



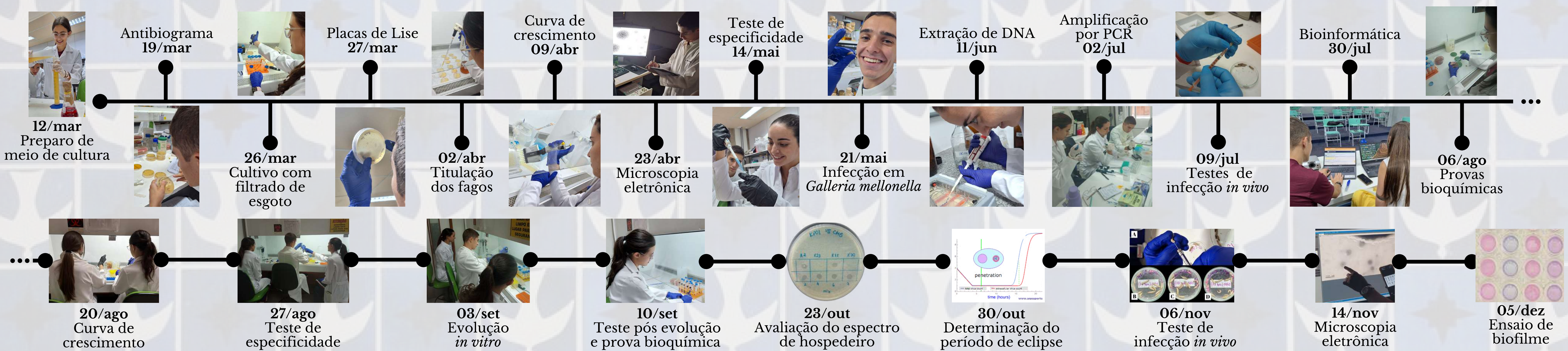
# PROJETO VENOM: FAGOTERAPIA COMO ALTERNATIVA NO COMBATE A BACTÉRIAS MULTIRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Mariana Damasio Ayres Lopes; Fernanda Ribeiro Wambier; Paulo Victor Rodrigues Mascarenhas; Gustavo Figueiredo Marques Leite; Lorena da Silveira Derengowski

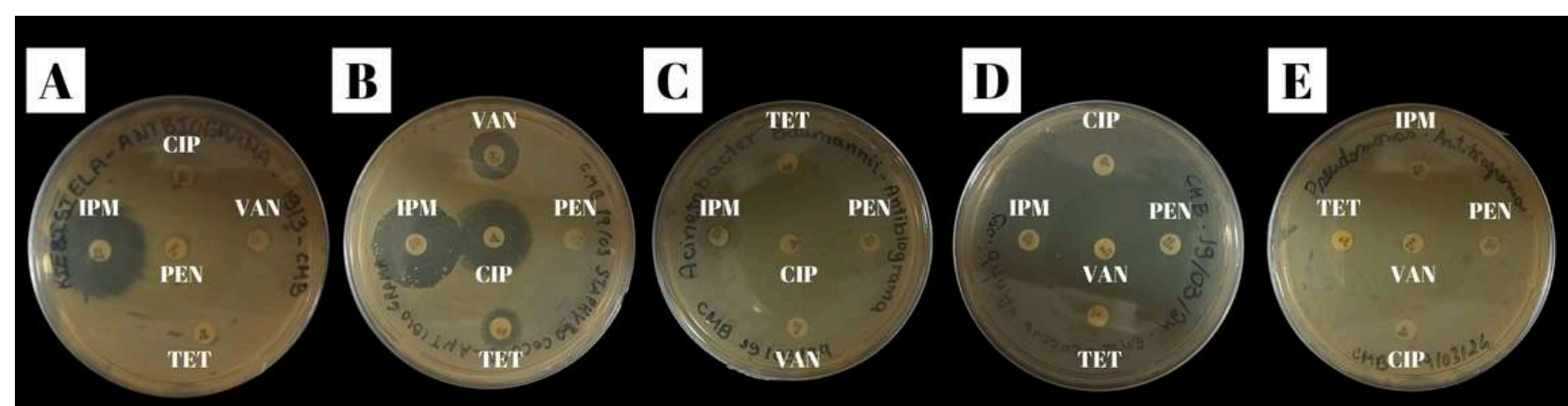
## OBJETIVO

O projeto propõe o isolamento e a caracterização de bacteriófagos como alternativa ao combate a bactérias multirresistentes, valendo-se da alta especificidade dos vírus bacteriófagos e sua capacidade de coevolução com o hospedeiro alvo.

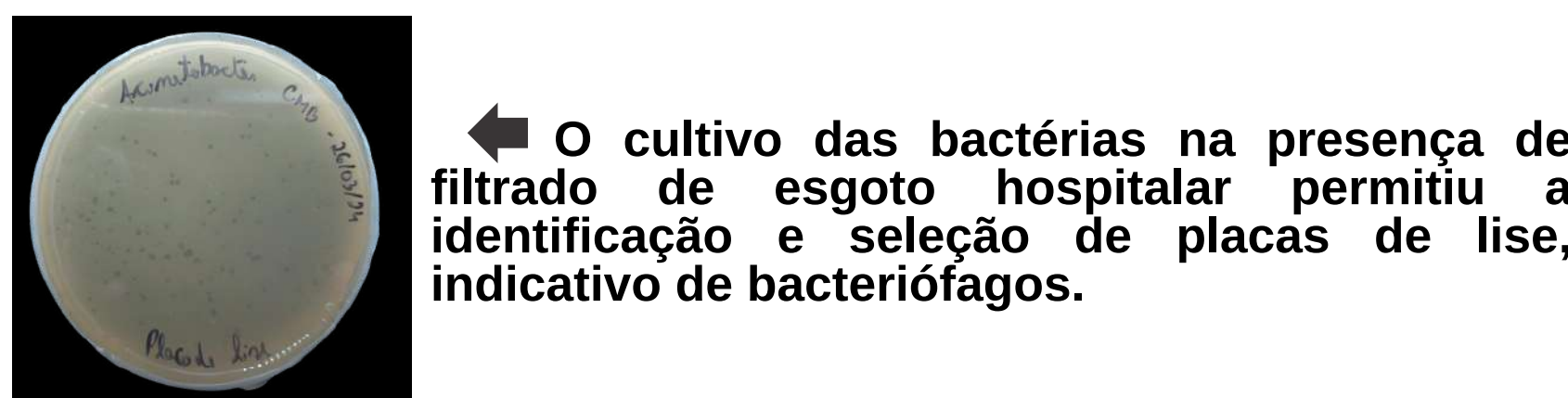
## METODOLOGIA



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

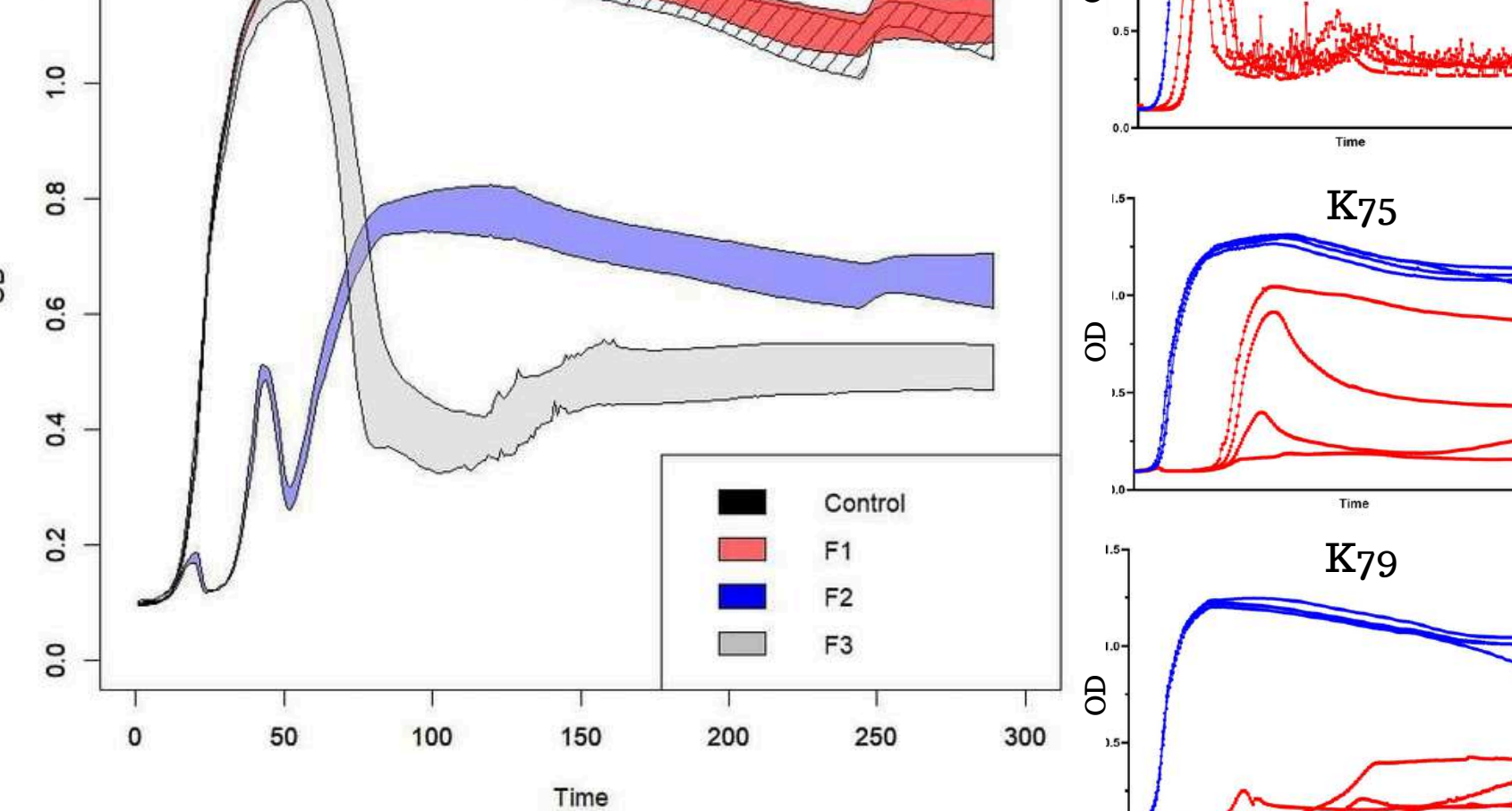


Três dos cinco isolados clínicos bacterianos obtidos mostraram-se resistentes a todos os antibióticos testados, confirmando a alta taxa de bactérias multirresistentes e a necessidade do desenvolvimento de terapias alternativas.

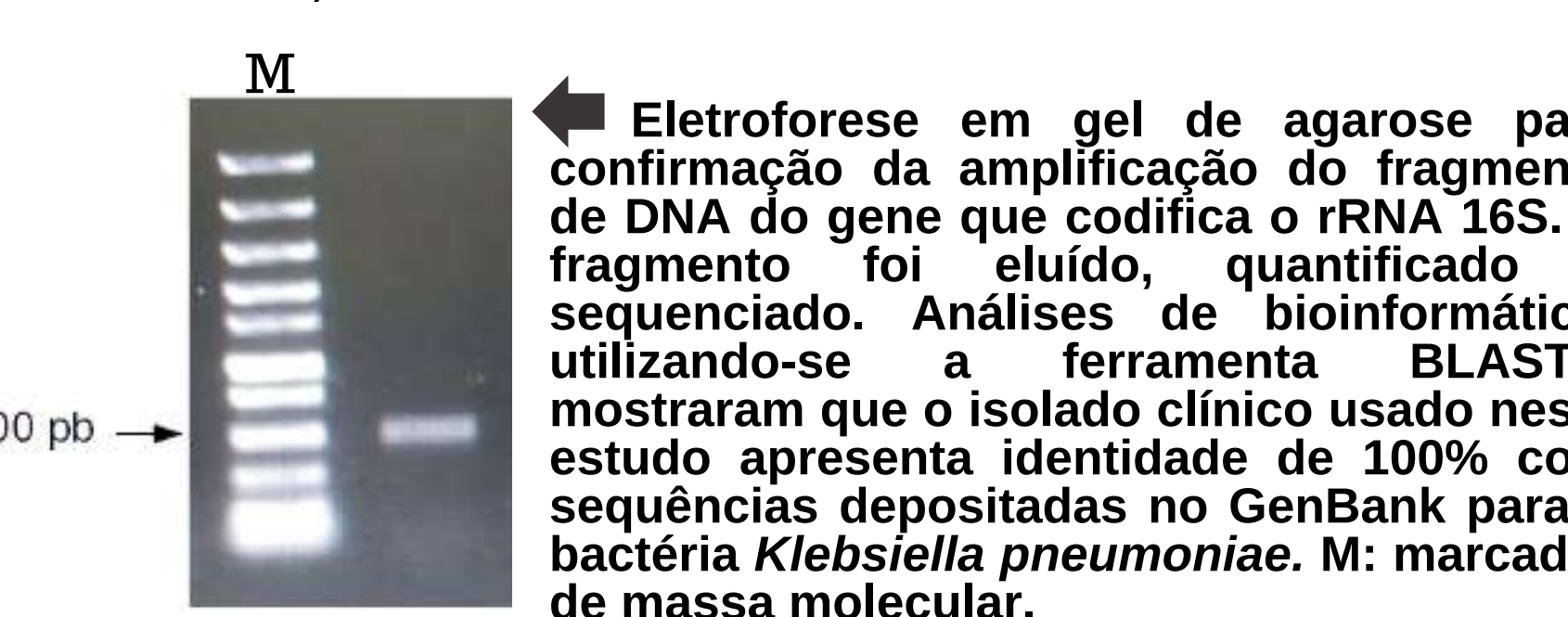


O cultivo das bactérias na presença de filtrado de esgoto hospitalar permitiu a identificação e seleção de placas de lise, indicativo de bacteriófagos.

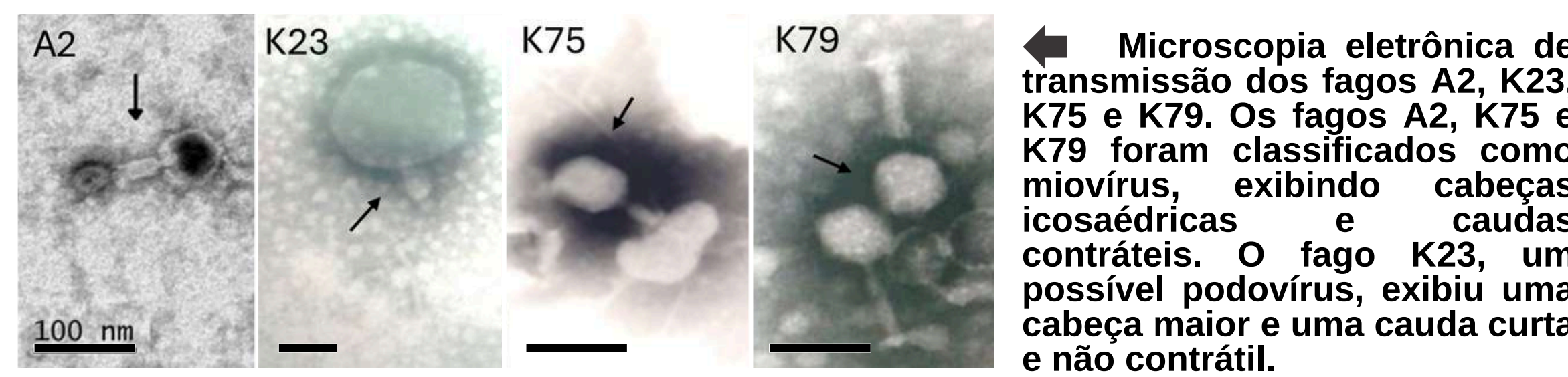
Os bacteriófagos isolados foram caracterizados quanto ao tipo de ciclo reprodutivo com base no padrão de crescimento de bactérias infectadas. Para o isolado previamente identificado como *Acinetobacter baumannii*, o fago A2 apresentou comportamento lítico, indicando um potencial terapêutico.



Inibição do crescimento de isolados de *Klebsiella pneumoniae* pelos bacteriófagos K23, K75 e K79. As culturas tratadas com fagos exibiram diminuição significativa do crescimento, refletindo lise bacteriana efetiva.



Eletroforese em gel de agarose para confirmação da amplificação do fragmento de DNA do gene que codifica o rRNA 16S. O fragmento foi eluído, quantificado e sequenciado. Análises de bioinformática, utilizando-se a ferramenta BLASTn, mostraram que o isolado clínico usado neste estudo apresenta identidade de 100% com sequências depositadas no GenBank para a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. M: marcador de massa molecular.



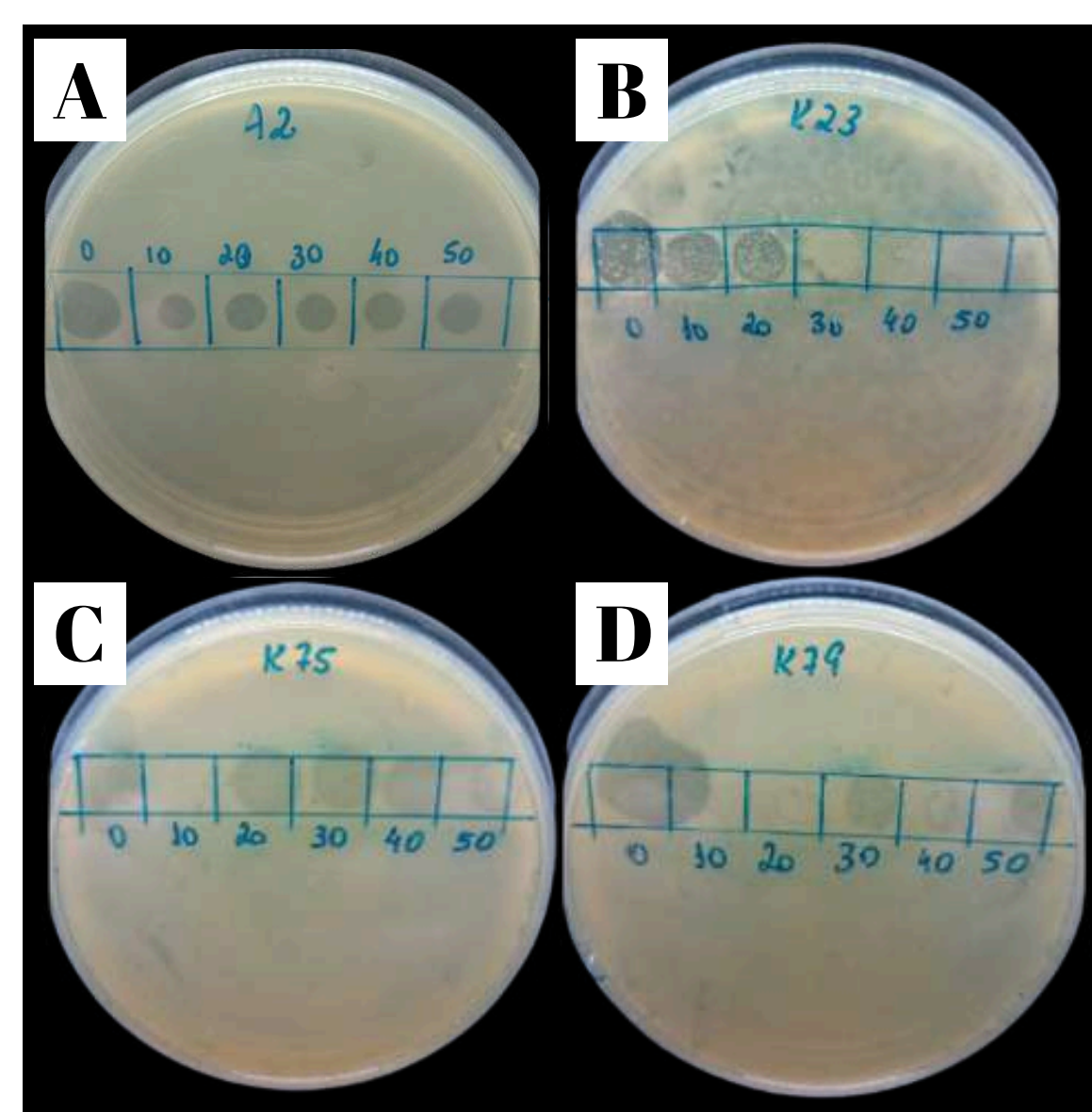
Microscopia eletrônica de transmissão dos fagos A2, K23, K75 e K79. Os fagos A2, K75 e K79 foram classificados como miovírus, exibindo cabeças icosaédricas e caudas contráteis. O fago K23, um possível podovírus, exibiu uma cabeça maior e uma cauda curta e não contrátil.

Após o ensaio de evolução *in vitro*, isolados previamente refratários aos 4 fagos testados apresentaram suscetibilidade aos mixes de fagos coletados durante o experimento.

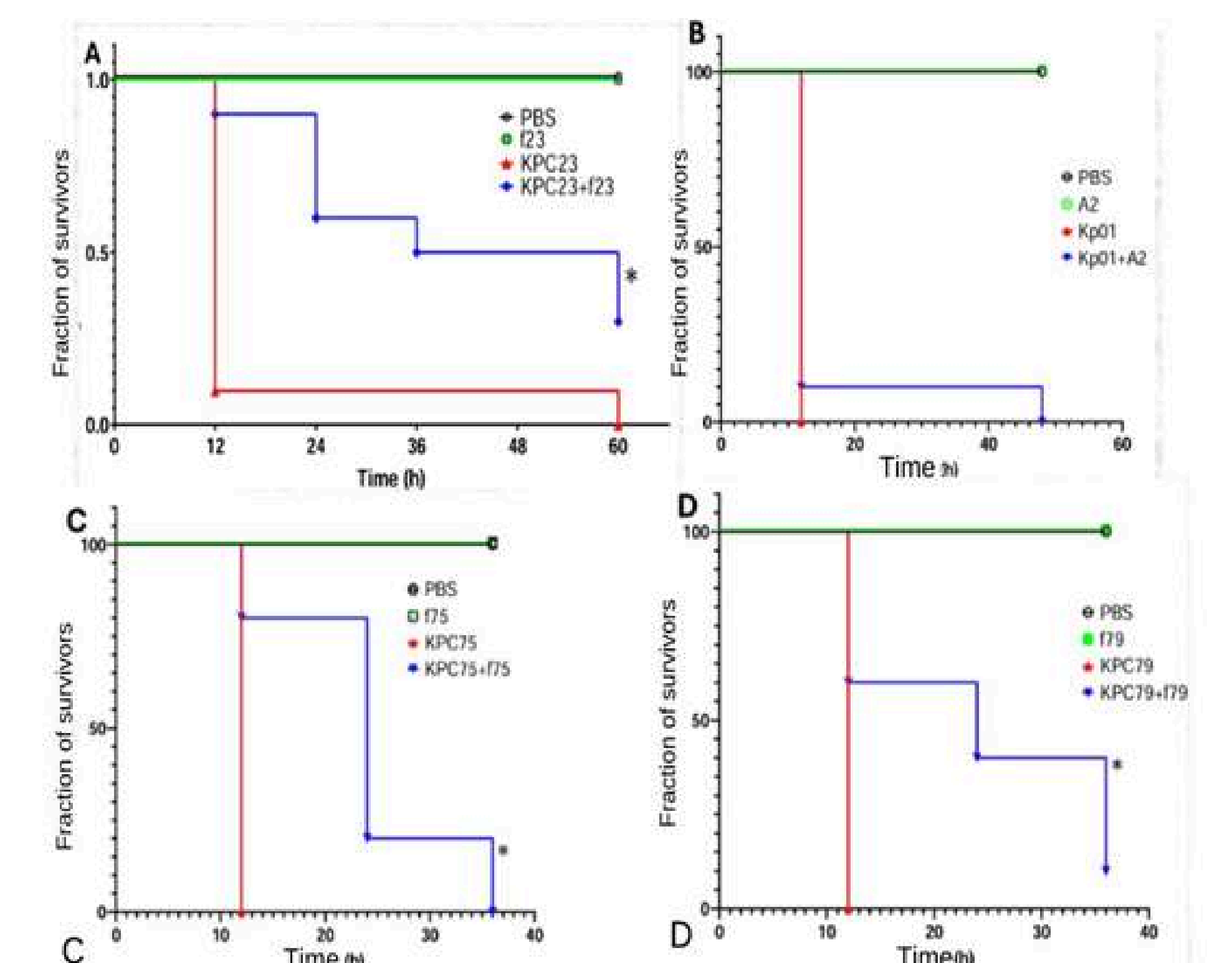
Isolado	Bacteriófagos				Mix
	A2	K23	K75	K79	
KP01	+	-	-	-	+
KPC	-	+	+	+	+
KP23	-	+	+	+	+
KP27	-	+	+	+	+
KP32	-	+	+	+	+
KP48	-	-	-	-	-
KP49	-	-	-	-	-
KP58	-	-	-	-	-
KP75	-	+	+	+	+
KP77	-	-	-	-	-
KP79	+	+	+	+	+
KP88	+	+	+	+	+
KSP39	-	+	+	+	+
KSP47	-	-	-	-	-
KSP48	-	-	-	-	-
KSP53	-	+	+	+	+
KSP73	-	+	+	+	+
KSP76	-	-	-	-	-
KSP80	-	-	+	+	+
KSP81	-	-	-	-	-
KSP99	-	+	+	+	+
KB107	-	+	+	+	+
KB120	-	+	+	+	+
KB134	-	-	+	+	+
KB142	-	+	+	+	+
KB169	-	+	+	+	+
KB171	-	+	+	+	+
KB172	-	+	+	+	+
KB177	-	+	+	+	+
KB212	-	+	+	+	+
KCL90	-	-	-	-	-
KCL103.2	-	-	-	-	-
KCL106	-	-	-	-	-
KCL107	-	+	+	+	+
KCL109.2	-	-	-	-	-
KCL110	-	+	+	+	+
KCL111	-	-	-	-	-
KCL113	-	-	-	-	-

(+): suscetível; (-): resistente.

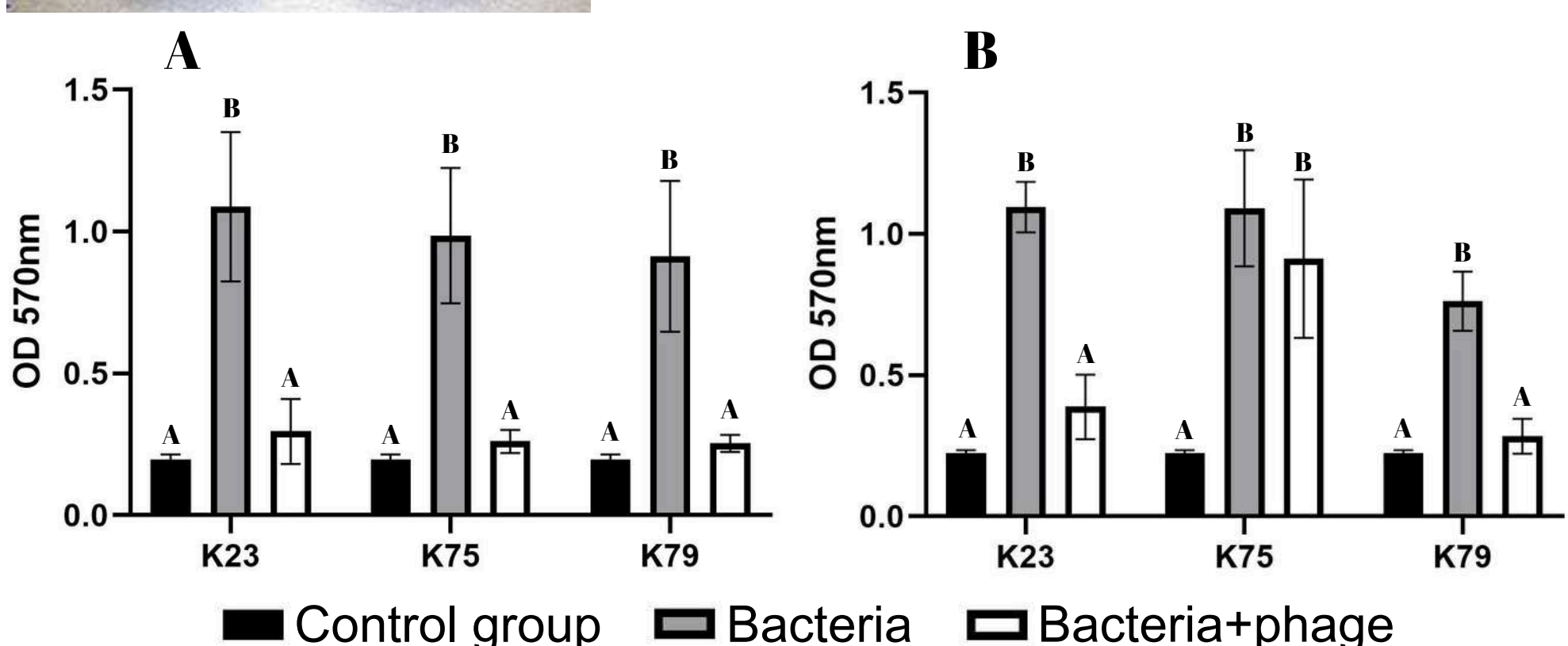
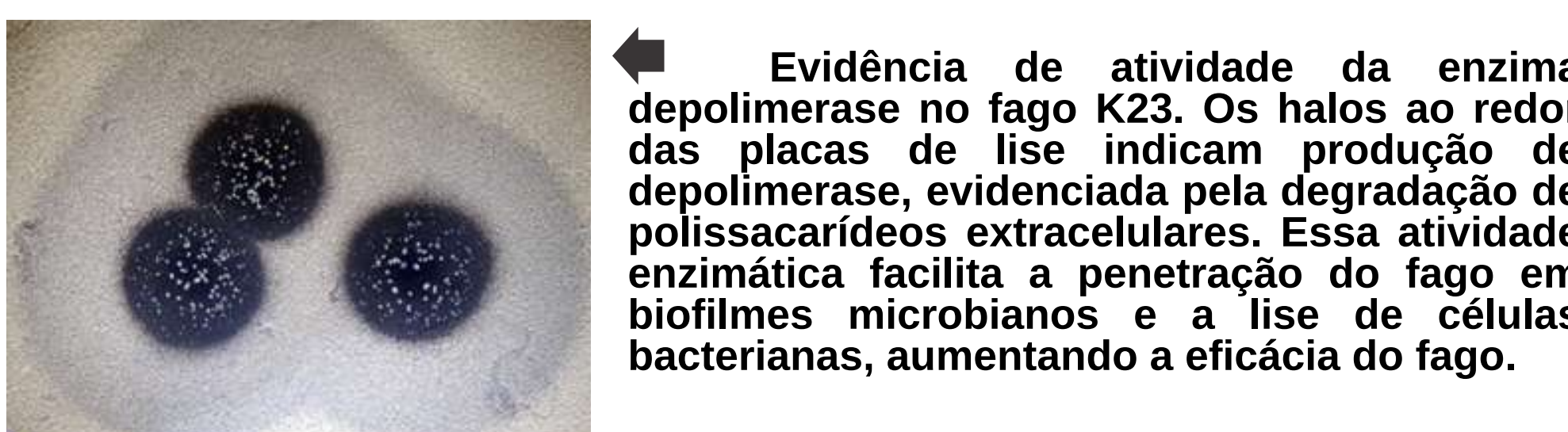
Perfil de suscetibilidade de 38 isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* testados contra os bacteriófagos A2, K23, K75 e K79. Cada isolado foi avaliado quanto à suscetibilidade (+) ou resistência (-) quando da infecção pelos bacteriófagos e pelos mixes de fagos obtidos a partir do ensaio de evolução *in vitro*. Os resultados mostram variabilidade no espectro de ação entre os fagos isolados, com o fago K23 exibindo a maior gama de hospedeiros.



Cinética de adsorção e período de eclipse de bacteriófagos contra *Klebsiella pneumoniae*. O fago A2 (A) apresentou adsorção mais lenta quando comparado aos fagos K23 (B), K75 (C) e K79 (D), correlacionando-se com a eficácia reduzida *in vivo*. O período de latência dos fagos K23, K75 e K79 foi de cerca de 10 a 20 minutos.



Taxa de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Klebsiella pneumoniae* e tratadas com bacteriófagos. Larvas infectadas e tratadas com os fagos K23 (A), K75 (C) e K79 (D) mostraram taxas de sobrevivência significativamente maiores do que o grupo infectado não tratado. Larvas tratadas com fago A2 (B) não exibiram sobrevida significativa.



Evidência de atividade da enzima depolimerase no fago K23. Os halos ao redor das placas de lise indicam produção de depolimerase, evidenciada pela degradação de polissacarídeos extracelulares. Essa atividade enzimática facilita a penetração do fago em biofilmes microbianos e a lise de células bacterianas, aumentando a eficácia do fago.

Efeito dos bacteriófagos na formação de biofilmes (A) e em biofilmes maduros (B) de *Klebsiella pneumoniae*. Os fagos K23, K75 e K79 inibiram significativamente a formação de biofilme durante os estágios iniciais em comparação ao grupo de bactérias não tratadas (A). Além disso, os fagos K23 e K79 apresentaram atividade significativa contra biofilmes maduros (B). Letras diferentes (A, B) indicam diferenças estatisticamente significativas.

## REFERÊNCIAS

DRUG-RESISTANT INFECTIONS: A Threat to Our Economic future (March 2017); GLOBAL BURDEN OF BACTERIAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN 2019: A SYSTEMATIC ANALYSIS. The lancet.; NO TIME TO WAIT: securing the future from drug-resistant infections. Report to the Secretary-General of the United Nations. 29 de abr. de 2019.; PHAGE THERAPY IN THE ERA OF MULTIDRUG RESISTANCE IN BACTERIA: A Systematic Review. International Journal of Molecular Science.; WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024.; TRANSLATING BACTERIOPHAGE-DERIVED DEPOLYMERASES INTO ANTIBACTERIAL THERAPEUTICS: CHALLENGES AND PROSPECTS. Acta Pharmaceutica Sinica B.

## AGRADECIMENTOS

Hugo Costa Paes (UnB); Ildinete Silva Pereira (UnB); Ana Cristina Galles (UNIFESP)

