

Giovanna Maria de Souza Nanini

**AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DE COQUETEL FÁGICO COM
BACTERIÓFAGOS PARA *Klebsiella pneumoniae* E *Pseudomonas aeruginosa*
PELO TESTE DE AMES**

RESUMO

A resistência adquirida antimicrobiana (RAM) é um problema de saúde pública global e ocorre quando microrganismos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) sofrem alterações quando expostos a antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivirais, antimaláricos ou anti-helmínticos), favorecendo a seleção de variedades resistentes chamadas multirresistentes, dificultando a prevenção e tratamento de um número cada vez maior de infecções. Com isso, tornam-se necessárias alternativas inovadoras para debelar as infecções, dentre elas, os bacteriófagos. Neste estudo, avaliou-se a faixa de segurança toxicológica *in vitro* de coquetel fágico com bacteriófagos para *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, através do ensaio *Salmonella*/microssoma. Foram utilizadas as cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella* Typhimurium, auxotróficas para o aminoácido histidina, em triplicata, com e sem ativação metabólica, a fim de detectar o potencial mutagênico da substância-teste. A amostra foi doada por pesquisadores da UNISO participantes do Projeto Finep intitulado “Desenvolvimento e Avaliação de Sistemas Inovadores para Liberação Modificada de Antimicrobianos”. O ensaio-teste é comparado estatisticamente com controle positivos, negativos e espontâneos através do programa estatístico Origin e valores com $p < 0,05$ considerados significantes. A mutagenicidade foi atribuída a valores $\geq 2,0$ obtida pelo índice de mutagenicidade (IM). Os valores obtidos por meio dos ensaios sem ativação metabólica foram adequados nas concentrações de $0,67 \cdot 10^{13}$; $1,34 \cdot 10^{13}$ e $2,68 \cdot 10^{13}$ Unidades Formadoras de Placas (UFP/placa). Nos ensaios com ativação metabólica, os títulos maiores, $4,02 \cdot 10^{13}$ e $5,37 \cdot 10^{13}$ UFP/placa, resultaram em toxicidade e apenas a cepa TA100 resultou em valores mutagênicos nos títulos $1,34 \cdot 10^{13}$ e $2,68 \cdot 10^{13}$ UFP/placa. As diluições feitas para verificar a faixa de segurança, sendo elas $0,04 \cdot 10^{13}$; $0,06 \cdot 10^{13}$ e $0,12 \cdot 10^{13}$ UFP/placa mostraram um resultado mutagênico não quantificável, devido ao número de revertentes ter sido elevado. Conclui-se que dentre todas as concentrações estudadas o título de $0,67 \cdot 10^{13}$ UFP/placa mostrou-se seguro, o que significa isenção de toxicidade ou mutagenicidade. O fato de diluições de 5 a 15 vezes do coquetel fágico mostrar-se mutagênico pode ser devido à presença de resquícios da célula hospedeira e endotoxinas bacterianas, sendo necessário purificação da amostra recebida.

Palavras-chave: Antibióticos; *Salmonella*/microssoma; Toxicidade.

ABSTRACT

Antimicrobial acquired resistance (AMR) is a global public health problem and occurs when microorganisms (bacteria, fungi, viruses, and parasites) undergo changes when exposed to antimicrobials (antibiotics, antifungals, antivirals, antimalarials, or antihelminthics), favoring the selection of resistant varieties called multidrug-resistant, which makes the prevention and treatment of an increasing number of infections more difficult. Consequently, innovative alternatives become necessary to combat infections, among them bacteriophages. In this study, the in vitro toxicological safety range of a phage cocktail containing bacteriophages for *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated through the Salmonella/microsome assay. Strains TA97a, TA98, TA100, and TA102 of *Salmonella* Typhimurium, auxotrophic for the amino acid histidine, were used in triplicate, with and without metabolic activation, in order to detect the mutagenic potential of the test substance. The sample was donated by researchers from UNISO participating in the Finep Project entitled "Development and Evaluation of Innovative Systems for Modified Release of Antimicrobials." The test assay was statistically compared with positive, negative, and spontaneous controls using the statistical program Origin, with values of $p < 0.05$ considered significant. Mutagenicity was attributed to values ≥ 2.0 obtained by the mutagenicity index (MI). The values obtained from assays without metabolic activation were adequate at concentrations of $0.67 \cdot 10^{13}$; $1.34 \cdot 10^{13}$; and $2.68 \cdot 10^{13}$ Plaque Forming Units (PFU/plate). In assays with metabolic activation, higher titers, $4.02 \cdot 10^{13}$ and $5.37 \cdot 10^{13}$ PFU/plate, resulted in toxicity, and only strain TA100 showed mutagenic values at titers $1.34 \cdot 10^{13}$ and $2.68 \cdot 10^{13}$ PFU/plate. Dilutions made to verify the safety range, namely $0.04 \cdot 10^{13}$; $0.06 \cdot 10^{13}$ and $0.12 \cdot 10^{13}$ PFU/plate, showed a nonquantifiable mutagenic result due to the elevated number of revertants. It is concluded that among all concentrations studied, the titer of $0.67 \cdot 10^{13}$ PFU/plate proved to be safe, meaning absence of toxicity or mutagenicity. The fact that 5 to 15 fold dilutions of the phage cocktail proved mutagenic may be due to the presence of host cell residues and bacterial endotoxins, making purification of the received sample necessary.

Keywords: Antibiotics. *Salmonella*/microsome. Toxicity.in.