

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNISO

### **\*TRABALHO COMPLETO CONTENDO ARTIGOS CIENTÍFICOS. AGUARDANDO A PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS**

O uso indiscriminado dos antibióticos, aliado a enorme capacidade adaptativa das bactérias, possibilitou o surgimento de cepas bacterianas com variáveis e crescentes níveis de resistência aos mesmos. Tal resistência limita a eficácia do arsenal terapêutico disponível para o tratamento contra infecções por cepas multirresistentes.

Esta realidade tem provocado dificuldades acrescidas no controle das infecções, contribuindo tanto para o aumento dos custos do sistema de saúde e das unidades de cuidados de saúde, como tem graves consequências para a saúde dos pacientes, prolongando o tempo de permanência nestas unidades e elevando os custos a ela associados. Além disto, contribuiu significativamente para a morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados. Sendo assim, as infecções hospitalares representam um grande desafio a ser enfrentado tanto pelo poder público como pela sociedade, na execução de ações de prevenção e controle de infecções nas unidades de cuidados de saúde. Dentre os microrganismos causadores de infecções hospitalares pode destacar-se a *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria oportunista que representa grande ameaça a pacientes nos serviços de saúde. O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo desenvolver um sistema de biodeteção da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, com base no uso de um biohidrogel cromogênico sensível a alterações de cor, contendo um coquetel de partículas bacteriofágicas específicas e estritamente líticas, isoladas de fontes ambientais. As partículas fágicas isoladas foram extensamente caracterizadas tanto físico-química como biologicamente. Os bacteriófagos isolados pertencem a ordem Caudovirales uma vez que tem cauda, com os fagos ph0031 e ph0034 a pertencerem, provavelmente, a família *Myoviridae*, e o fago ph0041 a pertencer, provavelmente, a família *Siphoviridae*, com tamanhos de genoma estimados em 62.5 kbp (fago ph0031), 106.9 kbp (fago ph0034) e 44.5 kbp (fago ph0041), com todos os fagos a serem capazes de se ligarem a várias estirpes de *P. aeruginosa* provenientes de isolados clínicos e levarem a sua morte. Os fagos ph0034 e ph0041 parecem ser bastante rápidos a lisarem o hospedeiro, com tamanhos de explosão de 20 UFP/célula hospedeira (fago ph0031), 28.3 UFP/célula hospedeira (fago ph0034) e 84.2 UFP/célula hospedeira (fago ph0041), indicando que se replicam eficientemente em *P. aeruginosa* com curtos períodos de latência (30 min, 10 min e 30 min para os fagos ph0031, ph0034 e ph0041, respectivamente). Os fagos isolados causaram uma elevada redução no crescimento de células de *P. aeruginosa*, mas os seus efeitos ocorrem apenas após as primeiras 8 h de incubação. Para o desenvolvimento de um sistema de biodeteção bacteriana, duas abordagens foram seguidas, integrando reagentes específicos numa matriz biopolimérica, em concentrações variáveis, com o objetivo de produzir sinal colorimétrico/bioluminescente em presença de um determinado componente citoplasmático liberado por lise fágica de células de *Pseudomonas aeruginosa* em contato com a matriz cromogênica. As partículas fágicas imobilizadas mostraram-se viáveis e mantiveram sua atividade lítica após o processo de polimerização que conduziu aos hidrogéis cromogênicos biorreativos, permitindo assim concluir que a estabilização tanto da sua estrutura como da sua função foi plenamente atingida.

Usando o sistema de biodeteção I, para números de células bacterianas até 107 UFC nenhuma mudança visível na cor pode ser observada além de 180 min de ensaio, permitindo inferir que a presença desta bactéria num fluido poderia ser detectada dentro de um período de ensaio de 3 h usando este biossensor. Utilizando o sistema de biodeteção II, desenvolveu-se bioluminescência após contato da bactéria com o hidrogel. A partir dos sinais de bioluminescência capturados pelo sensor LDR, quatro

momentos principais puderam ser definidos, estando estes em estreita concordância com a duração geral de um ciclo lítico, e permitiram detectar positivamente uma carga bacteriana de *P. aeruginosa* num período de tempo inferior a 180 min. Com relação ao sinal proveniente do sensor de estado sólido (fotodiodo), ele foi um tanto errático sem uma correspondência clara com o sinal do sensor LDR e, portanto, o sensor fotodiodo foi considerado não adequado para o propósito pretendido do sistema de biodeteção bacteriana II. Os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa permitem concluir que ambos os dispositivos de biossensor foram capazes de detectar positivamente a presença de células de *P. aeruginosa* dentro de um período de ensaio de 3 h. Hidrogéis cromogênicos biorreativos facilitam o manuseio e, portanto, são desejáveis ao projetar-se um sistema integrado de biodeteção bacteriana de utilização prática. Neste caso, os hidrogéis biorreativos aprisionando partículas bacteriofágicas e exibindo características cromogênicas / bioluminescentes foram utilizados com sucesso para detectar células de *P. aeruginosa* supostamente presentes em fluidos biológicos dentro de um intervalo de tempo de 180 min e, portanto, exibem potencial para uso em (mas não limitado a) ambientes hospitalares.

**Palavras-chave:** Partículas bacteriofágicas estritamente líticas. Estabilização estrutural e funcional. Biohidrogel cromogênico/luminescente. Biodeteção colorimétrica de *Pseudomonas aeruginosa*. Biossensor.

#### **ABSTRACT**

The indiscriminate use of antibiotics combined with the enormous adaptive capacity of bacteria, made possible the emergence of bacterial strains with variable and increasing levels of resistance to them. Such resistance limits the effectiveness of the therapeutic arsenal available for treatment of infections by such multi-resistant strains. This reality has led to increased difficulties in the control of infections, and contributes both to the increase in the costs of the health care and health care units, as well as present serious consequences for the health of patients, prolonging hospital stay and increasing treatment costs in addition to contributing significantly to the morbidity and mortality of hospitalized patients. Therefore, hospital infections represent a major challenge to be faced by both public authorities and society, in the implementation of actions for the prevention and control of infections in health care units. Among the microorganisms that cause hospital infections, *Pseudomonas aeruginosa* can be highlighted, an opportunistic bacterium that represents a great threat to patients in health services. The present research work aimed to develop a biodetection system for the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, based on the use of a chromogenic biohydrogel sensitive to color changes, containing a cocktail of bacteriophage particles isolated from environmental sources, specific and strictly lytic for *Pseudomonas aeruginosa*. The isolated phage particles were extensively characterized both physicochemically and biologically. All isolated phages belong to the order Caudovirales since they are tailed, with phages ph0031 and ph0034 belonging most likely to the *Myoviridae* family and phage ph0041 belonging most likely to the *Siphoviridae* family, with genome sizes estimated to be 62.5 kbp (phage ph0031), 106.9 kbp (phage ph0034) e 44.5 kbp (phage ph0041), and all phages were able to bind to several of the *P. aeruginosa* bacterial strains from clinical isolates and kill the bacteria. Phages ph0034 and ph0041 look like fairly quick phages to lyse the host, but not unreasonably so, with burst sizes of 20 PFU/host cell (phage ph0031), 28.3 PFU/host cell (phage ph0034) and 84.2 PFU/host cell (phage ph0041), indicating that the isolated phages replicate efficiently in *P. aeruginosa* with a short latency period (30 min, 10 min and 30 min for phages ph0031, ph0034 and ph0041, respectively). The isolated phages caused a high reduction in the growth of *P. aeruginosa* cells, but their effect only occurs after the first 8 h of incubation. For the development of a bacterial biodetection system, two approaches were followed, integrating specific reagents in a biopolymeric matrix, in variable concentrations, with the objective of producing a colorimetric / bioluminescent signal in the presence of a given cytoplasmic component released by phage lysis of *P. aeruginosa* cells in contact

with the chromogenic matrix. The immobilized bacteriophage particles were viable and retained their lytic activity after the polymerization process leading to the bioreactive chromogenic hydrogels, thus allowing to conclude that stabilization of both their structure and function was fully attained. Using biodetection system I, for bacterial cell numbers up to 10<sup>7</sup> CFU no visible change in color could be observed beyond 180 min of assay, allowing to infer that the presence of this bacterium in a fluid could be detected within a 3-hr timeframe assay using this biosensing device. Using biodetection system II, bioluminescence was developed upon contacting the hydrogel with the bacterium. From the bioluminescence signals captured by the LDR sensor, four major moments could be defined that were in close agreement with the general duration of a lytic cycle, and allowed to positively detect a (*P. aeruginosa*) bacterial load in a timeframe of less than 180 min. Regarding the signal emanating from the photodiode sensor, it was somewhat erratic without a clear correspondence with the signal from the LDR sensor, and hence the photodiode sensor was deemed not suitable for the intended purpose of bacterial biodetection system II. The results obtained in this research work allow to conclude that both biosensing devices were able to positively detect the presence of *P. aeruginosa* cells within a 3-hr timeframe assay. The use of bioreactive chromogenic hydrogels facilitates handling, and hence are desirable when designing an integrated bacterial biodetection system of practical use. In this case, the bioreactive hydrogels entrapping bacteriophage particles and exhibiting chromogenic/bioluminescent characteristics were successfully employed for detecting *Pseudomonas aeruginosa* cells supposedly present in biological fluids within a 180 min timeframe, and hence exhibit potential for use in (but not limited to) hospital settings.

**Keywords:** Strictly lytic bacteriophage particles. Structural and functional stabilization. Chromogenic/bioluminescent biohydrogel. Colorimetric biodetection of *Pseudomonas aeruginosa*. Biosensor.