

Bruna Ribera Guerrero

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL EM LIPOSSOMAS, DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS PARA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO PARA INFECÇÕES PULMONARES”

RESUMO

As bactérias têm se tornado cada vez mais resistentes devido ao uso incorreto e exacerbado de antibióticos. Entre os agentes patogênicos prioritários, a *Klebsiella pneumoniae* se destaca na lista crítica da Organização Mundial de Saúde (OMS), representando séria ameaça à saúde pública. Em particular, a *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) é responsável por surtos hospitalares graves devido à sua resistência a múltiplas classes de antibióticos, incluindo carbapenêmicos, considerados última linha de defesa. Este patógeno persiste por longos períodos no ambiente e em superfícies abióticas, como equipamentos cirúrgicos, podendo causar uma variedade de doenças, incluindo infecções do trato urinário, pneumonias e sepse. Diante da escassez de novos antibióticos eficazes, os bacteriófagos surgem como uma alternativa promissora. Por isso, este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar, encapsular em lipossomas e testar os bacteriófagos líticos para *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase. Os fagos foram isolados de águas residuais de Hospitais. A caracterização dos bacteriófagos isolados incluiu varredura espectral UV-Vis para determinação do coeficiente de extinção molar e microscopia eletrônica de transmissão (MET) para avaliação morfoestrutural, avaliou-se a gama de hospedeiros, os parâmetros de crescimento das partículas fágicas via curva de crescimento em um só ciclo síncrono (OSGC), e as taxas de adsorção e dessorção às células bacterianas. Além disso, a capacidade de biocontrole de bacteriano foi avaliada em diferentes multiplicidades de infecção (MOIs). Após a caracterização, os fagos foram estabilizados em um coquetel, e encapsulados em lipossomas, que foram caracterizados por dispersão dinâmica de luz laser (Dynamic Laser Light Scattering, DLS) e testados em ensaios de inativação bacteriana *ex vivo* em pulmões artificialmente contaminados. Os bacteriófagos isolados, denominados KpnS01BRG e KpnS02SCE, pertencentes à classe Caudoviricetes, apresentaram especificidade para o hospedeiro de isolamento e estabilidade sob diferentes condições de temperatura e pH,

além de ótimo desempenho nos testes de atividade antibacteriana in vitro em diferentes MOIs. Nos testes ex vivo, tanto o coquetel livre quanto o encapsulado em lipossomas mostraram eficiência no controle da carga bacteriana. Integrados a soluções isotônicas, os fagos encapsulados têm potencial aplicação terapêutica para infecções pulmonares e sistêmicas, destacando-se como uma alternativa viável para enfrentar os desafios impostos pela resistência bacteriana da KPC.

Palavras-chave: Bacteriófagos; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; isolamento e caracterização; lipossomas; nebulização.

ABSTRACT

Bacteria have become increasingly resistant due to the incorrect and excessive use of antibiotics. Among the priority pathogens, *Klebsiella pneumoniae* stands out on the World Health Organization (WHO) critical list, representing a serious threat to public health. In particular, carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (KPC) is responsible for serious hospital outbreaks due to its resistance to multiple classes of antibiotics, including carbapenems, considered the last line of defense. This pathogen persists for long periods in the environment and on abiotic surfaces, such as surgical equipment, and can cause a variety of diseases, including urinary tract infections, pneumonia, and sepsis. Given the scarcity of new effective antibiotics, bacteriophages emerge as a promising alternative. Therefore, this work aimed to isolate, characterize, encapsulate in liposomes, and test lytic bacteriophages for carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. The phages were isolated from hospital wastewater. Characterization of the isolated bacteriophages included UV-Vis spectral scanning to determine the molar extinction coefficient and transmission electron microscopy (TEM) for morphostructural evaluation. The host range, growth parameters of the phage particles via single-cycle synchronous growth curve (OSGC), and adsorption and desorption rates to bacterial cells were evaluated. In addition, the bacterial biocontrol capacity was evaluated at different

multiplicities of infection (MOIs). After characterization, the phages were stabilized in a cocktail and encapsulated in liposomes, which were characterized by dynamic laser light scattering (DLS) and tested in ex vivo bacterial inactivation assays in artificially contaminated lungs. The isolated bacteriophages, named KpnS01BRG and KpnS02SCE, belonging to the Caudoviricetes class, showed specificity for the isolation host and stability under different temperature and pH conditions, in addition to excellent performance in in vitro antibacterial activity tests at different MOIs. In ex vivo tests, both the free cocktail and the one encapsulated in liposomes showed efficiency in controlling the bacterial load. Integrated into isotonic solutions, the encapsulated phages have potential therapeutic application for pulmonary and systemic infections, standing out as a viable alternative to face the challenges imposed by bacterial resistance of KPC.

Keywords: Bacteriophages; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; isolation and characterization; liposomes; nebulization.