) foram *Pre-stained Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-RAD, California CA, E.U.A.). 74
- Figura 13. Difratoograma de raios-X (DRX) de uma amostra da suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031. 77
- Figura 14. Fotomicrografias de MET de coloração negativa da suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 a diferentes ampliações: (**a**: x100000; **b**: x215600). 79
- Figura 15. Resultados positivos obtidos no *spot-test* do fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 na cepa hospedeira de coleção *Klebsiella pneumoniae* CCCD-K001 e nas 11 cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos humanos. 82
- Figura 16. Curva de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC) do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 na presença de 86

Klebsiella pneumoniae CCCD - K001 como hospedeiro. Os valores representam a média de três ensaios independentes; as barras de erro representam o desvio-padrão.

Figura 17. Curva de adsorção do bacteriófago isolado PhL_UNISO_KP- 88
CFR_ph0031 às células hospedeiras de *Klebsiella pneumoniae* CCCD - K001, permitindo o cálculo da taxa de adsorção das partículas fágicas após ajuste não linear de uma função logarítmica aos dados experimentais. Os valores representam a média de três ensaios independentes; as barras de erro representam o desvio-padrão.

Figura 18. Resultados dos antibiogramas realizados às cepas de 92
Klebsiella pneumoniae provenientes de isolados clínicos humanos e espectro lítico do bacteriófago isolado, após aplicação de discos dos antibióticos meropenem, imipenem, cefepime e polimixina B e gotas de 10 µL da suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031: **(a)** cepa 1 de swab anal, **(b)** cepa 2 de urina, **(c)** cepa 3 de urina, **(d)** cepa 4 de swab anal, **(e)** cepa 5 de urina, **(f)** cepa 6 de urina, **(g)** cepa 7 de urina, **(h)** cepa 8 de swab anal, **(i)** cepa 9 de swab anal, **(j)** cepa 10 de swab anal, **(k)** cepa 12 de secreção de fêmur, **(l)** cepa 13 de urina, **(m)** cepa 14 de urina, **(n)** cepa 15 de hemocultura, **(o)** cepa 16 de ponta de cateter, **(p)** cepa 17 de urina, **(q)** cepa 18 de swab anal, **(r)** cepa 19 de urina, **(s)** cepa 20 de urina, **(t)** cepa 21 de swab anal, **(u)** cepa 22 de urina, **(v)** cepa 23 de swab anal, **(w)** cepa 24 de swab anal, **(x)** cepa 26 de urina, **(y)** cepa 29 de swab anal, **(z)** cepa 30 de swab anal, e **(xx)** cepa de *Klebsiella pneumoniae* da coleção CEFAR (CCCD - K001).

Figura 19. Inativação da *Klebsiella pneumoniae* pelo bacteriófago 97
PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 e 1000 durante 24 h. **(a)** Concentração de bactéria: BC, controle de bactéria; BP, bactéria mais fago; **(b)**

Concentração de fago: PC, controle de fago; BP, bactéria mais fago. Os valores representam a média de três ensaios independentes; as barras de erro representam o desvio-padrão.

Figura 20. Diferença entre a inativação a MOI 1000 e a inativação a MOI 99 1, de *Klebsiella pneumoniae* pelo fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, durante 24 h.

Figura 21. Resultados obtidos nas tentativas de imortalização das 100 partículas do fago isolado PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, após determinação do título fágico nas várias condições usando tapetes bacterianos de *Klebsiella pneumoniae*, pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada. **(a)** Bacteriófago + goma de alfarroba + alginato de sódio + água ultrapura; **(b)** Bacteriófago + goma de alfarroba + alginato de sódio + trehalose + água ultrapura; **(c)** Bacteriófago + goma de alfarroba + glicerol; **(d)** Bacteriófago + goma de alfarroba + trehalose + glicerol.

LISTA DE QUADROS E TABELA

Quadro 1.	Dados utilizados para preparar uma curva de calibração com o objetivo de determinar o coeficiente de extinção molar das partículas inteiras do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031.	72
Quadro 2.	Distribuição de pesos moleculares das proteínas estruturais do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031.	75
Quadro 3.	Resultados dos antibiogramas realizados nas 26 estirpes bacterianas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes de isolados clínicos, e da suscetibilidade destas cepas ao bacteriófago isolado.	91
Quadro 4.	Suscetibilidade a antibióticos de uso restrito hospitalar, de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> obtidas de isolados clínicos humanos.	94
Tabela 1	Gama de hospedeiros das partículas fágicas isoladas , determinada em 36 cepas. As cepas provenientes de isolados clínicos estão marcadas com (*). Zona de lise clara(+) e zona sem lise (-). O plaqueamento com cepa hospedeira foi considerado com EOP = 100% (EOP = Eficiência de Plaqueamento).	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
°C	Grau centígrado
cm	Centímetro
CPM 30	Cefepime 30 µg
Cu	Cobre
DME	Diagnóstico Microbiológico Especializado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DRX	Difração de raios-X
dsDNA	DNA de fita dupla
dsRNA	RNA de fita dupla
EOP	Eficiência de plaqueamento
EPS	Exopolissacarídeos
ϵ	Coeficiente de extinção molar
IACG	<i>Ad Hoc Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance</i>
IPM 10	Imipenem 10 µg
kDa	QuiloDaltons
kV	Quilovolts
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
MPM 10	Meropenem 10 µg
MTA-TSB	Meio molten top ágar de TSB

MW	Peso molecular
$M\Omega \cdot \text{cm}$	MiliOhm centímetro (resistividade)
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μS	MicroSiemens
nm	Nanômetro
θ	Ângulo theta
OD	Densidade óptica
ONU	Organização das Nações Unidas
OSGC	Curva de crescimento em um só ciclo síncrono
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PES	Poliétersulfato
pH	Potencial hidrogeniônico
ph31	Bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031
POL 300	Polimixina B 300 μg
PSA	Persulfato de amônio
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
SM	Tampão fágico (mistura de cloreto de S ódio, sulfato de M agnésio e gelatina)
ssDNA	DNA de fita simples
ssRNA	RNA de fita simples
t	Tempo
Temed	Tetrametiletlenodiamina
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias

UFP	Unidades formadoras de placas
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNISO	Universidade de Sorocaba
UV-VIS	Radiação no espectro UltraVioleta-VISível
W	Watts
Δ	Taxa de absorção
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	25
1.1 Introdução	25
1.2 Resistência Microbiana	27
1.3 Bactérias Patogênicas do grupo ESKAPE	29
1.4 Agente Etiológico <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
1.5 Bacteriófagos	32
1.6 Terapia Fágica	40
1.7 Estabilização estrutural e funcional de entidades proteica	42
2 OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
3 JUSTIFICATIVA	46
4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	47
4.1 Material	47
4.1.1 Reagentes e consumíveis	47
4.1.2 Material Biológico	47
4.1.3 Equipamentos analíticos e outros	48
4.2 Métodos	49
4.2.1 Preparação de meios de cultura	49

4.2.2	Preparação das cepas de <i>K. pneumoniae</i> provenientes de isolados clínicos humanos	51
4.2.3	Preparação da curva de crescimento da cepa de coleção de <i>K. pneumoniae</i>	52
4.2.4	Isolamento, amplificação e titulação de partículas bacteriofágicas estritamente líticas para <i>K. pneumoniae</i> .	52
4.2.4.1	Enriquecimento de bacteriófagos a partir da fonte coletada	52
4.2.4.2	Preparação do tapete bacteriano de <i>Klebsiella pneumoniae</i> pela técnica <i>pour plate</i>	53
4.2.4.3	Verificação da presença de bacteriófagos por <i>spot test</i> das amostras enriquecidas	53
4.2.4.4	Isolamento da placa bacteriofágica	54
4.2.4.5	Amplificação do bacteriófago	54
4.2.4.6	Determinação do título bacteriofágico pela técnica de plaqueamento de dupla camada	55
4.2.4.7	Nomenclatura do bacteriófago isolado	56
4.2.5	Caracterização biológica do bacteriófago isolado	56
4.2.5.1	Análise espectrofotométrica por varredura espectral na região UV-Vis	56
4.2.5.2	Análise eletroforética (SDS-PAGE) das proteínas estruturais das partículas bacteriofágicas isoladas	57
4.2.5.3	Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por difração de raios-X (DRX)	58
4.2.5.4	Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	58

4.2.6 Caracterização biológica do bacteriófago isolado	59
4.2.6.1 Gama de hospedeiros das partículas fágicas isoladas: ensaios de <i>spot test</i> e eficiência de plaqueamento (EOP)	59
4.2.6.2 Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)	60
4.2.6.3 Curva de adsorção	61
4.2.6.4 Avaliação da suscetibilidade a antibióticos das várias cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> originárias de isolados clínicos humanos	62
4.2.6.5 Ensaio de terapia fágica <i>in vitro</i> (curvas de morte)	63
4.2.7 Estabilização estrutural / funcional das partículas fágicas	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 Curva de crescimento da cepa de coleção de <i>K. pneumoniae</i>	65
5.2 Isolamento de um bacteriófago lítico para <i>K. pneumoniae</i>	66
5.3 Caracterização físico-química do bacteriófago isolado	69
5.3.1 Análise espectrofotométrica por varredura espectral na região UV-Vis	70
5.3.2 Análise eletroforética (SDS-PAGE) das proteínas estruturais das partículas bacteriofágicas isoladas	72
5.3.3 Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por difração de raios-X (DRX)	75
5.3.4 Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	77
5.4 Caracterização biológica do bacteriófago isolado	78
5.4.1 Título da suspensão fágica	79
5.4.2 Gama de hospedeiros das partículas fágicas isoladas: ensaios de <i>spot test</i> e eficiência de plaqueamento (EOP)	79

5.4.3 Curva de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC)	84
5.4.4 Curva de adsorção	86
5.4.5 Avaliação da suscetibilidade a antibióticos e ao bacteriófago isolado, das várias cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> originárias de isolados clínicos humanos	89
5.4.6 Ensaio de terapia fágica <i>in vitro</i> (curvas de morte)	93
5.4.7 Tentativas de imortalização das partículas bacteriofágicas isoladas e avaliação da manutenção da sua viabilidade ao longo do tempo sob diferentes condições adversas de armazenamento	97
6 CONCLUSÕES	100
7 SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	103
REFERÊNCIAS	105
ANEXOS E APÊNDICES	119

APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa aplicada realizado, intitulado “**Isolamento, caracterização, estabilização estrutural/funcional e avaliação *in vitro* de um novo bacteriófago contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes**”, foi financiado pela Universidade de Sorocaba, com Auxílio/Taxa escolar do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Superior Particulares (Prosuc-Capes/Uniso), concedido à candidata Fernanda de Campos Moreli, tendo sido orientado pelo Prof. Doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão e coorientado pela Profa. Doutora Marta Maria Duarte Carvalho Vila, da Universidade de Sorocaba.

Os bacteriófagos são vírus que infectam única e especificamente bactérias, sendo totalmente desprovidos de atividade metabólica. Ao contrário dos agentes antibacterianos de amplo espectro, que funcionam indiscriminadamente, os bacteriófagos visam especificamente apenas certas espécies/cepas de bactérias, e é precisamente esta especificidade que torna os bacteriófagos muito atrativos para o combate de infecções por bactérias multi-resistentes aos antibióticos. O trabalho de pesquisa aqui apresentado visou o isolamento e caracterização de um bacteriófago estritamente lítico para *Klebsiella pneumoniae*. Para isso, uma amostra de efluente hospitalar (água de esgoto do Hospital UNIMED "Miguel Soeiro" em Sorocaba/SP, Brasil, coletada a 16 de janeiro de 2018) foi inoculada com a bactéria hospedeira para enriquecimento em potenciais bacteriófagos presentes. Após esta etapa de enriquecimento, um bacteriófago foi isolado, amplificado e purificado para posterior caracterização tanto físico-química quanto biológica. A caracterização físico-química das partículas bacteriofágicas isoladas incluiu análise via varredura espectral na zona UV-Vis para determinação do seu coeficiente de extinção molar, difração de raios X (DRX), eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE) e microscopia eletrônica e transmissão (MET), enquanto a caracterização biológica incluiu a avaliação da gama de hospedeiros do bacteriófago isolado usando uma cepa de coleção de *Klebsiella pneumoniae* como hospedeiro e 35 outras cepas bacterianas, determinação da eficiência de plaqueamento (EOP), determinação da curva de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC) para cálculo do período de eclipse, período latente, período de acumulação intracelular e tamanho de explosão, e

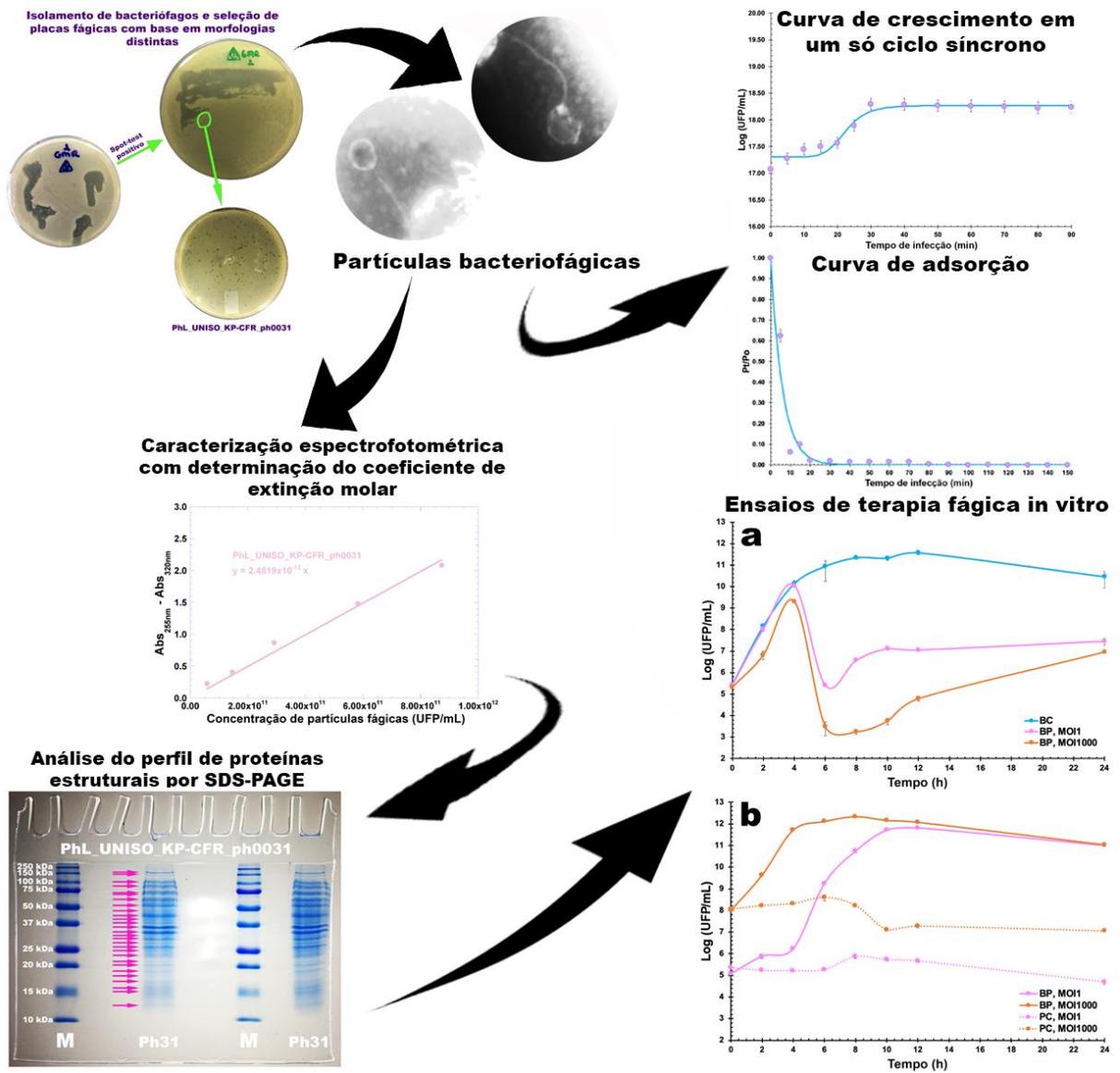
determinação da curva de adsorção das partículas bacteriofágicas às células bacterianas hospedeiras para cálculo da taxa de adsorção.

Alguns dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho de pesquisa foram apresentados no Congresso Científico - XXIX Congresso Brasileiro de Virologia e XIII Encontro de Virologia do Mercosul (Gramado, RS, de 17 a 21 de outubro de 2018) (ANEXO A) e também no 22º EPIC – Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica (evento realizado de 05 a 07 de novembro de 2019 na Universidade de Sorocaba) (ANEXO B).

Adicionalmente, os resultados obtidos deram ainda origem à preparação de um manuscrito científico que se encontra atualmente em processo de submissão para publicação em revista científica internacional indexada com arbitragem por pares (Fernanda C. Moreli; Liliam K. Harada; Erica C. Silva; Thais J. Oliveira; Marta M.D.C. Vila; Victor M. Balcão (2020) A phage tale: isolation and *in vitro* evaluation of a lytic bacteriophage for the biocontrol of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*, Antibiotics [submetido]). Este trabalho comprova a qualidade e importância dos resultados obtidos no trabalho de pesquisa aqui descrito.

A Figura 1 apresenta um resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido, começando com o isolamento de um bacteriófago a partir de águas residuais do Hospital UNIMED "Miguel Soeiro" em Sorocaba/SP (Brasil) e sua caracterização físico-química e biológica, passando por ensaios de terapia fágica *in vitro* (curvas de morte) usando a cepa hospedeira de *Klebsiella pneumoniae* e teste em 26 cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos humanos.

Figura 1. Resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido.



Fonte: elaboração própria.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Introdução

As infecções do trato respiratório são responsáveis por altos níveis de mortalidade e morbidade em todo o mundo, com especial atenção no aumento da incidência de bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos antibióticos, como é o caso das bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*, em pacientes com doença adquirida na comunidade, pneumonia nosocomial e em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (HOWARD et al., 2012; JANSEN et al., 2018; MERABISHVILI et al., 2014; RIOS et al., 2016; RODRIGO-TROYANO; SIBILA, 2017; VISHWANATH; CHAWLA; GOPINATHAN, 2013).

A presença de bactérias Gram-negativas multirresistentes aos antibióticos têm sido relacionada a resultados clínicos (CHAN; ABEDON; LOC-CARRILLO, 2013) provavelmente associados à prescrição empírica inadequada de tratamentos com antibióticos (DAVEY et al., 2017; JANSEN et al., 2018), o que representa uma ameaça para a saúde pública de resistência bacteriana generalizada a antibióticos juntamente com opções limitadas de tratamento devido à ausência de novos antibióticos (GHAJAVAND et al., 2017a). A Organização Mundial de Saúde (OMS) identificou recentemente a resistência antimicrobiana como um dos três problemas mais importantes que a saúde humana enfrenta (CERQUEIRA; PELEG, 2011). Os patógenos multirresistentes mais regulares foram integrados à sigla “ESKAPE”, representando *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* (D’ANDREA et al., 2017).

A pneumonia bacteriana causada por *Klebsiella pneumoniae* é uma infecção difícil de tratar devido à cápsula espessa desta célula bacteriana (ASHURST; DAWSON, 2018; WYRES; HOLT, 2018,). Esta bactéria coloniza normalmente a superfície das mucosas humanas da orofaringe e trato gastrointestinal. Uma vez entrando no corpo, ela pode exibir altos graus de virulência e resistência a antibióticos (ASHURST; DAWSON, 2019). Atualmente, a pneumonia bacteriana causada por *K. pneumoniae* é considerada a causa mais comum de pneumonia

adquirida em ambiente hospitalar nos Estados Unidos, sendo responsável por 3% a 8% de todas as infecções bacterianas nosocomiais no corpo humano (ASHURST; DAWSON, 2019).

As tendências mundiais crescentes de resistência aos antibióticos, associadas à já alta percentagem, cerca de 5,5 % (LEE et al., 2016) de resistência da *K. pneumoniae* aos antibióticos existentes, ilustram a perda contínua de opções terapêuticas antimicrobianas eficazes contra este microrganismo e enfatizam a necessidade de estratégias abrangentes visando o uso prudente de antibióticos, já que as opções de tratamento para infecções por bactérias multi-resistentes são atualmente limitadas (BARCHITTA et al., 2019; RUSSO et al., 2018; WYRES; HOLT, 2018). Adicionalmente, uma vez que é muito pouco provável que novos antibióticos eficazes para patógenos Gram-negativos multirresistentes sejam lançados em breve no mercado (BARCHITTA et al., 2019; RUSSO et al., 2018; WYRES; HOLT, 2018), há uma necessidade crítica de implementar estratégias alternativas contra o desenvolvimento de resistência adquirida (GHAJAVAND et al., 2017b; UL HAQ et al., 2012). No trabalho de pesquisa aqui apresentado, o potencial de isolamento (a partir de fontes ambientais) e caracterização de novas partículas bacteriofágicas com ampla gama de hospedeiros capazes de infectar *K. pneumoniae* resistente a múltiplos antibióticos, foi investigado, assim como foram testadas as partículas fágicas isoladas na inativação de *Klebsiella pneumoniae* em ensaios de terapia fágica *in vitro*.

A caracterização físico-química das partículas bacteriofágicas isoladas incluiu análises via varredura espectral na zona UV-Vis para determinação do seu coeficiente de extinção molar, DRX para determinação do tamanho de eventuais cristalitos na suspensão concentrada de partículas fágicas, eletroforese SDS-PAGE para avaliação do perfil de proteínas estruturais das partículas fágicas, e MET para análise da morfologia dos bacteriófagos. Já a caracterização biológica abrangeu a avaliação da gama de hospedeiros do bacteriófago isolado, eficiência de plaqueamento usando uma cepa de coleção de *Klebsiella pneumoniae* como hospedeiro específico, determinação da curva de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC) para cálculo do período latente, período de eclipse, período de acumulação intracelular e tamanho de explosão, determinação da curva de adsorção para cálculo da taxa de adsorção das partículas bacteriofágicas em sua célula

hospedeira bacteriana, e avaliação da capacidade de inativação bacteriana *in vitro* pelas partículas fágicas utilizando valores de multiplicidade de infecção (MOI) de 1 e 1000.

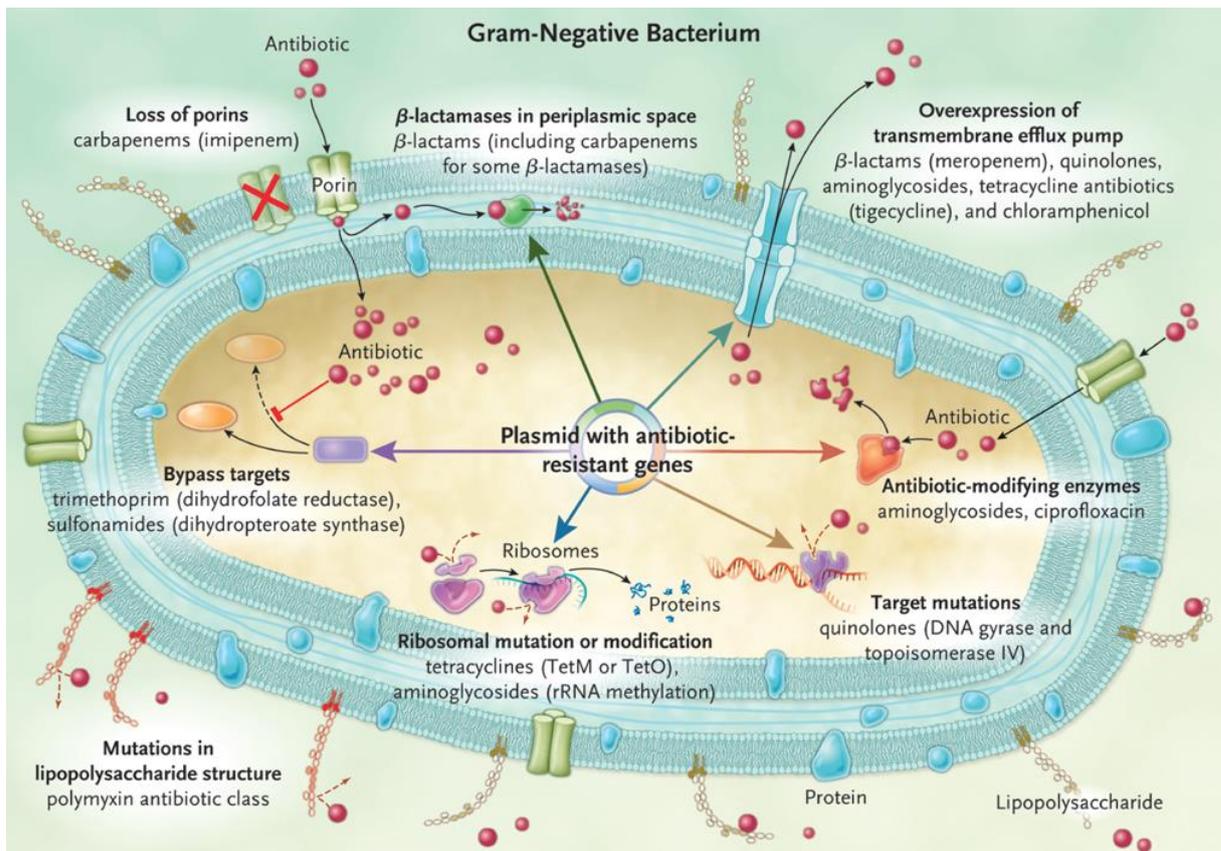
1.2 Resistência microbiana

Os coeficientes de morbidade e mortalidade, quando diz respeito às doenças infecciosas, diminuíram com a descoberta dos agentes antibióticos, fato que se tornou um marco na história da medicina. Entretanto, é sabido que existe uma relação direta entre o uso aumentado de antibióticos e um aumento dos índices de resistência bacteriana, ou seja, o mau uso desses fármacos acelera o processo de seleção natural de microrganismos resistentes a múltiplos antibióticos (BRASIL, 2010). Os fatores que contribuem para o aumento continuado da resistência aos antibióticos vão desde uma terapia inadequada de pacientes infectados, a um atraso na iniciação da antibioticoterapia apropriada. Estes fatores, associados à falta de cuidados básicos no ambiente hospitalar e ao uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos, favorecem o aparecimento de cepas bacterianas multirresistentes (SILVEIRA et al., 2006; TENOVER et al., 2006).

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos podem ser intrínsecos ou adquiridos (Figura 2). As bombas de efluxo são um dos tipos de resistência bacteriana que resulta da atividade de proteínas que promovem o efluxo do antibiótico do meio intracelular para o meio extracelular, observando-se uma diminuição da sua concentração no interior da célula. Este processo é feito por transporte ativo, ou seja, com gasto energético (MOREIRA et al., 2013). Já na alteração de permeabilidade, as porinas, proteínas transmembranares existentes na membrana das bactérias Gram-negativas, constituem um canal para a entrada de nutrientes e outros elementos como as moléculas de antibióticos, para o interior da célula. Modificações genéticas nestas proteínas diminuem a entrada de fármaco para o interior da célula bacteriana promovendo desta forma a resistência aos antibióticos (DESLOUCHES et al., 2015). Há também a produção de enzimas que têm a capacidade de hidrolizar os antibióticos. Dois dos grupos de enzimas com grande dispersão entre bactérias são o grupo das β -lactamases, como as penicilinases, cefalosporinas e carbapenemases, responsáveis pela inativação da

maioria dos antibióticos β -lactâmicos, e o grupo composto pelas enzimas N-acetiltransferases (AAC), O-nucleotidil-transferases (ANT) e O-fosfotransferases (APH), que são responsáveis pela inativação dos antibióticos aminoglicosídeos. Outro mecanismo de resistência consiste na alteração genética do alvo, podendo ser resultado da aquisição de genes ou de uma mutação, ocorrendo desta forma uma alteração do alvo original, isto é, do local de ligação do antibiótico no citoplasma da célula bacteriana, impossibilitando deste modo a ligação do fármaco ao local de ação (CASTANHEIRA, 2013). Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos (PELEG; HOOPER, 2010) encontram-se esquematizados na Figura 2.

Figura 2: Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos, ilustrados numa bactéria Gram-negativa.



Mecanismos similares podem ser encontrados em bactérias Gram-positivas mas a ausência nestas bactérias de uma membrana mais externa provoca a excreção das β -lactamases para fora da célula em vez de para o espaço periplásmico entre as membranas mais interna e externa, e reduz a eficiência das bombas de efluxo porque os fármacos exportados podem re-entrar na célula após atravessar uma única membrana, em vez das duas membranas nas bactérias Gram-negativas. As esferas vermelhas representam moléculas de antibiótico.

Fonte: retirado de PELEG; HOOPER (2010).

De acordo com Getahu e Balkhy (2019), a resistência bacteriana precisa ser entendida como uma crise que coloca 100 anos de progresso na saúde humana em sério risco. A *Ad Hoc Interagency Coordination Group (IACG) on Antimicrobial Resistance* (IACG) da Organização das Nações Unidas (ONU) sugere fortalecer os sistemas existentes e integrar os esforços de combate à resistência antimicrobiana por forma a alavancar ganhos através dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), uma vez que o uso indevido e excessivo de antibióticos em seres humanos e animais e com fins fitossanitários, representa a força motriz para o aparecimento e disseminação de patógenos resistentes aos antibióticos em muitos países. A ONU visa também à mudança de paradigma na resposta global à resistência bacteriana aos antibióticos através do estabelecimento de metas, antes do problema atingir níveis desastrosos. As recomendações do IACG concentram-se em cinco áreas principais da resposta à resistência bacteriana aos antibióticos: 1) Acelerar o progresso nos países em desenvolvimento; 2) Inovação para garantia do futuro; 3) Colaborar para uma ação mais eficaz; 4) Investir para uma resposta sustentável; e 5) Fortalecimento da responsabilidade e governança global.

1.3 Bactérias patogênicas do grupo “ESKAPE”

Durante vários anos, as infecções hospitalares (ou nosocomiais) foram consideradas um problema fundamental, mas passíveis de serem contornadas. Todavia, estudos levantaram questões sobre se muitas dessas infecções são, de fato, inevitáveis. Ao mesmo tempo, a circunstância e disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos associada à escassez de fármacos antibióticos sob investigação com atividade contra patógenos multirresistentes, suscitaram a preocupação de que essas infecções podem tornar-se incontroláveis, pela falta de terapia antibacteriana eficaz. O problema da resistência bacteriana aos antibióticos no hospital moderno encontra-se concentrado em um número limitado de espécies bacterianas, que se tornaram conhecidos como patógenos “ESKAPE”. A sigla ESKAPE inclui seis patógenos que exibem virulência e resistência a múltiplos antibióticos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter ssp.* (MULANI et al., 2019; RICE, 2010).

Diversos microrganismos que infectam o ser humano utilizam variados mecanismos de patogênese, fatores de virulência e perfis de resistência aos antibióticos. No entanto, uma característica comum compartilhada pela maioria desses microrganismos reside na sua capacidade e propensão para formar biofilmes (BALES et al., 2013; DESLOUCHES et al., 2015; MULANI et al., 2019; RICE, 2010). Alterações fenotípicas em adição à regulação positiva de adesinas, promovem a secreção de uma grande quantidade de exopolissacarídeos (EPS) pelas bactérias. Isto ocorre durante a conversão de crescimento planctônico em crescimento em biofilme. Tais EPS podem representar uma parte crucial da componente polimérica extracelular, sendo que esta substância está associada ao desenvolvimento de biofilmes, servindo para consolidar populações bacterianas inteiras a uma determinada superfície, ao invés de ir rodeando células individuais (VUONG et al., 2004). Também se incluem no EPS: proteínas, ácidos nucléicos secretados, substâncias húmicas e íons metálicos. Juntos, o EPS protege as bactérias integradas no biofilme de eventuais ameaças ambientais (NWODO; GREEN; OKOH, 2012). O papel do biofilme na patogênese tem sido estudado em muitos microrganismos em que se demonstrou que a forma do crescimento deste biofilme permite uma maior resistência ao tratamento com antibióticos, dificulta a resposta do sistema imunológico por meio da mimetização das células do hospedeiro e ameniza condições limitadoras de nutrientes no hospedeiro (KUMAR; MODY; JHA, 2007). A formação de biofilmes em dispositivos de implantes médicos, como catéteres e válvulas cardíacas mecânicas, representa também um grande problema que está intimamente associado à capacidade relacionada com a adesão e resistência bacteriana aos antibióticos, características concedidas pela capacidade de sintetizar e secretar tais EPS (BALES et al., 2013).

Genes de resistência bacteriana aos antibióticos podem ser incorporadas no cromossoma bacteriano, plasmídeo ou transposons (SIRIJAN SANTAJIT; NITAYA INDRAWATTANA, 2016). As infecções bacterianas podem ser derivadas de doenças exógenas ou endógenas. São transferidas por contato direto ou indireto entre pacientes, profissionais de saúde, objetos contaminados, visitantes ou até várias fontes ambientais (MOREIRA et al., 2013).

1.4 Agente etiológico *Klebsiella pneumoniae*

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Este patógeno é responsável por infecções do trato urinário, pneumonia, infecção abdominal, entre outras morbidades, sendo considerado um microrganismo oportunista isolado. Esta bactéria não é importante apenas pela sua alta virulência, mas também pela resistência a múltiplos antibióticos (GONZALEZ-MENENDEZ et al., 2018). É um dos gêneros bacterianos mais associados a infecções hospitalares, infectando principalmente pacientes imunocomprometidos com doenças subjacentes tais como *Diabetes Mellitus* ou DPOC (METAB, 2015).

Esta bactéria foi descrita pela primeira vez por Carl Friedlander, no final do século 19, tendo sido isolada dos pulmões de pacientes que morreram de pneumonia. É um gênero bacteriano com grande variedade de espécies, sendo que até ao momento foram descritas 19 espécies, das quais as linhagens de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* são as mais frequentemente encontradas na prática clínica (MARTIN; BACHMAN, 2018). As espécies do gênero *Klebsiella* são geralmente identificadas e diferenciadas de acordo com as suas reações bioquímicas e material genético. Dentre as espécies, os microrganismos da espécie *K. pneumoniae* são os mais associados a infecções hospitalares e, por esta razão, apresentam grande relevância clínica (POTTER et al., 2018).

De acordo com Broberg, Palacios e Miller (2014), a *Klebsiella ssp.* é encontrada abundantemente na natureza, incluindo plantas e animais, fazendo parte da microbiota residente ou transitória no trato gastrointestinal em grande parte dos mamíferos, aves e seres humanos. Uma vez adquirida, a *K. pneumoniae* coloniza facilmente as mucosas humanas incluindo a orofaringe e o trato gastrointestinal. Esse microrganismo pode também ser encontrado na pele, porém não a coloniza, e por isso é considerado microbiota transiente nesse local.

As taxas de colonização variam de acordo com o local do corpo e se a bactéria foi adquirida na comunidade ou em ambiente hospitalar. Quando se trata de colonização adquirida na comunidade, a nasofaringe é o local mais propício para encontrá-la. Já nos ambientes hospitalares a taxa de colonização é mais evidente no

trato gastrointestinal, provavelmente pela utilização de antibióticos. Apesar da colonização nesses locais ser benigna para o hospedeiro, eles constituem a porta de entrada para que a bactéria possa se evadir para outros tecidos e causar prováveis infecções graves (DORMAN; SHORT, 2017).

O tratamento de infecções causadas por cepas de *K. pneumoniae* tem se tornado difícil pela existência de cepas portadoras de plasmídeos (Figura 2), que codificam enzimas conhecidas como β -lactamases, conferindo resistência a antibióticos β -lactâmicos (MENEZES et al., 2007). Também existem referências à produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que é uma enzima capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico dos antibióticos carbapenêmicos, e com isso esta bactéria acaba também sendo resistente a este grupo de antibióticos (Figura 2). Outra peculiaridade desta enzima reside num gene localizado no plasmídeo, gerando ampla difusão e transferência entre várias espécies bacterianas e promovendo resistência aos antibióticos num maior número de microrganismos (RICE, 2010; PELEG; HOOPER, 2010).

A dificuldade no tratamento de infecções graves por bacilos Gram-negativos resistentes aos antibióticos carbapenêmicos conduziu ao retorno da utilização das polimixinas (polimixina B e colistina) a nível mundial como última opção no tratamento dessas infecções, porém foi evidenciada também resistência a estes fármacos antibacterianos de última linha, o que confere à *K. pneumoniae* resistência a todos os antibióticos ativos tornando-a pan-resistente, sendo que isto tudo é o resultado de uma multiplicidade de fatores que atuam em simultâneo para promover a evasão às defesas do hospedeiro (REYES-CHACÓN et al., 2017).

1.5 Bacteriófagos

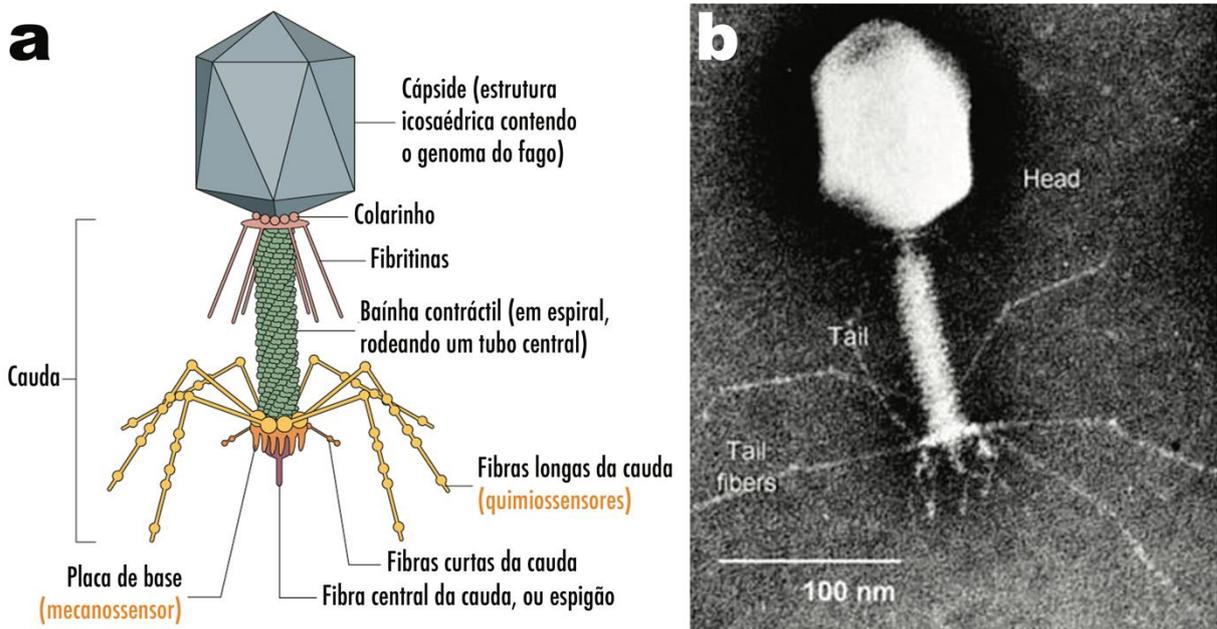
O uso de bacteriófagos contra doenças bacterianas teve início a mais de um século com Felix d'Herelle, o qual refletia sobre ideias ecológicas antes mesmo deste ramo da biologia se tornar uma disciplina científica bem estabelecida. Pode afirmar-se que este foi o início da biotecnologia e da ecologia, no entanto surgiu a questão "O que é a vida?". A resposta mais lógica, na época, foi que os fagos eram

sistemas mais simples. O papel desempenhado pelos fagos na biosfera é agora visto de outra forma (CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004).

A visão tradicional da importância ecológica dos vírus deriva de seu status parasitário e sua origem é frequentemente associada a três cenários: no primeiro, os vírus são vistos como descendentes diretos de um mundo molecular antes do surgimento das células; no segundo, os vírus são vistos como produtos de um processo de redução de celularidade com perda de autonomia; e, finalmente, no terceiro cenário, os vírus são encarados como produtos da fuga de material genético de células juntamente com a captura das proteínas hospedeiras que formam seus capsídeos. No entanto, o desenvolvimento de novos métodos analíticos e a descoberta de novos grupos virais abriu um vasto campo de pesquisas focadas nas origens e importância dos vírus nos ecossistemas. Apesar dos avanços em nossa compreensão da biologia viral, questões-chave sobre sua posição na árvore da vida permanecem sem solução.

O impacto destes na reciclagem de matéria orgânica na biosfera global, a influência na evolução dos genomas bacterianos e seu uso como potenciais ferramentas para enfrentar a resistência bacteriana aos antibióticos, demonstram uma mudança na abordagem reducionista (HARADA et al., 2018; RIOS et al., 2016; CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004).

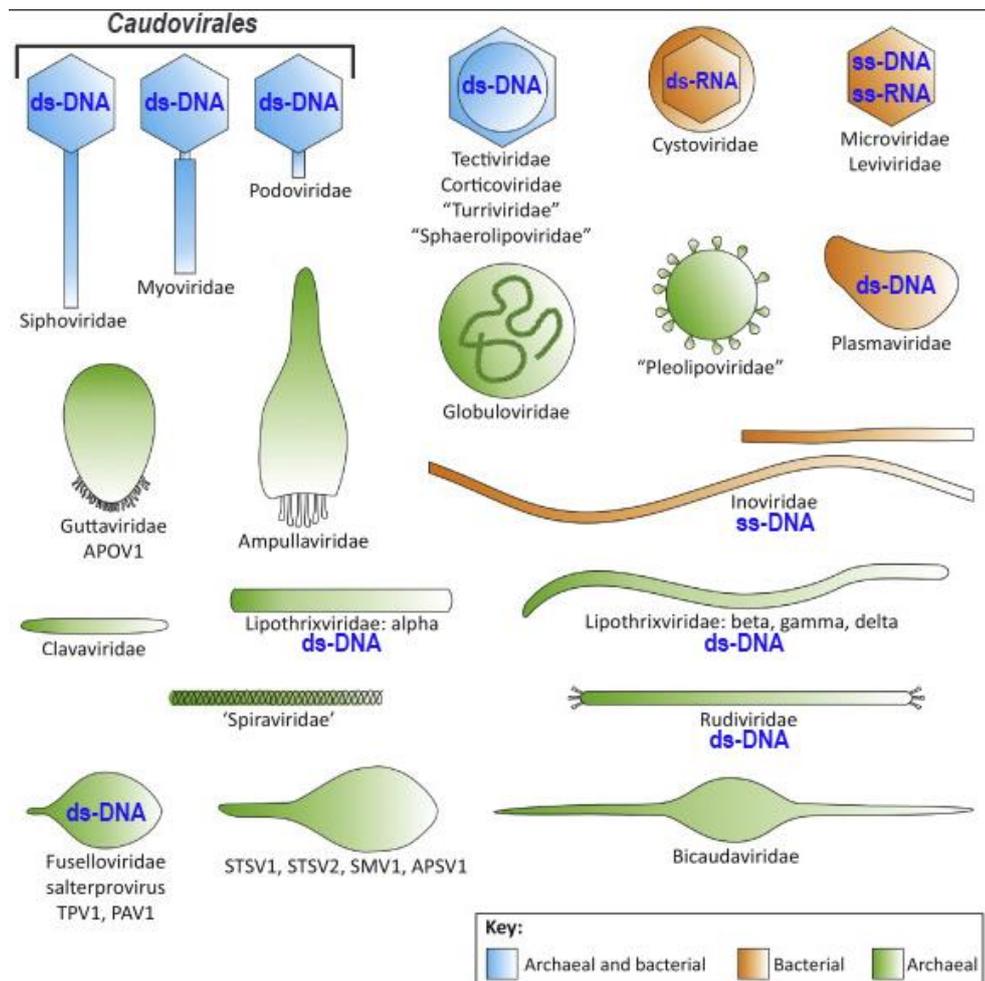
Figura 3. Representação esquemática de uma partícula bacteriófágica **(a)**, e fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão de um bacteriófago prototípico para fins de observação de estrutura geral **(b)**.



Fonte: **(a)** Adaptado de NOBREGA et al., 2018; HYMAN; VALLUZZI; GOLDBERG, 2002; **(b)** retirado de https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Phage_Therapy.

Os bacteriófagos, ou apenas fagos, podem ser encontrados em qualquer habitat onde também proliferem bactérias, sendo as entidades biológicas mais abundantes no nosso planeta e estimando-se que existam dez bacteriófagos para cada célula bacteriana, num total estimado de 10^{30} partículas fágicas, ou mais, na biosfera (CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004). É também evidente a existência de vírus específicos para arqueobactérias, os chamados arqueófagos (ABEDON; MURRAY, 2013). Alguns fagos são altamente específicos, enquanto outros são extremamente amplos em sua gama de hospedeiros. A taxonomia dos bacteriófagos baseia-se na sua forma e tamanho, bem como na estrutura molecular do seu genoma. A maioria dos bacteriófagos possui ácido desoxirribonucleio (DNA) de fita dupla (dsDNA), no entanto alguns possuem DNA de fita simple (ssDNA), ácido ribonucleico (RNA) fita dupla (dsRNA) ou RNA fita simples (ssRNA). Todos os fagos exibem uma estrutura bem definida (Figura 3), geralmente um capsídeo de forma icosaédrica envolvendo o material genético, uma bainha contráctil e fibras da cauda, entre outras estruturas (Figura 3). (ACKERMANN, 2007; RIOS et al., 2016). Esta classificação encontra-se ilustrada na Figura 4.

Figura 4. Classificação dos bacteriófagos de acordo com a sua morfologia, material genético e principais características.

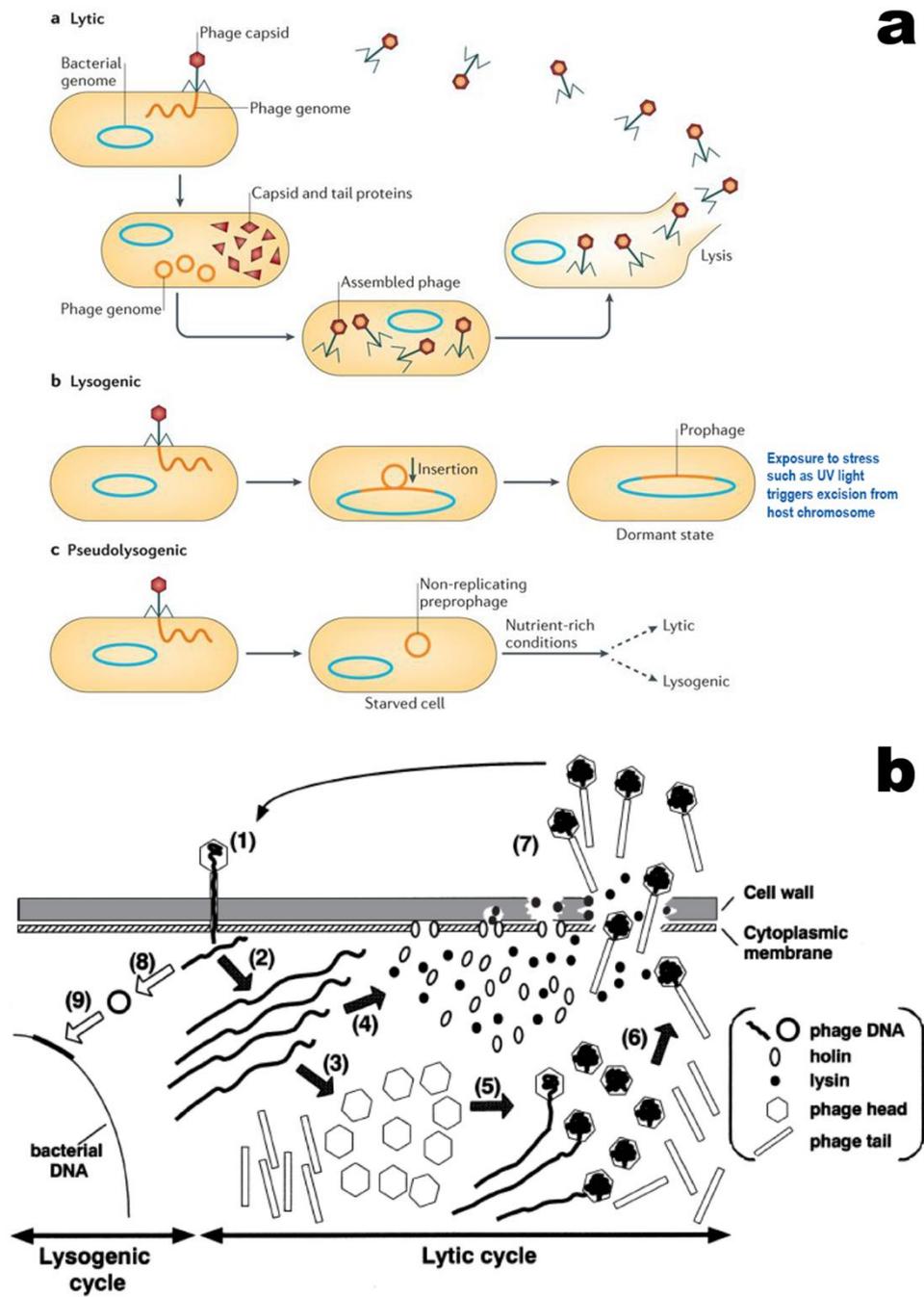


Fonte: adaptado de RIOS et al. (2016), PIETILÄ et al. (2014) e MATSUZAKI et al. (2005).

Após a infecção da célula hospedeira bacteriana, os fagos podem ter destinos bem diferentes. Alguns fagos seguem o ciclo de infecção lítica (Figura 5) pelo qual se multiplicam na célula bacteriana e provocam a sua lise no final do ciclo para liberar partículas de fago recém-formadas, enquanto outros fagos podem usar a via lisogênica (Figura 5) onde o genoma do fago será integrado no genoma da célula bacteriana hospedeira e será replicado como parte do genoma do hospedeiro permanecendo em um estado latente como profago por longos períodos de tempo. Se a bactéria hospedeira encontrar condições ambientais adversas, o profago pode então ser ativado e dá-se início ao ciclo lítico, no final do qual as novas partículas de fago formadas lisarão a célula hospedeira (HARADA et al., 2018; HERMOSO; GARCÍA; GARCÍA, 2007; SKURNIK; STRAUCH, 2006).

No processo de desenvolvimento do ciclo lítico há primeiramente a adsorção da partícula fágica à célula hospedeira bacteriana, na qual ocorre o reconhecimento e a fixação do vírus à célula. Os bacteriófagos são entidades proteicas completamente desprovidas de metabolismo e que por isso são parasitas intracelulares obrigatórios, e a célula bacteriana hospedeira é dotada de determinados receptores químicos capazes de permitirem que as partículas fágicas os detectem e se liguem à membrana. O genoma viral pode ser inserido na célula hospedeira (i) pela fusão do envelope viral com a membrana celular fazendo com que a cápside se desintegre e o genoma do parasita viral invada a célula, (ii) pela injeção direta do material genético viral na célula bacteriana, ou (iii) quando receptores da membrana celular promovem a fixação do vírus e este é internalizado através de invaginações da membrana celular bacteriana. Uma vez inserido na célula hospedeira, o material genético do fago começa a controlar as atividades metabólicas da célula hospedeira para produção de partículas virais, tais como proteínas e material genético, que são depois organizados por forma a constituir novos vírus. E por fim, após a produção de uma grande quantidade de novos vírions, são produzidas também as enzimas lisozima e holina que provocam a lise celular e a liberação dos novos vírions que irão infectar imediatamente células vizinhas, recomeçando o ciclo lítico (ACKERMANN, 2007; SKURNIK; STRAUCH, 2006). Os dois ciclos são ilustrados na Figura 5.

Figura 5. Ciclos lítico, lisogênico e pseudolisogênico de replicação bacteriofágica **(a)**, e detalhe do ciclo lítico e seu sistema enzimático **(b)**.



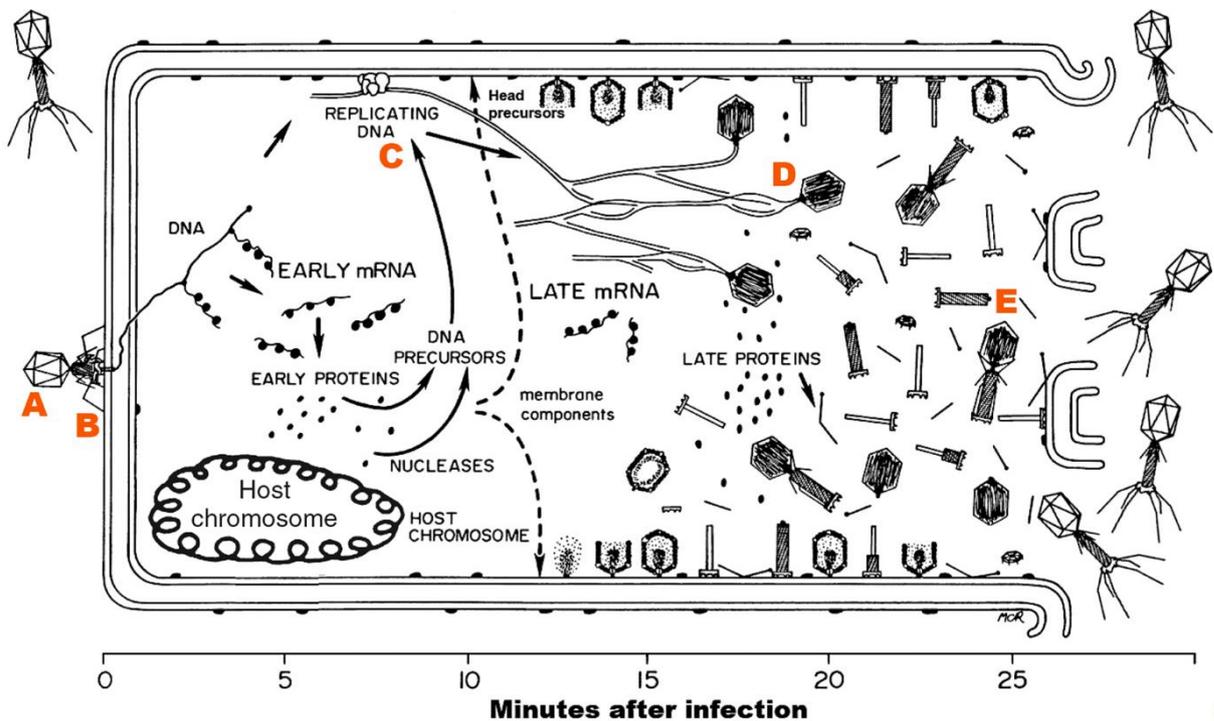
Fonte: **(a)** retirado de FEINER et al. (2015); **(b)** retirado de MATSUZAKI et al. (2005). **Legenda:** (1) adsorção e injeção do DNA; (2) replicação do DNA; (3) produção da cabeça e cauda; (4) síntese de holinas e lisinas; (5) encapsulação do DNA; (6) montagem final dos viriões; (7) ruptura da membrana interna e parede celular e liberação da progênie fágica; (8) circularização do DNA; (9) integração do DNA fágico no genoma do hospedeiro.

Durante o processo de infecção de uma célula bacteriana por uma partícula fágica, este garante que apenas o seu material genético seja replicado, evitando dessa forma a interferência de outros fagos no processo da sua replicação (HARADA et al., 2018; HANLON, 2007; RIOS et al., 2016). Tanto no ciclo lítico como no ciclo lisogênico (após excisão do genoma viral do genoma do hospedeiro), após a síntese de proteínas virais e enzimas responsáveis pela formação da cápside e encapsulamento do material genético viral, ocorre a montagem e a formação de novos viriões. A progênie fágica promove então o rompimento da parte interna da membrana citoplasmática, ajudada pela ação de enzimas holinas (Figura 5b) e, em seguida, da camada de peptidoglicano, ajudada pela ação de endolisinas, levando à lise da célula bacteriana (processo lítico) e expelindo desta forma a progênie fágica recém-formada para o ambiente extracelular (WITTEBOLE et al., 2013; MAURA; DEBARBIEUX, 2011; ACKERMANN, 2007; MATSUZAKI et al., 2005).

Na Figura 6 podem observar-se em maior detalhe os vários processos intracelulares do ciclo de crescimento das partículas fágicas ao longo do tempo, após ocorrer à infecção da célula bacteriana hospedeira, que culminam com a sua lise.

Algumas características importantes dignas de registro incluem (Figura 6): a ação nucleolítica no cromossoma hospedeiro e as novas enzimas fágicas fornecem precursores de DNA; o DNA em replicação é muito mais longo que o DNA do vírion; várias proteínas codificadas pelos fagos associam-se à membrana do hospedeiro para alterar as funções do hospedeiro e facilitar a montagem e a maturação dos novos vírions.

Figura 6. Fenômenos que ocorrem durante o espaço temporal de um ciclo lítico de replicação de uma partícula bacteriofágica numa célula bacteriana hospedeira.



Fonte: adaptado de ABEDON (2006) e KUTTER (2005).

Os processos que ocorrem no interior da célula bacteriana hospedeira imediatamente após esta ser infectada por uma partícula bacteriofágica e que culminam na lise do hospedeiro, são fundamentalmente cinco e incluem as etapas de **adsorção** da partícula fágica à parte externa da membrana celular da célula hospedeira (A: o bacteriófago adere através das suas fibras da cauda a receptores de lipopolissacárido e triptofano existentes na superfície da célula hospedeira), **penetração** (B: o bacteriófago penetra a parede da célula bacteriana aproximando e contactando a placa da base com a superfície da célula, promovendo uma alteração conformacional que faz com que a bainha se contraia e perfure a membrana celular, injetando o seu genoma no interior do citoplasma da célula bacteriana e dando assim início ao complexo processo de replicação do genoma viral. Alguns dos primeiros genes que são transcritos, chamados precoces, codificam para enzimas que hidrolizam (em apenas alguns minutos após a infecção) o DNA da célula hospedeira por forma a utilizar os nucleotídeos do genoma hospedeiro para produzir mais DNA viral), **replicação** (C: genes iniciais, tardios, codificam cerca de 20 proteínas que estão diretamente envolvidas na replicação viral. Numa primeira fase,

a replicação ocorre de forma bidirecional com múltiplas origens de replicação no genoma. Os primeiros ciclos de replicação são iniciados por *primers* de RNA sintetizados pela RNA-polimerase do hospedeiro. Numa segunda fase, o bacteriófago utiliza a sua própria maquinaria replicativa para transcrever os seus genes tardios), **montagem** (**D**: uma vez expressos os genes tardios, (i) a placa da base viral é primeiro montada, ligando-se depois (ii) à cauda e (iii) às proteínas das fibras da cauda. Estas três vias proteicas diferentes combinam-se para formar uma cápside fágica madura. O DNA fágico é encapsulado na cápside proteica madura. A cápside também contém enzimas necessárias para futuras infecções, tais como a DNA-polimerase codificada viralmente), e **liberação** (**E**: a enzima holina, codificada viralmente, perfura a membrana interior da célula hospedeira bacteriana para permitir que as lisozimas saiam e degradem a parede celular de peptidoglicano. À lise celular segue-se a liberação da progenia fágica para o espaço extracelular, sendo que cada novo virião irá infectar uma nova célula hospedeira viável e dar origem à repetição de todo este processo).

1.6 Terapia fágica

A terapia fágica é uma das possíveis estratégias antibacterianas alternativas à antibioticoterapia convencional e consiste no uso de fagos estritamente líticos como alternativa ou complemento no tratamento de infecções bacterianas. Esta terapia ganhou um interesse renovado desde que a resistência bacteriana a múltiplos antibióticos começou a aumentar dramaticamente. Como mencionado anteriormente, esta terapia antimicrobiana tem sido usada desde há um século. No entanto, o seu uso encontra-se restringido aos países do Leste europeu, que seguem diretrizes diferentes para ensaios clínicos, sendo que vários artigos importantes de pesquisa científica são publicados principalmente em russo, georgiano, ou em outros idiomas que não o inglês. Por esse motivo, a terapia fágica não é atualmente usada na grande maior parte dos países europeus e norte-americanos. Existe, portanto, um esforço acrescido por parte de pesquisadores em todo o planeta para gerar e seguir diretrizes bem estabelecidas de ensaios clínicos para a utilização de bacteriófagos em terapia antimicrobiana. (CHEN et al., 2018; DOMINGO-CALAP; DELGADO-MARTÍNEZ, 2018).

Os bacteriófagos apresentam inúmeras vantagens que os tornam candidatos ideais para o tratamento de infecções bacterianas em terapia fágica, como ,por exemplo, (mas não se limitando a) **(i)** alta especificidade para o seu hospedeiro (evitando assim danos à microbiota normal e não infectando as células eucarióticas), **(ii)** necessidade de baixas dosagens para tratamento, e **(iii)** proliferação rápida nas células bacterianas hospedeiras. (HARADA et al., 2018; DOMINGO-CALAP; DELGADO-MARTÍNEZ, 2018; RIOS et al., 2016). Os bacteriófagos devem obedecer a alguns critérios, quando se pretende a sua utilização para controle microbiológico: devem ser obrigatoriamente e estritamente líticos, ou seja, devem ser capazes de infectar células bacterianas e produzir descendência fágica sem demonstrarem capacidade de integrar o seu genoma no genoma da célula bacteriana hospedeira. Devem também suportar temperaturas onde ocorre maior duplicação das bactérias, devem suportar baixo pH e devem manter a atividade lítica somente para as bactérias nocivas (hospedeiras) e não para as comensais. (HARADA et al., 2018; RIOS et al., 2016; JANEŽ; LOC-CARRILLO, 2013).

Vários estudos científicos foram desenvolvidos envolvendo o uso de fagos ao longo das últimas três décadas. Os modelos experimentais existentes demonstram ser possível a administração de fagos por vias tanto intravenosas quanto peritoneais, ambas com eficácia evidenciada. Todavia, não sendo possível garantir que as suspensões contendo bacteriófagos estejam completamente desprovidas de agentes pirogênicos (como, por exemplo, endolisinas bacterianas liberadas por lise) esta não é ainda a opção mais viável. (MAURA; DEBARBIEUX, 2011).

A alta especificidade dos fagos pode ser considerada um fator vantajoso e limitador ao mesmo tempo. Os testes *in vitro* da eficácia das partículas fágicas se tornam necessários na terapia monofágica antes destes ser administrado a um paciente o que faz desta técnica um processo muito laborioso. O uso de coquetéis de fagos, integrando vários fagos distintos que atuam contra diferentes espécies ou cepas bacterianas, pode contornar esses problemas. (CHEN et al., 2018; JIN et al., 2012).

O uso de um coquetel de fagos que pertençam a famílias ou grupos diferentes, que exibam ampla gama de hospedeiros e alta capacidade de adsorção às estruturas das paredes celulares altamente conservadas nas bactérias, é indicado como ideal por diversos especialistas em todo o mundo. Entretanto, outros

pesquisadores ressalvam a ideia de que fagos individuais devem ser aplicados sequencialmente num dado paciente, proposta esta que, no entanto se revela mais difícil de ser aplicada na prática. (MOROZOVA; VLASSOV; TIKUNOVA, 2018).

As bactérias também são capazes de desenvolver mecanismos de resistência aos fagos, tais como: a prevenção de adsorção, o bloqueio da injeção do DNA do fago, o sistema restrição/modificação por metilação (Sistema R-M; não específico) que use a metilação para rotular o DNA genômico do 'eu' e reconhecer e clivar qualquer DNA 'não-eu' não modificado, a infecção abortiva (Sistema ABI), o sistema toxina-antitoxina (Sistema TA), o sistema de fosfotilação do DNA (Sistema DND) e o sistema de imunidade CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), que atua também contra plasmídeos (GASIUNAS, et al., 2012).

Os sistemas de defesa bacterianos supracitados podem ser classificados em dois amplos grupos que diferem em seus modos de ação. Um primeiro grupo que inclui os sistemas que atuam na discriminação do próprio e do não próprio, com o DNA sendo alvo de reconhecimento discriminatório (os sistemas R-M, DND e CRISPR/CAs), podendo ser vistos como uma imunidade procariótica, inata para os sistemas R-M e DND e adaptativa para o CRISPR/Cas. O segundo grupo incluem os sistemas baseados geralmente na morte celular programada ou dormência induzida por infecção (os sistemas TA e ABI) (MARAKOVA et al., 2013).

Os sistemas associados ao CRISPR (Cas) fornecem imunidade adaptativa contra vírus e plasmídeos em bactérias e arqueias. O silenciamento de ácidos nucleicos invasores são executados por complexos de ribonucleoproteínas pré-carregado com pequenos RNAs CRISPR interferentes (crRNAs) que atuam como guias para direcionamento e degradação de ácido nucleico estranho (GASIUNAS, et al., 2012).

1.7 Estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas

Como a maioria dos vírus, os bacteriófagos são geralmente resilientes à maioria das condições ambientais, tais como temperatura, pH e concentração de sais, embora a sua sensibilidade varie significativamente entre diferentes tipos de fagos (JONCZYK et al., 2011). A desidratação, no entanto, não é algo que muitos

fagos possam suportar, sendo por isso um dos desafios mais significativos encontrarem métodos para proteger os fagos contra os efeitos da desidratação. Entre os métodos propostos até à data para a estabilização em longo prazo de preparações de bacteriófagos, a liofilização (PUAPERMPOONSIRI et al., 2010) e a congelação em nitrogênio líquido são os mais prevalentes. Nenhum dos dois métodos, no entanto, pode preservar a estabilidade (tanto estrutural como funcional) do fago a não ser que um protetor, tal como glicerol, alginato (LONE et al., 2016; BALCÃO e VILA, 2015; BALCÃO et al., 2014; DINI et al., 2012; MOGHTADER et al., 2017; KIM et al., 2015; COLOM et al., 2017; MA et al., 2012), pectina (DINI et al., 2012, 2014), quitosana (MOGHTADER et al., 2017; KIM et al., 2015), proteína de soro de leite (VONASEK et al., 2014; TANG et al., 2013), lipossomas (COLOM et al., 2015; SINGLA et al., 2016) e polióxido de etileno / diacetato de celulose (KOREHEI e KADLA, 2014), esteja presente.

Além disso, as amostras liofilizadas devem ser mantidas em ampolas com vácuo para a efetiva estabilização do fago. Ambos os métodos requerem acesso a equipamentos especializados para preparação de amostras (liofilizador, bomba de alto vácuo) e seu armazenamento (nitrogênio líquido). Embora alguns bacteriófagos possam ser degradados durante o armazenamento, é impossível generalizar sobre a sua capacidade para sobreviverem intactos independentemente da bactéria hospedeira, pelo que isso precisa ser definido para bacteriófagos individuais, assim como todas as suas propriedades (CARLTON et al., 2005).

Os bacteriófagos são partículas completamente desprovidas de metabolismo, e a sua inativação segue provavelmente uma cinética de primeira ordem, embora as taxas de inativação variem dependendo de vários fatores. A atividade lítica dos bacteriófagos é geralmente evidente somente quando as condições ambientais e nutricionais são favoráveis ao crescimento das células hospedeiras bacterianas.

A trehalose é um dissacarídeo não redutor que está presente em uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos, insetos, invertebrados e plantas, onde pode servir como fonte de energia e carbono. Em leveduras e plantas, também pode servir como molécula sinalizadora para direcionar ou controlar certas vias metabólicas ou até afetar o crescimento. Adicionalmente, foi demonstrado que a trehalose pode proteger proteínas e membranas celulares da inativação ou desnaturação causada por uma variedade de condições de estresse,

incluindo dessecação, desidratação, calor, frio e oxidação (BALCÃO e VILA, 2015). Finalmente, nas micobactérias e corinebactérias, a trealose é um componente integrante de vários glicolipídios que são importantes estruturas da parede celular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Isolar e caracterizar, tanto do ponto de vista biológico quanto físico-químico, um bacteriófago estritamente lítico contra *Klebsiella pneumoniae*.

2.2. Objetivos específicos

- Ⓜ Propagar uma cepa de coleção da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, bem como outras 26 cepas provenientes de isolados clínicos;
- Ⓜ Isolar, através do enriquecimento de águas residuais hospitalares, um bacteriófago estritamente lítico para *Klebsiella pneumoniae*;
- Ⓜ Amplificar e purificar o bacteriófago isolado para posterior caracterização e ensaios de terapia fágica *in vitro*;
- Ⓜ Caracterizar biologicamente o bacteriófago;
- Ⓜ Caracterizar físico-quimicamente o bacteriófago;
- Ⓜ Realizar ensaios de inativação bacteriana *in vitro* (terapia fágica) usando dois valores distintos de multiplicidade de infecção, isto é, MOI = 1 e MOI = 1000;
- Ⓜ Realizar ensaios de imortalização das partículas bacteriofágicas e avaliar a manutenção da sua viabilidade ao longo do tempo sob diferentes condições adversas de armazenamento.

3. JUSTIFICATIVA

O avanço das infecções causadas por cepas bacterianas resistentes a múltiplos antibióticos associados à fraca penetração dos antibióticos convencionais em biofilmes bacterianos torna necessário o desenvolvimento de tratamentos antimicrobianos alternativos, seguros e eficazes.

Os bacteriófagos são predadores naturais das bactérias, sendo considerados alternativas atrativas aos antibióticos químicos convencionais e revelando-se altamente eficazes numa altura em que a resistência bacteriana aos antibióticos assume proporções alarmantes. A terapia fágica apresenta-se assim como uma potencial alternativa antimicrobiana frente aos antibióticos convencionais, permitindo contornar o problema associado a cada vez maior falta de eficácia dos mesmos.

Na preparação de formas farmacêuticas que veiculem partículas bacteriofágicas, é essencial que estas entidades proteicas totalmente desprovidas de metabolismo mantenham a sua atividade lítica quando expostas a condições abióticas adversas durante o armazenamento. Assim, e por todas as potenciais vantagens inerentes à sua utilização, pretendeu-se também avaliar se tentativas de estabilização estrutural e funcional de tais partículas bacteriofágicas com recurso à adição de açúcares, polissacarídeos e glicerol (componentes com características de biocompatibilidade, solúveis em água e seguros para consumo humano), teriam influência na manutenção da viabilidade lítica de tais entidades proteicas.

Adicionalmente, a utilização de açúcares e polissacarídeos permitirá a estabilização estrutural e funcional das partículas bacteriofágicas através de um aumento da sua viscosidade translacional, vibracional e rotacional, promovida pela substituição de algumas moléculas de água de hidratação das partículas bacteriofágicas por moléculas tanto de açúcares como de polissacarídeos. Esta estratégia foi delineada tendo por base as teorias descritas por Balcão e Vila (2015).

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. Material

4.1.1. Reagentes e consumíveis

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou superior. A água utilizada foi ultrapurificada num sistema Master System All (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil) para uma resistividade final de cerca de 18,18 $M\Omega\cdot cm$ e condutividade de $0,05 \mu S\cdot cm^{-1}$.

O fosfato de sódio dibásico, o fosfato de sódio monobásico e o cloreto de cálcio foram adquiridos à Dinâmica Química Contemporânea Ltda (Indaiatuba, Brasil). O sulfato de magnésio foi adquirido à Labsynth (Diadema, Brasil).

O meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) foi adquirido a Sigma-Aldrich do Brasil (Cotia/SP, Brasil) e o ágar sólido foi adquirido à Gibco Diagnostics (Wisconsin, E.U.A.). Para as análises por eletroforese SDS-PAGE, o tampão de ruptura foi produzido com os reagentes Trizma-Base (hidroximetilaminometano), β -mercaptoetanol, dodecilsulfato de sódio, glicerol, azul de bromofenol, tetrametiletilenodiamina e persulfato de amônio, todos adquiridos à Bio-RAD (Bio-RAD, Califórnia CA, USA).

Os marcadores moleculares Pre-Stained Precision Plus Protein™ Dual color foram adquiridos à Bio-RAD (Bio-RAD, Califórnia CA, E.U.A.). Os Sensidiscs™ para antibiograma na forma de discos impregnados com polimixina B (POL300), cefepime (CPM30), imipenem (IPM10) e meropenem (MPM10), foram adquiridos à DME-Diagnósticos Microbiológicos Especializados (Araçatuba, Brasil).

4.1.2. Material biológico

A cepa de *Klebsiella pneumoniae* utilizada no trabalho de pesquisa como hospedeiro para o isolamento e amplificação dos bacteriófagos foi uma cepa de

coleção da CEFAR (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumonia* ref. CEFAR CCCD-K001). Todas as adicionais 26 cepas multi-resistentes de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos humanos foram gentilmente cedidas pela Dra. Priscilla Carmona, Técnica Coordenadora do Laboratório de Microbiologia e Urinálise do Hospital UNIMED "Miguel Soeiro" em Sorocaba/SP (Brasil).

Os bacteriófagos foram isolados a partir de amostras de água de esgoto do Hospital UNIMED "Miguel Soeiro" em Sorocaba/SP, Brazil, coletadas a 16 de janeiro de 2018.

4.1.3. Equipamentos analíticos e outros

Para o isolamento e propagação dos bacteriófagos, os equipamentos utilizados foram: cabine de segurança biológica de classe II tipo B2 (modelo 4SP-SBII B2-1266/4, SP-LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil), autoclave vertical (modelo Autoclave Digital CS 50L, Primatec, Manaus/AM, Brasil), estufa de incubação microbiológica (modelo 502, Fanem, São Paulo/SP, Brasil), centrífuga Eppendorf (modelo AG 22331, Hamburgo, Alemanha).

O sistema de filtração esterilizante utilizado (Stericup™-GP, membrana de poliétersulfato (PES) com tamanho de poro de 0,22 µm de diâmetro) foi adquirido à Merck-Milipore (Darmstadt, Alemanha).

Para purificação da água utilizou-se um equipamento Master System All (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil), com a água ultrapurificada a apresentar resistividade de 18,8 MΩ.cm⁻¹ e condutividade de 0,05 µS.cm⁻¹.

O equipamento utilizado para as análises de eletroforese em gel de poli(acrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foi um sistema Mini-Protean® Tetra Cell 4-gel para eletroforese vertical da Bio-RAD (Califórnia CA, USA), juntamente com uma fonte de alimentação PowerPac™ HC (Bio-RAD, Califórnia CA, USA) e um banho seco digital também da Bio-RAD (Califórnia CA, USA).

As análises de microscopia eletrônica de transmissão dos bacteriófagos foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) da Jeol (modelo JEM-

1400 PLUS, Jeol, Tóquio, Japão), equipado com um filamento de hexaboreto de lantânio (LaB₆), operando a 120 kV, e equipado com câmera fotográfica com sensor CCD (Charge-Coupled Device) da Gatan Inc. (modelo MultiScan 794, Pleasanton CA, EUA) com uma resolução de 1k x 1k pixels para a aquisição digital de imagens. Os resultados (imagens e medições) foram analisados utilizando o software Digital Micrograph da Gatan Inc. (Pleasanton CA, USA). Este equipamento pertence ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis da Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA).

As análises de difração de raios-X foram realizadas em difratômetro de raios-X (DRX) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kioto, Japão) usando radiação de raios-X provenientes de uma lâmpada de cobre com radiação K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) filtrada através de um alvo de cobre.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação de meios de cultura

A preparação dos meios de cultura foi realizada de acordo com os procedimentos e determinações em microbiologia clínica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2013), seguindo também a orientação dos fabricantes. Todos os meios de cultura assim como as demais suspensões, soluções e materiais destinados aos ensaios microbiológicos, tais como: tubos Eppendorf®, tubos de ensaio, tubos Falcon™, pinças, pontas de micropipetas, fitas de papel, criotubos, entre outros, foram esterilizados em autoclave durante 30 minutos a 121 °C sob 1 atm de pressão.

Meio sólido *Tryptic Soy Agar* (TSA). Para a elaboração deste meio de cultura, foram pesados 24 g de meio seco TSB e adicionados 9,6 g de ágar bacteriológico em um Erlenmeyer de 1000 mL de capacidade, adicionou-se uma parte de água ultrapura para sua dissolução e completou-se com água ultrapura até ao volume de 800 mL. Esta suspensão foi então esterilizada em autoclave e, após ser resfriada,

mas não solidificada, foi vertida em placas de Petri descartáveis e estéreis dentro da cabine de segurança biológica (fluxo laminar). Após solidificação do meio, as placas foram acondicionadas em filme PVC e armazenadas invertidas em geladeira a 4 °C, para impedir a formação de gotículas de água no meio solidificado.

Caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB). Pesou-se, em balança de precisão, 24 g de meio seco TSB, transferiu-se para um béquer de 1000 mL de capacidade e adicionou-se lentamente 800 mL de água ultrapura até completa dissolução. Foram depois retiradas alíquotas de 5 mL e 10 mL desta suspensão e colocadas em tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca de alumínio. Foram também retiradas alíquotas de 25 mL e colocadas em Erlenmeyers de 50 mL de capacidade, os quais foram depois fechados com rolha confeccionada em algodão e gaze e posteriormente coberta com papel Kraft, sendo depois esterilizados em autoclave e, após resfriamento, armazenados em geladeira a 4 °C.

Caldo *Tryptic Soy Broth* duas vezes concentrado (2xTSB). Pesou-se, em balança de precisão, 48 g de meio seco TSB, transferiu-se para um béquer de 1000 mL de capacidade e adicionou-se lentamente 800 mL de água ultrapura até completa dissolução. Foram retiradas alíquotas de 25 mL e 50 mL e colocadas em Erlenmeyers de 50 mL de capacidade, os quais foram depois fechados com rolha confeccionada em algodão e gaze e posteriormente coberta com papel Kraft, sendo depois esterilizados em autoclave e, após resfriamento, armazenados em geladeira a 4 °C.

Meio líquido Molten Top-Ágar TSB (MTA-TSB). Pesaram-se 15 g de meio seco TSB e 3 gramas de ágar bacteriológico, e transferiu-se para um frasco de 500 mL de capacidade, sendo este completado com 500 mL de água ultrapura até completa homogeneização da suspensão. Posteriormente o frasco *Schott* contendo a suspensão foi esterilizado em autoclave e mantido em estufa a 47 °C por forma a manter o meio na fase líquida.

Solução Tampão SM para Bacteriófagos (*SM-buffer*). Pesaram-se 6,06 g de Tris-base em um béquer de 100 mL de capacidade. Adicionou-se 50 mL de água ultrapura e o pH desta solução foi ajustado a 7,5 usando HCl com o auxílio de um agitador magnético. Transferiu-se depois essa solução para um balão volumétrico de 1000 mL de capacidade, e adicionou-se 5,8 g de NaCl, e 2 g de MgSO₄•7H₂O. Completou-se então o volume com água ultrapura até 1000 mL. O tampão SM foi

depois transferido para um frasco *Schott* de 1000 mL de capacidade, esterilizou-se em autoclave e armazenou-se a 4 °C.

4.2.2. Preparação das cepas de *K. pneumoniae* provenientes de isolados clínicos humanos

Foram obtidas através de doação 26 cepas de *K. pneumoniae* multi-resistentes aos antibióticos de utilização hospitalar, previamente isoladas a partir de amostras clínicas humanas no Laboratório de Microbiologia do Hospital UNIMED “Miguel Soeiro” em Sorocaba e que seriam descartadas, todas em tubos Eppendorf® numa suspensão de glicerol a 30% (v/v). Para a manutenção destas cepas de *Klebsiella pneumoniae* foi realizada a sua propagação em meio líquido TSB em tubos de ensaio e, posteriormente, hastes flexíveis esterilizadas com ponta de algodão (igualmente esterilizado) foram inseridas em cada um dos tubos contendo as várias cepas da bactéria e depois colocadas em contato com meio TSA sólido em placas de Petri, para que houvesse a propagação destas bactérias neste meio, tendo as placas sido incubadas durante a noite a 37 °C durante 12 h. Após o período de incubação, as placas de Petri foram vedadas com Parafilm™ e acondicionadas em geladeira a 4 °C.

Relativamente à cepa liofilizada de *Klebsiella pneumoniae* de coleção da CEFAR (ref. CCCD-K001), adicionou-se 1 mL de solução fisiológica (0,9% NaCl, m/v) à ampola da cultura e homogeneizou-se com movimentos suaves. Uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi então transferida para um frasco contendo meio líquido TSB esterilizado o qual foi mantido a 37 °C durante 24 horas. Após visualização de turvação no meio, foi realizada a propagação da bactéria em placa de Petri contendo meio sólido TSA conforme descrito anteriormente, com o auxílio de uma haste flexível esterilizada contendo ponta de algodão.

4.2.3 Preparação da curva de crescimento da cepa de coleção de *K. pneumoniae*

Da placa de Petri contendo a bactéria *Klebsiella pneumoniae* de coleção propagada, retirou-se uma unidade formadora de colônia (UFC) com o auxílio de uma alça estéril descartável e inoculou-se em Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo TSB esterilizado, o qual foi suavemente homogeneizado por agitação orbital. Retirou-se uma alíquota ao tempo 0 e a densidade óptica lida em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 610 nm usando cubetas de plástico descartáveis. O Erlenmeyer contendo a suspensão bacteriana foi mantido armazenado a 37 °C com agitação orbital sempre após a retirada de uma alíquota para leitura. Os resultados de densidade ótica (OD) foram convertidos em concentração de biomassa (UFC/mL), utilizando a relação empírica: $OD_{610nm} = 1.0 \rightarrow [\text{biomassa}] \approx 1 \times 10^8$ UFC/mL.

4.2.4 Isolamento, amplificação e titulação de partículas bacteriofágicas estritamente líticas para *K. pneumoniae*

Uma vez que as cepas de *K. pneumoniae* multi-resistentes aos antibióticos de utilização hospitalar foram adquiridas no Hospital, a fonte ambiental de escolha para o isolamento de bacteriófagos foi a rede de esgoto do próprio Hospital.

4.2.4.1. Enriquecimento de bacteriófagos a partir da fonte coletada

A etapa de enriquecimento de bacteriófagos teve início com a inoculação da bactéria de coleção em um tubo de ensaio contendo meio líquido TSB esterilizado, com o auxílio de uma haste flexível esterilizada com ponta de algodão, o qual foi incubado durante a noite a 37 °C. Após este período de tempo, uma amostra de 50 µL desta suspensão bacteriana foi adicionada a 50 mL de meio 2xTSB em um frasco Erlenmeyer estéril de 250 mL de capacidade. A este Erlenmeyer adicionou-se, com

o auxílio de uma proveta, 50 mL de amostra líquida de esgoto hospitalar e, após homogeneização suave, o frasco foi incubado a 37 °C durante a noite.

Após este período de incubação, retiraram-se 50 mL de meio enriquecido e centrifugou-se a 2500 rpm por 20 min em tubos Falcon de 15 mL de capacidade, o sobrenadante foi removido cuidadosamente com o auxílio de uma seringa de 5 mL tendo sido filtrado através de filtro descartável Milipore de 0,22 µm de tamanho de poro para tubos Eppendorf® de 2 mL de capacidade estéreis. Para o teste de verificação da presença de bacteriófagos através de *spot-test*, foi necessário preparar um tapete bacteriano pela técnica de *pour plate*.

4.2.4.2. Preparação de tapete bacteriano de *K. pneumoniae* pela técnica de *pour plate*

Uma alíquota de 100 µL de suspensão bacteriana de *K. pneumoniae* ($OD_{600nm} = 1,0$) foi adicionada a 5 mL de meio MTA-TSB mantido previamente a 47 °C, em tubo de ensaio de 15 mL de capacidade. A suspensão resultante foi suavemente homogeneizada por agitação orbital e imediatamente vertida em placas de Petri contendo meio TSA sólido, as quais foram incubadas a 37 °C durante a noite.

4.2.4.3. Verificação da presença de bacteriófagos por *spot-test* das amostras enriquecidas

Com o auxílio de uma micropipeta, uma gota de 20 µL da amostra enriquecida na etapa 4.2.4.1 foi colocada no centro do tapete bacteriano de *K. pneumoniae* preparado em 4.2.4.2. A placa de Petri foi depois incubada a 37 °C durante a noite. Após o período de incubação, inspecionou-se a placa de Petri quanto à presença de uma zona translúcida na zona de aplicação da gota, indicativa de lise bacteriana e da presença de bacteriófagos.

4.2.4.4. Isolamento de bacteriófagos

O uso de tiras de papel de filtro de 1 cm de largura, estéreis, umedecidas na suspensão fágica filtrada, em uma placa com tapete bacteriano de *K. pneumoniae* já previamente formado pela técnica de *pour plate* se deu para que nesta placa fosse possível o contato da suspensão fágica com a bactéria. Nesse sentido, uma fita de papel de filtro estéril umedecida na suspensão fágica filtrada foi arrastada no sentido da esquerda para direita, na porção superior da placa; uma nova fita de papel estéril foi seguidamente arrastada no mesmo sentido mas mantendo contato com a parte já úmida arrastada pela fita anterior, e assim sucessivamente até à parte mais inferior da placa de Petri. Em seguida, a placa foi incubada durante a noite a 37 °C.

As placas de Petri foram depois inspecionadas visualmente quanto à presença de placas bacteriofágicas, e onde havia um halo de inibição mais isolado e menor pode inferir-se que se tratava de uma única placa bacteriofágica. Assim, com o auxílio de um palito de madeira estéril, esta placa fágica foi picada e uma nova placa de Petri com tapete bacteriano formado recentemente foi espetada em linha em diversos pontos usando o palito que perfurou a placa fágica. Utilizou-se novamente uma fita de papel de filtro estéril, como anteriormente, para passar sobre os pontos onde se espetou o palito e em camadas, mas desta vez sem trocar a fita de papel de filtro. Então, essa placa de Petri foi incubada durante a noite a 37 °C.

4.2.4.5. Amplificação do bacteriófago isolado

Picou-se uma placa fágica com um palito de madeira estéril, no isolado do procedimento anterior. Outras 20 placas de Petri já contendo tapetes bacterianos formados foram picadas em diferentes pontos com o mesmo palito utilizado para picar a placa fágica no isolado do procedimento anterior. Uma fita de papel de filtro estéril foi então arrastada por todas estas 20 placas, cobrindo a totalidade do tapete bacteriano. As placas foram depois incubadas durante a noite a 37 °C. Após o período de incubação, adicionou-se 5 mL de tampão fágico SM a cada placa de Petri, tendo estas sido novamente incubadas a 37 °C durante a noite, para que o tampão fágico promovesse a remoção dos bacteriófagos do meio de cultura.

Após o período de incubação adicional, recuperou-se o sobrenadante para tubos Falcon de 15 mL e descartaram-se as placas de Petri. Adicionou-se então 1 mL de clorofórmio para 9 mL de sobrenadante, em tubos Falcon de 15 mL. A fase superior formada foi coletada com o auxílio de uma micropipeta de 5 mL e filtrada para um frasco Stericup™ através de membrana polietersulfônica (PES) de 0,22 μ m de tamanho de poro. Os filtrados resultantes foram mantidos a 4 °C até utilização.

4.2.4.6. Determinação do título fágico pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada

Prepararam-se diluições seriadas (1×10^{-1} – 1×10^{-10}) em tubos Eppendorf® contendo 900 μ L de tampão fágico. Retiraram-se 100 μ L da suspensão estoque de bacteriófago produzida na etapa 4.2.4.5. e transferiram-se para um tubo Eppendorf® contendo 900 μ L de tampão fágico. Repetiu-se este procedimento em série até se obter uma diluição de 1×10^{-10} . Seguidamente, 100 μ L de cada diluição foram adicionados a tubos de ensaio contendo 5 mL de meio MTA-TSB a 42 °C e 100 μ L de suspensão bacteriana em fase de crescimento exponencial e, após suave homogeneização, os conteúdos dos tubos de ensaio foram vertidos em placas de Petri contendo meio sólido TSA. Após solidificação, as placas de Petri foram incubadas a 37 °C durante a noite. Após o período de incubação, as placas de Petri foram inspecionadas visualmente e naquelas que apresentaram placas fágicas procedeu-se à contagem das mesmas, considerando apenas valores de contagens de UFP (unidades formadoras de placas) entre 20-200.

O título bacteriofágico da suspensão estoque concentrada de bacteriófagos foi calculado através da Equação (1),

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

onde UFP representa o número de unidades formadoras de placas e V é o volume de inóculo da suspensão concentrada de bacteriófagos (mL).

4.2.4.7. Nomenclatura desenvolvida para o bacteriófago isolado

A nomenclatura para os novos bacteriófagos isolados seguiu as regras determinadas pelo laboratório PhageLab:

- ⊗ PhL representa “PhageLab”;
- ⊗ KP-CFR representa “*Klebsiella pneumoniae* proveniente de coleção da CEFAR”;
- ⊗ ph representa “fago”;
- ⊗ 00ij representa a combinação tamanho de placa fágica x fonte ambiental de isolamento, onde i=1 é o maior tamanho da placa fágica, i=2 é o tamanho médio da placa fágica, i=3 é o tamanho intermediário da placa fágica e i=4 é o menor tamanho da placa fágica; j=4 representa a fonte água de esgoto hospitalar.

Assim, de acordo com a nomenclatura desenvolvida no PhageLab, o bacteriófago isolado passa a tomar a designação PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 a partir deste ponto.

4.2.5 Caracterização físico-química do bacteriófago isolado

4.2.5.1. Análise espectrofotométrica por varredura espectral na região UV-Vis

Foi realizada uma varredura espectral UV-Vis de uma diluição da suspensão concentrada de fago (100 μ L de suspensão concentrada de bacteriófago diluída a 3000 μ L com tampão fágico SM) com o objetivo de determinar o comprimento de onda que produz a máxima absorvância das partículas fágicas.

Com o intuito de determinar o coeficiente de extinção molar do fago isolado, seguiu-se o procedimento descrito em detalhe por Rios et al. (2018). Partindo do título fágico calculado como descrito anteriormente com base em procedimentos microbiológicos, foram preparadas cinco diluições em tampão fágico SM (até um volume total de 2000 μ L) usando diferentes volumes de suspensão concentrada do

bacteriófago. A absorvância das várias diluições resultantes foi determinada a 255 nm (comprimento de onda que produziu a máxima absorvância das partículas fágicas) e 320 nm (comprimento de onda onde existe pouca absorção de luz pelos cromóforos dos bacteriófagos), usando cubetas de quartzo (Tabela 1).

4.2.5.2. Análise eletroforética (SDS-PAGE) das proteínas estruturais das partículas bacteriofágicas isoladas

A distribuição de pesos moleculares das proteínas estruturais do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 foi investigada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), usando um sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell 4-gel para eletroforese vertical da Bio-RAD (California CA, E. U. A.) acoplado a uma unidade de fornecimento de energia PowerPac™ HC (Bio-RAD, California CA, E. U. A.) e a um bloco de aquecimento digital também da Bio-RAD. Para determinar o perfil de proteínas estruturais das partículas fágicas e a sua distribuição de pesos moleculares, 500 µL da suspensão concentrada (purificada) de bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 (contendo $1,43 \times 10^{13}$ viriões) foram adicionados a um volume (500 µL) de tampão de ruptura (1,51% (m/v) Tris-Base, 0,5% (v/v) β-mercaptoetanol, 4% (m/v) dodecilsulfato de sódio, 10% (v/v) glicerol, e 0,012% (m/v) azul de bromofenol) num tubo Eppendorf® (com a sua tampa previamente perfurada por uma agulha aquecida) e fervido durante 10 min. De seguida, realizou-se a análise eletroforética de SDS-PAGE do sobrenadante da amostra (20 µL) e de marcadores de peso molecular (5 µL de *Pre-stained Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* da Bio-RAD, com padrões de proteínas com pesos moleculares entre 10 kDa e 250 kDa), com os géis (gel de concentração com 5% acrilamida-bisacrilamida / gel de separação com 12% acrilamida-bisacrilamida) corridos a uma voltagem de 200 V, 20 mA por gel, 20 W, durante 60 min, após o que os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 e fotografados em alta resolução para análise posterior.

4.2.5.3. Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por difração de raios-X (DRX)

Difratogramas de raios-X de amostras da suspensão concentrada de bacteriófago foram obtidos num Difratômetro de Raios-X (DRX) da Shimadzu (modelo XRD7000, Quioto, Japão), usando radiação de raios-X filtrada através de um alvo de cobre. A varredura de raios-X foi realizada a ângulos de difração de 2-Theta (de 5° a 90°, com incrementos de 0,02 graus e taxa de 2°.min⁻¹), com voltagem de 40 kV, intensidade de corrente elétrica de 30 mA, e potência de raios-X de 3 kW.

4.2.5.4. Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A preparação das grades de carbono foi realizada utilizando amostras não diluídas da suspensão concentrada de bacteriófagos, almejando uma melhor observação das estruturas. Para a **Coloração Negativa (NS)**, as amostras foram preparadas em grades de cobre de 3-mm de diâmetro (*Ultrathin Formvar/Carbon on a 300 mesh copper grid*, Electron Microscopy Sciences, Hatfield PA, E.U.A.). As grades de cobre (hidrofóbicas por natureza) foram aplicadas com a amostra (3 µL) na sua superfície, e a coloração das amostras foi realizada aplicando 3 µL de uma solução aquosa de fosfotungstato de potássio a 2% (m/m) e pH 7.0 na grade de cobre contendo a amostra e deixando secar ao ar. Após 30 s, o excesso de solução de fosfotungstato de potássio foi removido usando papel de filtro convencional. As **análises de microscopia eletrônica** foram realizadas num microscópio eletrônico de transmissão (MET) da Carl Zeiss Microscopy GmbH (modelo LEO 906, Jena, Alemanha), equipado com um filamento de tungstênio, e operando a 60 kV; o microscópio estava também equipado com uma câmera MORADA CCD da Soft Imaging System (Houston TX, E.U.A.) com uma resolução de 11 MegaPixels e uma gama dinâmica de 14 bits (tamanho de pixel de 9 µm) para a aquisição digital de imagens de alta resolução.

4.2.6. Caracterização biológica do bacteriófago isolado

Para avaliar o potencial infeccioso das partículas bacteriofágicas isoladas, realizaram-se ensaios de caracterização biológica englobando a avaliação da sua gama de hospedeiros, determinação da eficiência de plaqueamento (EOP), e determinação dos parâmetros de crescimento do bacteriófago tais como o período de eclipse, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão através da curva de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC). Adicionalmente, a avaliação do processo de ligação de cada partícula de bacteriófago à sua célula bacteriana hospedeira (que é uma combinação de difusão física, interações bioquímicas de superfície e alterações conformacionais nas proteínas receptoras induzidas por reação) foi estudada através da produção da sua curva de adsorção. A eficácia do bacteriófago isolado foi também avaliada em ensaios de terapia fágica *in vitro* através da produção das suas curvas de inativação bacteriana a dois valores diferentes de multiplicidade de infecção (MOI).

4.2.6.1. Gama de hospedeiros das partículas fágicas isoladas: ensaios de *spot test* e eficiência de plaqueamento (EOP)

A gama de hospedeiros do bacteriófago isolado foi determinada usando as cepas bacterianas listadas na Tabela 2, por *spot test*, de acordo com o procedimento descrito por Pereira et al. (2016) e Pinheiro et al. (2019a,b). Resumidamente, quatro mililitros de MTA-TSB, previamente inoculados com 300 µL de cultura bacteriana (Tabela 2) foram sobrepostos em meio TSA sólido e aplicada uma gota de 10 µL da suspensão do fago. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C durante 24 h e, após este período de incubação, foram examinadas quanto à presença de placas de lise. A sensibilidade bacteriana ao fago foi estabelecida pela formação de uma zona clara de lise no local de aplicação da gota. Dependendo da translucidez da zona de lise, as bactérias testadas foram diferenciadas de acordo com zona de lise clara (+) ou zona sem lise (-). A EOP (número relativo de placas fágicas que uma suspensão estoque de bacteriófagos é capaz de produzir em um determinado hospedeiro bacteriano) foi determinada para aquelas bactérias com testes de *spot* positivos (ou

seja, ocorrência de uma zona de lise clara), usando o método de ágar de camada dupla (Adams, 1959). As placas de Petri foram incubadas a 37 °C e examinadas quanto à presença de placas fágicas após 24 h. A EOP para cada hospedeiro bacteriano foi calculada por comparação com a eficiência para a cepa de coleção de *Klebsiella pneumoniae* (hospedeiro), de acordo com a expressão na Equação (2) (Kutter, 2009; Melo et al., 2014; Pinheiro et al., 2019a).

$$EOP = \frac{\text{Média das UFP na bactéria-alvo}}{\text{Média das UFP na bactéria hospedeira}} \times 100 \quad (2)$$

O valor da EOP obtido com a cepa hospedeira foi considerado como EOP = 100%. Os valores apresentados para a EOP são a média de três ensaios independentes. A EOP foi pontuada como alta, moderada ou baixa, quando os títulos relativos do bacteriófago para cada cepa representam 100-10%, 10-0,1% e 0,1-0,001%, respectivamente.

4.2.6.2. Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)

Para preparar a curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC), a bactéria foi cultivada num Erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de meio TSB, até as células atingirem a fase exponencial ($OD_{600nm} \approx 1,0$). 10 mL da suspensão bacteriana foram então centrifugados a 7000 g (5 min, 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 5 mL de meio TSB fresco ($OD_{600nm} \approx 1,0$ corresponde a $\approx 1 \times 10^8$ UFC/mL). Cinco mL da suspensão de bacteriófagos com um título de 1×10^5 UFP/mL foram então adicionados, para produzir a multiplicidade de infecção desejada ($MOI \leq 0,001$). A suspensão resultante foi incubada com agitação durante 5 min, para permitir que as partículas de bacteriófagos adsorvessem às células hospedeiras bacterianas. Os 10 mL de cultura foram centrifugados a 7000 g (5 min, 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 10 mL de meio TSB fresco e incubado à temperatura adequada (37 °C) sob agitação (150-200 rpm). Uma amostra (100 µL) foi retirada e imediatamente diluída em diluições decimais em série, e todas as diluições foram plaqueadas para

enumeração usando a técnica de sobreposição em ágar de dupla camada (seção 4.2.4.6.). Após o período de incubação, as placas fágicas formadas em cada diluição em série foram contadas, considerando apenas as diluições com 20-200 placas fágicas. Esta primeira amostra representou o tempo zero do ensaio. A cada 5 min (ou 10 min) subsequentes (até 90 min), foram retiradas amostras e imediatamente diluídas e plaqueadas. Os resultados foram subsequentemente plotados para determinar o período de eclipse do fago, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão. Os dados produzidos da curva de crescimento em um só ciclo síncrono foram mais bem ajustados via ajuste não linear dos dados a uma curva sigmoideal típica (ou modelo de regressão logística de 4 parâmetros, 4-PL) (Equação (2)).

$$\text{Log}(P_t) = m_2 + \frac{m_1 - m_2}{1 + \left(\frac{t}{m_3}\right)^{m_4}} \quad (3)$$

onde P_t é a concentração de fago (UFP/mL) no tempo t , m_1 é a resposta em $t = 0$, m_2 é a resposta em $t = \infty$, m_3 é o ponto de inflexão da curva, m_4 é o declive de Hill da curva (declive que define a inclinação da curva) e t é o tempo (min). O ajuste não-linear dos dados de crescimento do fago ao modelo na Equação (3) foi realizado usando o software KaleidaGraph v. 4.5.2 para MacOS X (Synergy Software, Reading PA, E.U.A.).

4.2.6.3. Curva de adsorção

A suspensão do fago (concentração final de 8×10^5 UFP/mL) foi adicionada a 10 mL de cultura bacteriana (concentração final de 10^8 UFC/mL) para obter um valor de MOI de 0,001 (Stuer-Lauridsen et al., 2003) e a suspensão resultante foi incubada a 37 °C. A mistura foi centrifugada a 10000 rpm durante 5 min e o sobrenadante foi imediatamente filtrado através de filtros de tamanho de poro de 0,20 µm. Os filtrados, contendo tanto partículas de fago não-adsorvidas como adsorvidas de forma reversível, foram diluídos e titulados como descrito anteriormente, com as placas sendo incubadas a 37 °C e examinadas quanto à presença de placas fágicas

após 24 h. A adsorção foi expressa como a diminuição percentual do título do fago no sobrenadante, em comparação com o tempo zero. Foram realizados três ensaios independentes. A taxa de adsorção das partículas fágicas foi estimada via ajuste não-linear dos dados experimentais ao modelo da Equação (4) (Shao e Wang, 2008; Santos et al., 2014; García et al., 2019).

$$\ln\left(\frac{P_t}{P_0}\right) = -\delta\left(\frac{X_0}{\mu(t)}\right)(e^{\mu(t)\cdot t} - 1) \quad (4)$$

onde P_t e P_0 são concentrações de fago nos tempos t e 0 , respectivamente, δ é a taxa de adsorção a ser estimada, X_0 é a concentração de células bacterianas (suscetíveis, não-infectadas) no tempo 0 , $\mu(t)$ é a taxa de multiplicação da bactéria e t é o tempo de infecção. O ajuste não-linear dos dados experimentais de adsorção ao modelo na Equação (4) foi realizado usando o software KaleidaGraph v. 4.5.2 para MacOS X (Synergy Software, Reading PA, E.U.A.).

4.2.6.4. Avaliação da suscetibilidade a antibióticos das várias cepas de *Klebsiella pneumoniae* originárias de isolados clínicos humanos

Vinte e seis cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos humanos foram testadas independentemente quanto à suscetibilidade aos antibióticos (de uso restrito no Hospital) Polimixina B, Cefepime, Imipenem e Meropenem. Todas as cepas de isolados clínicos foram cedidas pelo Coordenador Técnico do Laboratório de Microbiologia e Urinálise do Hospital UNIMED "Miguel Soeiro" em Sorocaba/SP (Brasil) em Caldo Brucella contendo 15% (v/v) de glicerol, em tubos Eppendorf® de 2,0 mL, e mantidas a -20 °C. Destas suspensões bacterianas, uma alça de cultura foi removida e utilizada para inocular um volume de 5 mL de meio líquido TSB, após o que os tubos contendo o meio líquido TSB inoculado foram incubados durante a noite a 37 °C. Após este período de incubação, 100 µL de cultura foram misturados com 4 mL de MTA-TSB (mantido líquido a cerca de 47 °C) em um tubo de ensaio de 15 mL e suavemente agitado. O conteúdo deste tubo foi então vertido sobre uma placa de Petri com meio TSA sólido, a qual foi

suavemente agitada por movimentos orbitais para espalhar o meio MTA-TSB inoculado. As placas foram deixadas secar por 1-2 min, após o que os discos de antibióticos foram cuidadosamente colocados no meio de cada pentante usando uma pinça esterilizada. Para avaliar os espectros líticos do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, uma gota de 10 μL da suspensão concentrada de bacteriófago foi colocada no meio de um dos pentantes em cada placa de Petri. Após incubação, foi mensurado o tamanho do halo de inibição de crescimento das bactérias frente aos antibióticos e o tamanho do halo de lise do bacteriófago.

4.2.6.5. Ensaios de terapia fágica *in vitro* (curvas de morte)

Através dos ensaios de terapia fágica *in vitro* foi possível determinar a inativação bacteriana pelo fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 isolado, tendo sido utilizados valores de MOI de 1 e 1000. Por forma a obter uma MOI de 1, uma cultura em fase exponencial da bactéria (concentração final de 1×10^5 UFC/mL) e suspensão de fago (concentração final de 1×10^5 UFP/mL) foram inoculadas em tubos de ensaio esterilizados contendo 10 mL de meio TSB e incubados a 37 °C sem agitação (BP, bactéria mais fago). Por forma a obter uma MOI de 1000, uma cultura em fase exponencial da bactéria (concentração final de 1×10^5 UFC/mL) e suspensão de fago (concentração final de 1×10^8 UFP/mL) foram inoculadas em tubos de ensaio esterilizados contendo 10 mL de meio TSB e incubados a 37 °C sem agitação (BP, bactéria mais fago). Para cada ensaio, foram preparadas também duas amostras de controle: um controle de bactéria (BC) e um controle de fago (PC). Os controles de bactéria foram inoculados apenas com *Klebsiella pneumoniae* e os controles de fago foram inoculados apenas com fago. Os controles (BC, PC) e amostras de teste (BP, bactéria mais fago) foram incubados exatamente nas mesmas condições. Alíquotas de 50 μL das amostras de teste (BP, bactéria mais fago) e dos controles de bactéria (BC) e fago (PC) foram retiradas aos 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®, até oito diluições decimais consecutivas. Em todos os ensaios, o título fágico foi determinado em triplicata pelo método de plaqueamento de gota (5 μL) em ágar de dupla camada contendo tapete bacteriano de *Klebsiella pneumoniae* (cultura em fase exponencial, $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0,5$) após um

período de incubação de 18 h a 37 °C. A concentração de bactéria foi determinada em triplicata em meio sólido TSA pelo método de plaqueamento por gota (10 µL) após um período de incubação de 18 h a 37 °C. Foram realizados três ensaios independentes para cada condição.

4.2.7. Estabilização estrutural/funcional das partículas bacteriofágicas

Misturou-se 100 µL de suspensão concentrada de bacteriófago com 900 µL de uma solução aquosa a 1% (m/m) de alfarroba, desta forma a concentração final de polissacarídeo na mistura bacteriófago/polissacarídeo foi de 10% (m/m). Este procedimento foi realizado com uma solução à base de glicerol. Após esta etapa, adicionou-se um dissacarídeo (trehalose) a cada uma dessas misturas, até concentração final de 0,5 mol/L, com mistura por pipetagem repetida para assegurar a homogeneização de todos os componentes, levando assim a quatro formulações. A suspensão foi dividida por vários tubos Eppendorf, com introdução de 100 µL da mistura em cada um deles, sendo que cada tubo Eppendorf foi sujeito a condições distintas: liofilização, secagem em estufa, congelação a -18 °C (freezer normal) durante 180 dias, congelação a -86 °C (biofreezer) durante 180 dias, refrigeração (+4 °C) durante 180 dias, temperatura ambiente (≈25 °C) durante 180 dias.

A infectividade das partículas bacteriofágicas foi quantificada utilizando a técnica de sobreposição em ágar conforme já descrito acima, bem como pela determinação do título fágico. As determinações foram realizadas em triplicata.

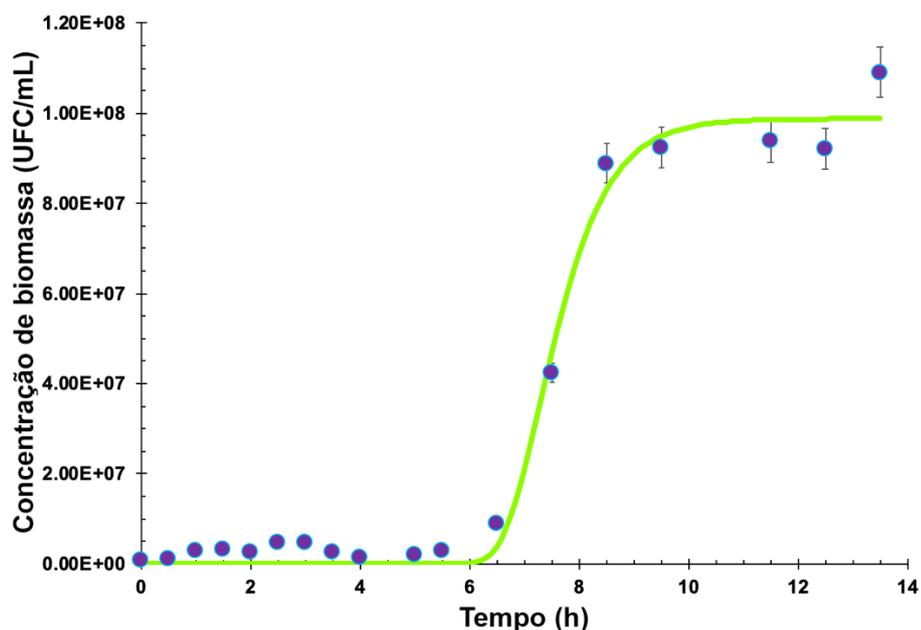
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curva de crescimento da cepa de coleção de *K. pneumoniae*

Conhecer o comportamento da bactéria em termos de crescimento é fundamental, para determinar quando esta entra em fase exponencial, sendo este o melhor período para interação entre fago e hospedeiro bacteriano e, assim, ocorrer à infecção bacteriana pelo fago para que este inicie o ciclo lítico e dê origem à sua progênie fágica. Segundo Santos et al. (2014), um aumento na área de superfície celular, um elevado número e densidade de receptores na superfície das células hospedeiras assim como uma maior mobilidade das bactérias, são fatores que podem interferir na primeira etapa do ciclo lítico, a adsorção. Deste modo, é imprescindível o conhecimento do comportamento de crescimento da bactéria em questão.

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que depois de 5 horas de crescimento, a bactéria deixou o período de latência e a biomassa aumentou exponencialmente. Após o tempo máximo de 8 h de crescimento exponencial a bactéria entrou na fase estacionária.

Figura 7. Curva de crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae* de coleção (CEFAR CCCD-K001).



Fonte: Elaboração própria.

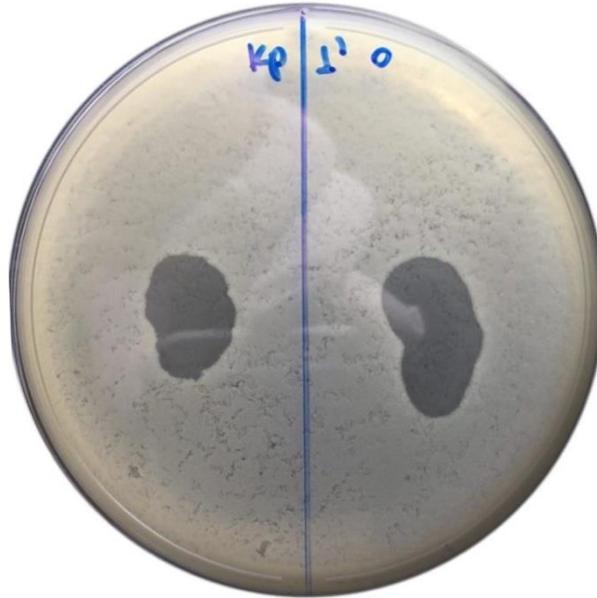
O ajuste não linear realizado (função sigmoideal de Gompertz, $y = m_1 \cdot e^{-m_2 \cdot e^{-m_3 \cdot x}}$, onde m_1 é a assíntota, isto é, a quantidade máxima atingível de biomassa, m_2 é o deslocamento da tendência de dados ao longo do período de tempo estudado, e m_3 é a taxa de crescimento de dados) permitiu estimar a máxima concentração de biomassa a $t=\infty$ de $9,88 \times 10^7$ UFC/mL, e um período *lag* de 5.5 h.

5.2. Isolamento de um bacteriófago lítico para *K. pneumoniae*

O isolamento de bacteriófagos para terapia fágica é frequentemente apresentado como um exercício simples de misturar uma amostra (no caso do presente estudo, água residual hospitalar) contendo fagos com células bacterianas hospedeiras, seguido de uma simples remoção de detritos bacterianos por filtração e/ou centrifugação no dia seguinte. Como retratado por Hyman (2019), esta etapa de enriquecimento tem a finalidade de aumentar o número de partículas fágicas, uma vez que para o estudo é necessária uma concentração elevada destas partículas.

Para verificar a presença de bacteriófagos na amostra de efluente hospitalar foi realizado um *spot test* (ou teste da gota) num tapete bacteriano da cepa hospedeira (*Klebsiella pneumoniae* de coleção, ref. CEFAR CCCD-K001), para observar potenciais zonas de lise indicativas da presença de bacteriófagos. Na Figura 8, que apresenta resultados obtidos no *spot test* após enriquecimento da amostra de efluente Hospitalar, observaram-se zonas de lise claras. O método utilizado aumentou a probabilidade de detectar e isolar o bacteriófago presente na amostra ambiental. As zonas de lise bacteriofágica que podem ser observadas na Figura 8 mostraram que a fonte ambiental testada foi positiva para partículas bacteriofágicas líticas para o hospedeiro do grupo *K. pneumoniae* escolhido, indicando assim que as águas residuais ou de esgoto são fontes interessantes para a pesquisa de bacteriófagos de interesse (HARADA et al., 2018).

Figura 8. Resultados obtidos no ensaio de *spot test* da amostra ambiental (água residual do Hospital UNIMED “Miguel Soeiro” em Sorocaba/SP) enriquecida num tapete bacteriano de *Klebsiella pneumoniae* de coleção (CEFAR CCCD-K001), para verificação da presença de bacteriófagos.

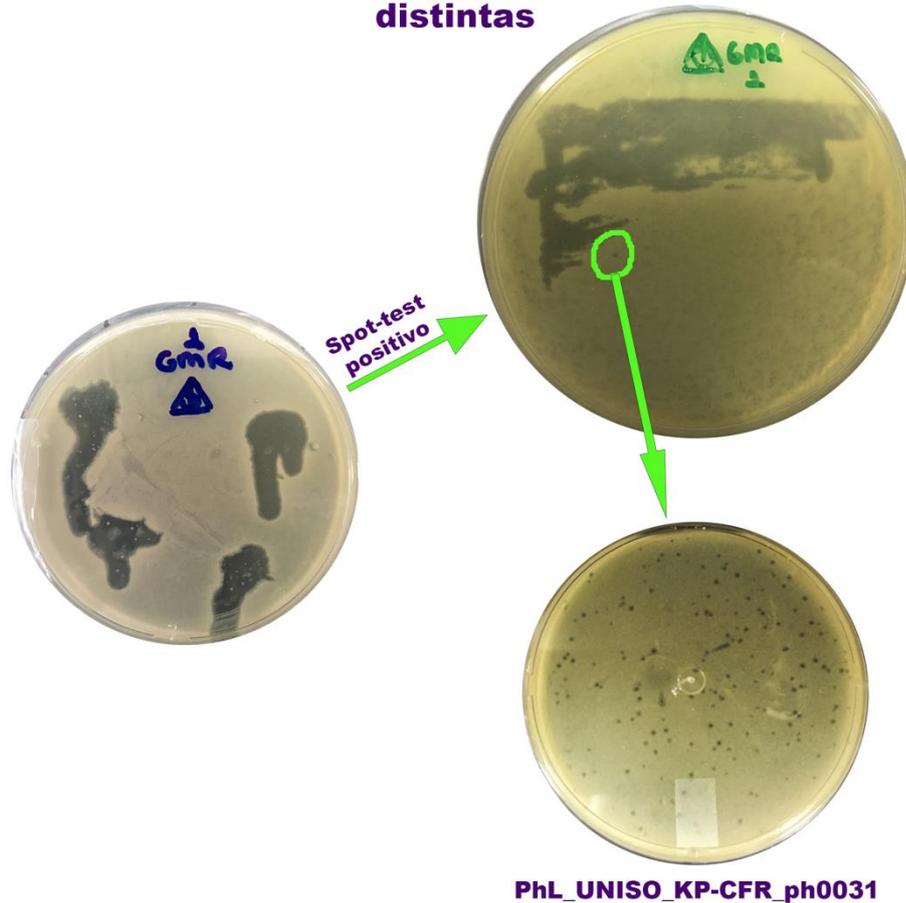


Fonte: Elaboração própria.

Após confirmação da presença na amostra de bacteriófagos líticos para *K. pneumoniae* (Figura 8), procedeu-se ao isolamento destas partículas bacteriofágicas. Foram realizadas estrias com uma tira de papel de filtro esterilizado umedecida com a amostra enriquecida, em uma placa de Petri contendo um tapete da bactéria hospedeira, com o objetivo de diluir e obter zonas de lise (placas fágicas) isoladas dos fagos presente na amostra (Figura 9).

Figura 9. Resultados obtidos a partir da estriagem da amostra de esgoto Hospitalar (Hospital UNIMED "Miguel Soeiro", Sorocaba/SP, Brasil) enriquecida em bacteriófagos, mostrando a morfologia das placas fágicas produzidas. A partir da estriagem, foi selecionada uma placa fágica isolada e designada como PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031.

Isolamento de bacteriófagos e seleção de placas fágicas com base em morfologias distintas



Fonte: Elaboração própria.

Através das características de morfologia da placa fágica observada no isolado, tais como tamanho, presença de halo secundário, coloração límpida e translúcida ou turva, foi possível o isolamento de um único tipo específico de bacteriófago lítico para *K. pneumoniae*. Uma forma de caracterização inicial é a observação de características morfológicas (MARTINS; MARTINS, 2014). Pode ser observado na Figura 9 a presença de placas fágicas com características morfológicas semelhantes, permitindo assim concluir da presença de um único tipo de bacteriófago lítico para a bactéria hospedeira. O fago foi nomeado como PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031.

Assim, seguindo-se ao isolamento do bacteriófago foi iniciada a amplificação e purificação do mesmo. De acordo com Loba (2014), a etapa de purificação das partículas fágicas é de extrema importância uma vez que, sendo os bacteriófagos parasitas intracelulares obrigatórios, a amplificação dos fagos se dá nas células hospedeiras específicas e, portanto, existe a obtenção não só de partículas fágicas mas também de debris celulares durante o processo lítico de amplificação dos fagos. A recuperação das partículas fágicas pode ser realizada através da indução de lise de eventuais células hospedeiras não-infectadas, recorrendo-se ao uso de solventes orgânicos como o clorofórmio para onde os debris celulares e outros contaminantes particionam. O processo de purificação do bacteriófago realizado neste trabalho de pesquisa consistiu numa filtração esterilizante do sobrenadante após adição de clorofórmio ao tampão utilizado para extração das partículas fágicas na fase final do processo de amplificação (ver seção 4.2.4.5.), utilizando um sistema filtrante SteriCup™ com membrana poliétersulfônica de 0.20 µm de tamanho de poro, dado que este tipo de filtração não retém partículas virais (SINOGAS, 2020). Ainda que esteja em acordo com o descrito por Loba (2014), esta técnica de purificação não impede que endotoxinas bacterianas possam permanecer no filtrado.

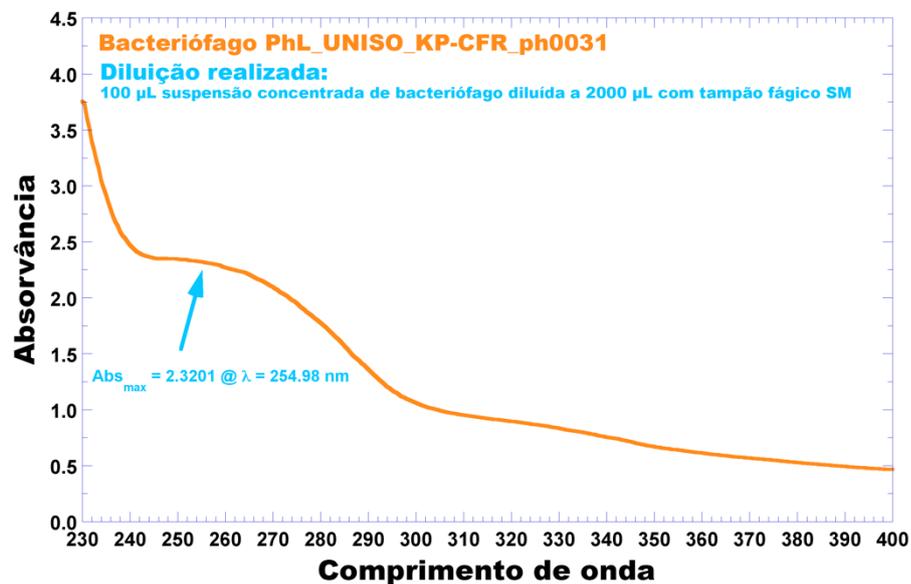
5.3. Caracterização físico-química do bacteriófago isolado

A caracterização físico-química das partículas fágicas isoladas compreendeu varreduras espectrais na zona UV-Vis com o objetivo de determinar o coeficiente de extinção molar do bacteriófago, a análise do perfil de proteínas estruturais e sua distribuição de tamanhos moleculares por eletroforese SDS-PAGE, a análise por difração de raios-X com o objetivo de determinar o tamanho putativo de eventuais cristalitos presentes na suspensão concentrada de partículas fágicas, e análise por microscopia eletrônica de transmissão com o objetivo de observar a estrutura do bacteriófago.

5.3.1. Análise espectrofotométrica por varredura espectral na região UV-Vis

Os resultados obtidos a partir da varredura espectral na zona UV-Vis do espectro realizada à suspensão concentrada do bacteriófago podem ser observados na Figura 10.

Figura 10. Varredura espectral na zona UV-Vis do espectro, da suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031.



Fonte: Elaboração própria.

Por análise da Figura 10 pode observar-se um mínimo de absorção em torno de 245 nm; quando este mínimo está ausente do espectro, muito provavelmente estão presentes contaminantes na suspensão provenientes das células bacterianas (debris celulares e proteínas citoplasmáticas liberadas por lise celular bacteriana), o que normalmente ocorre quando estas contêm poucos vírions. Ainda que não muito pronunciado, este não foi o caso.

Uma concentração média de partículas bacteriofágicas igual a $1,165 \times 10^{13}$ virions/mL foi obtida para a suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031. Os dados utilizados para preparar a curva de calibração relacionando a concentração de partículas fágicas com a sua absorvância corrigida, com o objetivo de determinar o coeficiente de extinção molar das

partículas inteiras do fago isolado, podem ser encontrados na Tabela 1, enquanto que a curva de calibração produzida está exibida na Figura 11.

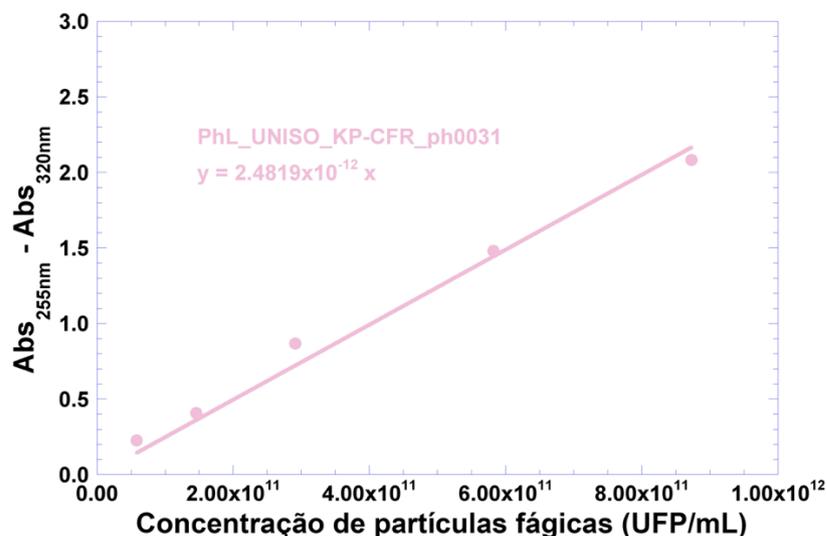
Quadro 1. Dados utilizados para preparar uma curva de calibração com o objetivo de determinar o coeficiente de extinção molar das partículas inteiras do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031.

Volume de suspensão concentrada de fago (μL)	Volume final da diluição (μL)	Número de UFP no volume de suspensão concentrada de fago	Concentração de partículas fágicas (UFP/mL)	Abs _{255 nm}	Abs _{320 nm}	Abs _{255nm} -Abs _{320nm}
10	2000	$1,1645 \times 10^{11}$	$5,82250 \times 10^{10}$	0,3512	0,1252	0,2260
25	2000	$2,9113 \times 10^{11}$	$1,45563 \times 10^{11}$	0,6667	0,2589	0,4078
50	2000	$5,8225 \times 10^{11}$	$2,91125 \times 10^{11}$	1,3113	0,4425	0,8688
100	2000	$1,1645 \times 10^{12}$	$5,82250 \times 10^{11}$	2,3767	0,8966	1,4801
150	2000	$1,7468 \times 10^{12}$	$8,73375 \times 10^{11}$	3,5000	1,4177	2,0823

Fonte: elaboração própria.

Efetuada um ajuste linear aos dados exibidos na Tabela 1, obteve-se a equação $\text{Abs}_{255\text{nm}} - \text{Abs}_{320\text{nm}} = 2,4819 \times 10^{-12} x [\text{Partículas fágicas, UFP/mL}]$ (Figura 11) para o fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 e também, por aplicação da equação de Beer-Lambert, foi possível determinar o coeficiente de extinção molar do bacteriófago isolado como $\epsilon_{\text{PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031}} = 2,4819 \times 10^{-12} (\text{UFP/mL})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Figura 11. Curva de calibração produzida para a relação entre a concentração de partículas bacteriofágicas inteiras em suspensão e a absorção da suspensão a 255 nm corrigida para debris celulares e outras proteínas intracitoplasmáticas ao comprimento de onda de 320 nm, para o fago isolado PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, permitindo determinar o seu coeficiente de extinção molar.



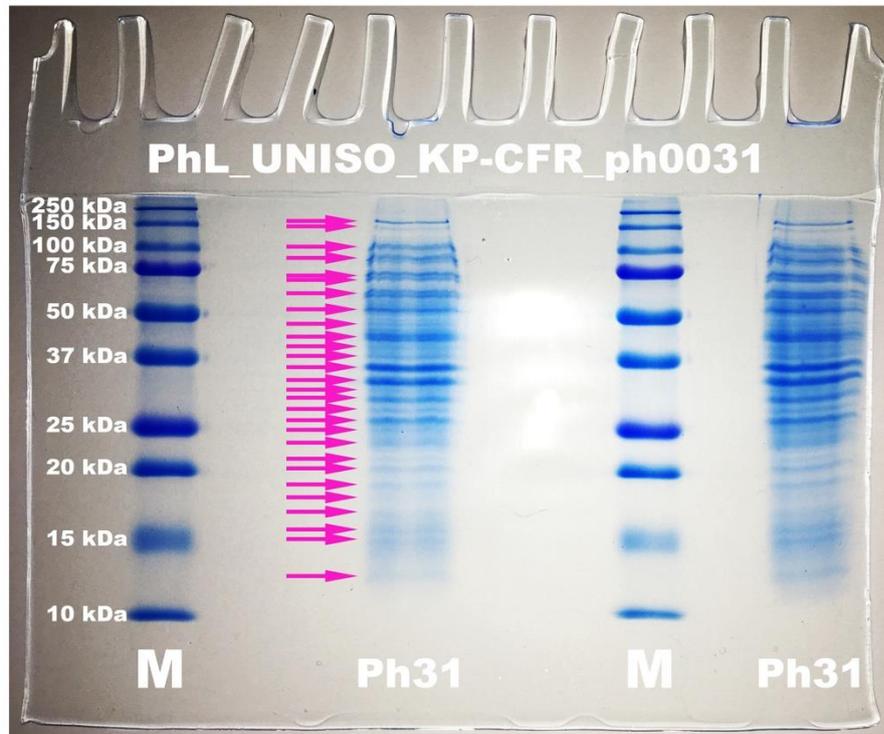
Fonte: Elaboração própria.

A subtração do valor de Abs_{320nm} , um comprimento de onda onde existe pouca absorção de luz pelos cromóforos dos bacteriófagos, teve como objetivo corrigir grosseiramente o espalhamento de luz causado pelas partículas de fago e contaminantes particulados não-bacteriofágicos (Rios et al., 2018; Pinheiro et al., 2019a).

5.3.2. Análise eletroforética (SDS-PAGE) das proteínas estruturais das partículas bacteriofágicas isoladas

Os resultados da análise por SDS-PAGE do sobrenadante, obtido após aquecimento a 100 °C de 500 µL da suspensão concentrada de bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 (lanes Ph31) na presença de β-mercaptoethanol e dodecilsulfato de sódio (lane M, marcadores de peso molecular de gama alargada). O electroforetograma corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 exibido na Figura 12 permitiu produzir uma curva de calibração para as proteínas na lane de marcadores de peso molecular (lane M), resultando na equação linear $\text{Log}_{10}(\text{MW, kDa}) = -1,4854 \times R_f + 2,1915$ ($r^2=0,9288$). A suspensão de fago concentrado e purificado exibiu uma ampla variedade de proteínas estruturais (ver setas inseridas, Figura 12) com gamas de pesos moleculares muito parecidos. O tratamento térmico da suspensão de fago na presença de SDS (transmitindo carga negativa uniforme e linearizando as proteínas) e β-mercaptoetanol (quebrando pontes dissulfeto de cisteína-cisteína) ajudou a desnaturar as proteínas estruturais do fago, e por isso as lanes Ph31 exibem uma grande quantidade de bandas devido à mistura de proteínas com diferentes pesos moleculares. Estes resultados estão em estreita concordância com a análise de proteínas estruturais de fagos por diferentes pesquisadores (DOMINGO-CALAP; DELGADO-MARTÍNEZ, 2018; MIHARA et al., 2016; ŠIMOLIŪNAS et al., 2018; YUAN; GAO, 2016).

Figura 12. Resultados da análise proteômica efetuada ao fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031. As proteínas estruturais do bacteriófago foram separadas por eletroforese SDS-PAGE e visualizadas com Coomassie Brilliant Blue G-250 (lane Ph31). Os marcadores de peso molecular (lane M) foram *Pre-stained Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-RAD, California CA, E.U.A.).



Fonte: Elaboração própria.

Após cálculo da mobilidade relativa (R_f) de tais bandas e por aplicação da curva de calibração resultante da distribuição de bandas proteicas dos marcadores de peso molecular na Figura 12 (lane M), obtiveram-se os pesos moleculares (MW) para as proteínas estruturais do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 exibidos na Tabela 2.

Quadro 2. Distribuição de pesos moleculares das proteínas estruturais do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031.

Rf	MW (kDa)
0,053	129,50
0,067	123,73
0,100	110,40
0,120	103,10
0,153	91,99
0,167	87,89
0,193	80,23
0,227	71,58
0,253	65,34
0,280	59,65
0,293	56,99
0,313	53,22
0,333	49,70
0,360	45,37
0,380	42,37
0,393	40,48
0,420	36,95
0,440	34,51
0,453	32,97
0,480	30,10
0,507	27,47
0,533	25,08
0,560	22,89
0,587	20,90
0,613	19,07
0,647	17,02
0,667	15,89
0,733	12,65

Fonte: Elaboração própria.

Ainda que os pesos moleculares das bandas proteicas exibidos na Tabela 2 sejam consistentes com resultados publicados por Lu et al., (2013), Shen et al., (2012) e Lin et al., (2010), é importante lembrar que a coloração com Coomassie permite a visualização de bandas proteicas com quantidades de proteína superiores a 70 µg, enquanto que a coloração com prata permite a determinação/visualização de bandas proteicas com quantidades de proteína tão pequenas quanto 7 µg. Assim, a coloração do eletroforetograma de SDS-PAGE com prata deveria ser uma melhor abordagem, permitindo detectar pequenas proteínas em quantidades diminutas, ainda que provavelmente pudesse ocorrer emborratamento devido ao elevado número de bandas (ROCHA et al., 2017).

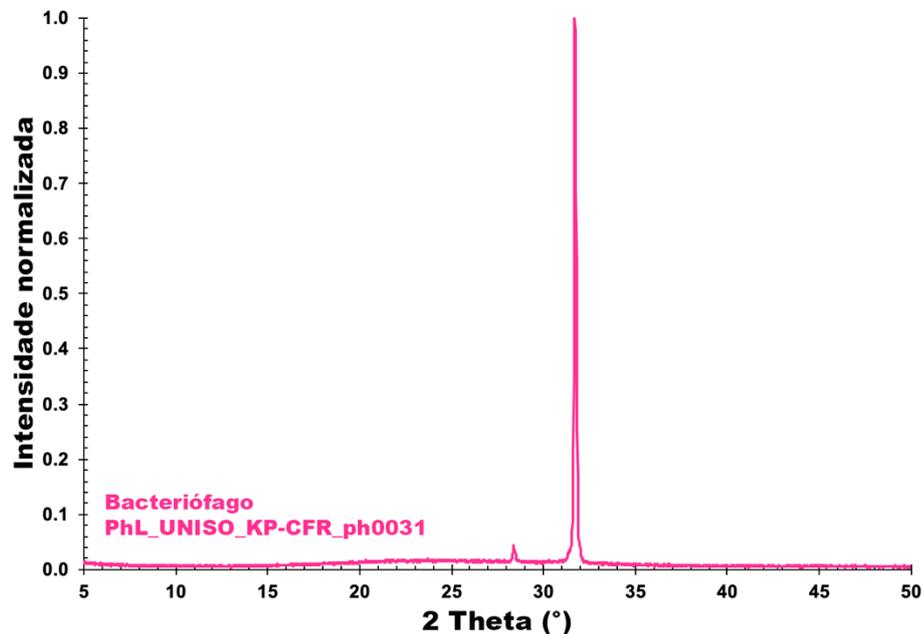
O eletroforetograma também permite inferir sobre a presença da proteína de cauda do bacteriófago, em concordância com os resultados publicados por Cuervo et al. (2013), dado que a cauda é um elemento de arquitetura proteica tridimensional comum aos bacteriófagos pertencentes às famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e

Podoviridae, e as proteínas da cauda das partículas bacteriofágicas são conhecidas e possuem pesos moleculares equivalentes a 10 kDa, 22 kDa, 59 kDa, 61 kDa e 89 kDa. Tal como ilustrado na Tabela 2, é possível observar a presença de proteínas com pesos moleculares de 22 kDa e 59 kDa.

5.3.3. Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por difração de raios-X (DRX)

Os resultados obtidos a partir das análises de difração de raios-X realizadas à suspensão concentrada de bacteriófago estão exibidos na Figura 13 na forma de um difratograma normalizado e permitem observar um comportamento amorfo generalizado com dois picos de cristalinidade.

Figura 13. Difratograma de raios-X (DRX) de uma amostra da suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031.



Fonte: Elaboração própria.

O padrão de raios-X pode ser utilizado para confirmar se a amostra que está sendo analisada é cristalina ou amorfa. O padrão de difração de amostras amorfas

exibe um "halo" amplo com poucos máximos. Apesar do fato de que esse padrão de "halo" não identifica o material sob exame de uma maneira única, confirma, no entanto, que o material é amorfo, que é uma informação crítica necessária para a caracterização (YOUNG, 2012). A equação de Scherrer (SCHERRER, 1918) (Equação (5)), em estudos de difração de raios-X, relaciona o tamanho de partículas submicrométricas, ou cristalitos, em um sólido, com o alargamento de um pico num padrão de difração. É utilizada na determinação do tamanho de partículas de cristais na forma de pó. Os estudos de DRX permitem medir o tamanho, forma e tensão interna de pequenas regiões cristalinas.

$$\tau(nm) = \frac{K \times \lambda}{FWHM \times \cos(\theta)} \quad (5)$$

Usando a equação de Scherrer, onde τ e λ têm a mesma unidade de medida (nm), FWHM é a largura total a metade do máximo do pico em rad, K é um fator de forma adimensional (0,94) e θ é metade do ângulo de Bragg em rad, e observando na Figura 13 que aparecem dois picos de cristalinidade no difratograma de raios-X do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, a $2\theta = 28,38^\circ$ e $2\theta = 31,70^\circ$, levando em consideração que o comprimento de onda dos raios-X utilizados foi igual a 1,5418 angstrom (0,15418 nm) e convertendo todos os ângulos em graus para radianos, então os cristalitos detectados nos valores de 2θ acima mencionados possuíam os tamanhos prováveis de $\tau_{2\theta=28,38^\circ} = 85,65$ nm, $\tau_{2\theta=31,70^\circ} = 43,16$ nm. A fórmula de Scherrer é útil para comparação qualitativa, e somente quando os cristalitos têm tamanhos inferiores a 1000 Å. A precisão da equação do tamanho de cristalito de Scherrer é, no entanto, limitada em parte pela incerteza no valor de FWHM, o alargamento de difração pura deduzido experimentalmente (ALEXANDER e KLUG, 1950). A fórmula de Scherrer afirma que a amplitude integral é inversamente proporcional ao tamanho aparente e aborda apenas o alargamento de linhas que é inteiramente causado por efeitos de tamanho (SCARDI et al., 2004).

A normalização da intensidade no difratograma da suspensão concentrada (seca) de bacteriófago foi realizada dividindo os valores de intensidade pelo valor

máximo de intensidade no difratograma (Figura 13), permitindo assim uma melhor comparação entre os picos de cristalinidade no difratograma de raios-X.

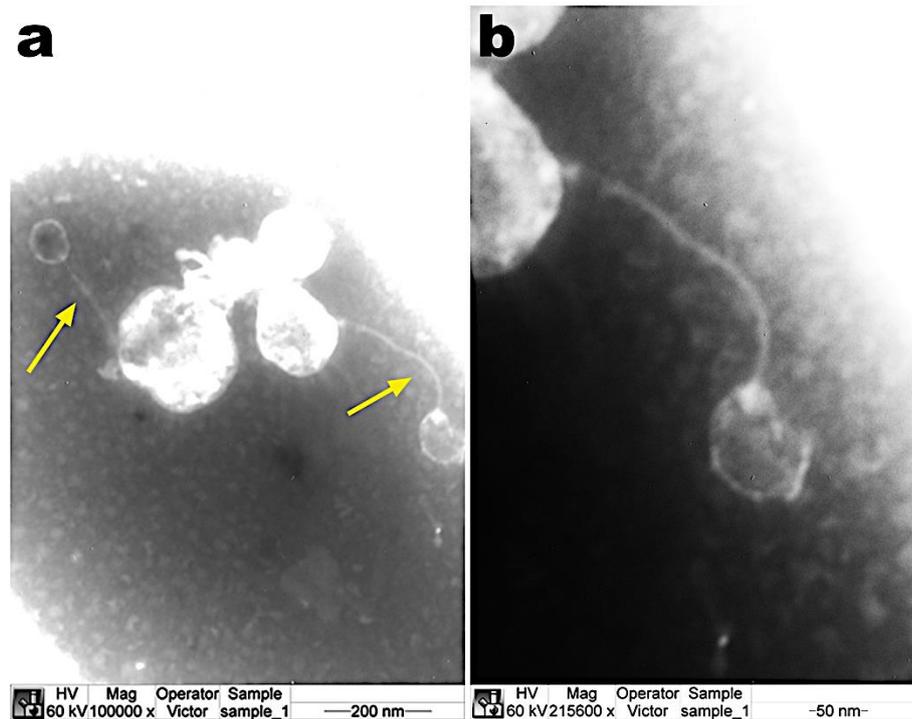
O difractograma do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 exibiu ruído muito pequeno, com picos muito bem definidos na região de $28,00^\circ \leq 2\theta \leq 33,00^\circ$, com um pico bastante alto a $2\theta = 31,70^\circ$, o que dificultou a visualização do ruído de toda a banda.

Os picos acentuados produzidos no padrão de difração do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 pelo espalhamento de raios-X por estruturas cristalinas, servem como uma assinatura para o material analisado (MBONYIRYIVUZE et al., 2015).

5.3.4. Análise das partículas bacteriofágicas isoladas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A preparação das grades de carbono foi realizada usando amostras não-diluídas da suspensão concentrada de bacteriófagos, almejando uma melhor observação das suas estruturas. O processo de coloração das partículas fágicas envolveu uma secagem suave da amostra ao ar após a aplicação de 3 μL de uma solução aquosa de fosfotungstato de potássio a 2% (m/m) e pH 7.0 na grade de cobre contendo a amostra. Ainda que muito suave, tal secagem foi suficiente para promover uma ligeira deformação das partículas fágicas, e defato isto pode ser claramente observado nas fotomicrografias da Figura 14.

Figura 14. Fotomicrografias de MET de coloração negativa da suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 a diferentes ampliações: **(a: x100000; b: x215600)**.



Fonte: Elaboração própria.

Não obstante este fato, as fotomicrografias obtidas nas análises por MET das amostras coradas negativamente permitiram a observação da estrutura das partículas fágicas isoladas com um contraste adequado (Figura 14). Após uma cuidadosa inspeção das fotomicrografias na Figura 14, pode concluir-se que as partículas bacteriófágicas isoladas têm cauda (ver setas inseridas na Figura 14) e são, portanto, bacteriófagos com material genético do tipo dsDNA, pertencendo muito provavelmente à família *Siphoviridae*.

5.4. Caracterização biológica do bacteriófago isolado

A caracterização biológica do fago isolado foi realizada através da determinação do título da suspensão fágica (concentração em partículas bacteriófágicas). Com o intuito de avaliar o potencial de infecção do hospedeiro bacteriano pelo fago, foi determinada a gama de hospedeiros e a eficiência de

plaqueamento (EOP) do bacteriófago isolado, a curva de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC) para determinação do período de eclipse, do período latente, do período de acumulação intracelular e do tamanho de explosão (*Burst size*) do fago na sua bactéria hospedeira, e a curva de adsorção para determinação da taxa de adsorção das partículas fágicas às células bacterianas hospedeiras. Finalmente, foram produzidas as curvas de morte da bactéria hospedeira a dois valores distintos de MOI, 1 e 1000, com a finalidade de avaliar a capacidade de inativação da bactéria pelo fago bem como o potencial de desenvolvimento de resistência bacteriana ao fago, num período de 24 horas.

5.4.1. Título da suspensão fágica

Para a determinação do título fágico foram efetuadas diluições decimais seriadas da suspensão concentrada do fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, tendo estas sido plaqueadas pelo método da gota em ágar de dupla camada. Foram determinados os números de unidades formadoras de placas (UFP) para cada diluição, sendo que somente para diluições superiores a 10^{-9} foi possível contar o número de placas fágicas. Cada UFP corresponde a uma partícula fágica. Assim, por aplicação da Equação (1), a concentração média de partículas fágicas na suspensão produzida foi de $1,165 \times 10^{13}$ virions/mL. Segundo Montso, Mlambo e Ateba (2019), fagos estritamente líticos com elevados títulos são considerados candidatos ideais para aplicações em controle biológico.

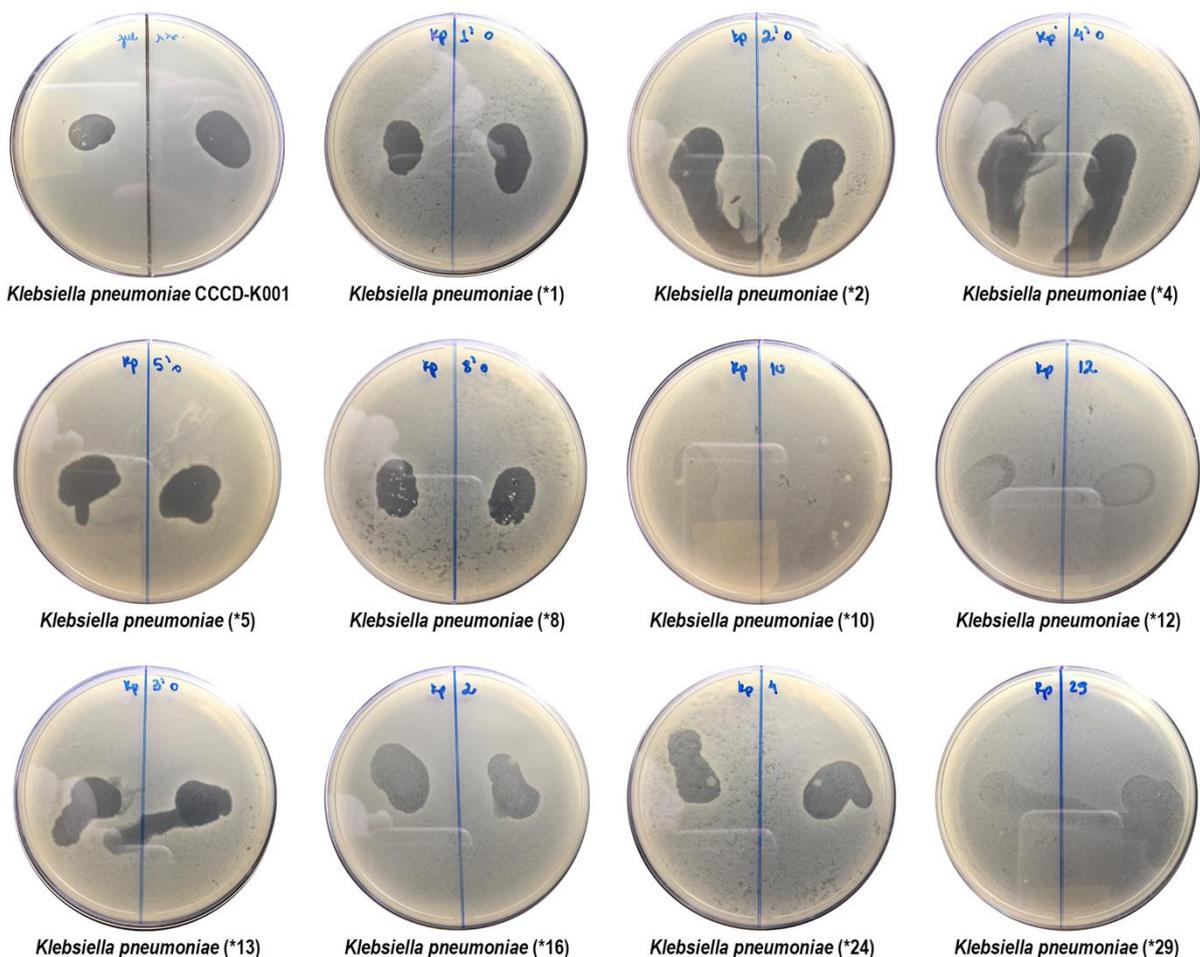
5.4.2. Gama de hospedeiros das partículas fágicas isoladas: ensaios de *spot test* e eficiência de plaqueamento (EOP)

A gama de hospedeiros do bacteriófago isolado foi determinada usando as cepas bacterianas listadas na Tabela 3. A sensibilidade bacteriana ao fago foi estabelecida pela formação de uma zona clara de lise no local de aplicação da gota (*spot test* com gotas de 10 μ L da suspensão do fago). Dependendo da translucidez

do *spot*, as bactérias foram diferenciadas de acordo com zona clara de lise (+) ou zona sem lise (-) (Tabela 5).

O espectro lítico do fago foi assim analisado por inspeção visual de zonas claras de lise após plaqueamento de gotas de 10 μ L em tapetes bacterianos produzidos com as cepas bacterianas de coleção e com as cepas provenientes de isolados clínicos humanos. Os resultados obtidos mostram a capacidade do fago isolado para infectar outras células bacterianas para além das células bacterianas hospedeiras. O fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 infectou apenas bactérias do gênero *K. pneumoniae*, como pode ser observado na Tabela 3 e na Figura 15.

Figura 15: Resultados positivos obtidos no *spot-test* do fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 na cepa hospedeira de coleção *Klebsiella pneumoniae* CCCD-K001 e nas 11 cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos humanos.



Fonte: Elaboração própria.

No trabalho de pesquisa aqui descrito, a gama de hospedeiros do bacteriófago isolado foi avaliada determinando se o fago era capaz de formar zonas de lise claras numa gama alargada de cepas bacterianas, um método comum utilizado para determinar se as partículas fágicas podem infectar as células bacterianas de forma produtiva, produzindo progênie (HYMAN e ABEDON, 2010; ROSS et al., 2016). No teste da gota (*spot-test*), um pequeno volume de suspensão fágica é colocado num tapete da bactéria em crescimento, para determinar se o bacteriófago é capaz de infectar as células. No entanto, esta técnica pode levar a falsos positivos devido à lise das células bacterianas sem ocorrer infecção pelo bacteriófago (MEADEN e KOSKELLA, 2013), um fenómeno que se pensa ocorrer ou devido a um grande número de partículas fágicas a adsorver a célula e a lisá-la, ou a lise promovida por endolisinas residuais presentes na suspensão fágica (ABEDON, 2011; ROSS et al., 2016).

De acordo com Hyman (2019), não é sempre verdade que novos fagos isolados infectarão apenas a cepa ou espécie bacteriana de isolamento, uma vez que em geral fagos recém isolados podem ser capazes de infectar um hospedeiro que exhibe o mesmo tipo geral de receptores que o hospedeiro de isolamento.

Normalmente, diluições seriadas da suspensão bacteriofágica são necessárias para observar placas fágicas individuais num tapete bacteriano, e o principal parâmetro que influencia este ensaio é a eficiência de plaqueamento (EOP) do bacteriófago. A eficiência de plaqueamento relativa, isto é, o título do fago numa determinada linha celular bacteriana comparado com o título máximo observado no hospedeiro, pode variar consideravelmente (KHAN MIRZAEI e NILSSON, 2015; KUTTER, 2009). Uma EOP de 100% significa que todas as partículas fágicas que se ligam a uma célula bacteriana hospedeira podem injetar o seu material genético e formar uma placa fágica nas cepas apropriadas sob condições ideais (KUTTER, 2009).

Tabela 1. Gama de hospedeiros das partículas fágicas isoladas, determinada em 36 cepas bacterianas. As cepas provenientes de isolados clínicos estão marcadas com (*). Zona de lise clara (+) e zona sem lise (-). O plaqueamento com a cepa hospedeira foi considerado como EOP = 100% (EOP = Eficiência de Plaqueamento).

Cepas bacterianas	Origem	Bacteriófago	
		PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 Spot Test	EOP (%)
<i>Escherichia coli</i> CCCD - E003	Coleção	-	-
<i>Salmonella enterica</i> CCCD - S004	Coleção	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCCD - P004	Coleção	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> CCCD - P001	Coleção	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CCCD - E002	Coleção	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> CCCD - B010	Coleção	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCCD - S010	Coleção	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> CCCD - S009	Coleção	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 16606	Coleção	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCCD - K001	Coleção	+	100,00 (hospedeiro)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*1)	Swab anal	+	84,64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*2)	Urina	+	71,23
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*4)	Swab anal	+	89,21
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*5)	Urina	+	70,18
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*8)	Swab anal	+	45,36
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*10)	Swab anal	+	9,54
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*12)	Secreção de fêmur	+	0,90
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*13)	Urina	+	59,64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*16)	Ponta de catéter	+	12,89
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*24)	Swab anal	+	55,12
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*29)	Swab anal	+	23,66
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*3)	Urina	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*6)	Urina	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*7)	Urina	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*9)	Swab anal	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*14)	Urina	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*15)	Hemocultura	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*17)	Urina	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*18)	Swab anal	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*19)	Urina	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*20)	Urina	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*21)	Swab anal	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*22)	Urina	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*23)	Swab anal	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*26)	Urina	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (*30)	Swab anal	-	-

Fonte: Elaboração própria.

A gama de hospedeiros é uma propriedade crítica para decidir a utilidade de um determinado bacteriófago para utilização em terapia fágica. Idealmente, um fago não infecta outras espécies de bactérias para além do seu hospedeiro específico, mesmo porque isso pode matar membros não-patogênicos da flora normal ou até diluir a ação efetiva do fago em relação às células bacterianas-alvo. Embora a suscetibilidade do hospedeiro possa por vezes ser considerada uma questão de o

receptor correto estar presente nas células das bactérias-alvo, restrições adicionais no alcance do hospedeiro incluem defesas bacterianas antifágicas, como o sistema CRISPR-Cas, enzimas de restrição e sistemas de toxinas e antitoxinas. Os fagos também possuem sistemas de combate, de forma que o alcance do hospedeiro é uma propriedade dinâmica que pode mudar ao longo do tempo (HYMAN, 2019).

O número relativo de placas fágicas que a suspensão estoque de um dado bacteriófago é capaz de produzir numa cepa bacteriana diferente da do seu hospedeiro bacteriano específico é chamado de Eficiência de Plaqueamento (EOP). Este parâmetro permite avaliar o potencial dos bacteriófagos para infectarem e lisarem outras bactérias para além das suas células hospedeiras específicas (MIRZAEK; NILSSON, 2015). Os resultados obtidos para a eficiência de plaqueamento do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 podem ser encontrados na Tabela 3, para todas as cepas bacterianas para as quais o *spot-test* deu resultado positivo.

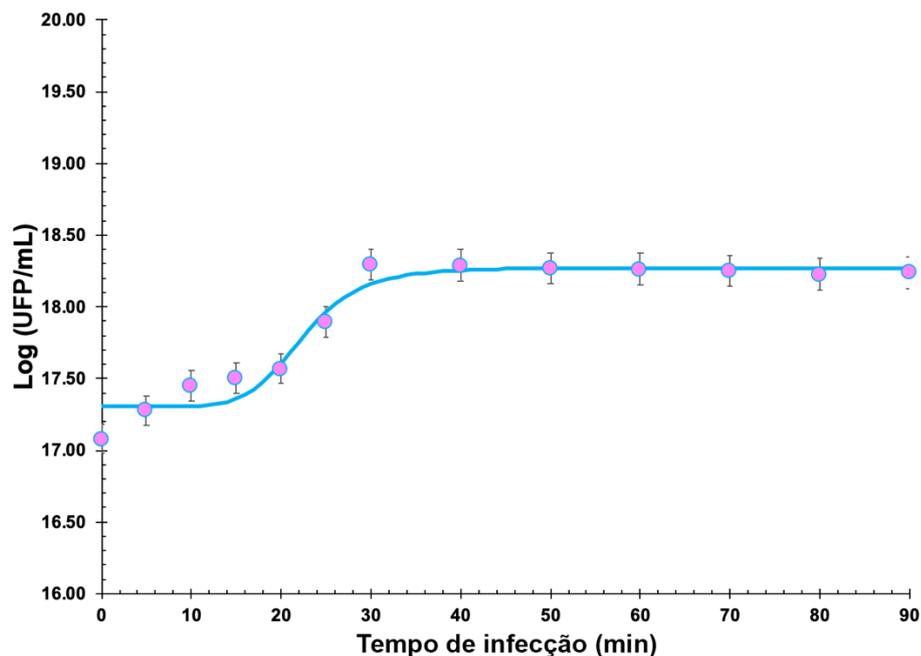
De acordo com os resultados obtidos, as partículas fágicas isoladas podem ser utilizadas contra o agente etiológico que pode causar diferentes tipos de infecções associadas aos cuidados de saúde, incluindo pneumonia, infecções de feridas ou de locais de cirurgias, e meningite: *Klebsiella pneumoniae*. Ainda que uma das principais vantagens do tratamento com bacteriófagos resida na sua elevada especificidade, uma vez que as populações bacterianas não-alvo devem permanecer inalteradas, as partículas fágicas deverão ser capazes de lisar a maioria das cepas de uma dada espécie bacteriana (RIOS et al., 2016; HAWKINS et al., 2010; PEREIRA et al., 2017).

Como a gama de hospedeiros do fago isolado é bastante apertada, bactérias naturais não patogênicas de seres humanos infectados não serão afetadas pelo tratamento com este bacteriófago. Não obstante, no futuro, novos fagos necessitarão de ser isolados e testados junto com o fago já isolado e devidamente caracterizado, por forma a produzir um coquetel com um espectro lítico de atividade mais alargado para controlar várias cepas de *Klebsiella pneumoniae*, incluindo uma vasta gama de cepas resistentes a múltiplos antibióticos.

5.4.3. Curva de um só ciclo de crescimento síncrono (OSGC)

Os parâmetros de crescimento das partículas fágicas isoladas, tais como o período de eclipse, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão (*burst size*), foram obtidos a partir da curva de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC) (OLIVEIRA et al., 2009; HANLON, 2007; ABEDON, 2006; PINHEIRO et al., 2019a). Os bacteriófagos e as células bacterianas interagem uns com os outros de forma similar àquela de um predador com a sua presa. A curva OSGC do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 encontra-se na Figura 16, usando células hospedeiras de *Klebsiella pneumoniae* CCCD - K001 na fase exponencial de crescimento ($OD_{600nm} \approx 0,1$, correspondendo a $\approx 1 \times 10^8$ UFC/mL) e suspensão do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 com um título ajustado a 8×10^5 UFP/mL (produzindo assim um valor desejado de $MOI \leq 0.001$).

Figura 16. Curva de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC) do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 na presença de *Klebsiella pneumoniae* CCCD - K001 como hospedeiro. Os valores representam a média de três ensaios independentes; as barras de erro representam o desvio-padrão.



Fonte: Elaboração própria.

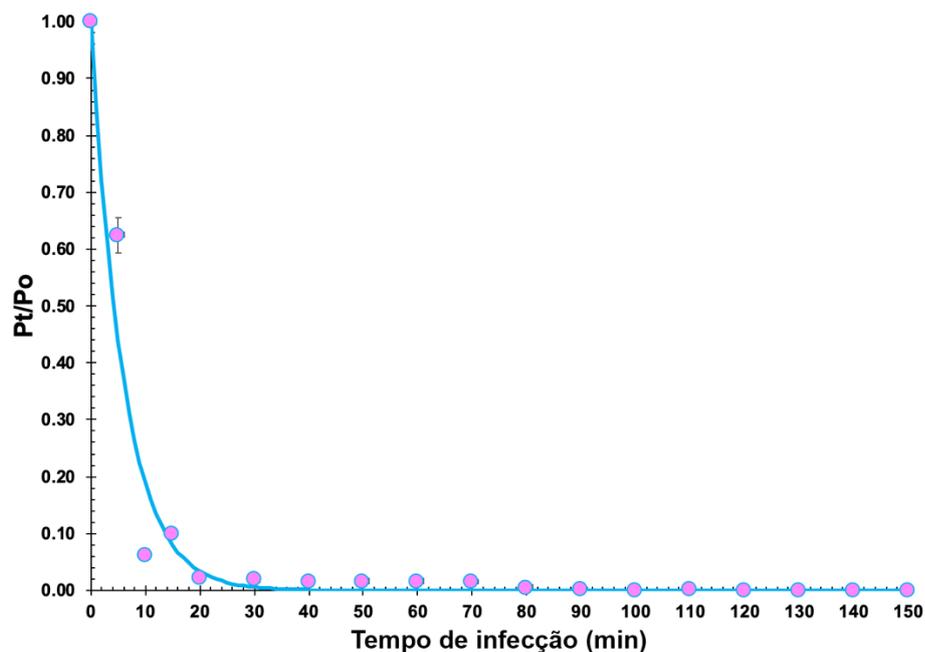
Os resultados obtidos foram subsequentemente plotados para determinar o período de eclipse, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão (*burst size*) do bacteriófago. Na curva OSGC, o *período de eclipse* representa o tempo após a penetração do bacteriófago até à biossíntese e montagem dos vírions maduros; o *período latente* representa o tempo após a penetração do bacteriófago até à liberação dos vírions maduros, englobando a lise da célula bacteriana; o número de vírions por célula infectada é o rendimento viral, ou tamanho de explosão (*burst size*). A diferença entre o período latente e o período de eclipse representa a fase de acumulação intracelular (CHAN; ABEDON; LOC-CARRILLO, 2013). A curva OSGC produzida foi mais bem ajustada via ajuste não linear dos dados a uma curva sigmoideal típica (modelo de regressão logística de 4 parâmetros, 4-PL), permitindo estimar o período de eclipse, o período latente, o período de acumulação intracelular e o tamanho de explosão do bacteriófago como 15 min, 30 min, 15 min e 16,6 vírions/célula hospedeira, respectivamente (Figura 16).

Os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa estão em clara concordância com resultados prévios do nosso grupo de pesquisa (HARADA et al., 2020) e com resultados publicados por Jansen et al. (2018) para o bacteriófago KARL-1, tipo T4, por Merabishvili et al. (2014) para dois bacteriófagos altamente líticos para *Acinetobacter baumannii*, por Lu et al. (2013) para a curva OSGC produzida para o miovírus PaP1 de *Pseudomonas aeruginosa*, por Garbe et al. (2010) para o bacteriófago JG024 de *Pseudomonas aeruginosa* com gama alargada de hospedeiros, por Santos et al. (2014) e Lindberg et al. (2014) para bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de fontes ambientais, e por Jin et al. (2012) para bacteriófagos de *Acinetobacter baumannii* isolados de várias amostras de água (esgoto municipal, água de lagos, e água de rios) coletadas de diferentes locais na província de Zhengzhou (China).

5.4.4. Curva de adsorção

O primeiro passo para a infecção da célula bacteriana por uma partícula bacteriofágica é a ligação/ancoragem do bacteriófago à superfície da célula hospedeira susceptível (JIN et al., 2012). A avaliação do processo de ligação das partículas bacteriofágicas à célula hospedeira (que é uma combinação de difusão física, interações bioquímicas de superfície e alterações conformacionais induzidas por reação nas proteínas receptoras à superfície das células bacterianas (HARADA et al., 2018)) foi realizada através da produção da sua curva de adsorção. Os resultados obtidos no ensaio de adsorção das partículas do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 às células de *Klebsiella pneumoniae* CCCD - K001 estão exibidos na Figura 17.

Figura 17. Curva de adsorção do bacteriófago isolado PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 às células hospedeiras de *Klebsiella pneumoniae* CCCD - K001, permitindo o cálculo da taxa de adsorção das partículas fágicas após ajuste não-linear de uma função logarítmica aos dados experimentais. Os valores representam a média de três ensaios independentes; as barras de erro representam o desvio-padrão.



Fonte: Elaboração própria.

Antes da aplicação de fagos para inativar patógenos bacterianos, é importante caracterizar a dinâmica da replicação fago-hospedeiro *in vitro*. A primeira etapa na infecção fágica consiste na ligação do vírion fágico a uma célula bacteriana hospedeira suscetível (JIN et al., 2012; CEYSSENS, 2009; HYMAN e ABEDON, 2009; MOLDOVAN et al., 2007). Este processo de adsorção é normalmente descrito por cinética de ação em massa (STORMS e SAUVAGEAU, 2015), que assume implicitamente uma influência igual da densidade do hospedeiro e da taxa de adsorção no processo de adsorção (JIN et al., 2012; CEYSSENS, 2009; SHAO e WANG, 2008). Assim, um ambiente com alta densidade bacteriana do hospedeiro pode ser considerado equivalente a um bacteriófago dotado de uma alta taxa de adsorção e vice-versa. O processo de ligação de um bacteriófago à sua célula hospedeira é uma combinação de difusão física, interações bioquímicas de superfície e alterações conformacionais induzidas por reação nas proteínas receptoras (HARADA et al., 2018; STORMS e SAUVAGEAU, 2015; RAKHUBA et al., 2010).

Idealmente, a determinação da taxa de adsorção de um fago às suas células hospedeiras bacterianas é realizada o mais próximo possível do ambiente em que o fago em estudo normalmente adsorveria. O tamanho e/ou fisiologia das células bacterianas também exerce uma influência importante nesse processo, e além disso nem todas as bactérias expressam receptores fágicos constitutivamente nem em níveis constantes. Outro fator que afeta as taxas de adsorção dos fagos às células bacterianas é o movimento dentro ou fora do meio de adsorção, onde existe muita luz: movimentos simples (ou seja, falta de mistura ou de agitação) ou muito movimento, resultam em taxas de adsorção reduzidas. A premissa para a determinação da taxa de adsorção de fagos em função da taxa de infecção fágica, é que a adsorção de cada partícula fornece o valor de um centro infeccioso, uma entidade capaz de dar origem a uma única placa fágica (HYMAN, 2019).

A principal dificuldade na medição de taxas de adsorção de partículas bacteriofágicas à sua célula hospedeira específica reside no fato de que o processo de adsorção se inicia a partir do crescimento (amplificação) do bacteriófago. Posteriormente, o bacteriófago será liberado da célula hospedeira por lise bacteriana, interferindo então na determinação da fração de partículas fágicas não-adsorvidas (DELBRÜCK, 1940).

Moldovan et al. (2007) descobriram que o processo de adsorção do bacteriófago à sua célula bacteriana hospedeira depende fortemente da concentração de MgSO_4 numa forma altamente não-linear. Para concentrações de MgSO_4 inferiores a $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ quase não existe adsorção, sendo que a adsorção do bacteriófago aumenta até atingir um máximo global a uma concentração de MgSO_4 de cerca de $3 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$. Para concentrações mais elevadas de MgSO_4 ($> 0.1 \text{ mol dm}^{-3}$), a adsorção diminui rapidamente. No trabalho de pesquisa aqui descrito, a concentração de MgSO_4 foi mantida a 1 mmol dm^{-3} . Os resultados obtidos por MOLDOVAN, CHAPMAN-MCQUISTON e WU (2007) sugerem que a afinidade de ligação de um bacteriófago para o receptor na superfície da sua célula hospedeira é a força motriz para o processo de infecção, o qual é mais crítico em *habitats* naturais onde a taxa de colisão entre bactéria e bacteriófago é bastante baixa. Assim, para assegurar uma infecção bem-sucedida da sua célula hospedeira, a capacidade de se ligar fortemente ao receptor torna-se um atributo significativo (MOLDOVAN et al., 2007). A taxa de adsorção do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 nas células de *K. pneumoniae* foi estimada por ajuste não-linear dos dados experimentais ao modelo representado na Equação (4), produzindo um valor para a taxa de adsorção das partículas bacteriofágicas igual a $\delta = 1.640 \times 10^{-09} \text{ UFP}^{-1} \text{ UFC}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ e uma taxa de multiplicação bacteriana igual a $\mu(t) = 0.00350 \text{ hr}^{-1}$ ($X_0 = 1.0 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$).

Por observação do perfil de adsorção exibido na Figura 17, pode concluir-se que após 20 min de contato das partículas bacteriofágicas com as células do hospedeiro bacteriano mais de 98% das partículas do fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 tinham adsorvido às células do hospedeiro bacteriano (Figura 17). Os resultados obtidos para a taxa de adsorção das partículas fágicas isoladas (Figura 17) estão em clara concordância com resultados publicados por Jansen et al. (2018), Santos et al. (2014), Shao e Wang (2008) e Lindberg et al. (2014) para bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de fontes ambientais, e por Jin et. al (2012) para bacteriófagos de *Acinetobacter baumannii* isolados de diversas amostras de águas (esgoto municipal, água de lagos, e água de rios) coletadas de diferentes locais na província de Zhengzhou (China).

5.4.5. Avaliação da suscetibilidade a antibióticos e ao bacteriófago isolado, das várias cepas de *Klebsiella pneumoniae* originárias de isolados clínicos humanos

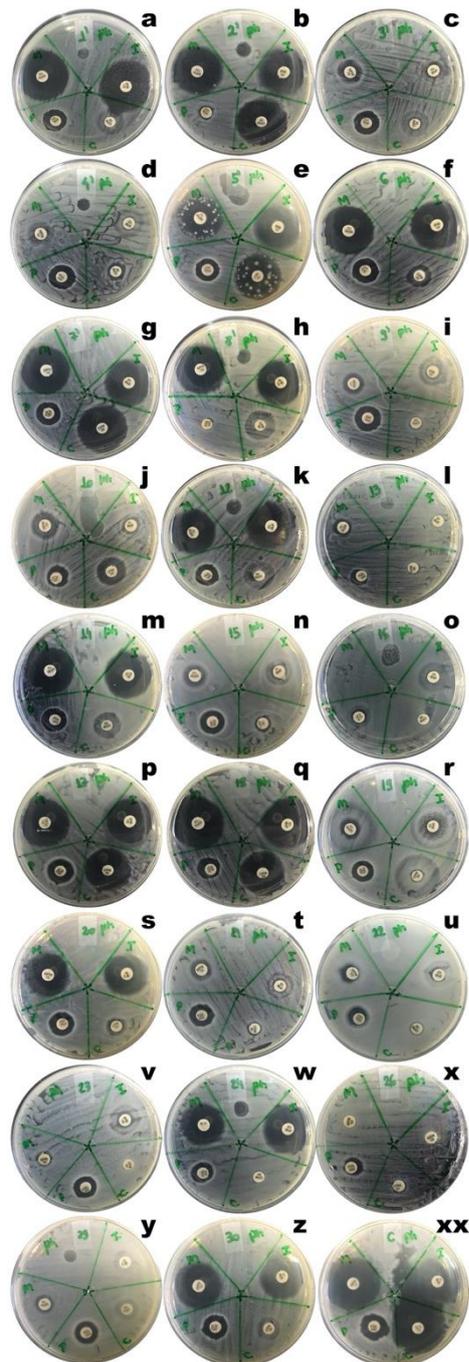
Verificou-se que as cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos eram resistentes a um grande número de antibióticos utilizados exclusivamente em ambientes hospitalares, em graus variados (Tabelas 4 e 5). Foi assim possível identificar o perfil de resistência de algumas das cepas provenientes de isolados clínicos aos antibióticos Polimixina B, Cefepime, Imipenem e Meropenem e ao bacteriófago isolado, mostrando o potencial do bacteriófago para controle de infecções por esta bactéria mesmo em casos de multirresistência, conforme ilustrado na Tabela 4 e na Figura 18.

Quadro 3. Resultados dos antibiogramas realizados nas 26 estirpes bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos, e da suscetibilidade destas cepas ao bacteriófago isolado.

Isolado clínico		Diâmetro do halo de inibição produzido pelos discos de antibiótico SENSIDISC™ (mm)				Diâmetro do halo de lise pelo fago KP0031 (mm)
ID#	Origem	Polimixina B (POL300)	Cefepime (CPM30)	Meropenem (MPM10)	Imipenem (IPM10)	
1 (a)	Swab anal	12	14	25	26	5,5 (claro)
2 (b)	Urina	7	25	25	24	8,0 (claro)
3 (c)	Urina	13	13	12	12	sem lise
4 (d)	Swab anal	14	9	13	15	6,0 (claro)
5 (e)	Urina	12	23	23	23	10,0 (claro)
6 (f)	Urina	13	12	25	25	8,0 (turvo)
7 (g)	Urina	12	25	23	22	sem lise
8 (h)	Swab anal	6	15	24	22	7,0 (claro)
9 (i)	Swab anal	13	6	10	14	sem lise
10 (j)	Swab anal	10	15	13	9	9,0 (claro)
12 (k)	Secreção de fêmur	11	14	24	25	7,0 (claro)
13 (l)	Urina	9	-----	9	-----	6,5 (claro)
14 (m)	Urina	13	13	25	24	sem lise
15 (n)	Hemocultura	12	8	11	13	sem lise
16 (o)	Ponta de catéter	8	-----	-----	15	8,5 (claro)
17 (p)	Urina	13	24	23	22	6,0 (turvo)
18 (q)	Swab anal	11	23	26	25	sem lise
19 (r)	Urina	11	22	10	23	sem lise
20 (s)	Urina	13	10	23	22	sem lise
21 (t)	Swab anal	13	7	10	13	7,0 (turvo)
22 (u)	Urina	12	6	9	13	9,5 (turvo)
23 (v)	Swab anal	11	-----	9	16	sem lise
24 (w)	Swab anal	12	-----	22	25	8,0 (claro)
26 (x)	Urina	10	7	-----	-----	sem lise
29 (y)	Swab anal	12	11	9	10	6,0 (claro)
30 (z)	Swab anal	12	11	25	22	sem lise

Fonte: Elaboração própria.

Figura 18. Resultados dos antibiogramas realizados às cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos humanos e espectro lítico do bacteriófago isolado, após aplicação de discos dos antibióticos meropenem, imipenem, cefepime e polimixina B e gotas de 10 µL da suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031: **(a)** cepa 1 de swab anal, **(b)** cepa 2 de urina, **(c)** cepa 3 de urina, **(d)** cepa 4 de swab anal, **(e)** cepa 5 de urina, **(f)** cepa 6 de urina, **(g)** cepa 7 de urina, **(h)** cepa 8 de swab anal, **(i)** cepa 9 de swab anal, **(j)** cepa 10 de swab anal, **(k)** cepa 12 de secreção de fêmur, **(l)** cepa 13 de urina, **(m)** cepa 14 de urina, **(n)** cepa 15 de hemocultura, **(o)** cepa 16 de ponta de catéter, **(p)** cepa 17 de urina, **(q)** cepa 18 de swab anal, **(r)** cepa 19 de urina, **(s)** cepa 20 de urina, **(t)** cepa 21 de swab anal, **(u)** cepa 22 de urina, **(v)** cepa 23 de swab anal, **(w)** cepa 24 de swab anal, **(x)** cepa 26 de urina, **(y)** cepa 29 de swab anal, **(z)** cepa 30 de swab anal, e **(xx)** cepa de *Klebsiella pneumoniae* da coleção CEFAR (CCCD - K001).



Fonte: Elaboração própria.

A cepa 1 mostrou-se moderadamente resistente à polimixina B e suscetível aos antibióticos restantes testados (Quadro 3); verificou-se que a cepa 2 é resistente à polimixina B (Quadro 3); a cepa 3 mostrou-se moderadamente resistente a todos os quatro antibióticos testados (Quadro 3); a cepa 4 mostrou-se moderadamente resistente a todos os quatro antibióticos (Quadro 3); verificou-se que a cepa 5 era moderadamente resistente à polimixina B (Quadro 3); a cepa 6 mostrou-se moderadamente resistente à polimixina B e cefepima (Quadro 3); a cepa 7 mostrou-se moderadamente resistente à polimixina B (Quadro 3); verificou-se que a cepa 8 era resistente à polimixina B e moderadamente resistente à cefepima (Quadro 3); a cepa 9 mostrou-se resistente à cefepima e moderadamente resistente a todos os outros antibióticos testados (Quadro 3); a cepa 10 mostrou-se resistente ao imipenem e moderadamente resistente a todos os outros três antibióticos testados (Quadro 3); a cepa 12 mostrou-se moderadamente resistente à polimixina B e cefepima (Quadro 3); a cepa 13 mostrou ser resistente a todos os antibióticos testados (Quadro 3); verificou-se que a cepa 14 era moderadamente resistente à polimixina B e cefepima (Quadro 3); verificou-se que a cepa 15 era resistente à cefepima e moderadamente resistente a todos os outros antibióticos testados (Quadro 3); verificou-se que a cepa 16 era resistente à polimixina B, cefepima e meropenem e moderadamente resistente ao imipenem (Quadro 3); verificou-se que a cepa 17 era moderadamente resistente à polimixina B (Quadro 3); a cepa 18 mostrou-se moderadamente resistente à polimixina B (Quadro 3).

As cepas de *K. pneumoniae* mencionadas acima se mostraram também resistentes a muitos antibióticos utilizados exclusivamente em ambientes hospitalares (Quadro 3).

Quadro 4. Suscetibilidade a antibióticos de uso restrito hospitalar, de cepas de *Klebsiella pneumoniae* obtidas de isolados clínicos humanos.

Isolado clínico		Susceptibilidade a antibióticos																									
#	Origem	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	T	U	V	W	X	Y	Z	ZZ	
1	Swab anal	R	S	S	R	+	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Urina	R	S	S	R	-	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Urina	R	S	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Swab anal	-	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R
5	Urina	S	S	S	R	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Urina	R	S	I	R	-	R	R	R	R	R	S	S	S	S	*	S	S	R	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Urina	S	S	S	R	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Swab anal	-	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	S	-	-	S	-	R	S	S	*	R	S	R	R
9	Swab anal	-	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R
10	Swab anal	-	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	R	S	R	R	R	R	R	R
12	Secreção fêmur	R	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	S	R	S	-	-	S	-	R	S	S	*	R	S	R	R
13	Urina	R	S	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Urina	R	S	S	R	-	R	R	R	R	R	R	S	S	S	*	R	S	R	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Hemocultura	-	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	R	S	R	R	R	R	R	R
16	Ponta de catéter	-	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	R	R	R	*	R	R	R	R
17	Urina	R	S	S	R	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	*	S	S	R	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Swab anal	-	S	-	S	-	-	S	-	*	*	S	S	S	S	-	-	S	-	S	S	S	R	*	*	S	S
19	Urina	R	S	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Urina	R	S	R	R	-	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Swab anal	-	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	R	S	R	R	R	R	R	R
22	Urina	R	S	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Swab anal	-	*	-	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	R	S	R	R	R	R	R	R
24	Swab anal	-	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	S	R	S	-	-	*	-	R	S	S	*	R	S	R	R
26	Urina	R	S	R	R	-	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	*	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Swab anal	-	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	R	S	R	*	R	R	R	R
30	Swab anal	-	S	-	R	-	-	R	-	R	R	R	S	S	S	-	-	*	-	R	S	S	*	R	S	R	R

Legenda: S: sensível; R: resistente; *: intermédio; -: antibiótico não testado; A: ácido nalidíxico; B: amikacina; C: amoxicilina / ácido clavulânico; D: ampicilina; E: beta-lactamases de espectro alargado (ESBL); F: cefalotina; G: cefepime; H: ceftriaxona; I: cefuroxime; J: acetil-cefuroxime; K: ciprofloxacina; L: ertapenem; M: gentamicina; N: meropenem; O: nitrofurantoína; P: norfloxacina; Q: piperacilina / tazobactam; T: trimetoprim / sulfametoxazole; U: ceftazidime; V: colistina; W: imipenem; X: tigeciclina; Y: ampicilina sulbactam; Z: ceftoxitina; ZZ: ceftriaxone.

Fonte: Elaboração própria.

A suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 também foi testada contra as 26 cepas diferentes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes clínicos, com a grande maioria delas mostrando resistência a vários antibióticos. Os resultados obtidos após a aplicação de gotas de 10 µL da suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 em tapetes bacterianos das várias cepas multi-resistentes de *Klebsiella pneumoniae* podem também ser encontrados na Tabela 4.

A presença de zonas claras de lise após a adição de gotas de 10 µL da suspensão concentrada do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 e incubação a 37 °C durante a noite indicou a eficiência lítica do bacteriófago isolado em algumas das cepas provenientes de isolados clínicos (Tabela 4). Das 26 cepas de isolados clínicos testadas, um total de 11 cepas (ou 42,3% de todas as cepas) mostrou ser susceptível ao fago isolado. O bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 mostrou-

se assim virulento e lítico para 42,3% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos humanos (Tabela 3), muitas delas resistentes a múltiplos antibióticos, mas não teve qualquer efeito nas restantes 57,7%. Adicionalmente, as cepas 13 e 16 mostraram-se resistentes aos antibióticos testados, mas foram susceptíveis ao bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, o que é bastante significativo em vista dos crescentes níveis de resistência aos antibióticos por parte desta bactéria patogênica.

Adicionalmente, devido ao fato de que a superfície das bactérias estriadas é ligeiramente hidrofóbica, em algumas das cepas provenientes de isolados clínicos o fago isolado produziu uma placa de lise turva, apesar das cepas serem suscetíveis ao bacteriófago.

5.4.6. Ensaios de terapia fágica *in vitro* (curvas de morte)

A forma como o fago interferiu no crescimento da bactéria pode ser observada na Figura 19a. A um valor de MOI de 1 e 1000, o máximo de inativação de *Klebsiella pneumoniae* com o bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 foi de 5,6 e 7,5 log UFC/mL, respectivamente (Figura 19a, ANOVA, $p < 0,05$), atingido após 6 h de incubação, quando comparado com o controle bacteriano (BC). Durante as primeiras 4 h de incubação, o fator de inativação foi similar para valores de MOI de 1 e 1000 (ANOVA, $p > 0,05$). Durante as primeiras 8 h de incubação, o fator de inativação foi ainda maior para a MOI de 1000 (ANOVA, $p < 0,05$). A uma MOI de 1000, após 6, 8, 10 e 12 h de incubação, o decréscimo na concentração de *Klebsiella pneumoniae* (7,5, 8,1, 7,5 e 6,8 log UFC/mL, respectivamente) foi significativamente maior (ANOVA, $p < 0,05$) do que aquele obtido com a MOI de 1 (5,6, 4,8, 4,2 e 4,5 log UFC/mL, respectivamente). As taxas de redução bacteriana no final do período de incubação (i.e., 24 h) foram estatisticamente similares (ANOVA, $p > 0,05$) para os dois valores de MOI (Figura 19a).

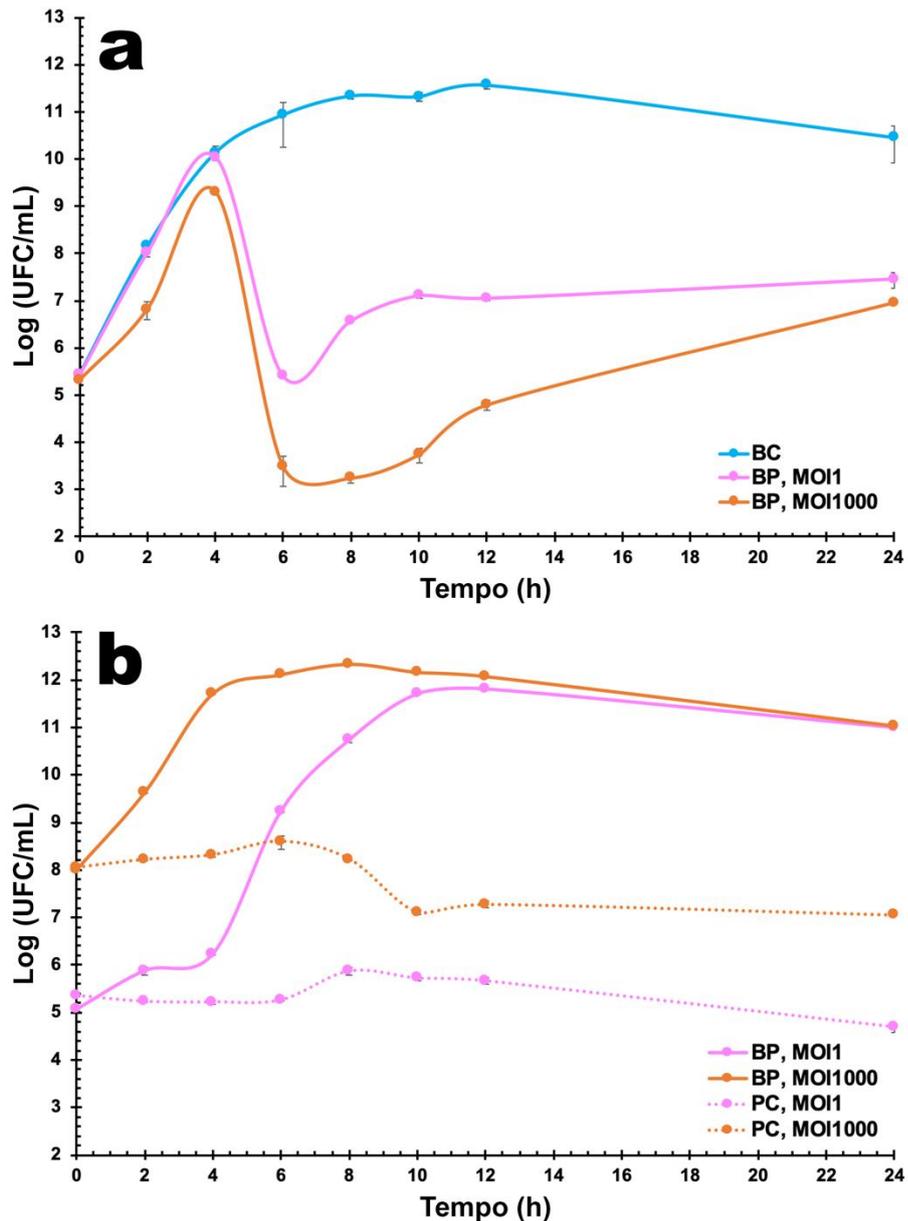
A densidade bacteriana no controle (BC) aumentou em 5,1 log UFC/mL (ANOVA, $p < 0,05$) durante as 24 h de incubação (Figura 19a). Durante o período de 24 h dos experimentos, a concentração de fago nos controles (PC) diminuiu (0,7 e 1,0 log UFP/mL, ANOVA, $p < 0,05$) para a MOI de 1 e 1000, respectivamente (Figura

19b). Quando o fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 foi incubado na presença do seu hospedeiro, observou-se um aumento significativo na concentração de partículas fágicas (5,9 e 3,0 log UFP/mL, ANOVA, $p < 0,05$) para a MOI de 1 e 1000, respectivamente (Figura 19b).

Durante as primeiras 6 h de incubação, a *Klebsiella pneumoniae* foi sensível ao fago. No entanto, após 24 h de incubação a inativação de *Klebsiella pneumoniae* pelo fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 diminuiu para 3,0 e 3,5 log UFC/mL para a MOI de 1 e 1000 respectivamente (Figura 19a), provavelmente devido à aquisição de resistência a este fago pela bactéria (comprovada pelo ligeiro aumento na concentração bacteriana em presença das partículas de fago após 8 h de incubação).

De acordo com vários autores (PEREIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2017; DUARTE et al., 2018; COSTA et al., 2019; PINHEIRO et al., 2019a; PINHEIRO et al., 2019b), o desenvolvimento de resistência bacteriana ao fago pode ser contornado usando um coquetel contendo diferentes fagos líticos para a mesma espécie bacteriana.

Figura 19. Inativação de *Klebsiella pneumoniae* pelo bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 e 1000 durante 24 h. **(a)** Concentração de bactéria: BC, controle de bactéria; BP, bactéria mais fago; **(b)** Concentração de fago: PC, controle de fago; BP, bactéria mais fago. Os valores representam a média de três ensaios independentes; As barras de erro representam o desvio-padrão.



Fonte: Elaboração própria.

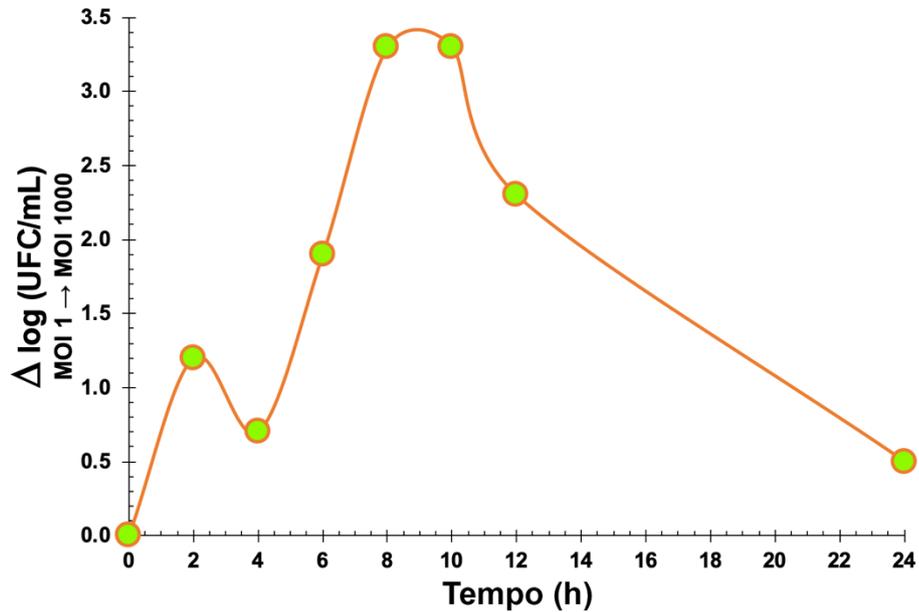
O efeito do valor da MOI foi mais pronunciado durante as primeiras 8-10 h de inativação bacteriana (Figura 20), com o valor de MOI 1000 a promover uma

redução maior nos níveis de células bacterianas relativamente à MOI 1. No entanto, esta diferença foi significativamente reduzida no final dos ensaios de inativação bacteriana, com uma diferença nos níveis atingidos de bactéria de apenas 0,5 log UFC/mL (Figura 19a e Figura 20).

Em consonância com a teoria cinética do tratamento fágico, que prevê que o valor da MOI pode ser crítico para a eficiência da inativação bacteriana, com a redução de bactérias patogênicas aumentando paralelamente à MOI ou ocorrendo mais cedo em valores mais altos de MOI, outros estudos (DUARTE et al.; 2018; PINHEIRO et al., 2019a) demonstraram que doses iniciais precisas de partículas de fago podem não ser mandatórias devido à natureza auto perpetuadora dos fagos, revelada pelo aumento do título do fago juntamente com as bactérias. Essa é, de fato, uma das principais (se não a maior) vantagens do tratamento fágico em comparação com a antibioticoterapia química. Além disso, altos valores de MOI podem até representar uma desvantagem para o sucesso do tratamento com fagos, já que o hospedeiro bacteriano alvo pode ser inativado antes de replicar as partículas do fago e liberar a progênie fágica. Este fenômeno pode ocorrer quando uma bactéria é infectada simultaneamente por um grande número de partículas de fago e ocorre lise, devido à presença de altas concentrações de lisinas, um processo conhecido como “lise a partir de fora” (ABEDON, 2011; KUTTER, 2009). De facto, no final do tratamento com o fago, a diferença na inativação bacteriana foi de apenas 0,5 log UFC/mL para ambos os valores de MOI (Figura 19a e Figura 20).

Uma questão importante ao inativar bactérias com fagos é o surgimento de bactérias resistentes aos fagos (MATEUS et al., 2014; PEREIRA et al., 2016; RIOS et al., 2016; PEREIRA et al., 2017; LIMA et al., 2019; PINHEIRO et al., 2019a). O fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 não impediu o recrescimento bacteriano durante o tratamento (Figura 19a). De acordo com vários pesquisadores, a desvantagem do surgimento de resistência bacteriana aos fagos pode ser ultrapassada pelo uso de coquetéis de fagos (PEREIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2017; DUARTE et al., 2018; COSTA et al., 2019; PINHEIRO et al., 2019a; PINHEIRO et al., 2019b).

Figura 20. Diferença entre a inativação a MOI 1000 e a inativação a MOI 1, de *Klebsiella pneumoniae* pelo fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, durante 24 h.

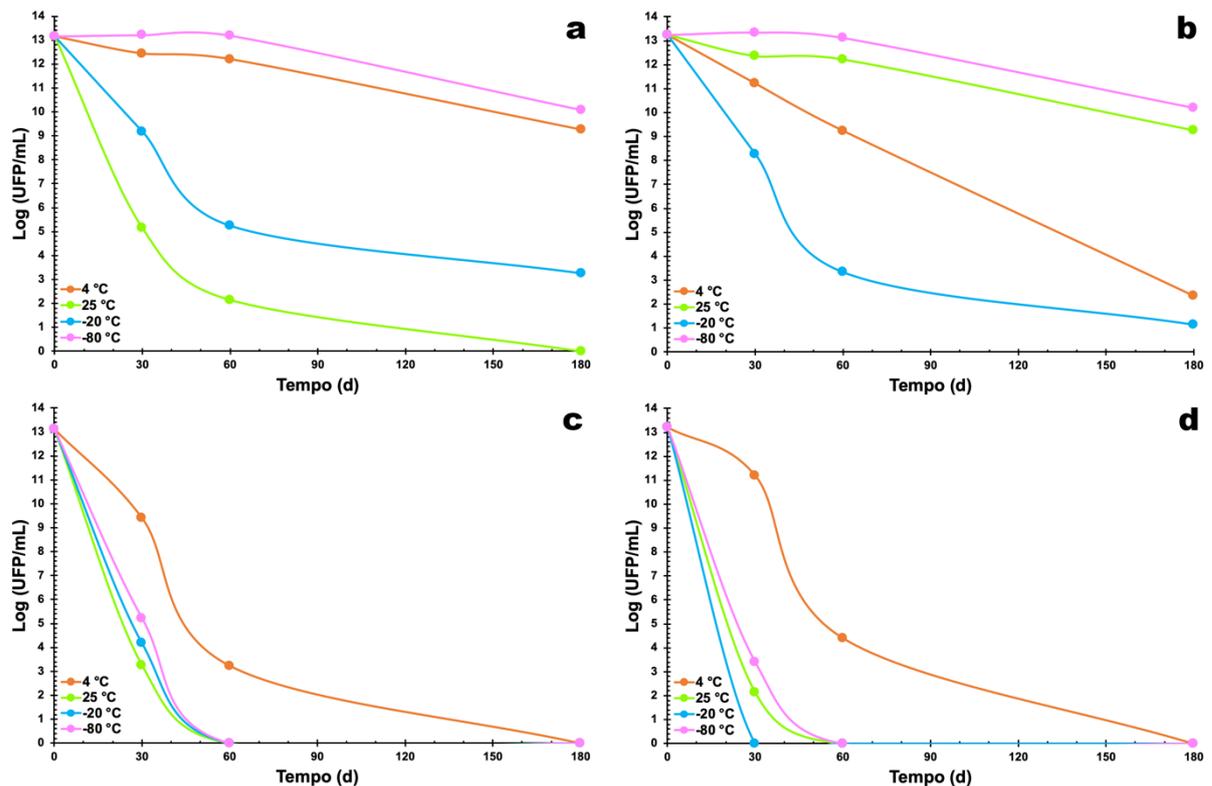


Fonte: Elaboração própria.

5.4.7. Tentativas de estabilização estrutural e funcional das partículas bacteriofágicas isoladas e avaliação da manutenção da sua viabilidade ao longo do tempo sob diferentes condições adversas de armazenamento

Os resultados obtidos nas tentativas de imortalização das partículas bacteriofágicas isoladas podem ser encontrados na Figura 21.

Figura 21. Resultados obtidos nas tentativas de imortalização das partículas do fago isolado PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, após determinação do título fágico nas várias condições usando tapetes bacterianos de *Klebsiella pneumoniae*, pela técnica de plaqueamento em ágar de dupla camada. **(a)** Bacteriófago + goma de alfarroba + alginato de sódio + água ultrapura; **(b)** Bacteriófago + goma de alfarroba + alginato de sódio + trehalose + água ultrapura; **(c)** Bacteriófago + goma de alfarroba + glicerol; **(d)** Bacteriófago + goma de alfarroba + trehalose + glicerol.



Fonte: Elaboração própria.

Após liofilização não foi possível obter título fágico em nenhuma das formulações, resultando na inativação do bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031. Provavelmente, como coloca Vireilio; Parra; Pitombo,(2006), na liofilização a congelação seguida de desidratação por sublimação provoca o desenrolamento molecular da estrutura proteica das partículas bacteriofágicas. Este é o método mais comumente utilizado para a preparação de proteínas desidratadas, as quais devem apresentar estabilidade adequada por longos períodos de armazenamento à temperatura ambiente.

Para a manutenção da viabilidade das partículas fágicas, observou-se que a adição de trehalose acrescida de goma de alfarroba e a adição apenas de goma de

alfarroba não diferem no resultado final de infectividade do bacteriófago, sendo que ambas estas condições apresentaram um valor médio (três determinações) de título fágico de $1,7 \times 10^{10}$ UFP/mL e $1,6 \times 10^{10}$ UFP/ mL, respectivamente, no final do período de armazenamento de 180 d.

Na ausência de trehalose, a presença de goma de alfarroba e alginato de sódio (Figura 21a) promoveu a manutenção da viabilidade do fago quando a solução aquosa foi armazenada a -80 °C (redução de 24,1% no título fágico da solução) e $+4$ °C (redução de 30,1% no título fágico da solução). A adição de trehalose teve um efeito pronunciado na manutenção da viabilidade do fago em presença de goma de alfarroba e alginato de sódio (Figura 21b) quando a solução aquosa foi armazenada a -80 °C (redução de 23,3% no título fágico da solução) e $+25$ °C (redução de 30,1% no título fágico da solução). Ao contrário do que se esperava, a adição de glicerol à goma de alfarroba na ausência e na presença de trehalose não permitiu manter a viabilidade das partículas fágicas (Figuras 21c e 21d), já que no final do período de armazenamento (180 d) não foi possível obter qualquer título fágico nas várias soluções. Condições de armazenamento a -20 °C e a $+25$ °C das soluções aquosas na ausência de trehalose conduziram a perdas de título fágico de 75,9% e 100%, respectivamente (Figura 21a) no final do período de armazenamento de 180 d, enquanto condições de armazenamento a $+4$ °C e a -20 °C das soluções aquosas em presença de trehalose conduziram a perdas de título fágico de 82,0% e 91,0%, respectivamente (Figura 21b) no final do período de armazenamento de 180 d. A -80 °C e a $+25$ °C, a presença de trehalose nas soluções aquosas contendo partículas bacteriofágicas conferiu proteção contra a dessecação durante o processo de armazenamento (Leung et al., 2017), e por isso o bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 deverá ser armazenado nessas condições.

Nas demais formulações (Figuras 21c e 21d) não foi possível manter a viabilidade das partículas fágicas, sendo que logo nos primeiros 60 dias de teste se verificou uma diminuição abrupta consistente da capacidade de infectividade das amostras, com total perda de atividade lítica em todas as temperaturas de armazenamento.

6. CONCLUSÕES

O bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 formou placas de lise translúcida em tapetes bacterianos de *Klebsiella pneumoniae*, com diâmetros de ≈ 0.5 mm, respectivamente (Figura 9). Foram obtidas suspensões fágicas de elevado título (10^{13} UFP/mL) para o bacteriófago isolado.

No processo de caracterização físico-química do bacteriófago isolado e purificado, a análise proteômica realizada via análises de SDS-PAGE revelou um conjunto alargado de diferentes proteínas estruturais (Figura 12), um resultado que está em clara concordância com a análise de proteínas estruturais de bacteriófagos por diferentes pesquisadores (MIHARA et al., 2016; SINGH et al., 2016; YUAN e GAO, 2016; SIMOLIUNAS et al., 2014; ALVAREZ et al., 1972; KUMARI et al., 2010; DRULIS-KAWA et al., 2011; JAMAL et al., 2015; DOMINGO-CALAP et al., 2020).

As análises de difração de raios-X (DRX) realizadas às partículas bacteriofágicas permitiram observar a presença de dois cristalitos (Figura 13), com a equação de Scherrer a relacionar o tamanho de tais cristalitos de tamanho sub-micrométrico com o alargamento dos seus picos no padrão de difração. Ainda que muito pequenos, com diâmetros entre 43,16 nm e 85,65 nm, tais cristalitos podem estar relacionados com estruturas externas nas partículas fágicas isoladas.

As partículas fágicas isoladas pertencem muito provavelmente à família *Siphoviridae*, uma vez que têm cauda longa e estreita sendo por isso bacteriófagos com material genético do tipo dsDNA, como se pode observar nas análises realizadas por MET (Figure 14).

A formação de placas fágicas em qualquer diluição é considerada uma indicação de virulência do fago (ESTRELLA et al., 2016). A EOP é o número relativo de placas fágicas que uma suspensão estoque de bacteriófago é capaz de produzir num determinado hospedeiro bacteriano (CHIBANI-CHENNOUFI et al., 2004). A EOP foi determinada para aquelas bactérias com resultados positivos no *spot-test*. As partículas do fago PhL_UNISO_KP_CFR_ph0031 foram capazes de se ligar às cepas *Klebsiella pneumoniae* (*10) e *Klebsiella pneumoniae* (*12) provenientes de isolados clínicos (Tabela 3) e causar morte bacteriana, através de uma infecção abortiva e/ou via lise a partir de fora (*lizes from without*) (KUTTER, 2009; ABEDON,

2011), mas não foram capazes de produzir suficiente progênie fágica, e por isso a EOP resultou nos baixos valores obtidos.

A eficácia do fago isolado neste trabalho de pesquisa foi também testada contra outros gêneros de bactérias patogênicas, mas nenhuma destas bactérias foi infectada pelas partículas fágicas (Tabela 3) à exceção de algumas cepas de *Klebsiella pneumoniae* originárias de isolados clínicos humanos.

As características de crescimento das partículas fágicas isoladas (Figura 16) mostraram um tamanho de explosão relativamente pequeno (16,6 UFP/célula hospedeira), indicando que o fago se replica eficientemente nas células de *Klebsiella pneumoniae* com um período de latência relativamente curto (30 min).

O estabelecimento de um perfil de adsorção mostrou que após 20 min de contato das partículas bacteriofágicas com as células do hospedeiro bacteriano mais de 98% das partículas do fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 tinham adsorvido às células do hospedeiro bacteriano e que após 30 min praticamente 100% das partículas fágicas estavam adsorvidas no hospedeiro (Figura 17). Das 26 cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos e resistentes a múltiplos antibióticos, o fago isolado foi capaz de infectar e lisar 42,3% delas, revelando assim uma gama de hospedeiros alargada para cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Tabela 3) que se mostraram resistentes a um grande número de antibióticos utilizados exclusivamente em ambientes hospitalares (Tabelas 4 e 5).

O fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 provocou uma elevada redução no crescimento de *Klebsiella pneumoniae*, mas o seu efeito ocorre apenas após 4 h de incubação (Figura 19a). A *Klebsiella pneumoniae* foi eficazmente inativada pelo fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 (Figura 19a), atingindo um máximo de inativação de 5,6 log UFC/mL e 7,5 log UFC/mL após 6 h de incubação a uma MOI de 1 e 1000, respectivamente. Após esse período de tempo, ainda que algumas bactérias não fossem inativadas pelo fago, a maior parte das bactérias inativadas não recomeçou a crescer após o tratamento. Entre 8 h e 24 h de tratamento com o fago a MOI 1 e 1000, a concentração bacteriana foi significativamente mais baixa que aquela observada para a cultura não-tratada (Figura 19a).

Quando o fago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 foi incubado na presença do seu hospedeiro, observou-se um aumento significativo na concentração de partículas

fágicas (5,9 e 3,0 log UFP/mL) para a MOI de 1 e 1000, respectivamente (Figura 19b).

A -80 °C e a +25 °C, a presença de trehalose nas soluções aquosas contendo partículas bacteriofágicas conferiu proteção contra a dessecação durante o processo de armazenamento (Leung et al., 2017), e por isso o bacteriófago PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 deverá ser armazenado nessas condições.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Para contornar o problema da aquisição de resistência bacteriana às partículas fágicas já isoladas, o isolamento e caracterização de outros bacteriófagos estritamente líticos para outras subespécies do grupo *Klebsiella pneumoniae*, permitiria produzir um coquetel fágico com um espectro lítico bem mais abrangente.

As partículas bacteriofágicas poderão também ser mais bem caracterizadas, através de sequenciação do seu material genético e respectiva anotação genômica com construção dos seus mapas genômicos através de ferramentas de bioinformática, para elucidação daqueles genes integrantes no seu genoma que possam codificar para endolisinas. A produção de endolisinas induzida pelos bacteriófagos poderia também levar ao seu isolamento e caracterização, visando potenciais aplicações na área da saúde. Adicionalmente, poderiam ser realizados estudos de estabilidade dos fagos a fatores abióticos (pH, T, radiação UVB, radiação solar), análises de microscopia eletrônica de transmissão com crio-congelamento em etano líquido dos fagos para observação da sua microestrutura e classificação.

A realização de ensaios de terapia fágica *in vitro*, utilizando os diferentes fagos isolados de forma independente e com diferentes valores (intermédios) de MOI (0,1, 10, 100), assim como utilizando coquetéis dos fagos isolados, permitiria obter a concentração ideal de fago para terapia fágica.

Também, uma identificação mais rigorosa das cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de isolados clínicos poderia ser realizada através de análises moleculares, por exemplo, pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), assim como poderia ser realizada a serotipagem daquelas cepas.

Será também fundamental avaliar o potencial de desenvolvimento de mutantes resistentes de *Klebsiella pneumoniae* usando suspensões de um único fago e coquetéis de diferentes fagos.

A realização de ensaios de inativação (terapia fágica *in vitro*) adicionando sequencialmente os fagos isolados, permitiria verificar se se evita o desenvolvimento de resistências bacterianas aos mesmos.

Por fim, o desenvolvimento de uma forma de veiculação das partículas fágicas para administração por aerossolização poderia ser uma mais valia, frente à necessidade de combate desta bactéria no trato respiratório, assim como a formulação de uma suspensão que possa ser utilizada em dispositivos urinários para o controle de infecção por esta bactéria em vias urinárias cateterizadas.

REFERÊNCIAS

- ABEDON, S. T. Lysis from without. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 46–49, 2011.
- ABEDON, S. T. The Bacteriophages, Richard Calendar (Ed.), 2nd edition, ISBN-13: 978-0-19-514850-3, Oxford University Press, 2006.
- ABEDON, S. T.; MURRAY, K. L. Archaeal viruses, not archaeal phages: an archaeological dig. **Archaea**, v. 2013, Article ID 251245, 2013.
- ACKERMANN, H. W. 5500 Phages examined in the electron microscope. **Archives of Virology**, v. 152, n. 2, p. 227–243, 2007.
- ADAMS, M. H. *Bacteriophages*; 1959; Interscience Publishers, Inc., New York-London.
- ALEXANDER, L.; KLUG, H. P. Determination of Crystallite Size with the X-Ray Spectrometer. **Journal of Applied Physics**, v. 21, p. 137-142, 1950.
- ALVAREZ, G.; SALAS, E.; PÉREZ, N.; CELIS, J. E. Ø29 Bacteriophage Structural Proteins. **J. gen. Virol.**, v. 14, p. 243-250, 1972.
- ASHURST, J. V.; DAWSON, A. (2019) Klebsiella pneumonia. [updated 2019 nov 22]. in: statpearls [internet]. treasure island (fl): statpearls publishing; 2020 jan-. disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk519004/>
- BALES, P. M. et al. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- BALZAR, D. X-ray diffraction line broadening: modeling and applications to high-Tc superconductors. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 98, n. 3, p. 321, 1993.
- BALCÃO, V. M. et al. Carbohydrate Hydrogels with Stabilized Phage Particles for Bacterial Biosensing: Bacterium Diffusion Studies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n.3, p. 1194–1214, 2014.
- BALCÃO, V. M.; VILA, M. M. D. C. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 93, p. 25-41, 2015.

- BARCHITTA, M. et al. Antibiotic consumption and resistance during a 3-year period in Sicily, Southern Italy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 13, 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para controle de infecção relacionada à assistência à Saúde, Módulo 4, 2013.
- BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS, D. DE A. F. E I. E. **Formulário Terapêutico Nacional: RENAME 2010**. [s.l.: s.n.], 2010.
- BROBERG, C. A.; PALACIOS, M.; MILLER, V. L. Klebsiella: A long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Reports*, v. 6, n. August, 2014.
- CARLTON, R.M. et al. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatics analyses, oral toxicity study, and application. **Regulatory Toxicology Pharmacology**, v. 43, p. 301-312, 2005.
- CASTANHEIRA, B. A. M. G. Mecanismos de resistência a antibióticos. **Dissertação de Mestrado, Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde**, p. 42, 2013.
- CERQUEIRA, G. M.; PELEG, A. Y. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. **IUBMB Life**, v. 63, n. 12, p. 1055–1060, 2011.
- CEYSSENS, P.-J. Isolation and characterization of lytic bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa*. **Ph.D. thesis**, Katholieke Universiteit LEUVEN, p. 166, 2009.
- CHAN, B. K.; ABEDON, S. T.; LOC-CARRILLO, C. Phage cocktails and the future of phage therapy. **Future Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 769–783, 2013.
- CHEN, H. L. et al. Adding a C-terminal Cysteine (CTC) Can enhance the bactericidal activity of three different antimicrobial peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–9, 2018.
- CHIBANI-CHENNOUFI, S. et al. Phage-Host Interaction : an Ecological Perspective MINIREVIEW. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 12, p. 3677–3686, 2004.
- COLOM, J. et al. Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved

- phage therapy. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41441, 2017.
- COLOM, J. et al. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. **Applied Environment Microbiology**, v. 81, n. 14, p. 4841–4849, 2015
- COSTA, P. et al. 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, 2019.
- CUERVO, A. et al. Structural characterization of the bacteriophage T7 tail machinery. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 36, p. 26290–26299, 2013.
- D'ANDREA, M. M. et al. ϕ bO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- DAVEY, P. et al. hospital inpatients (Review). 2017.
- DELBRÜCK, M. Adsorption of Bacteriophage Under Various Physiological Conditions of the Host. **The Journal of General Physiology**, v. 23, n. 5, p. 631–642, 1940.
- DESLOUCHES, B. et al. Engineered cationic antimicrobial peptides to overcome multidrug resistance by ESKAPE pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1329–1333, 2015.
- DINI, C. et al. Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: Enhanced protection against acidity and protease activity. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 9, p. 1200–1208, 2012.
- DINI, C.; ISLAN, G. A.; CASTRO, G. R. Characterization and Stability Analysis of Biopolymeric Matrices Designed for Phage-Controlled Release. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 6, p. 2031–2047, 2014.
- DOMINGO-CALAP, P.; DELGADO-MARTÍNEZ, J. Bacteriophages: Protagonists of a post-antibiotic era. **Antibiotics**, v. 7, n. 3, p. 1–16, 2018.
- DOMINGO-CALAP, P.; BEAMUD, B.; VIENNE, J.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; SANJUÁN, R. Isolation of Four Lytic Phages Infecting *Klebsiella pneumoniae* K22 Clinical Isolates from Spain. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, p. 425, 2020.

- DORMAN, M. J.; SHORT, F. L. Genome watch: *Klebsiella pneumoniae*: When a colonizer turns bad. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 1, 2017.
- DRULIS-KAWA, Z.; MACKIEWICZ, P.; KĘSIK-SZELOCH, A.; MACIASZCZYK-DZIUBINSKA, E.; WEBER-DĄBROWSKA, B.; DOROTKIEWICZ-JACH, A.; AUGUSTYNIAK, D.; MAJKOWSKA-SKROBEK, G.; BOCER, T.; EMPEL, J.; KROPINSKI, A. M. Isolation and characterisation of KP34—a novel ϕ KMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1333-1345, 2011.
- DUARTE, J.; PEREIRA, C.; MOREIRINHA, C.; SALVIO, R.; LOPES, A.; WANG, D.; ALMEIDA, A. New insights on phage efficacy to control *Aeromonas salmonicida* in aquaculture systems: An in vitro preliminary study. **Aquaculture**, v. 495, p. 970-982, 2018.
- ESTRELLA, L. A.; QUINONES, J.; HENRY, M.; HANNAH, R. M.; POPE, R. K.; HAMILTON, T.; TENEZA-MORA, N.; HALL, E.; BISWAJIT, B. Characterization of novel *Staphylococcus aureus* lytic phage and defining their combinatorial virulence using the OmniLog® system. **Bacteriophage**, v. 6, n. 3, p. e1219440, 2016.
- FEINER, R.; ARGOV, T.; RABINOVICH, L.; SIGAL, N.; BOROVOK, I.; HERSKOVITS, A. A. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 641-650, 2015.
- O'FLAHERTY, S. et al. Potential of the Polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1836–1842, 2005.
- GARBE, J.; WESCHE, A.; BUNK, B.; KAZMIERCZAK, M.; SELEZSKA, K.; ROHDE, C.; SIKORSKI, J.; ROHDE, M.; JAHN, D.; SCHOBERT, M. Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 301-311, 2010.
- GARCÍA, R.; LATZ, S.; ROMERO, J.; HIGUERA, G.; GARCÍA, K.; BASTÍAS, R. Bacteriophage production models: An overview. **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 1-7, 2019.

- GASIUNASA, G.; BARRANGOUB, R.; HORTVATHC, P.; SIKSNYS, V. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **PNAS**. Published online September 4, 2012, disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1208507109
- GETAHU, H.; BALKHY, H. Global governance to tackle antimicrobial resistance: The way forward . n. 3, p. 10–13, 2019.
- GHAJAVAND, H. et al. Isolation of bacteriophages against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 5, p. 373–380, 2017a.
- GHAJAVAND, H. et al. Isolation of bacteriophages against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 5, p. 373–380, 2017b.
- GONZALEZ-MENENDEZ, E. et al. Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–14, 2018.
- HANLON, G. W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 2, p. 118–128, 2007.
- HARADA, L. K. et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. **Microbiological Research**, v. 212–213, n. February, p. 38–58, 2018.
- HARADA, L. K.; MORELI, F. C.; SILVA, E. C.; CAMPOS, W. F.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M.; BALCÃO, V. M. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* new lytic bacteriophages: a deadly cocktail for the molecular hijacking of bacterial metabolic machinery of multidrug-resistant strains. **Microbiological Research** [submitted], 2020.
- HAWKINS, C.; HARPER, D.; BURCH, D.; ANGGARD, E.; SOOTHILL, J. Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: A before/after clinical trial. **Vet. Microbiol.**, v. 146, p. 309-313, 2010.
- HERMOSO, J. A.; GARCÍA, J. L.; GARCÍA, P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n.

5, p. 461–472, 2007.

HOWARD, A. et al. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 5, 2012.

HYMAN, P. Phages for phage therapy: Isolation, characterization, and host range breadth. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, 2019.

HYMAN, P.; VALLUZZI, R.; GOLDBERG, E. Design of protein struts for self-assembling nanoconstructs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 13, p. 8488-8493, 2002.

HYMAN, P.; ABEDON, S. T. Bacteriophage host range and bacterial resistance. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 70, p. 217-248, 2010.

HYMAN, P.; ABEDON, S. T. Practical Methods for Determining Phage Growth Parameters, *In*: Clokie M.R.J. and Kropinski A.M. (Eds) *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, vol 501, Chapter 18. Humana Press, p. 175-202, 2009.

JAMAL, M.; HUSSAIN, T.; DAS, C. R.; ANDLEEB, S. Characterization of Siphoviridae phage Z and studying its efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* planktonic cells and biofilm. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 454-462, 2015.

JANEŽ, N.; LOC-CARRILLO, C. Use of phages to control *Campylobacter* spp. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 1, p. 68–75, 2013.

JANSEN, M. et al. Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

JIN, J. et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

JONCZYK, E. et al. The influence of external factors on bacteriophages—review. **Folia Microbiologica** (Dordrecht, Neth.), v. 56, n. 3, p. 191–200, 2011.

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, n. 3, p. e0118557, 2015.
- KIM, S.; JO, A.; AHN, J. Application of chitosan-alginate microspheres for the sustained release of bacteriophage in simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Science Technology**, v. 50, n. 4, p. 913–918, 2015.
- KOREHEI, R.; KADLA, J. F. Encapsulation of T4 bacteriophage in electrospun poly (ethylene oxide)/cellulose diacetate fibers. *Carbohydrate Polymers*, v. 100, p. 150–157, 2014.
- KUMAR, A. S.; MODY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides - A perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 103–117, 2007.
- KUMARI, S.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Isolation and characterization of *Klebsiella pneumoniae* specific bacteriophages from sewage samples. **Folia Microbiol.**, v. 55, p. 221-227, 2010.
- KUTTER, E. Phage therapy: Bacteriophages as natural, self-limiting antibiotics. In *Textbook of Natural Medicine*, 3rd ed.; Pizzorno, W., Ed.; Churchill Livingstone: London, UK, pp. 1147-1161, 2005.
- KUTTER, E. Phage host range and efficiency of plating, *In: Clokie M.R. and Kropinski A.M. (Eds) Bacteriophages. Methods in Molecular Biology™*, vol 501, Chapter 14. Humana Press, 141-149, doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_14, 2009.
- LEE, Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Front. Microbiol.**, 13 June 2016
- LEUNG, V. et al. Long-Term Preservation of Bacteriophage Antimicrobials Using Sugar Glasses, **ACS Biomaterials Science & Engineering**, DOI: 10.1021/acsbiomaterials.7b00468, 2017.
- LIMA, R.; DEL FIOL, F. S.; BALCÃO, V. M. Prospects for the use of new technologies to combat multidrug-resistant bacteria. **Front. Pharmacol.**, v. 2019, n. 10, p. 692, 2019.
- LIN, N.-T.; CHIOU, P.-Y.; CHANG, K.-C.; CHEN, L.-K.; LAI, M.-J. Isolation and characterization of fAB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*.

Research in Microbiology, v. 161, p. 308-314, 2010.

LINDBERG, H. M.; MCKEAN, K. A.; WANG, I.-N. Phage fitness may help predict phage therapy efficacy. **Bacteriophage**, v. 4, n. 4, p. e964081, 2014.

LOBA, A.P.F.R. Fagoterapia como alternativa ao uso dos antibióticos convencionais. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.

LONE, A. et al. Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 49–58, 2016.

LU, S.; LE, S.; TAN, Y.; ZHU, J.; LI, M.; RAO, X.; ZOU, L.; LI, S.; WANG, J.; JIN, X.; HUANG, G.; ZHANG, L.; ZHAO, X.; HU, F. Genomic and proteomic analyses of the terminally redundant genome of the *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP1: establishment of genus PaP1-like phages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e62933, 2013.

MA, Y. et al. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 2, p. 434–440, 2012.

MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. **Nucleic Acids Research**, Vol. 41, No. 8, 2013

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–15, 2018.

MARTINS, S.C.S.; MARTINS, C.M. Bacteriófagos: ferramenta para controle de bactérias patogênicas. **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n.18; p. 3180-3189, 2014

MATEUS, L.; COSTA, L.; SILVA, Y.J.; PEREIRA, C.; CUNHA, A.; ALMEIDA, A. Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. **Aquaculture**, v. 424-425, p. 167-173, 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, p. 211-219, 2005.
- MAURA, D.; DEBARBIEUX, L. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 851–859, 2011.
- MBONYIRYIVUZE, A.; OMOLLO, I.; NGOM, B. D.; MWAKIKUNGA, B.; DHLAMINI, S. M.; PARK, E.; MAAZA, M. Natural Dye Sensitizer for Grätzel Cells: Sepia Melanin. **Physics and Materials Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2015).
- MEADEN, S.; KOSKELLA, B. Exploring the risks of phage application in the environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 358, 2013.
- MELO, D. R.; SILLANKORVA, S.; ACKERMANN, H.; KROPINSKI, A. M.; AZEREDO, J.; CERCA, N. Isolation and characterization of a new Staphylococcus epidermidis broad-spectrum bacteriophage. **J. Gen. Virol.**, v. 95, p. 506-515, 2014.
- MENEZES, E. A. et al. Avaliação da atividade in vitro do meropenem contra cepas de Klebsiella pneumoniae produtoras de betalactamases de espectro expandido isoladas na cidade de Fortaleza, Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 349–350, 2007.
- MERABISHVILI, M. et al. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against Acinetobacter baumannii. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.
- METAB, D. E. F. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA – PPGBOT INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB. p. 1–92, 2015.
- MIHARA, T. et al. A Ralstonia solanacearum phage ϕ RP15 is closely related to Viunalikeviruses and encodes 19 tRNA-related sequences. **Virology Reports**, v. 6, p. 61–73, 2016.
- MOGHTADER, F.; EĞRI, S.; PISKIN, E. Phages in modified alginate beads. Artificial Cells, **Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 357–363, 2017.
- MOLDOVAN, R.; CHAPMAN-MCQUISTON, E.; WU, X. L. On kinetics of phage adsorption. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 1, p. 303–315, 2007.
- MONTSO, P. K.; MLAMBO, V.; ATEBA, C. N. Characterization of Lytic

- Bacteriophages Infecting Multidrug-Resistant Shiga Toxigenic Atypical *Escherichia coli* O177 Strains Isolated From Cattle Feces. **Frontiers in Public Health**, v. 7, n. November, 2019.
- MOREIRA, N. M. et al. OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA DA *Salmonella* sp. FRENTE À UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 1131–1153, 2013.
- MOROZOVA, V. V.; VLASSOV, V. V.; TIKUNOVA, N. V. Applications of bacteriophages in the treatment of localized infections in humans. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, 2018.
- MULANI, M. S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, 2019.
- NOBREGA, F. L.; VLOT, M. DE JONGE, P. A.; DREESENS, L. L.; BEAUMONT, H. J. E.; LAVIGNE, R.; DUTILH, B. E.; BROUNS, S. J. J. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 760-773, 2018.
- NWODO, U. U.; GREEN, E.; OKOH, A. I. Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 14002–14015, 2012.
- OLIVEIRA, A.; SILLANKORVA, S.; QUINTA, R.; HENRIQUES, A.; SERENO, R.; AZEREDO, J. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. **J. Appl. Microbiol.**, v. 106, n. 6, p. 1919-1927, 2009.
- PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **N. Engl. J. Med.**, v. 362, n. 19, p. 1804-1813, 2010.
- PEREIRA, C. et al. Bacteriophages with potential to inactivate *Salmonella* Typhimurium: Use of single phage suspensions and phage cocktails. **Virus Research**, v. 220, p. 179-192, 2016.
- PEREIRA, C.; MOREIRINHA, C.; LEWICKA, M.; ALMEIDA, P.; CLEMENTE, C.; ROMALDE, J. L.; NUNES, M. L.; ALMEIDA, A. Characterization and in vitro evaluation of new bacteriophages for the biocontrol of *Escherichia coli*. **Virus Res.**, v. 227, p. 171-182, 2017.
- PIETILÄ, M. K.; DEMINA, T. A.; ATANASOVA, N. S.; OKSANEN, H. M.; BAMFORD,

- D. H. Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 334-344, 2014.
- PINHEIRO, L. et al. Efficiency of phage phi6 to biocontrol *Pseudomonas syringae* infections in plants: an in vitro preliminary study. **Microorganisms**, v. 7, n. 286, p. 1–23, 2019a.
- PINHEIRO, L. A. M. et al. Efficiency of phage $\phi 6$ for biocontrol of *pseudomonas syringae* pv. *Syringae*: An in vitro preliminary study. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, 2019b.
- POTTER, R. F. et al. Population structure, antibiotic resistance, and uropathogenicity of *klebsiella variicola*. **mBio**, v. 9, n. 6, p. 1–17, 2018.
- PUAPERMPOONSIRI, U.; FORD, S. J.; VAN DER WALLE, C. F. Stabilization of bacteriophage during freeze drying. **International Journal Pharmaceutics**, v. 389, n. 1–2, p. 168–175, 2010.
- RAKHUBA, D. V.; KOLOMIETS, E. I.; SZWAJECER DEY, E.; NOVIK, G. I. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 145-155, 2010.
- REYES-CHACÓN, J. A. et al. Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en *Enterobacteriaceae*. **Infectio**, v. 21, n. 4, p. 251–254, 2017.
- RICE, L. B. Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 31, n. S1, p. S7–S10, 2010.
- RIOS, A. C. et al. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. **Microbiological Research**, v. 191, p. 51–80, 2016.
- RIOS, A. C.; VILA, M. M. D. C.; LIMA, R.; DEL FIOLE, 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.
- ROCHA, L. K. H., FAVARO, L. I. L., RIOS, A. C., SILVA, E. C., SILVA, W. F., STIGLIANI, T. P., GUILGER, M., LIMA, R., OLIVEIRA JR., J. M.; ARANHA, N.,

- TUBINO, M., VILA, M. M. D. C., BALCÃO, V. M. Sericin from *Bombyx mori* cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical applications. **Process Biochem.**, v. 61, p. 163-177, 2017.
- RODRIGO-TROYANO, A.; SIBILA, O. The respiratory threat posed by multidrug resistant Gram-negative bacteria. **Respirology**, v. 22, n. 7, p. 1288–1299, 2017.
- ROSS, A.; WARD, S.; HYMAN, P. More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 1352, 2016.
- RUSSO, A. et al. Comparison of septic shock due to multidrug-resistant acinetobacter baumannii or klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing k. Pneumoniae in intensive care unit patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. 1–12, 2018.
- 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.
- SCARDI, P.; LEONI, M.; DELHEZ, R. Line broadening analysis using integral breadth methods: a critical review. **J. Appl. Cryst.**, v. 37, p. 381-390, 2004.
- SCHERRER, P. Bestimmung der Grösse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen. **Nachr. Ges. Wiss. Göttingen**, v. 26, p. 98-100, 1918.
- SHAO, Y.; WANG, I.-N. Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. **Genetics**, v. 180, p. 471-482, 2008.
- SHEN, G.-H.; WANG, J.-L.; WEN, F.-S.; CHANG, K.-M.; KUO, C.-F.; LIN, C.-H.; LUO, H.-R.; HUNG, C.-S. Isolation and characterization of ϕ km18p, a novel lytic phage with therapeutic potential against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e46537, 2012.
- SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844–855, 2006.
- ŠIMOLIŪNAS, E. et al. Pantoea Bacteriophage vB_PagS_Vid5: A Low-Temperature Siphovirus That Harbors a Cluster of Genes Involved in the Biosynthesis of Archaeosine. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 1–14, 2018.

- SIMOLIUNAS, E.; KALINIENE, L.; STASILO, M.; TRUNCAITE, L.; ZAJANCKAUSKAITE, A.; STANIULIS, J.; NAINYS, J.; KAUPINIS, A.; VALIUS, M.; MESKYS, R. Isolation and Characterization of vB_ArS-ArV2 – First *Arthrobacter* sp. Infecting Bacteriophage with Completely Sequenced Genome. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e111230, 2014.
- SINGLA, S. et al. Encapsulation of bacteriophage in liposome accentuates its entry in to macrophage and shields it from neutralizing antibodies. **PLOS One**, v. 11, n. 4, e0153777, 2016.
- SINGH, V.; JAIN, P.; DAHIYA, S. Isolation and characterization of bacteriophage from waste water against *E. coli*, a food borne pathogen. **Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.**, v. 18, n. 1, p. 163-170, 2016.
- SINOGAS, C.; VIROLOGIA: Manual de apoio às Sessões Laboratoriais (2020); disponível em: <http://www.ensino.uevora.pt/virol/ManualVirol.pdf>.
- SIRIJAN SANTAJIT; NITAYA INDRAWATTANA. Mechanisms of antimicrobial resistance in Pasteurellaceae. **PBioMed Research International**, v. 2016, p. 267, 2016.
- SKURNIK, M.; STRAUCH, E. Phage therapy: Facts and fiction. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 1, p. 5–14, 2006.
- STORMS, Z. J.; SAUVAGEAU, D. Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms. **Virology**, v. 485, p. 355-362, 2015.
- 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, p. 10-17, 2003.
- TANG, F. et al. Isolation and characterization of a broad-spectrum phage of multiple drug resistant *Salmonella* and its therapeutic utility in mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, n. November, p. 193–198, 2019.
- TANG, Z. et al. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 460–466, 2013.
- TENOVER, F. C. et al. Accuracy of six antimicrobial susceptibility methods for testing linezolid against staphylococci and enterococci. **Journal of Clinical**

Microbiology, v. 45, n. 9, p. 2917–2922, 2007.

UL HAQ, I. et al. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: A review. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 9, 2012.

VIREILIO, T.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. D. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 127–136, 2006.

VISHWANATH, S.; CHAWLA, K.; GOPINATHAN, A. Multidrug resistant Gram-negative bacilli in lower respiratory tract infections. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 323–327, 2013.

VONASEK, E.; LE, P.; NITIN, N. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. *Food Hydrocolloids*, v. 37, p. 7–13, 2014.

VUONG, C. et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54881–54886, 2004.

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. 4, n. 8, p. 1-10. 2013.

WYRES, K. L.; HOLT, K. E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 131–139, 2018.

YOUNG, A. L. Powder X-ray Diffraction and its Application to Biotherapeutic Formulation Development, *American Pharmaceutical Review* (available online at: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/38371-Powder-X-ray-Diffraction-and-its-Application-to-Biotherapeutic-Formulation-Development/>), 2012.

YUAN, Y.; GAO, M. Proteomic analysis of a novel *Bacillus Jumbo* phage revealing glycoside hydrolase as structural component. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–11, 2016.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A

Certificado do XXIX Congresso Brasileiro de Virologia e XIII Encontro de Virologia do Mercosul. Gramado, RS, 17-21 Out. 2018.



We certify that the work entitled
**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE LYTIC BACTERIOPHAGES
FROM HOSPITAL SEWAGE SAMPLES**

authored by

**FERNANDA DE CAMPOS MORELLI, LILIAM KATSUE HARADA ROCHA, ERICA CRISTINA
SANTOS SILVA, WELIDA FRANCIELLY DE CAMARGO CAMPOS, THAIS JARDIM OLIVEIRA,
ANAHI ARIADNE MIGUEL, MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA, VICTOR MANUEL
CARDOSO FIGUEIREDO BALCÃO**

was presented in the **Poster Session** during the **XXIX BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY & XIII
MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY**,
held from October 17 to 21, 2018 in Gramado, RS, Brazil.

Gramado, October 21, 2018.

MAURICIO LACERDA NOGUEIRA
PRESIDENT OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR VIROLOGY

FERNANDO ROSADO SPILKI
PRESIDENT OF THE ORGANIZING COMMITTEE

realização



apoio



CERTIFICATE

Pôster apresentado no XXIX Congresso Brasileiro de Virologia e XIII Encontro de Virologia do Mercosul. Gramado, RS, 17-21 Out. 2018.

Isolation and characterization of *Klebsiella pneumoniae* lytic bacteriophages from Hospital sewage samples



Fernanda C. Moreli¹; Liliam K. Harada¹; Erica C. Silva¹; Welida F. Campos¹; Thais J. Oliveira¹; Anahi A. Miguel¹; Marta M. Vila¹; Victor M. Balcão^{1,2,✉}

¹ PhageLab – Laboratory of Biofilms and Bacteriophages, i(b)s² – intelligent biosensing and biomolecule stabilization research group, University of Sorocaba, Sorocaba/SP, Brazil.
² CEB – Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal.
 ✉E-mail: victor.balcao@prof.uniso.br



Introduction

Klebsiella pneumoniae have emerged as an increasingly important cause of community-acquired nosocomial infections, mostly due to extensive use of broad-spectrum antibiotics in hospitalised patients, which has led to both increased colonization by *Klebsiella* and the development of multidrug-resistant strains that frequently produce extended-spectrum β -lactamases and/or other defences against antibiotics. Many of these bacterial strains are highly virulent and exhibit a strong propensity to spread. In the research effort entailed herein, strictly lytic bacteriophage particles were isolated from Hospital-sewage in Sorocaba (Brazil) and characterised as phage therapy candidates against *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from thirty eight human clinical samples.

Methods

Physicochemical characterization of the isolated bacteriophage particles included verification of bacterial lysis, phage morphology, amplification of the bacteriophages, titration of the concentrated bacteriophage suspensions, SDS-PAGE electrophoresis, XRD and UV-Vis scanings, whereas biological characterization encompassed evaluation of their lytic spectra on *Klebsiella pneumoniae* from both collection and clinical isolates, host range, and efficiency of plating (EOP) assays.

Experimental results and discussion

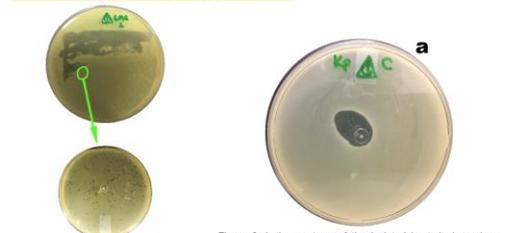


Figure 1. Bacteriophage isolation and plaque selection for phage amplification.

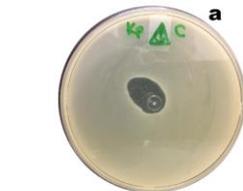


Figure 2. Lytic spectrum of the isolated bacteriophage in a bacterial lawn of a collection *Klebsiella pneumoniae* strain.

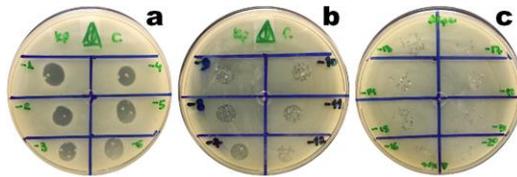


Figure 3. Efficiency of plating (EOP) of the bacteriophage isolated, in a bacterial lawn of a collection *Klebsiella pneumoniae* strain. The concentrated bacteriophage suspension was tested in the collection strain at dilutions ranging from 10^1 to 10^{-10} , showing its effectiveness even at the highest dilution tested.

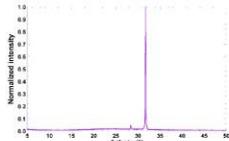


Figure 4. X-ray diffractogram (XRD) of the concentrated bacteriophage PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 suspension.

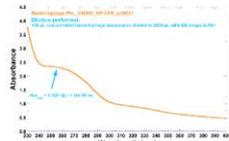


Figure 5. UV-VIS spectrum of PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 phage.

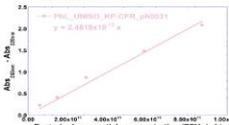


Figure 6. Calibration curve produced for phage PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, allowing to obtain its molar extinction coefficient.



Figure 7. Coomassie-stained electrophoretogram of bacteriophage PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 (lane Ph31) and wide-range molecular weight markers (lane M), allowing to observe the protein profile of the bacteriophage.

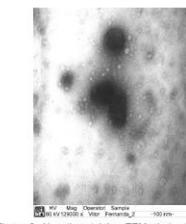


Figure 8. Negative-staining TEM photomicrograph of the concentrated bacteriophage suspension PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031, at a magnification of x129300.

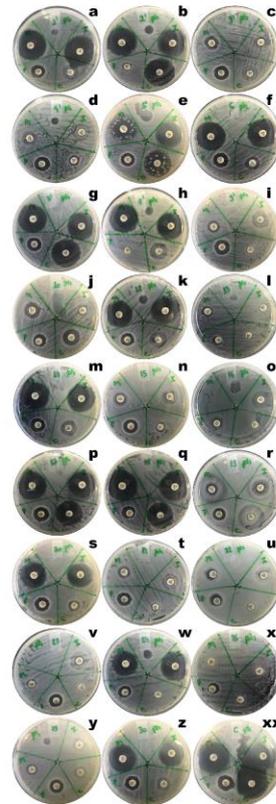


Figure 9. Results obtained for the lytic spectra following application of 10 μ L droplets of the concentrated bacteriophage PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 suspension onto bacterial lawns of the several pathogenic multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains obtained from clinical isolates: (a) anal swab, (b) urine, (c) urine, (d) anal swab, (e) urine, (f) urine, (g) urine, (h) anal swab, (i) anal swab, (j) anal swab, (k) femur secretion, (l) urine, (m) urine, (n) blood culture, (o) catheter tip, (p) urine, (q) anal swab, (r) urine, (s) urine, (t) anal swab, (u) urine, (v) anal swab, (w) anal swab, (x) urine, (y) anal swab, (z) anal swab, (xx) collection strain.

Conclusions

The bacteriophage isolated and characterized produced clear plaques of bacterial lysis and exhibited a broad lytic spectrum against several *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from (human) clinical samples.

The bacteriophage particles were capable of efficiently promote the lysis of the majority of *Klebsiella pneumoniae* strains comprising a collection of 38 clinical isolates originating from Hospital UNIMED Dr. Miguel Soeiro in Sorocaba (Brazil), thus exhibiting a number of properties indicative of potential use in phage cocktails for eradicating infections caused by *Klebsiella pneumoniae* in humans.

Wavelength screening of the (propagated) bacteriophage suspension PhL_UNISO_KP-CFR_ph0031 allows observation of the wavelength producing maximum absorption of the concentrated phage suspension, and the minimum absorption observed around 245 nm (allowing to infer about the absence of bacterial cell contaminants such as cell debris and other intracytoplasmatic proteins released upon bacterial cell lysis, and concomitant presence of a very high number of virions in the concentrated suspension).

The SDS-PAGE electrophoretogram performed to the isolated bacteriophage allowed to observe a protein profile with a wide range of molecular weights.

The TEM analysis performed allows to conclude that the bacteriophage isolated most probably belongs to the Myoviridae family.

Acknowledgements

FAPESP (São Paulo, Brazil; Refs. No. 2016/08884-3 and 2016/12234-4) and CNPq (São Paulo, Brazil; Research Productivity (PQ) fellowship granted to Victor M. Balcão, Refs. No. 306113/2014-7 and 308208/2017-0), is hereby gratefully acknowledged. Funding for Liliam Harada, Erica Silva and Welida Campos by UNISO, in the form of scholarships, is hereby also gratefully acknowledged.

ANEXO B

**Certificado do 22º EPIC: Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica
Universidade de Sorocaba (UNISO), 05-07 Nov. 2019.**




DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL:
Saúde e Bem-estar, promoção da vida saudável para todos

- 22º Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica
- 17º Encontro de Extensão
- 2º E_PIBID

CERTIFICADO

Certificamos que o pôster do trabalho **“ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BACTERIÓFAGOS COM ATIVIDADE LÍTICA CONTRA KLEBSIELLA PNEUMONIAE”**, de autoria de **FERNANDA DE CAMPOS MORELI, WELIDA FRANCIELY CAMPOS, LILIAM KATSUE HARADA, ERICA CAMPOS SILVA, ANAHI ARIADNE MIGUEL, THAIS JARDIM OLIVEIRA, MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA, VICTOR MANOEL BALCÃO**, foi apresentado, neste dia, no **22º EPIC – Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica**, evento realizado de 05 a 07 de novembro de 2019, na Universidade de Sorocaba (Uniso).

Sorocaba, 05 de novembro de 2019.



Prof. Dr. José Martins de Oliveira Jr.
Pró-Reitor de Pós-Graduação, Pesquisa,
Extensão e Inovação – Propein



Profa. Dra. Angela Faustino Jozala
Presidente da Comissão Organizadora
do EPIC, ENEX e E_PIBID 2019

Pôster do 22º EPIC: Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica
 Universidade de Sorocaba (UNISO), 05-07 Nov. 2019.

epic DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL: Saúde e Bem-estar, promoção da vida saudável para todos

• 22º Encontro de Pesquisadores e de Iniciação Científica
 • 17º Encontro de Extensão
 • 2º E_PIBIO

UNISO

Isolamento e Caracterização de Bacteriófagos com Atividade Lítica contra *Klebsiella pneumoniae*

MORELI, Fernanda¹; CAMPOS, Welida F.1 ;HARADA, Liliam K.1; SILVA, Erica C.1; OLIVEIRA, Thais J.1; MIGUEL, Anahi A.1; VILA, Marta M.1, BALCÃO, Victor 1,2,*

1 PhageLab – Laboratório de Bacteriófagos e Biofilmes, Universidade de Sorocaba, Sorocaba/SP, Brasil
 2 CEB – Centro de Engenharia e Biologia, Universidade de Minho, Braga, Portugal

fernandacamposmoreli@gmail.com



Introdução

A *Klebsiella pneumoniae* emergiu como uma causa cada vez mais importante de infecções nosocomiais adquiridas na comunidade, principalmente devido ao uso extensivo de antibióticos em pacientes hospitalizados, o que levou ao aumento da colonização por *Klebsiella p.* e ao desenvolvimento de cepas multiresistentes que frequentemente produzem β -lactamases de espectro estendido e/ou outras defesas contra antibióticos. Muitas dessas cepas bacterianas são altamente virulentas e exibem uma forte propensão a se espalhar. Na pesquisa aqui apresentada, partículas estritamente líticas de bacteriófagos foram isoladas da rede de esgoto de um Hospital de Sorocaba (Brasil) e caracterizadas como candidatas à terapia fágica contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de tinta e oito amostras.

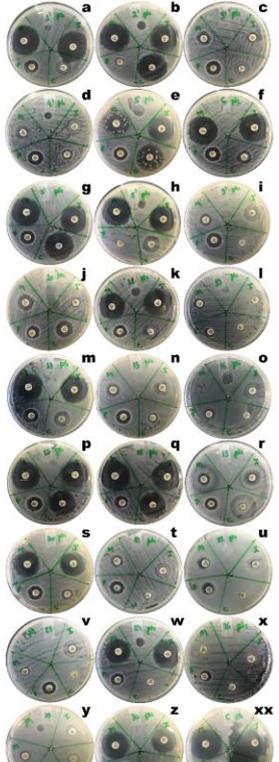
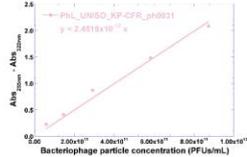
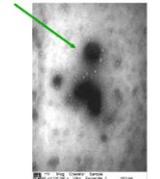
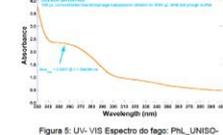
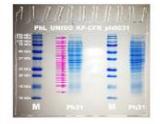
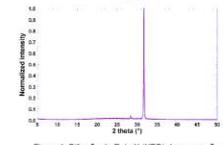
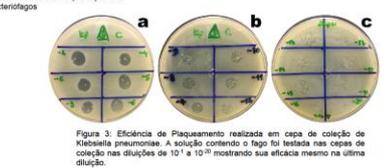
Metodologia

A caracterização físico-química das partículas isoladas de bacteriófagos incluiu verificação de lise bacteriana, morfologia de fagos, amplificação dos bacteriófagos, titulação das suspensões concentradas de bacteriófagos, eletroforese em SDS-PAGE, varredura de DRX e UV-VIS, enquanto a caracterização biológica abrangeu a avaliação de seus espectros líticos, gama de hospedeiros, ensaios de eficiência de revestimento (EOP), determinação da curva de crescimento em uma etapa (OGCG) para determinações de período latente e tamanho de rajada e determinação da curva de adsorção para cálculo da taxa de adsorção de bacteriófagos em sua célula hospedeira bacteriana.

Resultados Experimentais e Discussão

Os bacteriófagos isolados e caracterizados produziram placas claras (e diferentes) de lise bacteriana e exibiram um amplo espectro lítico contra várias cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de amostras.

Bacteriophage isolation and plaque selection based on distinct morphologies



Conclusão

As partículas de bacteriófagos foram capazes de lisar eficientemente a maioria das cepas de *Klebsiella pneumoniae*, compreendendo uma coleção de 35 isolados clínicos de Sorocaba (Brasil), exibindo assim várias propriedades indicativas de potencial utilidade em coquetéis de terapia fágica.

A eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou que o isolado bacteriófágico possui um perfil proteico com ampla variedade de pesos moleculares. A análise do MET permitiu concluir que o isolado bacteriófágico provavelmente pertence à família Myoviridae.

A triagem do comprimento de onda permitiu a observação do comprimento de onda produzindo absorção máxima da suspensão do fago concentrado e a absorção mínima, observada em torno de 245 nm (permitindo inferir sobre a ausência de contaminantes bacterianos assim como debris celulares e proteínas citoplasmáticas liberados na lise das células bacterianas, concomitantemente a um número muito alto de vírions na suspensão concentrada.

Referências

BALCÃO, V. M. et al. Carbohydrate Hydrogels with Stabilized Phage Particles for Bacterial Biosensing. *Bacterium Diffusion Studies: Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 172, n.3, p. 1194-1214, 2014.

CARLTON, R.M. et al. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatics analyses, oral toxicity study and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 43, p. 301-312, 2005.

MOGHADDER, F.; EGRI, S.; PISKIN, E. Phages in modified alginate beads. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 45, n. 2, p. 357-363, 2017

Agradecimentos

Bolsa FAPESP (São Paulo, Brasil: Ref. 2016 / 08984-3 e 2016 / 12324-4) e CNPq (São Paulo, Brasil: Research Productivity (PQ)) concedida a Victor M. Balcão, Ref. 306113 / 2014-7 e 308208 / 2017-0), é reconhecido com gratidão. Também é reconhecido com gratidão o financiamento de Liliam Harada, Erica Silva e Welida Campos pela UNISO, na forma de bolsas de estudos.