

UNIVERSIDADE FEEVALE
Mestrado Acadêmico em Virologia

NICOLE MARIELE SANTOS RÖHNELT

**ISOLAMENTO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS AMBIENTAIS E SUA
ATIVIDADE CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES DE IMPORTÂNCIA
CLÍNICA**

Novo Hamburgo
Fevereiro de 2020

UNIVERSIDADE FEEVALE
Mestrado Acadêmico em Virologia

NICOLE MARIELE SANTOS RÖHNELT

**ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS AMBIENTAIS E SUA
ATIVIDADE CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES DE IMPORTÂNCIA
CLÍNICA**

Dissertação apresentada ao
Mestrado Acadêmico em Virologia
como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Virologia.

Orientador: Prof. Dr. Simone Ulrich Picoli

Novo Hamburgo
Fevereiro de 2020

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Röhnelt, Nicole Mariele Santos.

Isolamento de bacteriófagos líticos ambientais e sua atividade contra bactérias multirresistentes de importância clínica / Nicole Mariele Santos Röhnelt. – 2020.

65 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Virologia) – Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2020.

Inclui bibliografia e anexos.

“Orientador: Prof. Dr. Simone Ulrich Picoli”.

1. Fagos. 2. Sequenciamento. 3. Resistência antimicrobiana.
I. Título.

CDU 578

Bibliotecária responsável: Janice Moser Corrêa – CRB 10/2315

UNIVERSIDADE FEEVALE
Mestrado Acadêmico em Virologia

NICOLE MARIELE SANTOS RÖHNELT

**ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS AMBIENTAIS E SUA
ATIVIDADE CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES DE IMPORTÂNCIA
CLÍNICA**

Dissertação de Mestrado aprovada pela banca examinadora em 27 de fevereiro de 2020, conferindo ao autor o título de Mestre em Virologia.

Componentes da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Simone Ulrich Picoli
Universidade Feevale

Prof. Dr. Laura Beatriz Rodrigues
Universidade de Passo Fundo (UPF)

Prof. Dr. Larissa Heinzemann
Universidade Feevale

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	6
1.1.1 INFECÇÕES E RESISTÊNCIA BACTERIANA	6
1.1.2 BACTERÍOFAGOS	8
1.1.3 FAGOTERAPIA	15
1.1.4 ISOLAMENTO DE FAGOS EM MATRIZES AMBIENTAIS.....	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 COLETA E CONCENTRAÇÃO VIRAL EM AMOSTRAS DE ÁGUA	22
4.2 LINHAGENS DE BACTÉRIAS.....	23
4.3 PESQUISA DE PRÓFAGOS	24
4.4 ENSAIO DE PLACA - INDUÇÃO DE INFECÇÃO POR BACTERÍOFAGOS.....	24
4.5 ISOLAMENTO DA PLACA DE LISE E PURIFICAÇÃO.....	25
4.6 TESTE DE SUSCETIBILIDADE.....	26
4.7 AMPLIFICAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS E ARMAZENAMENTO.....	27
4.8 TITULAÇÃO APROXIMADA E EXATA.....	27
4.9 ANÁLISE GENÔMICA.....	28
5 RESULTADOS	30
5.1 LINHAGENS DE BACTÉRIAS.....	30
5.2 PESQUISA DE PRÓFAGOS	30
5.3 ENSAIO DE PLACA	30

5.4 ISOLAMENTO DA PLACA DE LISE E PURIFICAÇÃO	31
5.5 ANÁLISE DE MORFOLOGIA DAS PLACAS DE LISE	31
5.6 TESTE DE SUSCETIBILIDADE.....	33
5.7 AMPLIFICAÇÃO E TITULAÇÃO	37
5.8 ANÁLISE GENÔMICA.....	38
5.8.1 FAGO DE <i>E. coli</i> ESBL (FEC.ESBL.P1).....	38
5.8.2 FAGO DE <i>K. pneumoniae</i> KPC (FKP.KPC.P1.1).....	39
5.8.3 FAGO DE <i>K. pneumoniae</i> ESBL (FKP.ESBL.P2).....	40
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO	54
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
9 ANEXOS	60

RESUMO

O controle de doenças infecciosas envolvendo bactérias resistentes aos antibióticos são um desafio constante e crescente, sendo necessários métodos alternativos para controlar esses microrganismos. Neste contexto, um método antigo e promissor, é o uso dos bacteriófagos, vírus que infectam e lisam procariotos. O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar bacteriófagos líticos, avaliando sua atividade sobre bactérias de importância clínica, bem como frente àquelas que apresentam resistência aos antibióticos. Para isso, foi realizada coleta de amostra de água superficial, a partir da qual buscou-se o isolamento de fagos através do ensaio de placa de lise. Subsequentemente, foi realizada a análise da suscetibilidade dos fagos encontrados contra novos isolados bacterianos. Por fim, foi realizado o sequenciamento dos fagos ativos sobre as bactérias resistentes, com o intuito de verificar se eles já foram previamente descritos ou se são bacteriófagos inéditos; além disso, confirmou-se a capacidade lítica dos fagos. A partir da amostra coletada foi possível isolar bacteriófagos para as seguintes bactérias hospedeiras: *Escherichia coli* ATCC 13706, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ESBL, *Klebsiella pneumoniae* KPC e *K. pneumoniae* ESBL. As placas de lise demonstraram morfologias variadas entre as bactérias utilizadas. O teste de suscetibilidade revelou que os fagos encontrados nas bactérias hospedeiras se diferem, além de mostrar que bacteriófagos de bactérias resistentes podem infectar outros isolados com o mesmo mecanismo de resistência. Os resultados deste estudo poderão fomentar a aplicabilidade dos fagos no controle de bactérias resistentes aos antibióticos.

Palavras chaves: fagos; sequenciamento; resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

The control of infectious diseases involving bacteria resistant to antibiotics is a constant and growing challenge, requiring alternative methods to combat these microorganisms. In this context, an old but promising alternative is the use of bacteriophages, viruses that infect and lyse prokaryotes. The objective of this study was to isolate and identify lytic bacteriophages, evaluating their activity on bacteria of clinical importance, as well as against those that show resistance to antibiotics. For this, a surface water sample was collected, from which phage isolation was sought through the lysis plate assay. Subsequently, an analysis was made of the susceptibility of the phages found against new bacterial isolates. Finally, the last step consisted of genetic analysis by sequencing the active phages on resistant bacteria, in order to verify whether they have been previously described or whether they are new bacteriophages; in addition, the lytic capacity of the phages was confirmed. From the collected sample, it was possible to isolate bacteriophages for the following host bacteria: *Escherichia coli* ATCC 13706, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ESBL, *Klebsiella pneumoniae* KPC and *K. pneumoniae* ESBL. The lysis plates showed varied morphologies among the bacteria used. The susceptibility test revealed that the phages found in the host bacteria differ, in addition showed that bacteriophages from resistant bacteria can infect other isolates with the same resistance mechanism. Through sequencing it was possible to determine important viral characteristics, such as proteins associated with the type of cycle carried out by the virus. The results of this study may promote the applicability of phages in the control of bacteria resistant to antibiotics.

Key words: phages; sequencing; antimicrobial resistance.

1 INTRODUÇÃO

O atual panorama relacionado às bactérias resistentes aos antibióticos vêm causando grandes preocupações e, conseqüentemente, novas alternativas para o controle desses microrganismos são necessárias (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; ORLOVA, 2012; SULAKVELIDZE; MORRIS, 2001; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). A gravidade inerente a esses microrganismos é alarmante, levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a criar uma lista de bactérias que devem ser priorizadas na busca por novas terapias (WHO, 2019).

Atualmente, é estimado que ocorra cerca de 700.000 mortes por ano devido à resistência aos antibióticos e especialistas preveem que em 2050 esse número pode subir para 10 milhões por ano (IACG, 2019).

Historicamente, os primeiros antibióticos surgiram no século XX, sendo a penicilina, em 1928, uma das primeiras e mais importantes substâncias descobertas. Os antibióticos permitiram um grande avanço na medicina, a partir do tratamento de infecções simples, assim como de doenças consideradas de alto risco como a tuberculose.

Porém, após anos de uso indiscriminado as bactérias evoluíram e apresentaram mecanismos de resistência a esses fármacos (NICOLAOU; RIGOL, 2018; O'NEILL, 2014; ORLOVA, 2012). Além do impasse causado pelas bactérias multirresistentes, outra problemática está relacionada ao desenvolvimento de novos antibióticos, que é um processo custoso e prolongado, cuja frequência vem decaindo com o passar dos anos (NICOLAOU; RIGOL, 2018).

O principal mecanismo de resistência aos antibióticos tem sido a produção de enzimas beta-lactamases. Essas inativam a estrutura funcional dos fármacos beta-lactâmicos tornando-os ineficazes. Tais enzimas são mais comuns em bacilos Gram negativos, como as enterobactérias, e podem conferir resistência a esses antimicrobianos em diferentes graus. A beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) confere resistência às penicilinas, penicilinas associadas a inibidores enzimáticos, cefalosporinas e monobactams. Adicionalmente, a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é uma enzima carbapenemase capaz de hidrolisar os carbapenêmicos, além de inativar os mesmos antibióticos que a ESBL (PAPP-WALLACE et al., 2010; PEREZ et al., 2008).

Como alternativa a essa problemática vem sendo proposta a fagoterapia. Fundamentalmente, ela consiste no uso dos bacteriófagos, vírus capazes de infectar procariotos,

para eliminação das bactérias infecciosas. Estes já foram utilizados logo após a sua descoberta, em 1917 por D'Hérelle (ACKERMANN, 2003; BRÜSSOW, 2013; O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; ORLOVA, 2012), entretanto, uma década após o uso dos fagos, os antibióticos foram desenvolvidos. Com isso, a antibioticoterapia se tornou o método mais comum e efetivo contra as infecções bacterianas, fazendo com que a fagoterapia e seus estudos fossem desconsiderados (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; ORLOVA, 2012).

Por outro lado, o agravamento relacionado às resistências fez com que a fagoterapia voltasse a ser estudada. Esta terapia poderá se constituir em um método alternativo no combate às bactérias patogênicas, tendo em vista o crescente avanço dos mecanismos de resistência associado à dificuldade na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; O'SULLIVAN et al., 2016).

Conceitualmente, os bacteriófagos, também chamados de fagos, são vírus que infectam bactérias. Eles são hospedeiros específicos, ou seja, cada bacteriófago apenas será capaz de infectar bactérias que tenham receptores próprios para a sua adsorção. A inexistência de tal receptor torna o fago incapaz de se ligar a célula alvo e liberar o seu material genético (DOWAH; CLOKIE, 2018; SILVA; STORMS; SAUVAGEAU, 2016). A principal ordem dos fagos é a *Caudovirales*, que apresenta cinco famílias: *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Herelleviridae* e *Ackermannviridae*, as quais são caracterizadas por apresentarem genoma de DNA fita dupla (ICTV, 2020).

Os bacteriófagos apresentam dois ciclos de replicação principais, designados ciclo lisogênico e lítico. O primeiro é caracterizado por fagos que são capazes de infectar e integrar seu DNA ao da bactéria, formando assim um prófago. Subsequentemente, são produzidas proteínas que induzem a latência, implicando em uma pausa na transcrição de produtos gênicos, permitindo a existência do prófago junto à bactéria. Se a célula hospedeira sofrer algum estresse (radiação ultravioleta, uso de antimicrobianos, entre outros) o fago é capaz de alterar seu ciclo, de lisogênico para lítico (MIRZAEI; MAURICE, 2017; ORLOVA, 2012).

O ciclo lítico é definido pela não integração do DNA do fago ao DNA do procarioto durante o processo de replicação viral. No final desse ciclo, quando os novos vírions já estão formados e prontos para serem liberados, o fago produz enzimas capazes de lisar a bactéria, caracterizando sua definição como fago lítico. Portanto, esse fago é o mais indicado para a utilização na fagoterapia, precisamente por ocasionar a lise celular no final do seu ciclo (ORLOVA, 2012).

Para a utilização dos fagos de modo terapêutico são necessárias pesquisas que mostrem que eles constituem um método seguro e eficaz. Neste contexto, entre as investigações a serem consideradas, é relevante confirmar a capacidade do fago ligar-se à bactéria de interesse promovendo o ciclo lítico. Adicionalmente, deve ser realizado o sequenciamento para garantir que o fago não codifique proteínas como a integrase, uma vez que essa enzima é mediadora da recombinação entre o DNA do fago e do hospedeiro, caracterizando o ciclo lisogênico, genes de virulência e ligados a resistência (GROTH; CALOS, 2004; KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005).

Dessa maneira, o presente projeto buscou isolar bacteriófagos presentes no meio ambiente, analisando sua capacidade em lisar bactérias patogênicas e multirresistentes de importância clínica. Junto disso, foi analisado genomicamente o fago lítico das bactérias resistentes. Essa investigação poderá demonstrar se esses vírus podem ser promissores candidatos para o controle de bactérias patogênicas.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 INFECÇÕES E RESISTÊNCIA BACTERIANA

A emergência originada por doenças infecciosas causadas por bactérias resistentes vem causando diversos desafios direcionados ao controle dessas enfermidades, sendo consideradas um grande problema da saúde pública atual. Com o surgimento dos antibióticos no século XX, as infecções por esses patógenos chegaram a ser consideradas de fácil controle. Contudo, com o uso incontido dos antimicrobianos, após poucos anos de seu emprego, as bactérias se adaptaram, passando a apresentar mecanismos de resistência que invalidam a função dos fármacos (NICOLAOU; RIGOL, 2018; O'NEILL, 2014; ORLOVA, 2012).

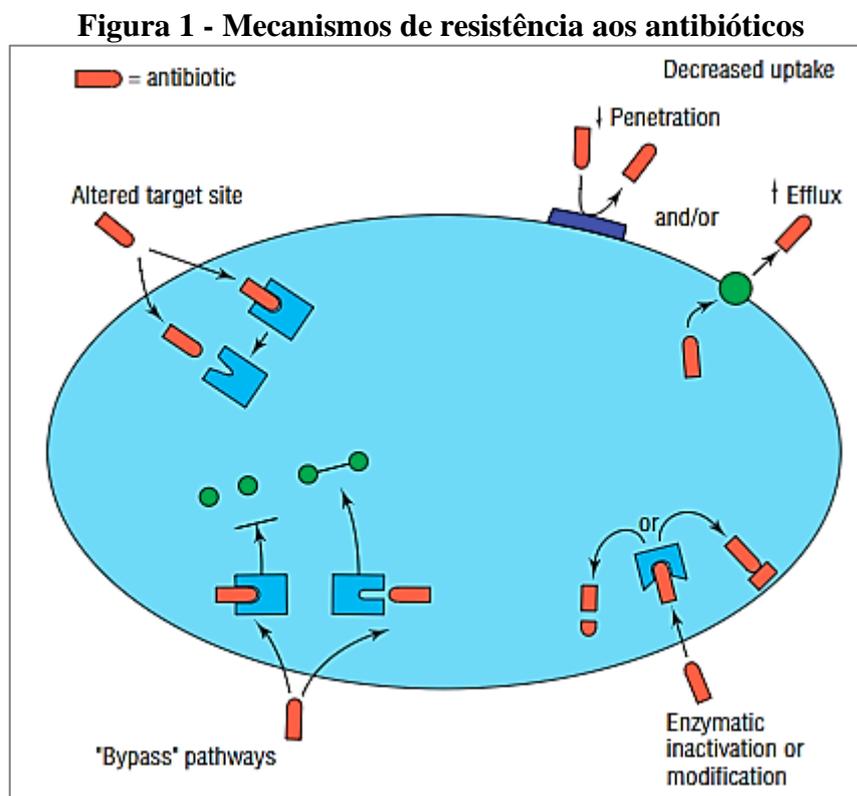
A era da antibioticoterapia começou com a descoberta dos primeiros elementos, aproximadamente em 1930. A primeira substância descrita foi a penicilina, em 1928, por Alexander Fleming. Ele observou o comportamento de colônias bacterianas contaminadas pelo fungo *Penicillium notatum* e concluiu que tal possuía uma substância capaz de eliminar as bactérias (NICOLAOU; RIGOL, 2018). Ultimamente, praticamente todos os antimicrobianos em uso são derivados ou componentes dos mesmos que foram descobertos no início da era antimicrobiana (LEWIS, 2013).

Os antibióticos inibem o crescimento de organismos suscetíveis, além de selecionar os resistentes que, por sua vez, serão determinantes na aquisição da resistência genética, podendo transferir esses genes para diversas outras bactérias através elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, transpósons e bacteriófagos (FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017; LEVY; MARSHALL, 2004). Esses genes são específicos para uma classe de antibióticos, entretanto, eles podem se acumular nas cepas, fazendo com que as mesmas se tornem bactérias multirresistentes (MDR) (LEVY; MARSHALL, 2004).

Os isolados bacterianos resistentes começaram a surgir entre 1930 e 1940 no âmbito hospitalar, onde a maioria dos antibióticos eram utilizados. Os agentes multirresistentes, no entanto, apareceram posteriormente, entre 1950 e 1960. A principal origem da resistência é atribuída ao uso exacerbado e indiscriminado de antibióticos, principalmente em países desenvolvidos onde tais medicamentos estavam facilmente disponíveis (LEVY; MARSHALL, 2004). Além disso, o uso de antimicrobianos em formas terapêuticas não humanas, como as doses subclínicas empregadas em alimentos pecuários e avícolas, também são considerados

responsáveis pelo decaimento da eficácia e aumento da resistência (JASSIM; LIMOGES, 2014).

Os mecanismos pelos quais as bactérias se tornam resistentes podem ser classificadas em quatro tipos, sendo eles: *i*) inativação do antibiótico, habitualmente associado à ação enzimática mediada por beta-lactamases; *ii*) bombas de efluxo, que expõem o fármaco para o meio extracelular; *iii*) alteração no sítio de ação, fazendo com que o fármaco não consiga se ligar ao alvo na bactéria; *iv*) produção de um alvo alternativo para o antibiótico, que não será afetado pela ligação (Figura 1) (HAWKEY, 1998; LOUREIRO et al., 2016).



Fonte: (HAWKEY, 1998).

O panorama das opções terapêuticas reflete uma quantidade limitada de fármacos contra as bactérias MDR. Entre as principais resistências enfrentadas atualmente estão *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), cepas multirresistentes de tuberculose, *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), *E. coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenens (VOUGA; GREUB, 2016).

A produção de enzimas beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, estando presentes essencialmente em bacilos Gram-negativos. Essas enzimas hidrolisam a estrutura funcional dos fármacos beta-lactâmicos tornando-os

ineficazes, podendo conferir resistência a esses antimicrobianos em diferentes graus. A ESBL atribui resistência às penicilinas, penicilinas associadas a inibidores enzimáticos, cefalosporinas e monobactams, já a KPC é uma carbapenemase capaz de hidrolisar os carbapenêmicos, somado aos mesmos antibióticos inibidos pelas ESBL (PEREZ et al., 2008).

E. coli e *K. pneumoniae* são bactérias Gram negativas ubíquas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. *E. coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa presente na microbiota intestinal. Assim, infecções causadas por ela estão relacionadas com linhagens mais patogênicas, hospedeiros debilitados e imunossupressos ou, ainda, quando a barreira gastrointestinal é violada. Entre as doenças mais comuns produzidas por *E. coli* estão: gastroenterites, infecção do trato urinário, sepse, meningite e doenças no sistema nervoso central (CROXEN; FINLAY, 2010). A *K. pneumoniae* também é um patógeno comum humano envolvido em infecções adquiridas na comunidade, bem como está associado às hospitalizações e aos pacientes imunocomprometidos, causando doenças nosocomiais tais como septicemia, pneumonia e infecção do trato urinário (MARTIN; BACHMAN, 2018).

E. coli e *K. pneumoniae* com resistência ESBL continuam sendo uma ameaça aos esforços clínicos desde sua primeira descrição, a mais de 20 anos atrás. Para o tratamento das infecções causadas por isolados produtores de ESBL, os carbapenens surgiram como a “melhor terapia”. Contudo, com o advento das carbapenemases, como a KPC, este cenário vem gerando grandes preocupações (PEREZ et al., 2008). Além disso, *K. pneumoniae* com resistência ESBL têm aumentada associação com infecções nosocomiais (KĘSIK-SZELOCH et al., 2013).

Mesmo com o agravamento das resistências, as indústrias farmacêuticas têm investido cada vez menos na descoberta de novos antibióticos. Entre as causas dessa situação estão o baixo retorno nos investimentos realizados e o prolongado tempo necessário para o desenvolvimento de um novo antibiótico, tempo habitualmente superior ao das adaptações bacterianas (O’FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; ORLOVA, 2012). Assim, são necessárias pesquisas de métodos alternativos capazes de contribuir no controle e combate das infecções causadas por esses organismos (JASSIM; LIMOGES, 2014).

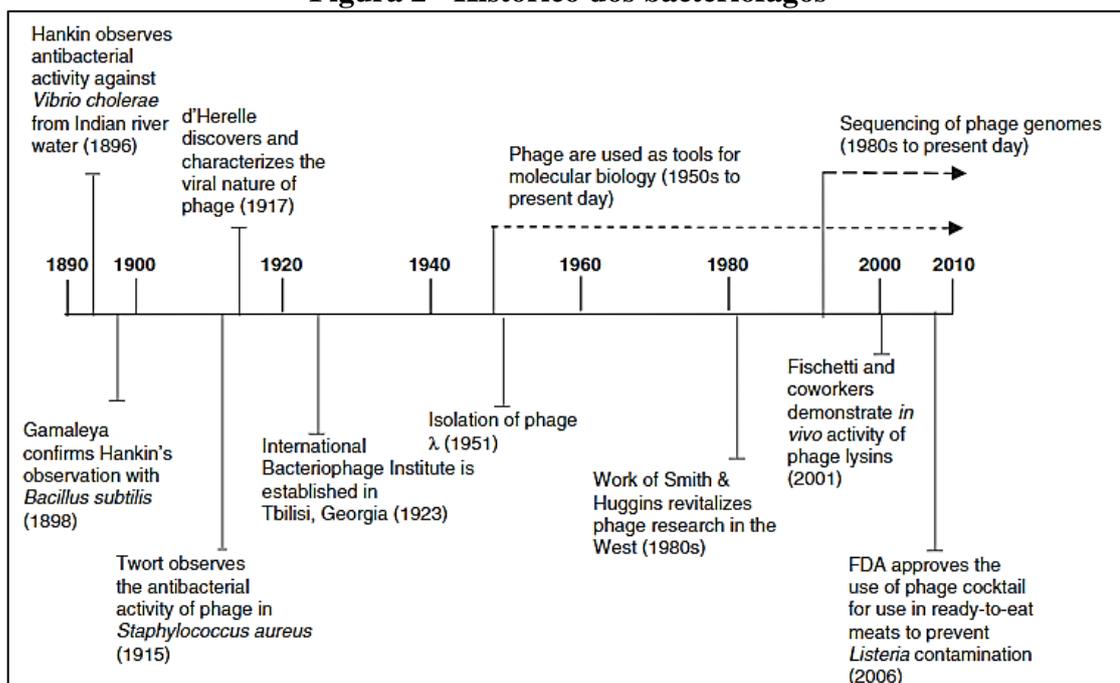
1.1.2 BACTERIÓFAGOS

Bacteriófagos, também chamados de fagos, são vírus que infectam procariotos, sendo considerados as entidades biológicas mais abundantes da Terra. Estima-se a existência de 10^{32}

bacteriófagos no planeta, estando presente em todos os meios onde existir o hospedeiro (FURFARO; CHANG; PAYNE, 2018; KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

A descoberta dos fagos foi atribuída a Felix d'Herelle, em 1917, que trabalhava no Instituto Pasteur, em Paris. O achado se deu pela observação de filtrados de esgoto, onde ele identificou um agente capaz de eliminar as bactérias de uma cultura de desintéria (*Shigella*), atribuindo ao final, a natureza viral desse agente. A atividade do fago também foi anteriormente descrita por Hankin, em 1896, que detectou propriedades contra a bactéria da cólera, constatando a habilidade de passar por filtros; contudo, essa descoberta não foi remetida a um agente viral. Outro bacteriologista que participou independentemente da descoberta foi Twort, em 1915, que encontrou um agente capaz de lisar bactérias em culturas. Seu trabalho foi publicado, porém as pesquisas não foram continuadas devido ao começo da Primeira Guerra Mundial (ACKERMANN, 2003; BRÜSSOW, 2013; O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; ORLOVA, 2012). Um avanço importante na área foi a criação do Instituto George Eliava de Bacteriófagos, Microbiologia e Virologia, aberto em 1923 em Tbilisi, Georgia, onde foram realizadas diversas pesquisas com fagos (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; ORLOVA, 2012). Um breve histórico dos fagos, desde sua descoberta até sua utilização em alimentos, é demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Histórico dos bacteriófagos



Fonte: (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009).

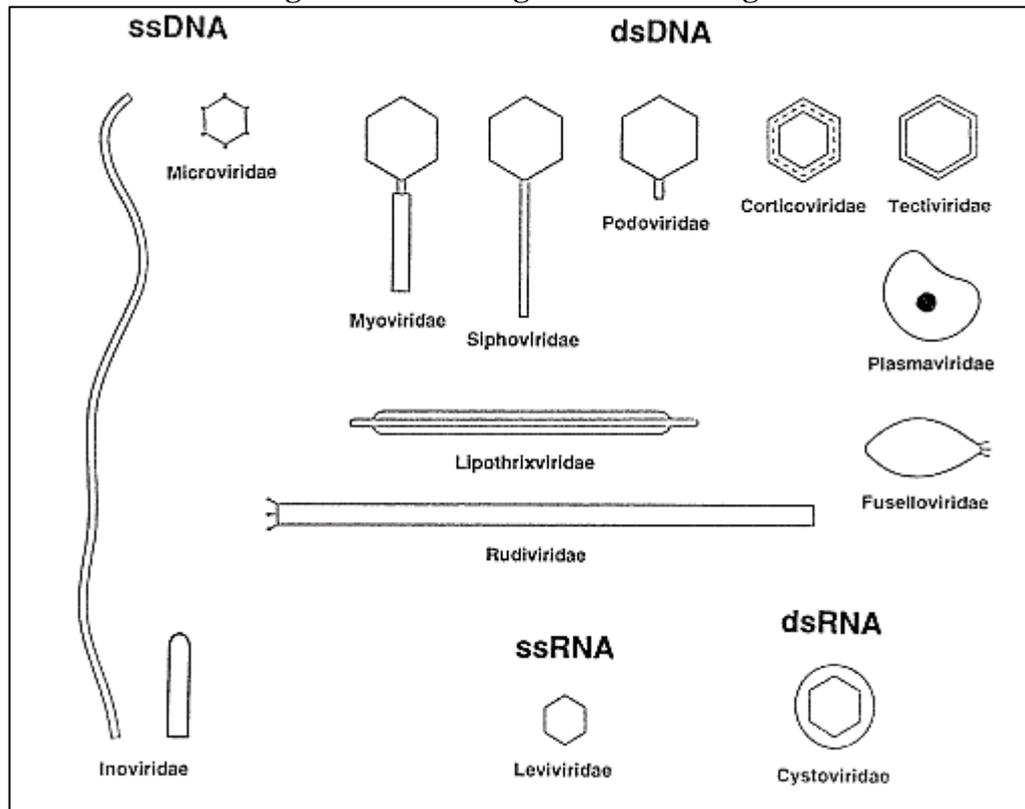
A partir de sua descoberta, os fagos vêm sendo propostos para diversos fins, entre eles: a fagoterapia (tratamento de infecções bacterianas em animais e humanos), ferramenta de diagnóstica, sistema de entrega de medicamentos, agentes de controle biológico contra a formação de biofilmes e aplicação em alimentos. Este último emprego foi validado nos EUA após diversos estudos, sendo aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) do país e os seus principais objetivos são a prevenção de contaminação bacteriana em pecuária e alimentos (BRÜSSOW, 2013; O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; O'SULLIVAN et al., 2016).

Características dos bacteriófagos

Conceitualmente, os bacteriófagos possuem hospedeiros específicos, ou seja, apenas infectam bactérias que possuem receptores próprios para a ligação das proteínas virais fágicas. A inexistência de tal receptor torna o fago incapaz de se ligar a bactéria alvo e liberar o seu material genético na célula (DOWAH; CLOKIE, 2018; SILVA; STORMS; SAUVAGEAU, 2016).

A principal ordem dos bacteriófagos é *Caudovirales*, que apresenta cinco famílias: *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Herelleviridae* e *Ackermannviridae*, as quais são caracterizadas por apresentarem genoma de DNA fita dupla (ICTV, 2020). Os fagos são classificados de acordo com seu hospedeiro, características morfológicas, tipo de ciclo viral, genoma, local onde habitam e estruturas (como cauda e envelope) (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). *Caudovirales* possuem forma icosaédrica e são diferenciados morfolologicamente pelo tipo de cauda que apresentam, podendo ser longa e flexível, longa e retrátil ou curta. Essa cauda é responsável por transmitir sinais para o fago, assim como pela adsorção e injeção do material genético na célula hospedeira (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; ORLOVA, 2012). Além do formato icosaédrico, os fagos podem apresentar formato filamentosos, poliédrico ou pleomórfico, além de conter envelope viral (ACKERMANN, 2003; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014) (Figura 3).

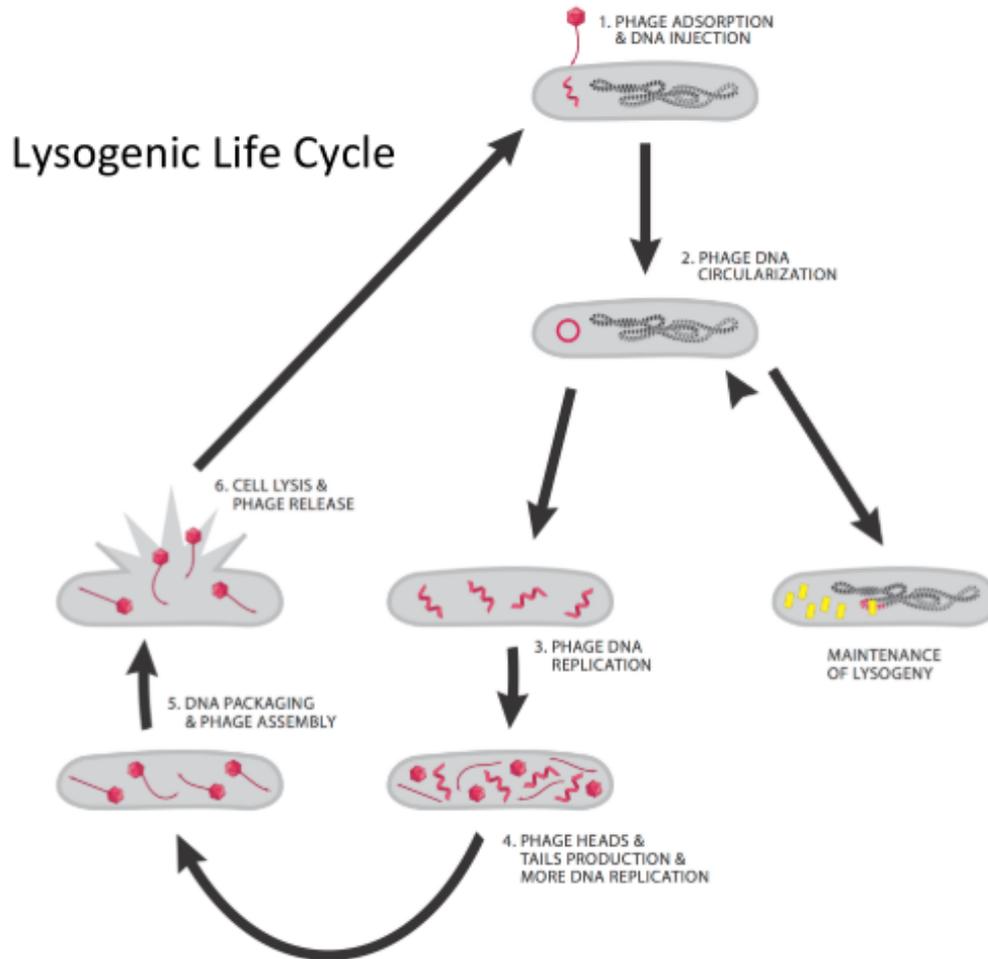
Figura 3 - Morfologia de bacteriófagos



Fonte: (ACKERMANN, 2003).

A replicação viral ocorre, essencialmente, em duas formas principais, ciclo lisogênico e ciclo lítico (Figura 4), além de formas não tradicionais como a pseudolisogenia e a infecção crônica (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). Independentemente do tipo de ciclo, o primeiro passo para a infecção do hospedeiro é a adsorção viral, onde ocorre a ligação à superfície da bactéria, através de proteínas localizadas nas fibras da cauda que se unem aos receptores específicos presentes na camada externa da bactéria (SILVA; STORMS; SAUVAGEAU, 2016). Após a ligação irreversível aos receptores, começa o processo de injeção do material genético, onde por fim, o fago induz a formação de um poro na membrana celular com ajuda de enzimas, através do qual o material genético é introduzido. Esse processo ocorre de formas distintas de acordo com o tipo de cauda presente no fago (ORLOVA, 2012; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

Figura 4 - Os principais ciclos de replicação viral



Dois ciclos de replicação. 1) Ligação a bactéria e injeção do DNA; 2) Fago entra no ciclo lítico ou lisogênico; 3 e 4) Replicação do fago e síntese de proteínas; 5) Montagem de novos viriões; 6) Lise celular e liberação de viriões;

Fonte: (POXLEITNER et al., 2017).

Logo após o material genético ser injetado, o ciclo de replicação se inicia. No caso do ciclo lisogênico (fagos temperados), o DNA viral se integra ao DNA bacteriano ou, em alguns casos, se mantém na forma de plasmídeo. A partir desse momento, o fago apresenta a forma latente, sendo sintetizadas apenas proteínas de repressão, que inibem a transcrição de outros genes, além de proteínas ligadas a imunidade da bactéria às novas infecções (MIRZAEI; MAURICE, 2017). Quando o DNA do fago está incluso no DNA da bactéria ele é chamado de prófago e pode ser transmitido por diversas gerações de bactérias sem maiores consequências (ORLOVA, 2012). Os fagos que utilizam esse tipo de ciclo são caracterizados por possuírem genes que codificam a proteína integrase (INT), enzima mediadora da recombinação entre o DNA do fago e o do hospedeiro (GROTH; CALOS, 2004).

A exposição a algum tipo de estresse pode acarretar a alteração do tipo de ciclo realizado, ou seja, o fago lisogênico passa para o ciclo lítico. Entre as ações que alteram o ciclo

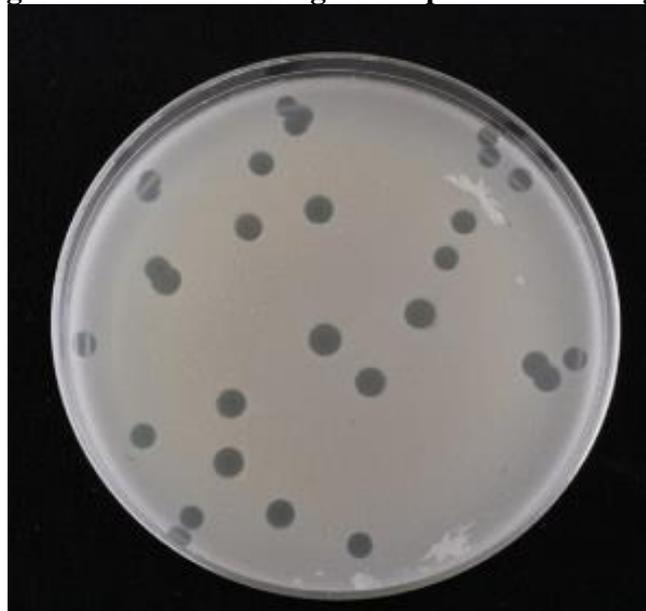
estão as mudanças no ambiente, como a falta de nutrientes, exposição aos raios ultravioleta, uso de antibióticos e de outros agentes químicos (MIRZAEI; MAURICE, 2017).

Por outro lado, no ciclo lítico, após a introdução do material genético na bactéria, a maquinaria celular do hospedeiro é direcionada para a produção dos componentes fágicos, como nucleotídeos e proteínas virais (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). Por fim, ocorre a montagem de novos virions e a produção de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular bacteriana, permitindo a liberação dos fagos no meio externo mediante a morte do hospedeiro (ORLOVA, 2012; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

Isolamento e detecção de bacteriófagos

A detecção dos bacteriófagos pode ser realizada pelo ensaio em placa, baseado na capacidade dos fagos matarem as bactérias pela lise celular, resultando na liberação de virions que, conseqüentemente, infectam novas células vizinhas. Resumidamente, é preparada uma mistura, em agar semi-sólido, de denso inóculo da bactéria hospedeira e da amostra onde se deseja isolar os fagos. Após, a mistura é depositada sobre uma camada de agar nutriente previamente solidificada em placa de petri e, após a solidificação dessa última camada, incubada em estufa a 35°C. Posteriormente, observa-se a formação de placas de lise, caracterizadas por zonas claras e/ou translúcidas arredondadas na camada de bactérias. Cada placa de lise é equivalente a capacidade de uma única partícula viral de lisar a bactéria (Figura 5) (ADAMS, 1959).

Figura 5 - Placas de lise geradas pelos bacteriófagos



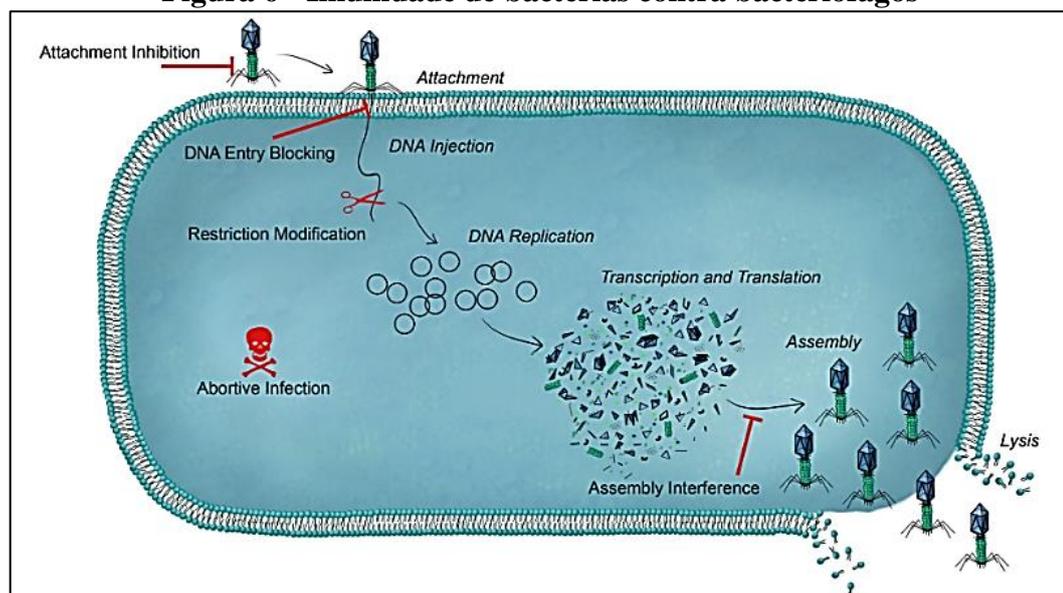
Fonte: (POXLEITNER et al., 2017).

Imunidade de bactérias contra bacteriófagos

Assim como todos os organismos, as bactérias possuem recursos protetivos contra infecções. Existe diversas formas pelas quais elas podem ser imunes às infecções causadas por bacteriófagos, podendo estar relacionada à imunidade inata ou adquirida. A imunidade inata está direcionada, principalmente, ao primeiro contato do fago com a parede celular, ou seja, no impedimento da adsorção viral. A não adsorção do fago pode ser consequência do bloqueio dos receptores utilizados por esses vírus, produção de camada extracelular que envolve a bactéria (cápsula) ou produção de moléculas inibidoras capazes de se ligar aos receptores de forma competitiva (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; SEED, 2015).

Complementar a isso, outro mecanismo de defesa é o sistema de exclusão de superinfecção, onde proteínas bloqueiam a introdução do material genético do vírus nas células bacterianas. Essas proteínas são localizadas na membrana ou associadas a outros componentes da membrana, sendo que a maioria são encontradas em prófagos. Outro modo de impedir a infecção é a eliminação dos ácidos nucleicos do fago por um sistema de restrição-modificação, que protege a célula contra invasões de DNA. Esse sistema reconhece o DNA a partir de uma enzima de restrição que degrada ou metila o material genômico impedindo o ciclo do fago (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; SEED, 2015). Como última estratégia na imunidade inata, pode ocorrer a infecção abortiva, onde há indução da apoptose bacteriana; esse passo atua em momentos cruciais da multiplicação do fago, impedindo assim a liberação final de vírus viáveis (Figura 6) (ABEDON, 2012; LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; SEED, 2015).

Figura 6 - Imunidade de bactérias contra bacteriófagos



Fonte: (SEED, 2015).

A imunidade adquirida está relacionada ao sistema CRISPRs (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), onde pequenas sequências do fago são capturadas e usadas para produzir imunidade específica (ABEDON, 2012; LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010).

Mecanismos de evasão de bacteriófagos para infectar bactérias resistentes

Assim como as bactérias, os bacteriófagos também podem se adaptar, escapando das barreiras criadas pela célula, culminando na replicação dentro do hospedeiro. O conhecimento desses mecanismos é importante para o entendimento completo dos bacteriófagos, pois contribui para avaliação de sua utilidade.

Entre as ferramentas utilizadas pelos fagos para driblar a imunidade da bactéria está a habilidade de se adaptar aos novos receptores criados pelas bactérias, assim como reconhecer a camada extracelular criada pelas mesmas, tendo a capacidade de se ligar ou degradar até alcançar o receptor na célula (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010). Outro exemplo é o sistema de anti-restrição presente no fago T4 que contém uma base incomum, a hidroximetilcitosina (HMC), ou seja, o sistema de restrição-modificação não reconhece o DNA invasor, permitindo a progressão normal do vírus na célula (CALENDAR, 2006; LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010). Os diversos mecanismos de evasão da resposta imune das bactérias permitem que os fagos continuem se disseminando, evoluindo de maneira conjunta aos seus hospedeiros (MATSUZAKI et al., 2005).

1.1.3 FAGOTERAPIA

Com a emergência das infecções bacterianas associadas a microrganismos com mecanismos de resistência aos antibióticos, a fagoterapia voltou a ser estudada como uma alternativa, com foco, principalmente, na eliminação das bactérias MDR (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; ORLOVA, 2012; SULAKVELIDZE et al., 2001; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). Diferente dos antibióticos, os bacteriófagos possuem uma vantagem, já que os mesmos podem se adaptar aos novos mecanismos de resistência, evoluindo paralelamente ao seu hospedeiro (MATSUZAKI et al., 2005).

Afortunadamente, técnicas inovadoras de pesquisa tornaram possíveis diversos avanços na área da fagoterapia. O conhecimento do ciclo de replicação, da penetração dos fagos na membrana celular, assim como a habilidade do fago infectar apenas bactérias específicas, possibilitou o desenvolvimento de métodos para sua utilização (ORLOVA, 2012). Sendo assim, ficou constatado, por exemplo, que os bacteriófagos que realizam o ciclo lítico, principalmente os da ordem *Caudovirales*, seriam os mais indicados para o emprego na fagoterapia por induzirem, no final do seu ciclo, a lise bacteriana (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

Os fagos podem ser administrados por via oral, inalatória, injeção intravenosa, subcutânea, localmente, como o uso de suspensões em infecções oculares ou uso tópico, constantemente estudado em infecções bacterianas decorrentes de queimaduras (FURFARO; CHANG; PAYNE, 2018; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). Além do próprio fago ser usado como agente antimicrobiano, os seus produtos, tais como enzimas líticas sintetizadas, também são alvo de pesquisas (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009).

Embora os estudos dos fagos tenham continuado em alguns locais, como na Geórgia e na Polônia, o primeiro estudo de fase I em humanos, segundo a literatura inglesa, só foi publicado em 2009, onde a fagoterapia foi utilizada para o controle de úlceras venosas crônicas em pernas de pacientes acometidos (RHOADS et al., 2009).

Algumas revisões, como de Wittebole et al., (2014), trazem levantamentos sobre a experiência clínica com fagoterapia no tratamento de infecção bacteriana invasiva. Para testar essa nova alternativa à terapia antimicrobiana, as pesquisas foram realizadas em animais como ratos, coelhos e aves infectados com bactérias associadas a diferentes complicações (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). Sulakvelidze et al., (2001) trazem estudos clínicos realizados com fagos, onde os vírus foram utilizados para diferentes propósitos como controle de infecções pulmonares e pleurais, disenteria bacteriana, infecções de pele e mucosa nasal, infecções pós-operatórias de feridas em pacientes com câncer, doenças urológicas inflamatórias, alergias infecciosas (rinite, faringite, dermatite e conjuntivite), entre outros. Em sua revisão, notaram que os fagos se comportam de forma semelhante aos antibióticos, com atividade antibacteriana notável, podendo apresentar algumas vantagens sobre os fármacos utilizados no tratamento de certas infecções humanas (SULAKVELIDZE et al., 2001).

Recentemente, um coquetel com três fagos diferentes foi utilizado com sucesso no tratamento de uma paciente de 15 anos de idade com fibrose cística e infecção disseminada por *Mycobacterium abscessus* resistente aos antibióticos (DEDRICK et al., 2019).

Entre as vantagens da fagoterapia estão: *i*) a atividade contra todos os tipos de bactéria, inclusive patógenos MDR; *ii*) especificidade, evitando efeitos colaterais significantes em

células que não são alvo da terapia, contrastando com o uso de antibióticos onde toda a microbiota pode ser alterada; *iii*) alta distribuição corporal; *iv*) evita o crescimento de patógenos secundários; *v*) capacidade de penetrar em biofilme, degradando seus componentes; *vi*) menor custo relacionado a duração do tratamento em comparação com a terapia antimicrobiana; *vii*) alta eficácia, quando comparado aos antibióticos (AZEREDO; SUTHERLAND, 2008; JASSIM; LIMOGES, 2014; O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

Em contrapartida, existem limitações para o uso de fagos na terapia, entre eles: *i*) a criação de anticorpos pelo sistema imune, problema eminente em casos de infecções crônicas ou de repetição, ou seja, acarreta na eliminação do fago antes de alcançar a bactéria de interesse clínico; *ii*) dificuldade de mensurar a dose de aplicação, já que trata-se de um agente que pode se multiplicar ao encontrar seu hospedeiro; *iii*) elucidação da correta rota de administração e o tempo de tratamento; *iv*) diagnóstico preciso e rápido do microrganismo que está causando a enfermidade; *v*) possibilidade de transferência de genes entre os patógenos através dos fagos, podendo ser responsável por transpassar determinantes patogênicos e fatores de virulência, resultando em uma possível resistência da bactéria; *vi*) necessidade de elucidar quais substâncias podem ser liberadas pela lise das bactérias; *vii*) habilidade da bactéria criar resistência contra os bacteriófagos (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

Entre todas as limitações, a que causa elevada preocupação é a capacidade de alguns fagos (lisogênicos) induzirem o aumento da virulência de bactérias mediante a integração dos materiais genéticos, possibilitando a produção de algumas substâncias, como toxinas. Um exemplo é o que ocorre em alguns sorotipos de *E. coli* que expressam genes tóxicos capazes de induzirem diarreias hemorrágicas graves na presença de fagos lisogênicos (CROXEN; FINLAY, 2010). Sendo assim, se faz necessária a análise genética dos fagos com o intuito de assegurar a natureza lítica dos mesmos, bem como a inexistência de genes tóxicos ou genes capazes de induzir a latência (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009).

Ainda neste contexto, alguns avanços já estão em andamento. Entre eles, o emprego de novos recursos diagnósticos, permitindo a rápida diferenciação da bactéria que está causando a enfermidade, além do uso de coquetéis com diferentes fagos para a mesma bactéria, aumentando ainda mais a especificidade e evitando a manifestação de resistência (SULAKVELIDZE et al., 2001; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). Adicionalmente, outros progressos vêm sendo demonstrados, como o isolamento de novos bacteriófagos do ambiente, uma vez que bactérias resistentes a alguns fagos continuam susceptíveis a outros,

assim como isolamento progressivo de fagos adaptados que podem elucidar a adversidade provocada pela resistência dos patógenos (SULAKVELIDZE et al., 2001; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

Sendo assim, o uso dos bacteriófagos como uma “droga viva” vem se mostrando uma boa alternativa, renovando as perspectivas para o controle das cepas bacterianas multirresistentes. Contudo, a fagoterapia deve ser realizada com precaução, com intuito de não reproduzir o problema enfrentado hoje pelos antibióticos (JASSIM; LIMOGES, 2014).

1.1.4 ISOLAMENTO DE FAGOS EM MATRIZES AMBIENTAIS

Bacteriófagos são caracterizados por serem encontrados em ambiente onde seu hospedeiro, as bactérias, está presente. Assim, é possível sua detecção em matrizes como solo, esgoto, águas naturais, entre outros (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014). Fatores como sua alta especificidade, capacidade de sobrevivência por longos períodos e sua habilidade de replicação rápida contribuem para sua sobrevivência equilibrada em uma ampla gama de hospedeiros e nos diferentes ecossistemas naturais (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005). A presença de grandes quantidades desses agentes, principalmente no esgoto, faz com que essa seja uma importante fonte para o isolamento de novos e diferentes tipos de bacteriófagos (SUNDAR et al., 2009).

Os bacteriófagos são inclusive investigados como indicadores de qualidade de água. Os fagos de *E. coli*, chamados especificamente de *colifagos*, são um exemplo de vírus que podem indicar poluição fecal, apresentando maior resistência que seu hospedeiro no ambiente aquático (ABEDON, 2012).

A possibilidade de isolar esses agentes de diferentes matrizes e sua caracterização de forma criteriosa é importante para ampliar o entendimento sobre essa população viral e sua diversidade, já que os mesmos são estimados em quantidades significativas e apenas uma parte já foi descrita na literatura (GREGORACCI, 2006).

Diversos ensaios com intuito de isolar e caracterizar bacteriófagos já foram realizados. Estudos de placas de lise efetuados com amostras de águas de esgoto detectaram a presença de zonas claras indicando a atividade de bacteriófagos líticos para as bactérias *Salmonella typhi*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (SUNDAR et al., 2009). Outro estudo realizado em Fortaleza (CE), com águas coletadas de tanque de sedimentação primária em estação de tratamento,

buscou bacteriófagos capazes de lisar as bactérias *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *S. Typhi*, *Salmonella Enteritidis*, *Enterobacter aerogenes* e *K. pneumoniae*; como resultado foram detectados bacteriófagos hábeis em lisar apenas as quatro primeiras bactérias (MARTINS; MARTINS, 2014). Contudo, ambos os trabalhos, apenas caracterizaram o ciclo lítico do fago com referência no tipo de placa de lise observada.

Buscando isolar e caracterizar fagos, através de análises morfológica, genética e de especificidade de hospedeiros, Gregoracci (2006) identificou 20 bacteriófagos, pertencentes à ordem *Caudovirales*; entre esses, obteve fagos específicos para *Chromobacterium violaceum*, que não haviam isolados e descritos até o momento. Khal (2016), com um trabalho semelhante, através de cultivo, isolamento e sequenciamento do genoma, caracterizou bacteriófagos contra a linhagem enteroinvasiva de *E. coli*. Este isolou 12 fagos, dos quais oito foram sequenciados, evidenciando vírus da ordem *Caudovirales*, sendo dois da família *Siphoviridae* e seis da família *Myoviridae*. Por fim, o seu estudo distinguiu o ciclo dos fagos, sendo um descrito como lisogênico e os demais não apresentaram genes que indicassem a lisogenia.

Em virtude das bactérias com mecanismos de resistência, alguns trabalhos foram realizados com o intuito de detectar fagos capazes de eliminar os isolados MDR. A partir de amostras de esgoto coletadas em hospital foi possível isolar dois fagos de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA); a caracterização revelou que ambos pertenciam a família *Siphoviridae* e eram líticos (RAHIMZADEH; GILL; REZAI, 2016). Outro estudo caracterizou bacteriófagos contra *K. pneumoniae* ESBL positiva, onde primeiramente foram coletadas amostras provenientes de esgoto, água tratada e águas ambientais. Como resultado foi possível isolar 32 bacteriófagos, principalmente das amostragens de esgoto, e todos pertenciam a ordem *Caudovirales*, sendo oito *Myoviridae* (fagos T4-like), oito *Siphoviridae* e 16 *Podoviridae* (KĘSIK-SZELOCH et al., 2013).

Por fim, a análise genética de um bacteriófago de *Enterococcus faecalis* (IME-EF3), isolado de esgoto, revelou a presença de um gene metalo-beta-lactamase (MBLs), responsável por conferir resistência aos antibióticos carbapenêmicos. Assim, o autor sugeriu que esse fago não seria adequado para o uso na fagoterapia, já que ele pode ser responsável pela transmissão horizontal do gene de resistência. Nesse sentido, fica ressaltada a importância do sequenciamento genômico na identificação de fagos propostos para a terapia (LI et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar genomicamente bacteriófagos em amostras de água superficial coletadas no Arroio João Correa e investigar sua capacidade de lisar bactérias de interesse clínico.

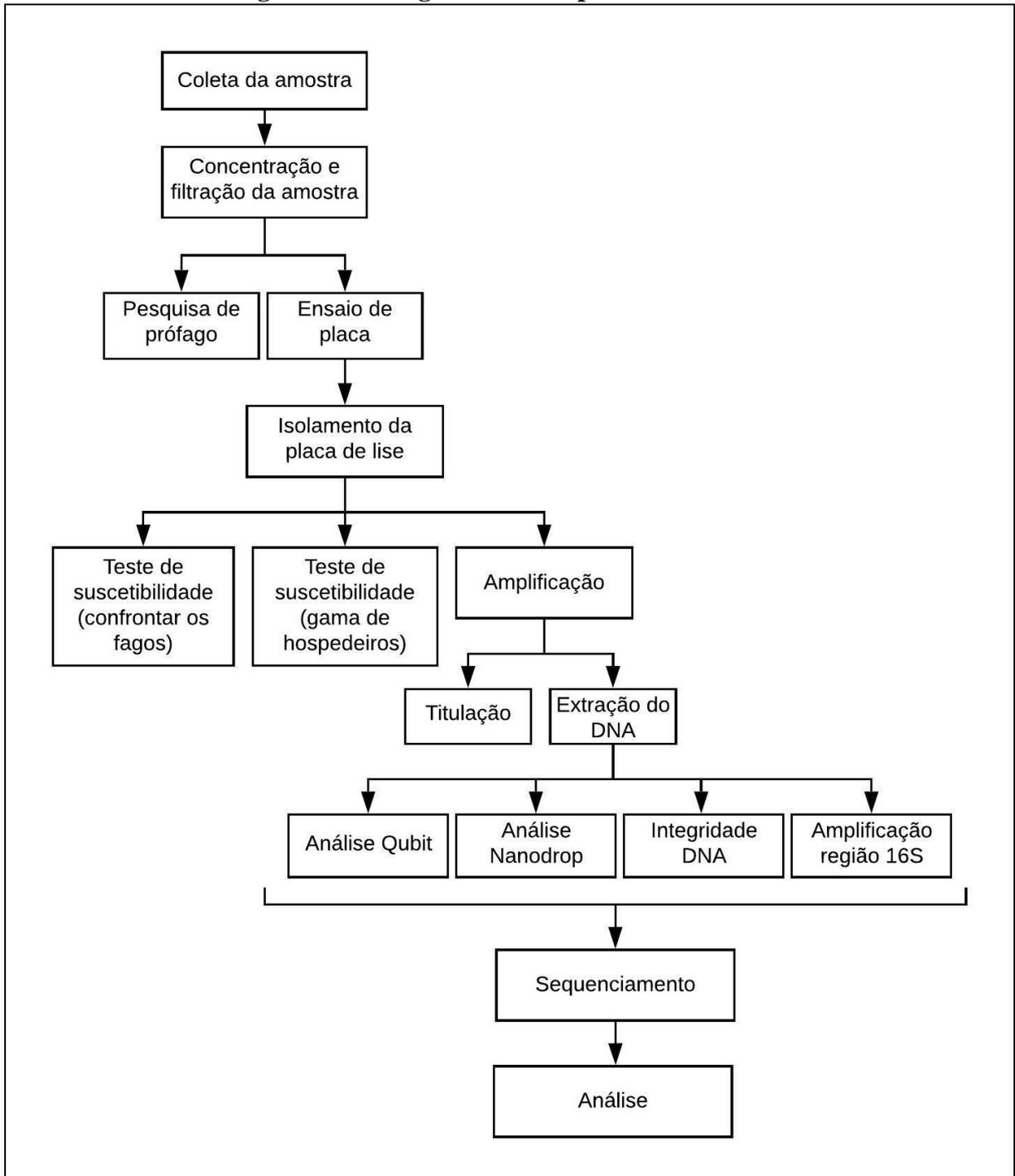
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bacteriófagos líticos para *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 13706, *E. coli* ESBL, *K. pneumoniae* ESBL e *K. pneumoniae* KPC em amostra de água superficial.
- Verificar se os fagos isolados nas bactérias hospedeiras se diferem.
- Determinar a suscetibilidade de outros isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* frente aos fagos previamente encontrados em bactérias multirresistentes.
- Caracterizar os fagos capazes de lisar bactérias com resistência aos antibióticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 7 resume as etapas práticas realizadas no presente trabalho, iniciando pela coleta da amostra até a análise genética.

Figura 7 - Fluxograma das etapas desenvolvidas



Fonte: Autor.

4.1 COLETA E CONCENTRAÇÃO VIRAL EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Foi realizada uma coleta de água superficial no Arroio João Correa localizado na cidade de São Leopoldo ($29^{\circ}46'13.6''S$ $51^{\circ}09'37.0''W$), no mês de setembro de 2018 (Figuras 8 e 9). O canal tem início na rua Jaci Porto, cruza a Avenida Thomas Edison e tem término na casa de bombas, totalizando 1,5 quilômetros de extensão. Local impactado que recebe fontes difusas de esgoto doméstico, sendo o encontro para a água de diversos bairros da cidade como Vicentina, Fião, Cristo Rei, Padre Reus, Duque de Caxias, Cohab Duque, Santa Tereza, Morro do Espelho e parte do Centro situado ao sul da avenida João Correa, que também inclui parte do município de Sapucaia do Sul.

Figura 8 - Localização geográfica do local de coleta



Fonte: Adaptado Google Maps (setembro de 2018).

Figura 9 - Arroio João Correa



Fonte: Autor (setembro de 2018).

A amostra foi obtida em frasco estéril de 500 mL, mantida sob refrigeração e transportada ao Laboratório de Biomedicina (Universidade Feevale).

Para o isolamento direto dos fagos foi realizada centrifugação, com rotação de 4500rpm por 20 minutos, para decantação de sólidos em suspensão. Para a remoção de células bacterianas, as amostras foram submetidas à filtração com bombas de vácuo através de membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; POXLEITNER et al., 2017).

No isolamento de bacteriófagos específicos para algumas das bactérias avaliadas foi necessário realizar uma etapa de ultracentrifugação adicional, para maior concentração dos vírus (PRATA et al., 2012). Para tanto, um volume de 36 mL da amostra foi submetido à centrifugação a 41000xg por 3 horas a 8°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL de TE (Tris-EDTA). O sobrenadante resultante, que contém a fração viral, foi armazenado a 4°C até o momento de uso (ACKERMANN; TREMBLAY; MOINEAU, 2004).

4.2 LINHAGENS DE BACTÉRIAS

Para o isolamento de bacteriófagos líticos foram utilizadas cinco bactérias diferentes (denominadas bactérias hospedeiras), incluindo duas linhagens sem mecanismos de resistência, sendo elas: cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 e cepa padrão *E. coli* ATCC 13706, além de três isolados bacterianos com mecanismos de resistência a antibióticos: *E. coli* ESBL, *K. pneumoniae* ESBL e *K. pneumoniae* KPC.

Nos testes de suscetibilidade foram utilizados novos isolados, incluindo cinco *E. coli* e cinco *K. pneumoniae* sem mecanismos de resistência, dez *E. coli* ESBL, dez *K. pneumoniae* ESBL e dez *K. pneumoniae* KPC.

Cada bactéria teve sua identificação verificada através de provas bioquímicas convencionais (Triple Sugar Iron Agar, agar Citrato de Simmons, meio SIM, Lisine Iron Agar, meio MIO, agar fenilalanina, agar ureia, prova de oxidase). A confirmação fenotípica dos mecanismos de resistências se deu pelo teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão, empregando inibidores enzimáticos adequados para cada mecanismo.

Para a identificação de isolados KPC foram utilizados dois discos de fármacos carbapenêmicos, sendo um disco de imipenem 10 µg e outro disco de imipenem 10 µg acrescido

de 10 µL de ácido borônico (40 mg/mL). Após incubação em estufa bacteriológica, as amostras foram consideradas positivas quando apresentaram ≥ 5 mm de diferença entre os halos de inibição (ANVISA, 2013). O mecanismo de resistência ESBL foram analisados por teste de sinergismo com discos contendo antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro (cefotaxima, ceftazidima, cefepima e aztreonam) dispostos a uma distância de 20 mm de um disco contendo ácido clavulânico (amoxicilina-ácido clavulânico). O resultado do teste é positivo quando as zonas de inibição em torno de qualquer disco são aumentadas na direção do disco contendo ácido clavulânico (BRCAST, 2017).

Os isolados bacterianos foram provenientes de laboratórios de microbiologia de hospitais da cidade de Novo Hamburgo, bem como da coleção de bactérias do Laboratório de Biomedicina da Universidade Feevale. As bactérias, preservadas a -20°C em Tryptone Soy Broth (TSB) glicerinado, foram cultivadas em placas de agar MacConkey e mantidas a 4°C para uso contínuo nos ensaios, sendo subcultivadas no dia anterior à realização dos experimentos.

4.3 PESQUISA DE PRÓFAGOS

Este teste analisa a presença de prófago nas bactérias hospedeiras utilizadas no estudo, evitando resultado falso positivo para presença de bacteriófagos. Os ensaios foram realizado adicionando-se uma camada de 3 mL de TSB semi-sólido (0,35% ágar) inoculado com 100 µL da bactéria em teste sobre uma fina camada de Tryptic Soy Agar (TSA) previamente distribuída em placas de Petri (90x15mm). Após, dispensou-se 50 alíquotas de 10 µL do inóculo bacteriano (mesma bactéria) sobre a camada de TSB semi-sólido e incubou-se em estufa a 35°C por 24 horas. A interpretação esperada neste ensaio é a ausência de áreas de lise no local de dispensação das alíquotas (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; POTTKER, 2016).

4.4 ENSAIO DE PLACA - INDUÇÃO DE INFECÇÃO POR BACTERIÓFAGOS

O ensaio de placa para fagos consiste em formar uma sobrecamada contendo o inóculo bacteriano junto com o filtrado viral a fim de visualizar a formação de placas de lise, zonas claras arredondadas, no crescimento bacteriano confluyente. Cada zona de lise indica a área de ocorrência de infecção pelo fago devido à lise celular bacteriana.

Assim, os fagos foram isolados na amostra ambiental mediante a adição de 100 µL de cultura bacteriana em fase exponencial de crescimento (densidade ótica entre 0,08 a 0,10 a 625 nm) em 1 mL do filtrado viral; essa mistura foi incubada em estufa bacteriológica por 15 minutos a 35°C para permitir a adsorção do fago junto à bactéria. Como controle positivo foi utilizado 100 µL do inóculo bacteriano, enquanto para o controle negativo empregou-se 1 mL da amostra filtrada. Em seguida, o material foi transferido para tubos tipo falcon (15 mL) contendo 3 mL de TSB semi-sólido fundido, sendo misturado e depositado em placa de petri contendo uma camada de 10 mL de TSA. Após a solidificação do meio, em temperatura ambiente, as placas foram incubadas invertidas em estufa a 35°C por 24 horas. Posterior ao período de incubação foi observada a formação de placas de lise (zonas claras) dentro da camada de crescimento da bactéria (ADAMS, 1959; KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; POXLEITNER et al., 2017). Este procedimento foi realizado para cada uma das cinco bactérias indicadas previamente: *E. coli* ATCC 13706, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ESBL, *K. pneumoniae* KPC e *K. pneumoniae* ESBL.

4.5 ISOLAMENTO DA PLACA DE LISE E PURIFICAÇÃO

Este método consiste em isolar e purificar os diferentes fagos capazes de infectar as bactérias hospedeiras no ensaio de placa de lise. As placas de lise foram escolhidas de acordo com as diferentes características fenotípicas visualizadas, tais como tamanho da placa, aparência límpida ou turva e presença de halo em torno da placa de lise (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005).

Para isso, uma pequena fração do agar do centro das placas de lise observadas no ensaio anterior (item 4.4) foram retiradas cuidadosamente, com auxílio de ponteiras estéreis. Os fragmentos retirados foram, então, transferidos para microtubos com 1 mL de TSB e agitados para o desprendimento dos vírus junto ao meio de cultura. Após, foram realizadas diluições seriadas (até 10^{-12}) no caldo contendo o fragmento de lise transferindo-se 50 µL da amostra para um microtubo estéril contendo 450 µL de TSB. Com o intuito de determinar qual seria a diluição

mais apropriada para o ensaio de lise foi realizada a titulação aproximada (conforme item 4.8). Após a definição da melhor diluição, realizou-se novo ensaio de placa de lise empregando-se 10 µL do material diluído com 100 µL de cultura da respectiva bactéria em fase exponencial de crescimento, seguindo o mesmo protocolo indicado no item 4.4 (POXLEITNER et al., 2017)

Para cada passagem foi retirada uma fração do ágar (placa de lise) da etapa de isolamento anterior. Ao total, foram realizadas sete passagens de cada fago e a última passagem foi filtrada em filtros de seringa de porosidade de 0,22 µm e armazenada em 4°C (ACKERMANN; TREMBLAY; MOINEAU, 2004) e utilizada para os ensaios posteriores.

4.6 TESTE DE SUSCETIBILIDADE

Este teste foi utilizado em dois momentos. Inicialmente, para confrontar se os fagos seriam capazes de infectar alguma das cinco bactérias hospedeiras utilizadas no isolamento dos bacteriófagos, analisando se eles se diferem.

O outro momento de uso desse ensaio foi para avaliar se um tipo de bacteriófago era capaz de infectar outras linhagens da mesma bactéria e a gama de hospedeiros. Etapa realizada apenas para os fagos isolados em bactérias resistentes. Para cada fago foi realizado o teste de suscetibilidade com dez isolados bacterianos com mecanismos de resistência, ou seja, dez *E. coli* ESBL, dez *K. pneumoniae* KPC e dez *K. pneumoniae* ESBL e cinco isolados sem resistência para cada espécie (*E. coli* e *K. pneumoniae*).

A metodologia consistiu em formar uma camada de 3 mL de TSB semi-sólido com 100 µL do inóculo da bactéria teste (em fase exponencial de crescimento) sobre uma camada de TSA em placa de petri. Após, foram depositadas gotas de 10 µL dos bacteriófagos sobre a camada, seguido da incubação por 24 horas em estufa a 35°C (CLOKIE; KROPINSKI, 2009; KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005).

Estes testes foram realizados em dois ensaios independentes e como controle positivo foi utilizado o bacteriófago em conjunto com bactéria hospedeira de origem (onde o fago foi previamente identificado). A suscetibilidade da bactéria àquele fago foi dada pela visualização de placas de lise no local da gota.

4.7 AMPLIFICAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS E ARMAZENAMENTO

Esta metodologia visa propagar a quantidade de bacteriófagos obtidos no final da purificação da placa de lise (4.5), adaptado de Kutter & Sulakvelide (2005). Esta metodologia foi utilizada para a preparação de estoque dos bacteriófagos isolados, assim como para utilização em ensaios futuros.

Para a amplificação 5 mL de TSB duplo, 2 mL da bactéria hospedeira (em fase exponencial de crescimento) e 1 mL contendo TSB com a fração de placa de lise retirada da última etapa da purificação foram homogeneizados. Este homogeneizado foi incubado por 24 horas a 35°C. Após o período de incubação, esse preparado foi centrifugado a 4500rpm, por 20 minutos, filtração em seringa com filtro de 0,22 µm (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; POTTKER, 2016). Alíquotas do fago amplificado foram armazenadas a -80°C, bem como mantidas sob refrigeração a 4°C para testes posteriores (ACKERMANN; TREMBLAY; MOINEAU, 2004).

4.8 TITULAÇÃO APROXIMADA E EXATA

Para a titulação aproximada foi utilizado, primeiramente, o método de “spot test”. Neste foram realizadas diluições seriadas dos fagos amplificados, seguido do ensaio de placa com a diluição mais apropriada para titulação exata, conforme protocolo adaptado de Poxleitner et al., (2017). As titulações foram realizadas para os fagos isolados de bactérias com mecanismos de resistência.

Ao total foram realizadas nove diluições (10^{-1} a 10^{-9}) de cada fago isolado e utilizado TSB como controle negativo. As diluições foram preparadas pela homogeneização de 10 µL do estoque de fagos em 90 µL de TSB (10^{-1}). Para a diluição seguinte foi retirado 10 µL da primeira diluição e adicionados à 90 µL de TSB (10^{-2}) e, assim, sucessivamente até a diluição de 10^{-9} . Para o “spot test” preparou-se uma camada com 3 mL de TSB semi-sólido com 100 µL da respectiva bactéria hospedeira sobre 10 mL de TSA em placas de petri, seguido da deposição de gotas de 3 µL das diluições dos bacteriófagos sobre a camada. Após incubação (35°C/24h), foi avaliada a formação de placas de lise nos pontos de inoculação das gotas (POXLEITNER

et al., 2017). Este protocolo forneceu a titulação aproximada das amostras para serem utilizadas na titulação exata.

Para a titulação exata foi utilizada a diluição mais apropriada (última diluição na qual foram visualizadas as placas de lise) previamente determinada na titulação aproximada. Tal diluição foi utilizada para o ensaio de placa de lise, onde foi homogeneizados 10 µL do material diluído com 100 µL da bactéria hospedeira em fase exponencial de crescimento, seguindo o mesmo protocolo do item 4.4. Após a incubação (35°C/24h) foi realizada a contagem macroscópica das zonas de lise. O ensaio foi realizado em duplicata. O título de bacteriófagos foi expresso em UFP (unidades formadoras de placa) por mL (CLOKIE; KROPINSKI, 2009; POXLEITNER et al., 2017).

$$\text{Título (UFP/mL)} = \frac{n \text{ (número de placa de lise)}}{v \text{ (volume usado em } \mu\text{L)}} \times 10^3 (\mu\text{L/mL}) \times \text{fator de diluição}$$

4.9 ANÁLISE GENÔMICA

Foram escolhidos aleatoriamente três fagos para o sequenciamento, sendo um fago isolado de *E. coli* ESBL (FEC.ESBL.P1), um fago de *K. pneumoniae* ESBL (FKP.ESBL.P2) e um fago de *K. pneumoniae* KPC (FKP.KPC.P1.1).

Os fagos foram primeiramente tratados com RNase e DNase, seguidos por extração dos ácidos nucleicos, com protocolo fenol/clorofórmio, utilizando como volume inicial 500 µL do fago amplificado (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Após a extração, as amostras foram analisadas quanto à pureza, determinadas no equipamento Nanodrop, com parâmetros A260/280 e A260/230 (valores devem ser < 1,8) e concentração por Qubit (valores devem ser > 0,2 ng/µL).

A amostra foi testada de eventual contaminação bacteriana através de amplificação da região 16S utilizando os primers 27F (Forward primer 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (Reverse primer 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991; WONG; RAO; SOON, 2018). A reação de PCR foi através do kit *Taq Platinum High Fidelity* e realizada em termociclador nas seguintes condições: desnaturação em 95°C durante 2 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C

por 1 minuto, seguido por uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos e finalizando com 4°C. Por fim, foi analisado a integridade do DNA viral por meio de gel de agarose a 0,8%.

As bibliotecas de DNA foram preparadas com o kit Nextera XT (Illumina®, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado na plataforma Miseq (Illumina®, USA), utilizando o kit Miseq Reagent kit v2 500. Sequências foram obtidas a partir do software do Base Space (Illumina) com o auxílio do aplicativo FASTQ TOOLKIT (v.2.2.0) para trimagem e os contigs foram formados no SPAdes Genome Assemble (v.3.9.0). A análise de contigs se deu no software PHASTER (ARNDT et al., 2016) com o auxílio do software Geneious. Foram considerados para a análise contigs maiores de 100 pb.

5 RESULTADOS

5.1 LINHAGENS DE BACTÉRIAS

O perfil de suscetibilidade aos antibióticos beta-lactâmicos testados por disco difusão revelou que *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 13706 e cinco isolados clínicos de *E. coli* e cinco de *K. pneumoniae* foram sensíveis a amoxicilina/ácido clavulânico, ceftazidima, cefotaxima, cefepima, aztreonam e imipenem. Os 11 isolados *K. pneumoniae* KPC foram resistentes a todos os antibióticos supracitados e apresentaram resultado positivo no teste de sinergismo com o inibidor (ácido borônico). Em relação aos isolados ESBL, tanto 11 *E. coli* quanto 11 *K. pneumoniae* apresentaram resistência a amoxicilina/ácido clavulânico, ceftazidima, cefotaxima, cefepima e aztreonam (teste de sinergismo positivo), mas foram sensíveis ao imipenem. As informações com os antibióticos testados se encontram no Anexo 1.

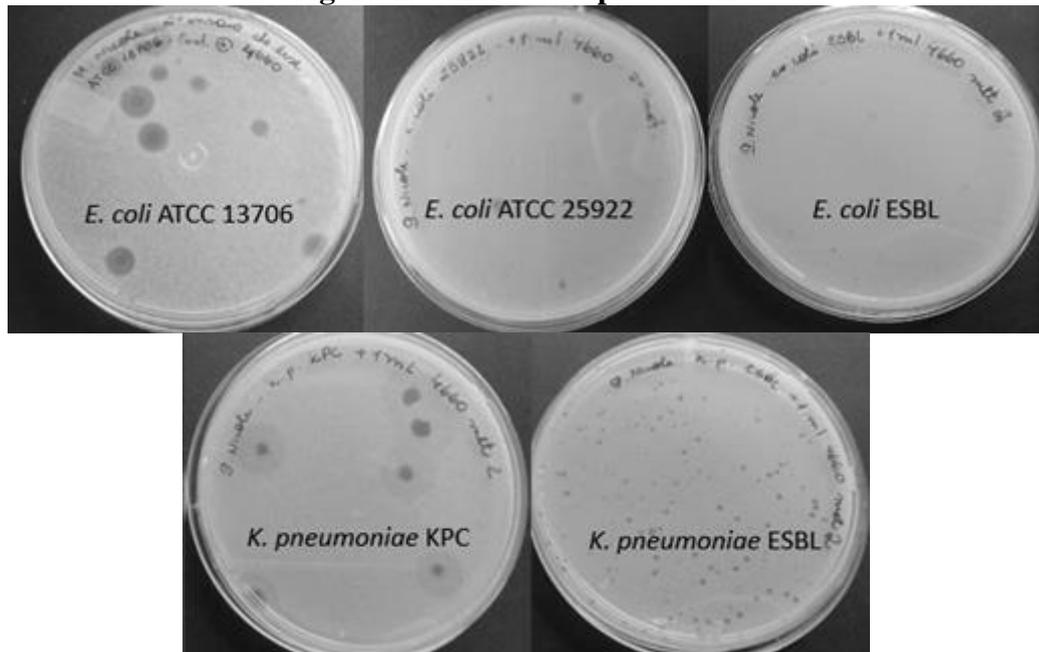
5.2 PESQUISA DE PRÓFAGOS

Não foram visualizadas placas de lise que indicassem a lisogenia em 50 alíquotas (gotas de 10 µL) das bactérias testadas.

5.3 ENSAIO DE PLACA

O ensaio de indução de infecção direta por bacteriófagos foi positivo para todas as bactérias estudadas (Figura 10). Para quatro das bactérias (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ESBL, *K. pneumoniae* KPC e *K. pneumoniae* ESBL) foi necessária a realização de ultracentrifugação para concentração dos fagos presentes na amostra antes da realização do ensaio de placa de lise.

Figura 10 – Ensaio de placa de lise



Fonte: Autor.

5.4 ISOLAMENTO DA PLACA DE LISE E PURIFICAÇÃO

Após a observação das placas de lise pelo ensaio de placa, algumas delas foram selecionadas e purificadas. A seleção das placas se deu conforme critérios definidos anteriormente (diferenças de tamanho de placa, aparência límpida ou turva e presença de halo em torno da placa de lise).

Sendo assim, foram retiradas seis placas de lise observadas em testes com *E. coli* ATCC 13706, cinco placas em *E. coli* ATCC 25922, cinco em *E. coli* ESBL, oito em *K. pneumoniae* KPC (uma placa adicional foi retirada durante a purificação, pois apresentou morfologia diferente) e seis em *K. pneumoniae* ESBL.

5.5 ANÁLISE DE MORFOLOGIA DAS PLACAS DE LISE

Durante a purificação dos fagos foi possível observar as características das placas de lise encontradas. Os fagos isolados no estudo apresentaram características de acordo com a

bactéria isolada inicialmente. Entre as placas isoladas para cada bactéria não foram observadas diferenças morfológicas, exceto para os fagos isolados de *K. pneumoniae* KPC que apresentaram diferença no tamanho da placa e halo (Figura 12). A descrição da quantidade de placas e a sua morfologia se encontram na Tabela 1 e Figuras 11 e 12.

Tabela 1 – Descrição da morfologia das placas de lise

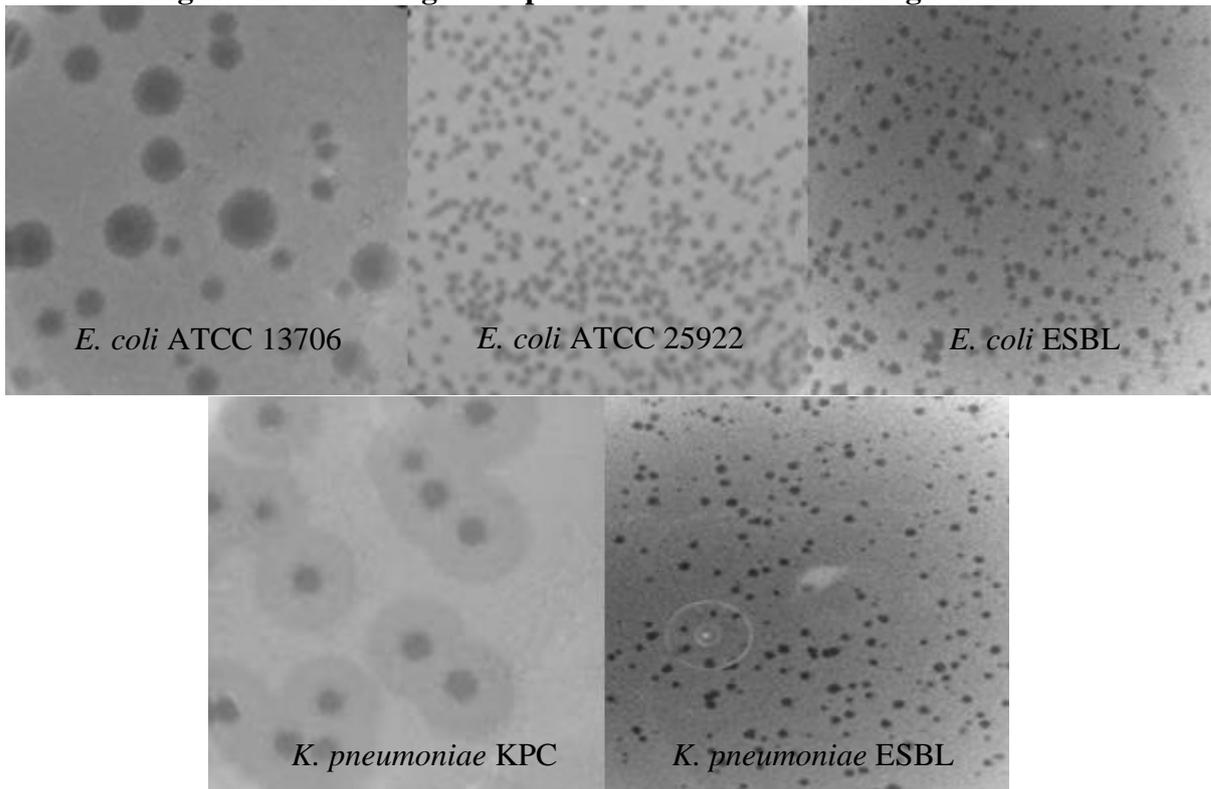
Bactéria	Número de placas purificadas	Nomes sugeridos dos fagos	Características fenotípicas das placas de lise
<i>E. coli</i> ATCC 13706	6	FEC.ATCC13706 (P1 a P6)	Grandes, com variação de tamanho, em torno de 2,0 a 5,0 mm, límpidas no centro, sem bordas definidas e presença de halo com variação de 1,0 a 4,0 mm.
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5	FEC.ATCC25922 (P1 a P5)	Pequenas, em torno de 0,5 a 1,5 mm, límpidas e sem presença de halo.
<i>E. coli</i> ESBL	5	FEC.ESBL (P1 a P5)	Pequenas, em torno de 0,1 a 1,0 mm, límpidas e sem presença de halo.
<i>K. pneumoniae</i> KPC	9*	FKP.KPC (P1.1 a P8)	Grandes com alta variação de tamanho entre as placas isoladas, em torno de 1,0 a 4,0 mm, límpidas no centro, bordas definidas e presença de halo com variação de 1,0 a 4,0 mm. *Um dos nove fagos isolados não apresentou halo.
<i>K. pneumoniae</i> ESBL	6 placas	FKP.ESBL (P1 a P6)	Pequenas, em torno de 0,1 a 1,0 mm, límpidas e sem presença de halo.

*Uma das nove placas de lise foi retirada durante a quarta passagem da etapa de purificação em razão de ter apresentado características diferentes das demais.

FEC: fago de *E. coli*; FKP: fago de *K. pneumoniae*.

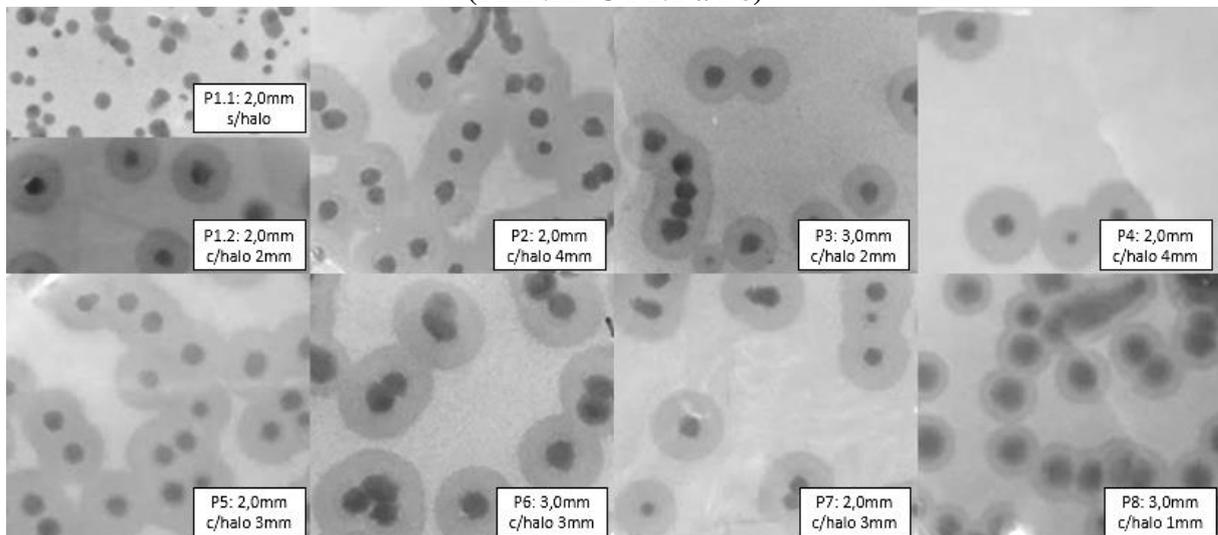
Fonte: Autor.

Figura 11 - Morfologia das placas de lise dos bacteriófagos isolados



Fonte: Autor.

Figura 12 - Morfologia das placas de lise para a bactéria *K. pneumoniae* KPC (FKP.KPC P1.1 a P8)



P: Placas de lise isoladas e purificadas.

Fonte: Autor.

5.6 TESTE DE SUSCETIBILIDADE

Primeiramente, este teste foi realizado com as bactérias hospedeiras utilizadas no isolamento inicial (*E. coli* ATCC 13706, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ESBL, *K. pneumoniae* KPC e *K. pneumoniae* ESBL) para confrontar e analisar se poderiam se tratar do mesmo fago isolado em bactérias diferentes (Tabela 2). Os resultados mostraram que os fagos isolados eram diferentes entre as cinco bactérias utilizadas, pois não apresentaram ação lítica igual.

O segundo teste foi realizado com os bacteriófagos isolados para as bactérias com mecanismos de resistência (*E. coli* ESBL, *K. pneumoniae* KPC e *K. pneumoniae* ESBL) e os resultados se encontram nas Tabelas 3, 4 e 5. Os fagos isolados de uma mesma bactéria demonstraram um espectro de ação semelhante.

Tabela 2 - Infecção cruzada entre os fagos isolados e as bactérias utilizadas na etapa inicial do estudo

	<i>E.coli</i> ATCC 13706	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i> ESBL	<i>K.pneumoniae</i> KPC	<i>K.pneumoniae</i> ESBL
FEC.ATCC13706.P1	CP				
FEC.ATCC13706.P2	CP				
FEC.ATCC13706.P3	CP				
FEC.ATCC13706.P4	CP				
FEC.ATCC13706.P5	CP				
FEC.ATCC13706.P6	CP				
FEC.ATCC25922.P1		CP			
FEC.ATCC25922.P2		CP			
FEC.ATCC25922.P3		CP			
FEC.ATCC25922.P4		CP			
FEC.ATCC25922.P5		CP			
FEC.ESBL.P1			CP		
FEC.ESBL.P2			CP		
FEC.ESBL.P3			CP		
FEC.ESBL.P4			CP		
FEC.ESBL.P5			CP		
FKP.KPC.P1.1				CP	
FKP.KPC.P1.2				CP	
FKP.KPC.P2				CP	
FKP.KPC.P3				CP	
FKP.KPC.P4				CP	
FKP.KPC.P5				CP	
FKP.KPC.P6				CP	
FKP.KPC.P7				CP	
FKP.KPC.P8				CP	
FKP.ESBL.P1					CP
FKP.ESBL.P2					CP
FKP.ESBL.P3					CP
FKP.ESBL.P4					CP
FKP.ESBL.P5					CP
FKP.ESBL.P6					CP

CP: controle positivo; CINZA: infecção pelo fago; BRANCO: não infecção pelo fago; FEC: fago de *E. coli*; FKP: fago de *K. pneumoniae*.

Fonte: Autor.

Tabela 3 - Gama de hospedeiros para o fago de *E. coli* ESBL (FEC.ESBL) contra isolados de *E. coli* oriundos de isolados clínicos

	3216	2765	3220	3170	02E	2091	720	699	1707	3242	01M*	03I*	3436*	51*	727*
FEC.ESBL.P1				■	■	■		■			■			■	■
FEC.ESBL.P2				■	■	■		■			■			■	■
FEC.ESBL.P3				■	■	■		■			■			■	■
FEC.ESBL.P4				■	■	■		■			■			■	■
FEC.ESBL.P5				■	■	■		■			■			■	■

CINZA: infecção pelo fago; BRANCO: não infecção pelo fago; *isolado sem resistência aos antibióticos.

Fonte: Autor.

Tabela 4 - Gama de hospedeiros para o fago de *K. pneumoniae* KPC (FKP.KPC) contra isolados de *K. pneumoniae* oriundos de isolados clínicos

	2777	2841	4693	1580	04J	2248	2252	3378	4202	9601	4337*	4193*	838*	904*	2869*
FKP.KPC.P1.1		■	■	■	■	■			■	■					■
FKP.KPC.P1.2		■	■	■	■	■			■	■					■
FKP.KPC.P3		■	■	■	■	■			■	■					■
FKP.KPC.P4		■	■	■	■	■			■	■					■
FKP.KPC.P5		■	■	■	■	■			■	■					■
FKP.KPC.P6		■	■	■	■	■			■	■					■
FKP.KPC.P7		■	■	■	■	■			■	■					■
FKP.KPC.P8		■	■	■	■	■			■	■					■

CINZA: infecção pelo fago; BRANCO: não infecção pelo fago; *isolado sem resistência aos antibióticos.

Fonte: Autor.

Tabela 5 - Gama de hospedeiros para o fago de *K. pneumoniae* ESBL (FKP.ESBL) contra isolados de *K. pneumoniae* oriundos de isolados clínicos

	2403	2129	1017	2567	2481	2440	3266	3762	876	2182	4337*	4193*	838*	904*	2869*
FKP.ESBL.P1	■	■		■	■	■	■	■	■	■			■		■
FKP.ESBL.P2	■	■		■	■	■	■	■	■	■			■		■
FKP.ESBL.P3	■	■		■	■	■	■	■	■	■			■		■
FKP.ESBL.P4	■	■		■	■	■	■	■	■	■			■		■
FKP.ESBL.P5	■	■		■	■	■	■	■	■	■			■		■
FKP.ESBL.P6	■	■		■	■	■	■	■	■	■			■		■

CINZA: infecção pelo fago; BRANCO: não infecção pelo fago; *isolado sem resistência aos antibióticos.

Fonte: Autor.

5.7 AMPLIFICAÇÃO E TITULAÇÃO

Após a realização da titulação aproximada foi determinada a diluição mais apropriada para o teste de titulação exata. As titulações de cada placa de lise isolada para as bactérias resistentes se encontram na Tabela 6.

Tabela 6 – Titulação exata dos bacteriófagos para as bactérias com mecanismo de resistência.

<i>E. coli</i> ESBL	UFP/mL
FEC.ESBL.P1	1,20E+13
FEC.ESBL.P2	7,70E+09
FEC.ESBL.P3	3,00E+09
FEC.ESBL.P4	6,70E+09
FEC.ESBL.P5	8,80E+09
<i>K. pneumoniae</i> KPC	
FKP.KPC.P1.1	2,80E+09
FKP.KPC.P1.2	9,00E+11
FKP.KPC.P2	4,60E+10
FKP.KPC.P3	3,00E+08
FKP.KPC.P4	2,30E+08
FKP.KPC.P5	1,00E+08
FKP.KPC.P6	4,70E+09
FKP.KPC.P7	4,00E+08
FKP.KPC.P8	6,40E+08
<i>K. pneumoniae</i> ESBL	
FKP.ESBL.P1	1,87E+09
FKP.ESBL.P2	3,19E+09
FKP.ESBL.P3	1,60E+09
FKP.ESBL.P4	1,23E+10
FKP.ESBL.P5	1,22E+09
FKP.ESBL.P6	1,29E+09

FEC: fago de *E. coli*; FKP: fago de *K. pneumoniae*.

Fonte: Autor.

5.8 ANÁLISE GENÔMICA

Todos os fagos apresentaram seu DNA integro pela avaliação por gel de agarose após a extração do material genético, com concentração acima de 0,2 ng/ μ L (medida por Qubit) e pureza adequada, parâmetros A260/280 e A260/230 com valores acima de 1,8. A amplificação da região 16S não mostrou contaminações por DNA bacteriano.

5.8.1 FAGO DE *E. coli* ESB (FEC.ESBL.P1)

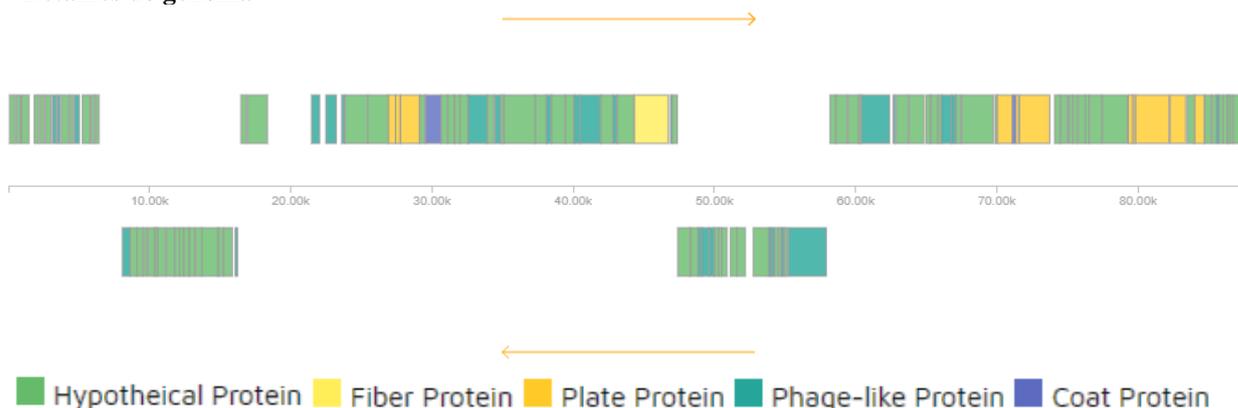
A análise do sequenciamento gerou 106 contigs e com base nos critérios do trabalho (contigs maiores de 100pb), 22 foram consideradas para as análises. Estas foram analisadas pelo software PHASTER que mostrou um genoma com 87,6kb e porcentagem de CG de 38,97%.

A sequência analisada apresentou 125 ORFs, dessas 84 são proteínas hipotéticas previstas no genoma do fago, sem uma função atribuída. As 41 ORFs restantes mostraram semelhança com proteínas já descritas, conforme Tabela 7.

Tabela 7 - Características gerais do genoma do fago FEC.ESBL.P1

Tamanho	87,6kb		
CG	38,97%		
Fagos semelhantes	<i>E. coli</i> O157 typing phage 1 (acesso NC_041979)		
Proteínas hipotéticas	84		
Proteínas descritas*	41	Phage-like protein	27
		Base	11
		Capsídeo	2
		Fibra da cauda	1

Detalhes do genoma



*Informações detalhadas encontram-se no Anexo 2.

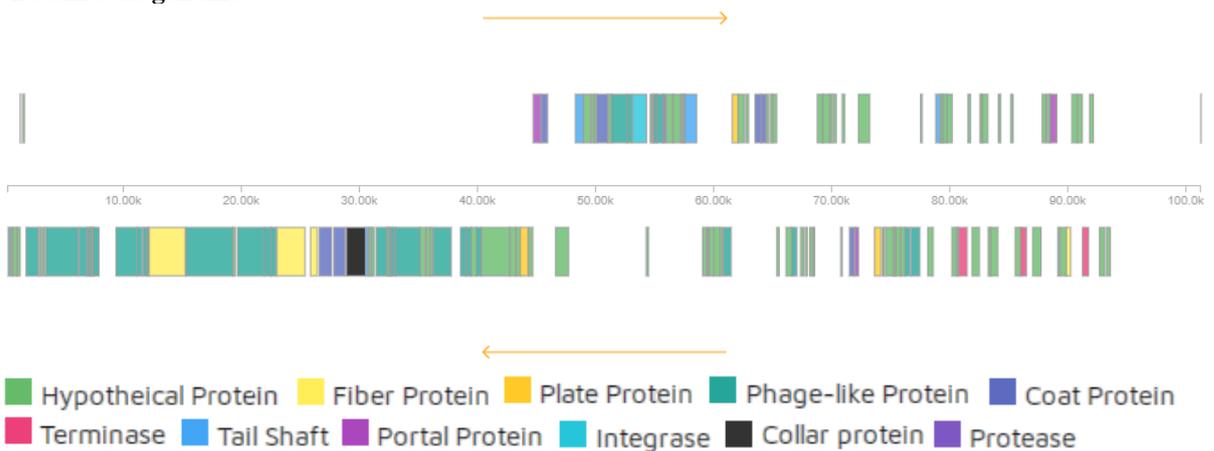
5.8.2 FAGO DE *K. pneumoniae* KPC (FKP.KPC.P1.1)

Os resultados apresentaram 782 contigs, sendo 309 maiores que 100pb, os quais foram analisados pela plataforma PHASTER. A sequência desse fago apresentou 101Kb com 52.37% de CG e 105 ORFs. 46 do total de ORFs foram reconhecidas como hipotéticas e 59 obtiveram sua função definida, conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Características gerais do genoma do fago FKP.KPC.P1.1

Tamanho	101Kb		
CG	52.37%		
Fago semelhante	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1 (acesso NC_028688)		
Proteínas hipotéticas	46		
Proteínas descritas*	59		
		Phage-like protein	32
		Capsídeo	7
		Fibra da cauda	4
		Cauda	4
		Terminase	3
		Portal	3
		Base	3
		Pescoço	1
		Integrase	1
		Protease	1

Detalhes do genoma



*Informações detalhadas encontram-se no Anexo 3.

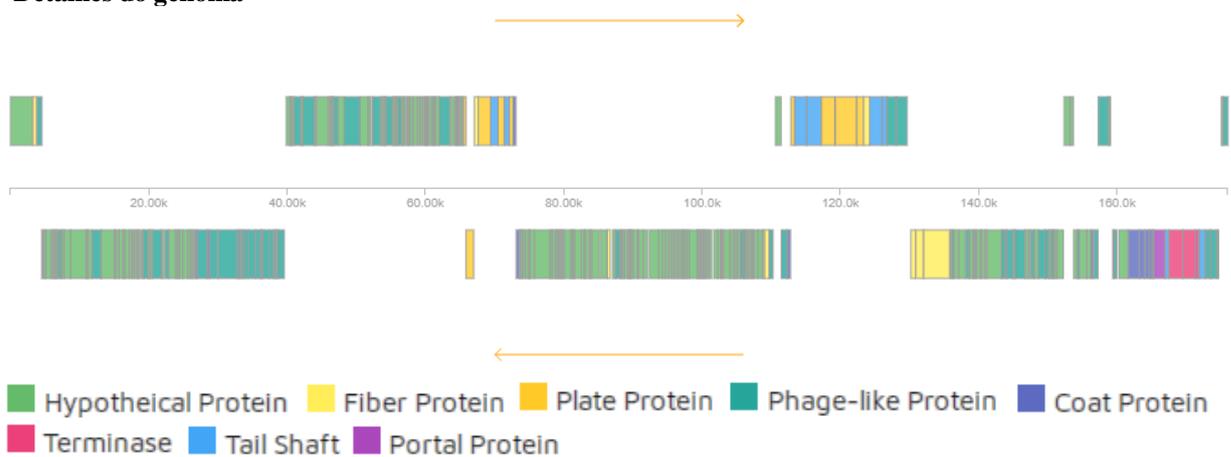
5.8.3 FAGO DE *K. pneumoniae* ESBL (FKP.ESBL.P2)

As leituras obtidas do sequenciamento foram montadas e resultaram em 274 contigs, 138 maiores que 100pb que foram analisados pela plataforma PHASTER, resultando em uma sequência de 176Kb com 41.85% de CG e 275 ORFs. 177 foram proteínas hipotéticas, enquanto 98 já foram descritas, conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Características gerais do genoma do fago FKP.ESBL.P2

Tamanho	176Kb		
CG	41.85%		
Fago semelhante	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1 (acesso NC_042138)		
Proteínas hipotéticas	177		
Proteínas descritas*	98	Phage-like protein	56
		Capsídeo	12
		Fibra da cauda	9
		Base	9
		Cauda	8
		Terminase	3
		Portal	1

Detalhes do genoma



*Informações detalhadas encontram-se no Anexo 4.

6 DISCUSSÃO

Para o início dos estudos com fagos se faz necessária a avaliação de qual tipo de vírus se deseja encontrar, por conseguinte é preciso identificar em qual ambiente o seu hospedeiro está presente (HYMAN, 2019). Amostras de esgoto são caracterizadas por apresentarem uma diversa gama de microrganismos, incluindo bactérias fecais humanas e as específicas do ambiente, formando uma estrutura populacional única (MCLELLAN et al., 2010). De acordo com estudo realizado por McLellan (2010), que analisou a comunidade microbiológica do esgoto, a classe *Gammaproteobacteria*, à qual pertencem as bactérias utilizadas no estudo, representam 38% da diversidade dos procariotos encontrados nesse nicho. Além disso, o esgoto urbano também apresenta microrganismos com mecanismos de resistência, sendo um dos principais veículos pelos quais ocorre a disseminação dos genes responsáveis pela resistência aos antibióticos (HENDRIKSEN et al., 2019; SU et al., 2017).

Tendo em vista os gêneros bacterianos eleitos para o presente estudo, a probabilidade de isolar fagos infectivos para as respectivas bactérias era elevada. Segundo uma pesquisa, a maioria das tentativas de isolamento de fagos tendo *Escherichia* e *Klebsiella* como hospedeiros permitiram a recuperação de bacteriófagos com taxas de 90,6% para *E. coli* e 83,3% para *K. pneumoniae* (MATTILA; RUOTSALAINEN; JALASVUORI, 2015).

Uma das bactérias mais características no tipo de amostra escolhido para o estudo, principalmente dos que recebem efluente doméstico, é *E. coli*, pois ela constitui parte da microbiota natural humana e de animais de sangue quente. Essa condição explica, em parte, a não obrigatoriedade da etapa de concentração adicional da amostra para fins de pesquisa de fagos. Além disso, uma das cepas padrão utilizada no estudo (*E. coli* ATCC 13706) é definida como hospedeira de bacteriófagos, ou seja, é permissiva para tais vírus, sendo utilizada em diversos trabalhos que buscam o isolamento de colifagos em águas residuais.

Entretanto, para as outras bactérias utilizadas no estudo, menos comuns e aparentemente menos permissivas, o método de isolamento direto por centrifugação e filtração não se apresentou satisfatório. Com isto, foi necessária a realização de uma etapa adicional de ultracentrifugação. Este recurso, incomum para isolamento de fagos ambientais, é habitualmente utilizado para a pesquisa de diversos vírus entéricos, como o *Mastadenovirus*, *Rotavirus*, entre outros (PRATA et al., 2012). Portanto, com o emprego desta alternativa, foi possível constatar a presença dos fagos capazes de lisar as demais bactérias no estudo, com ênfase para os bacteriófagos capazes de infectar as linhagens multirresistentes.

Em concordância, trabalhos semelhantes que buscavam o isolamento de fagos também obtiveram resultados promissores. Synnott et al., (2009) isolaram fagos de *S. aureus* com alto espectro de infectividade frente a outros isolados da mesma espécie em efluente coletado de uma estação de tratamento de águas residuais municipais em Tóquio, Japão. De modo semelhante, Li et al., (2014) isolaram bacteriófagos contra *Enterococcus faecalis* em esgoto proveniente de hospital.

No âmbito das bactérias multirresistentes, alguns trabalhos também demonstraram resultados exitosos. Em pesquisa realizada com propósito de isolar novos fagos de esgoto Mattila et al., (2015) identificaram fagos contra *E. coli* ESBL, *K. pneumoniae* ESBL e *P. aeruginosa* MDR, além de fagos que infectaram *Enterococcus* resistentes e *S. aureus* (MRSA), porém a taxa de detecção para esses dois últimos foi menor. Rahimzadeh et al., (2016) isolaram e caracterizaram bacteriófagos capazes de infectar MRSA a partir de amostras de esgoto hospitalar. Como no presente trabalho, Keşik-Szeloch et al., (2013) isolaram bacteriófagos contra *K. pneumoniae* ESBL, sendo a maioria oriundos de amostras de esgoto.

É importante salientar que foi realizada a pesquisa de prófago (ou fagos temperados) nas linhagens utilizadas para o isolamento dos bacteriófagos (*E. coli* ATCC 13706, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ESBL, *K. pneumoniae* KPC e *K. pneumoniae* ESBL) e o teste apresentou ausência de placas de lise. Este teste possibilita excluir do estudo as bactérias que possuam o DNA do fago inserido no seu material genético (prófago), podendo resultar em falso positivo e interferindo nos resultados durante a realização dos testes, principalmente no isolamento inicial.

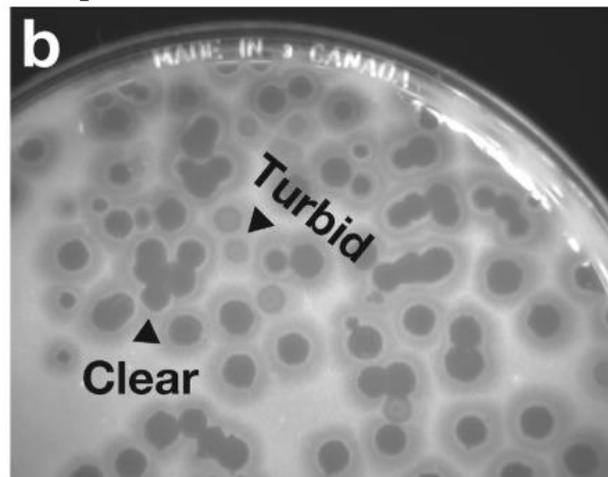
O passo seguinte à identificação da lise por fagos foi a seleção das placas a serem analisadas posteriormente, mediante a retirada do fragmento de lise para a purificação. Conceitualmente, cada zona de lise é o resultado da atividade de uma partícula fágica capaz de infectar e lisar o hospedeiro e, por sequência, infectar as células vizinhas, sendo que cada zona/placa morfologicamente diferente sugere um tipo de fago. Assim, é indicado que a escolha das placas de lise seja de acordo com a morfologia encontrada, uma vez que formas diferentes podem indicar fagos distintos (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; POXLEITNER et al., 2017). Resumidamente, esta etapa consistiu em purificar os bacteriófagos presentes, visto que uma bactéria pode ser infectada por fagos distintos e que, no isolamento inicial, não se tem conhecimento de quais fagos estão presentes. A purificação permite que o estoque obtido seja constituído de apenas um tipo viral (MATTILA; RUOTSALAINEN; JALASVUORI, 2015).

O isolamento dos bacteriófagos por ensaio direto, usado neste estudo, permite a produção de placas de lise por fagos líticos, mas também por fagos que realizam o ciclo lisogênico. Supostamente, a diferenciação entre as respectivas placas considera que os maiores

tamanhos de zona de lise indicam traços desejáveis como rápida adsorção do fago, amplo espectro de atividade e/ou rápida replicação. Junto disso, a ausência da turbidez (placa “clara”) pode indicar um estilo virulento (ciclo lítico), enquanto a turbidez (“nuvem”/placa turva no centro) é associada à capacidade de integração ao DNA bacteriano (Figura 13) (ADAMS, 1959; GILL; HYMAN, 2010; KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; MILLER; MILLER, 2011).

Por outro lado, a literatura sugere que as morfologias das placas podem ser fortemente influenciadas por múltiplos fatores, como a fase de crescimento, a natureza da bactéria hospedeira, a temperatura, o pH do meio, assim como a capacidade de difusão dos virions no ágar (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005; MILLER; MILLER, 2011). Segundo Kutter & Sulakvelide (2005), os critérios de morfologia de placa clara e amplo espectro de atividade, embora sugestivos de uma natureza lítica do fago, podem nem sempre fornecer informações precisas sobre sua capacidade de transformação.

Figura 13 – Morfologia de placas de lise: placas turvas indicando ciclo lisogênico e placas claras indicando ciclo lítico

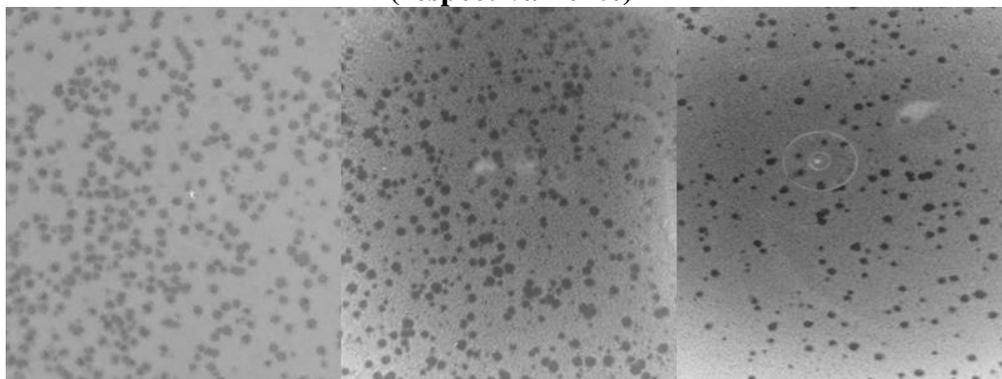


Fonte: (SOZHAMANNAN et al., 2008)

Fagos que realizam ciclo lítico são mais indicados para a fagoterapia em comparação aos fagos temperados. Entre as razões para evitar a utilização de fagos temperados na terapia estão: *i)* o genoma do fago pode alterar o fenótipo da célula hospedeira, fazendo-a expressar genes tóxicos ou a tornando mais infectiva; *ii)* os fagos temperados são capazes de transdução, ou seja, transferir material genético de um hospedeiro para outro, aumentando o potencial bacteriano de causar doença, principalmente pela transmissão de genes de resistência *iii)* após a inserção no genoma bacteriano o fago torna a célula imune a outra infecção fágica (GILL; HYMAN, 2010).

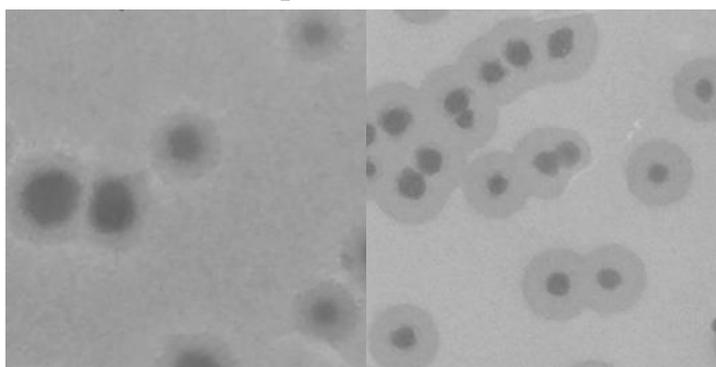
No presente estudo, a maioria das placas obtidas durante a purificação apresentaram aspecto límpido, sugerindo a ocorrência do ciclo lítico (fago lítico). A morfologia das placas se distinguiu entre as cinco bactérias estudadas, porém se manteve uniforme entre as placas isoladas para cada bactéria, exceto as placas de lise para as bactérias *K. pneumoniae* KPC e *E. coli* ATCC 13706. As placas de lise dos fagos FEC.ATCC25922, FEC.ESBL e FKP.ESBL apresentaram morfologia semelhante, sem halo e com pequena diferença no tamanho (Figura 14), enquanto a morfologia de FEC.ATCC13706 e FKP.KPC foi de placas grandes com halo (Figura 15).

Figura 14 – Placas de lise de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ESBL e *K. pneumoniae* ESBL (respectivamente)



Fonte: Autor.

Figura 15 – Halo das placas de lise de *E. coli* ATCC 13706 e *K. pneumoniae* KPC (respectivamente)



Fonte: Autor.

Em trabalho semelhante, Verma et al., (2009) isolaram fagos de *K. pneumoniae* em esgoto, pertencentes a família *Podoviridae*, e obtiveram placas isoladas de tamanho grande, com centro claro e com três zonas de atividade de despolimerase, sendo morfologicamente diferentes das observadas no presente trabalho. Kęsik-Szeloch et al., (2013), após isolarem fagos de *K. pneumoniae* ESBL de esgoto, relacionaram a morfologia das placas de lise com a família à qual pertenciam. Assim, fagos *Myoviridae* apresentaram placas claras de 1 mm;

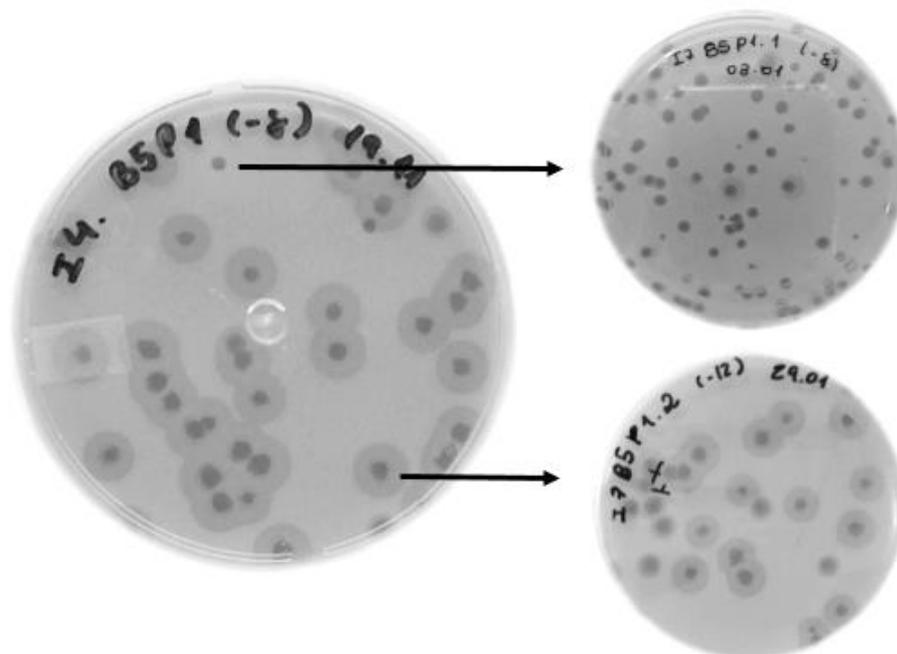
Siphoviridae produziram placas definidas de aproximadamente 3-5 mm cercados com um largo halo, enquanto membros de *Podoviridae* apresentaram placas de 3 mm com presença de halo e, ainda, um fago desta mesma família com placas de lise de tamanho maior (5-7 mm), claras e com halo pequeno.

Considerando a morfologia da placa de lise dos trabalhos citados anteriormente, os fagos FEC.ATCC25922, FEC.ESBL e FKP.ESBL (zonas claras e pequenas) poderiam ser associados a família viral *Myoviridae*, enquanto os fagos FEC.ATCC13706 e FKP.KPC (grandes com halo) poderiam pertencer a família *Siphoviridae* ou *Podoviridae*.

A presença de halo, observada nas placas dos fagos de *E. coli* ATCC 13706 e *K. pneumoniae* KPC, é indicativa de características específicas do bacteriófago. De acordo com Hughes et al., (1998) o halo presente ao redor da placa de lise indica a ação de enzimas despolimerase polissacarídica, ou seja, enzimas responsáveis pela degradação da camada de polissacarídeo (cápsula) apresentada por algumas bactérias hospedeiras, como as do gênero *Klebsiella*. Esta cápsula está relacionada à defesa, já que ela mascara o receptor celular para o fago; em contrapartida os bacteriófagos produzem enzimas que clivam o polissacarídeo capsular e expõem o receptor-alvo (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010). Além disto, as despolimerases podem amplificar a vulnerabilidade bacteriana por ruptura da cápsula presente em *Klebsiella*, tornando-a mais suscetível (KĘSIK-SZELOCH et al., 2013).

A placas exibidas em *K. pneumoniae* KPC apresentaram tamanhos diferentes durante a purificação das oito zonas de lise escolhidas (Figura 12). Além disso foi possível isolar uma placa de lise adicional durante a quarta etapa de purificação de uma das zonas de lise isoladas inicialmente, e esta foi caracterizada pela ausência de halo. Esta mudança permaneceu constante durante as seguintes passagens da purificação (Figura 16).

Figura 16 - Alteração de morfologia durante a purificação de fagos de *K. pneumoniae* KPC (placa 1, subdividida em 1.1 e 1.2)



Fonte: Autor.

As passagens sucessivas são necessárias para a purificação do fago, mas também é possível a ocorrência de indução de mutação. Este evento é observado quando, durante as passagens, a placa de lise muda as suas características originais. Tal fenômeno foi observado isoladamente durante a quarta passagem de purificação neste estudo. Foi constatado que uma placa de lise, isolada em *K. pneumoniae* KPC, deixou de apresentar o halo característico presente em todas as demais placas a partir do primeiro ensaio de placa. Esta placa de lise foi separada (nomeada “F5P1.1”) e sua purificação seguida para a avaliação do fenótipo, que se manteve sem halo até a sétima passagem (Figura 16).

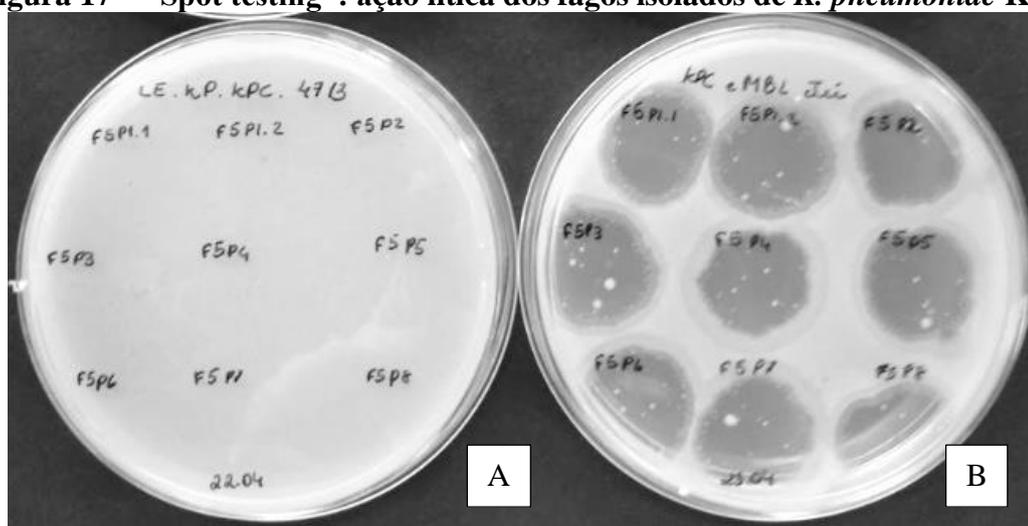
Mutações são esperadas quando há o isolamento de fagos lisogênicos e a mudança para o ciclo lítico é desejada. Alterações desse tipo já foram documentadas para o fago γ , que tem suas zonas de lise normalmente túrbidas devido a lisogenia, porém mutantes do fago γ produzem placas claras e são incapazes de integrar seu DNA na célula hospedeira (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005). Sozhamannan et al., (2008) isolaram placas de lise límpidas durante a purificação de bacteriófagos que normalmente produziam zonas túrbidas e, através de análise molecular, demonstraram que o novo fago possuía ação lítica e alta eficácia em matar as bactérias (Figura 13).

Esta alteração é um exemplo de estimada importância quando se pensa em evolução dos fagos, já que as bactérias podem criar mecanismos de resistência contra os vírus de forma

semelhante a criada para os antibióticos. Assim, seria possível “adaptar” novos fagos para as linhagens bacterianas, tornando-os mais resistentes à inativação causada pelas bactérias, sendo um diferencial positivo ao desenvolvimento e uso da fagoterapia. É importante ressaltar que a presença do halo é indicativa de atividade de enzimas sobre a parede bacteriana; sendo assim, a sua ausência pode apontar alterações na liberação ou produção das mesmas pelo vírus. Outrossim, a morfologia dos fagos pode variar de acordo com algumas condições, conforme mencionado previamente, e é possível que a alteração possa ser devido aos fatores externos e não à mutação propriamente.

Na avaliação da suscetibilidade, onde utilizou-se o “spot testing”, o resultado foi obtido pela presença de zonas de lise que se formam sobre um tapete da bactéria de interesse (Figura 17). Este método é simples, permite a avaliação de vários fagos simultaneamente na mesma placa de petri e sua principal característica é avaliar a capacidade dos fagos de lisar um hospedeiro alternativo àquele utilizado inicialmente (HYMAN, 2019; POXLEITNER et al., 2017).

Figura 17 – “Spot testing”: ação lítica dos fagos isolados de *K. pneumoniae* KPC



Legenda: (A) hospedeiro não suscetível, ausência de zonas de lise; (B) hospedeiro suscetível, presença de zonas de lise.

Fonte: Autor.

Cada um dos fagos líticos inicialmente encontrados nos testes específicos com cada uma das bactérias foram testados entre todas as cinco diferentes bactérias hospedeiras para verificar a sua suscetibilidade (Tabela 2). Através dessa análise foi possível verificar que os fagos isolados eram distintos entre as cinco bactérias, pois não apresentaram equivalente ação lítica entre os respectivos hospedeiros.

Além disso, os resultados mostraram que apenas um fago de FEC.ATCC13706 (que gerou a placa de lise designada “P4”) foi capaz de infectar a bactéria *K. pneumoniae* KPC, enquanto os demais fagos de *E. coli* não infectaram o outro gênero. Os fagos FEC.ESBL foram capazes de lisar os outros dois isolados de *E. coli* utilizados (ATCC 13706 e ATCC 25922). Os fagos de *K. pneumoniae* não foram capazes de infectar a outra espécie (*E. coli*).

A segunda etapa do “spot test” buscou analisar a capacidade dos fagos de bactérias resistentes em infectar e lisar outros isolados clínicos. Na terapia fágica, a gama de hospedeiros dos bacteriófagos é importante para determinar a utilidade do fago, pois alguns são capazes de infectar apenas algumas linhagens, outros infectarão muitas bactérias da mesma espécie e determinados fagos poderão infectar mais de uma espécie. O uso de fagos com ampla gama de hospedeiros levaria, presumivelmente, a menos falhas de tratamento. Portanto, em termos de bactérias dentro das espécies-alvo, um intervalo de hospedeiros mais amplo é desejável (HYMAN, 2019).

O teste de suscetibilidade revelou a ação dos vírus sobre grande parte dos isolados bacterianos específicos, principalmente de *K. pneumoniae* KPC e ESBL, embora não tenham sido capazes de infectar a totalidade dos isolados. Junto disso, os fagos obtidos apresentaram atividade contra algumas bactérias sem resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Os fagos com maior gama de hospedeiros para bactérias com mecanismos de resistência foram: FKP.ESBL, com 90% dos isolados infectados, seguidos por FKP.KPC com 70%. Entretanto, os fagos FEC.ESBL se mostraram mais específicos, apresentaram baixo espectro de infecção, causando lise em apenas 40% das amostras com resistência testadas.

Em trabalho semelhante Verma et al., (2009) isolaram fagos para *K. pneumoniae* e no teste de suscetibilidade o vírus foi capaz de infectar sete dos 25 isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Por outro lado, Mattila et al., (2015) encontraram fagos em esgoto, entre eles vírus específicos para *E. coli* ESBL e *K. pneumoniae* ESBL. Contudo, os testes de suscetibilidade mostraram que os fagos de *E. coli* infectaram mais de uma linhagem, enquanto os fagos de *K. pneumoniae* se apresentaram mais específicos aos hospedeiros originais, contrapondo os achados do presente estudo.

Kęsik-Szeloch et al., (2013), testaram os fagos ativos de *K. pneumoniae* ESBL contra 254 amostras bacterianas pertencentes à diferentes gêneros e espécies (*Pantoea* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella mobilis* e *Klebsiella rhinoscleromatis*) e não observaram infecção viral. Apenas *Klebsiella oxytoca* foi infectada por alguns dos fagos testados. Em relação a *K. pneumoniae*, membros da família *Siphoviridae* e *Podoviridae* exibiram 7-15% da gama de infecção, enquanto os membros de *Myoviridae*

apresentaram maior espectro lítico (KĘSIK-SZELOCH et al., 2013). Weber-Dabrowska et al., (2016) em um artigo sobre a experiência no isolamento e caracterização dos bacteriófagos do seu grupo de pesquisa, apontaram que fagos de *E. coli* de sua coleção tem 86% de espectro lítico (incluindo ação contra bactérias produtoras de ESBL), enquanto os fagos ativos sobre *Klebsiella* lisaram 62% de outras bactérias com aspectos semelhantes.

No presente estudo foram utilizados cinco fagos isolados de *E. coli* ESBL, nove isolados de *K. pneumoniae* KPC, seis isolados de *K. pneumoniae* ESBL e os resultados de suscetibilidade para os fagos oriundos da mesma bactéria foram similares aos obtidos quando testados frente a outros isolados bacterianos, impossibilitando inferir alguma distinção entre os fagos isolados. Este achado pode indicar que os fagos são iguais, muito semelhantes quanto ao seu espectro de infecção ou, ainda, sugere que os próprios hospedeiros podem estar geneticamente muito próximos uns dos outros (MATTILA; RUOTSALAINEN; JALASVUORI, 2015).

O fato de os fagos não serem capazes de infectar todos os isolados bacterianos pode ser explicado pelo desenvolvimento de resistência das bactérias contra os fagos, tornando um isolado mais resistente que outro. Embora a gama de hospedeiros seja, por vezes, vinculada à presença do receptor nas bactérias alvo, restrições adicionais incluem defesas bacterianas anti-fágicas, tais como sistema CRISPR, enzimas de restrição e sistemas toxina-antitoxina (HYMAN, 2019). Vale ressaltar que a vantagem dos fagos, em contraposição aos antibióticos, é que eles são capazes de contornar a resistência criada e evoluir de forma conjunta com a bactéria hospedeira.

A titulação dos fagos ocorreu após a amplificação, iniciando pela titulação aproximada, seguido pela titulação exata. A maior titulação foi para FEC.ESBL.P1 com $1,2 \times 10^{13}$ UFP/mL e a menor para FKP.KPC.P5 com $1,0 \times 10^8$ UFP/mL. Esta etapa foi realizada apenas para os fagos de bactérias resistentes, FKP.KPC (P1.1 a P8), FKP.ESBL (P1 a P6) e FEC.ESBL (P1 a P5), pois foram os bacteriófagos utilizados na etapa de análise genômica.

O sequenciamento dos fagos é decisivo para a sua segurança como agente terapêutico, além de permitir sua caracterização detalhada. Entre as averiguações necessárias no genoma dos fagos está a presença de genes que indicam virulência, genes envolvidos na lisogenia (integrases) e ligados a resistência aos antibióticos. O sequenciamento completo do fago é um recurso aconselhado como forma de triagem de múltiplas propriedades dos vírus, permitindo a análise conjunta de diversos fatores, de forma a excluir fagos que contenham genes potencialmente nocivos (GILL; HYMAN, 2010; HYMAN, 2019; KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005).

Wang et al., (2016) analisaram fagos de *S. aureus* multirresistente por sequenciamento e verificaram características como genes envolvidos na montagem do vírion, lise e replicação de DNA, possibilitando a comparação com vírus já descritos, além de assegurar a capacidade lítica do fago. Já na análise de bacteriófagos líticos de *E. faecalis* foi encontrado um gene de metalo-beta-lactamase responsável por transmitir a resistência aos antibióticos. Assim, em razão da possibilidade de transferência horizontal de genes, o fago foi considerado inadequado para terapia (LI et al., 2014). Ciacci et al., (2018) caracterizaram um fago de *K. pneumoniae* e através do sequenciamento mostraram que o vírus não possuía genes indesejáveis, tais como integrases, genes de resistência aos antibióticos ou genes codificadores de toxinas, sendo então útil para uma perspectiva terapêutica.

O fago de *E. coli* ESBL apresentou um tamanho de 87.6Kb. Segundo o software utilizado, esse vírus mostrou maior semelhança com o fago de *E. coli* O157 typing phage 1 (COWLEY et al., 2015), com 41.6% de proteínas similares. Este pertence a ordem *Caudovirales*, família *Myoviridae*, subfamília *Ounavirinae* e gênero *Felixounavirus* (ICTV, 2020). Entre as proteínas encontradas no genoma: 27 são phage-like protein, 11 proteínas relacionadas à base da estrutura do fago, duas de capsídeo e uma de fibra da cauda.

O fago de *K. pneumoniae* ESBL apresentou o maior tamanho genômico, 176Kb e foi o mais similar a um bacteriófago já descrito na literatura (*Klebsiella* phage PMBT1), com 86.23% de proteínas similares, segundo o software utilizado. O fago PMBT1 possui 175,206 bp e 276 ORFs, e assim como o fago FKP.ESBL, foi virulento para a bactéria *K. pneumoniae* ESBL e isolado de estação de esgoto municipal localizada no norte da Alemanha (KOBBERG et al., 2017). Este pertence a ordem *Caudovirales*, família *Myoviridae*, subfamília *Tevenvirinae* e gênero *Slopekvirus* (ICTV, 2020). Devido à elevada semelhança e características comuns acredita-se que o fago FKP.ESBL possa ser uma variação do fago PMBT1. No genoma do fago FKP.ESBL 56 das proteínas descritas encontradas são phage-like protein, 12 proteínas do capsídeo, nove proteínas da fibra, nove relacionadas à base, oito proteínas de cauda, três terminases e uma associada ao portal.

Já o fago de *K. pneumoniae* KPC apresentou 101Kb e semelhança com o fago *Klebsiella* phage vB_Kp1, com 52,37% de proteínas similares. Este fago possui 40,114pb, pertence a ordem *Caudovirales*, família *Podoviridae*, subfamília *Autographivirinae* e gênero *Przondovirus* (ICTV, 2020), sendo isolado de estação de tratamento de águas residuais (NCBL, 2020). Nas proteínas do fago FKP.KPC descritas foram encontradas 32 phage-like protein, sete associadas ao capsídeo, quatro proteínas da fibra da cauda, quatro de cauda, uma proteína do pescoço, uma integrase, uma protease, três relacionadas ao portal, três da base e três terminases.

Todos os fagos sequenciados apresentaram sequências de genes relativos a estruturas ligadas a cauda, sendo proteínas do tubo, das fibras ou da base. Estas características podem indicar a relação com a ordem *Caudovirales*. A base dos bacteriófagos (*baseplate*) localizada no final da cauda, é formada por diversas proteínas estruturais. Após a ligação reversível das fibras longas com as proteínas da parede celular bacteriana, as proteínas da base sofrem mudanças conformacionais liberando as fibras curtas que são responsáveis pela ligação irreversível do fago com a bactéria, iniciando o processo de adesão e injeção do material genético na célula (LEIMAN et al., 2010). Esta contém a estrutura “*baseplate hub*”, localizada na ponta da cauda, que é a primeira a entrar em contato com a membrana que, com a ajuda de outras proteínas, irá perfurar a célula, liberar lisozimas que digerem localmente a camada de peptidoglicano, permitindo a entrada do DNA viral (LEIMAN et al., 2010).

No fago FEC.ESBL foram encontradas 11 proteínas de *baseplate* e entre os fagos que contém as mesmas proteínas estão *E. coli* O157 typing phage 1 (COWLEY et al., 2015) e dois fagos de *Salmonella* sp., (*Salmonella* phage BPS15Q2 e *Salmonella* phage BPS17W1), todos pertencentes a ordem *Caudovirales*, família *Myoviridae*, subfamília *Ounavirinae* e gênero *Felixounavirus* (ICTV, 2020). No fago FEC.ESBL não foram sequenciadas proteínas do tubo, porém estão presentes no seu genoma as proteínas das fibras.

O fago FKP.ESBL apresentou nove proteínas da base, oito proteínas associadas a cauda, assim como nove proteínas das fibras (longas e curtas) com homologia a três fagos: *Enterobacter* phage phiEap-3, *Klebsiella* phage Miro e *Klebsiella* phage PMBT1, todos pertencentes a ordem *Caudovirales*, família *Myoviridae*, subfamília *Tevenvirinae* e gênero *Slopekvirus* (ICTV, 2020). O fago também apresentou proteínas específicas de *baseplate hub*, ponta da cauda, assim como de lisoenzimas responsáveis por digerir a parede bacteriana.

Por último, o fago FKP.KPC apresentou três proteína da base, quatro proteínas da cauda e quatro das fibras, a maioria presente nos fagos *Klebsiella* phage vB_Kp1 (taxonomia *Caudovirales*; *Podoviridae*; *Autographivirinae*; *Przondovirus*) e *Salmonella* phage SEN34 (taxonomia: *Caudovirales*; *Myoviridae*; *Brunovirus*) (ICTV, 2020).

Ainda relacionado às proteínas estruturais, foram encontradas proteínas do capsídeo no genoma dos fagos. Na montagem dos vírions, primeiramente as proteínas internas da cabeça se juntam formando uma “*pro-head*” que, após, é revestida por proteínas externas do capsídeo. Também estão presentes na estrutura dos fagos: o “pescoço” no qual encontra-se o vertex que serve de portal para a entrada do DNA no capsídeo; o colar; e podem estar presentes “*whiskers*”, que ajudam na contração do tubo da cauda e na detecção de células bacterianas (CALENDAR, 2006; LEIMAN et al., 2010). No fago FEC.ESBL foram identificadas duas dessas proteínas,

uma ligada a proteína externa do capsídeo e outra ao vertex. O fago FKP.ESBL apresentou proteínas ligadas a pro-head, externas do capsídeo, whiskers e vertex. Já o fago FKP.KPC contém seis dessas proteínas, ligadas ao colar, proteínas internas e externas.

Entre as proteínas não estruturais que podem estar presentes no genoma dos bacteriófagos estão as ligadas à inativação das funções da célula hospedeira, além das relacionadas à transcrição, alongamento e estabilidade viral, controle e combinações da tradução e enzimas requeridas para a lise celular. Foram encontrados no genoma dos fagos proteínas relacionadas às três fases da replicação: *i*) genes iniciais, necessários para a síntese de DNA; *ii*) intermediários, indispensáveis para a replicação, recombinação e metabolismo de nucleotídeos; *iii*) tardios, que auxiliam na construção do capsídeo e da cauda, assim como as enzimas virais (HINTON, 2010).

No genoma do fago FEC.ESBL foi encontrado uma metiltransferase, cuja habilidade é conferir proteção contra o sistema de restrição-modificação de seu hospedeiro bacteriano (MURPHY et al., 2013). O sistema holina-endolisina foi encontrado no fago FKP.KPC e está relacionado à lise bacteriana do final do ciclo replicativo (CALENDAR, 2006). Também foi encontrado no genoma de dois fagos de *K. pneumoniae* a enzima terminase responsável pelo empacotamento do DNA. Ela corta o genoma do fago em locais definidos e media a translocação do DNA através da proteína portal para o interior do capsídeo na montagem do fago (LI et al., 2014).

No fago FKP.KPC foi encontrada a enzima integrase, responsável pela integração do DNA fágico com o DNA bacteriano, demonstrando que o fago realiza o ciclo lisogênico (fago temperado) (GROTH; CALOS, 2004). Em concordância, foi encontrado uma proteína repressora, responsável por manter o fago lisogênico no estado de latência (POXLEITNER et al., 2017). A biologia dos fagos temperados torna-os inapropriados para a fagoterapia. Após a inserção do material genético viral no hospedeiro são expressos genes que induzem a integração do genoma do fago com o da bactéria, assim como genes que suprimem a expressão genética do fago (exceto os necessários para manter no estado lisogênico) (GILL; HYMAN, 2010; MIRZAEI; MAURICE, 2017). O fago, agora designado prófago, é replicado em conjunto com a célula hospedeira, podendo permanecer neste estado por centenas de gerações antes de induzir o ciclo lítico (MIRZAEI; MAURICE, 2017; ORLOVA, 2012).

Tendo em conta os fagos e as proteínas fágicas semelhantes juntamente com a morfologia da placa de lise, é possível inferir que os fagos FEC.ESBL e FKP.ESBL pertençam à família *Myoviridae*. Em contrapartida, o fago FKP.KPC apresentou características de mais de uma família, impossibilitando alguma consideração neste sentido. Ainda assim, entende-se que

será necessária a realização de microscopia eletrônica para fins de confirmação da família dos fagos sequenciados neste estudo.

A análise do sequenciamento mostrou um número elevado de proteínas hipotéticas nos fagos analisados, sendo 67% no FEC.ESBL, 38% no fago de FKP.KPC e 64% no FKP.ESBL. As proteínas hipotéticas podem estar relacionadas ao reconhecimento do hospedeiro e interrupção do metabolismo da bactéria. A ausência dessas proteínas no banco de dados está relacionada à falta de modelos experimentais (KLUMPP; FOUTS; SOZHAMANNAN, 2013).

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, percebe-se que foi possível isolar fagos para bactérias com mecanismos de resistência aos antibióticos e avaliar a gama de hospedeiros de tais fagos, contribuindo para melhor compreensão do seu espectro de ação, etapa básica necessária para o desenvolvimento de futura aplicação. A análise genética dos fagos foi realizada com o intuito de assegurar-se a respeito da restrita atividade lítica, bem como para certificar-se de sua eficácia no controle das bactérias de interesse, ampliando sua caracterização. Neste contexto, apenas um dos fagos (FKP.KPC) apresentou a enzima integrase, confirmando o ciclo lisogênico e invalidando-o como agente para a fagoterapia. Por fim, foi constatado que os fagos sequenciados são inéditos, onde não foram lidos no sequenciamento genes que transmitam resistência e/ou elementos tóxicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDON, S. T. Bacterial ‘immunity’ against bacteriophages. **Rna Biology**, v. 9, n. 6, p. 924–937, 2012.

ACKERMANN, H.; TREMBLAY, D.; MOINEAU, S. Long-Term Bacteriophage Preservation. **WFCC Newsletter**, n. January, 2004.

ACKERMANN, H. W. Bacteriophage observations and evolution. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 4, p. 245–251, 2003.

ADAMS, M. H. Bacteriophages. p. 1–620, 1959.

ANVISA. Nota Técnica N° 01/2013. MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS MULTIRESISTENTES. **Câmara Técnica De Resistência Microbiana Em Serviços De Saúde**, p. 1–22, 2013.

ARNDT, D. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W16–W21, 2016.

AZEREDO, J.; SUTHERLAND, I. The Use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 261–266, 2008.

BRCAS. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e / ou epidemiológica. p. 1–39, 2017.

BRÜSSOW, H. Bacteriophage-host interaction: From splendid isolation into a messy reality. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 500–506, 2013.

CALENDAR, R. The bacteriophages. 2006.

CIACCI, N. et al. Characterization of vB_Kpn_F48, a newly discovered lytic bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 101. **Viruses**, v. 10, n. 9, 2018.

CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. Bacteriophages Methods and Protocols. 2009.

COWLEY, L. A. et al. Analysis of whole genome sequencing for the *Escherichia coli* O157: H7 typing phages. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, 2015.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, 2010.

DEDRICK, R. M. et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. **Nature Medicine**, v. 25, n. 5, p. 730–733, 2019.

DOWAH, A. S. A.; CLOKIE, M. R. J. Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 2, p. 535–542, 2018.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 453–464, 2017.

FURFARO, L. L.; CHANG, B. J.; PAYNE, M. S. **Applications for bacteriophage therapy during pregnancy and the perinatal period** **Frontiers in Microbiology**, 2018.

GILL, J. J.; HYMAN, P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 2–14, 2010.

GREGORACCI, G. B. Levantamento de bacteriófagos líticos: isolamento e caracterização de vírus provenientes de esgoto comum com potencial aplicação antimicrobiana. 2006.

GROTH, A. C.; CALOS, M. P. Phage integrases: Biology and applications. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 3, p. 667–678, 2004.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **Bmj**, v. 317, n. 7159, p. 657–660, 1998.

HENDRIKSEN, R. S. et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

HINTON, D. M. **Transcriptional control in the prereplicative phase of T4 development** **Virology Journal**, 2010.

HUGHES, K. A. et al. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases--novel tools for study of bacterial biofilms. **Journal of applied microbiology**, v. 85, n. 3, p. 583–90, 1998.

HYMAN, P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 35, 2019.

IACG, O. G. A. HOC DE C. I. **Não há tempo a perder: acautelar o futuro contra infecções resistentes aos medicamentos**. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_summary_PT.pdf?ua=1>. Acesso em: 29 jan. 2020.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2018b Release**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

JASSIM, S. A. A.; LIMOGES, R. G. Natural solution to antibiotic resistance: Bacteriophages “The Living Drugs”. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 8, p. 2153–2170, 2014.

KĘSIK-SZELOCH, A. et al. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Virology Journal**, v. 10, p. 1–12, 2013.

KHAL, A. EL. Isolamento e caracterização genômica de bacteriófagos quanto ao seu potencial de uso terapêutico em infecções causadas por enterobactérias. p. 1–96, 2016.

KLUMPP, J.; FOUTS, D. E.; SOZHAMANNAN, S. Bacteriophage functional genomics and its role in bacterial pathogen detection. **Briefings in Functional Genomics**, v. 12, n. 4, p. 354–365, 2013.

- KOBERG, S. et al. Genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage PMBT1 isolated from raw sewage. **Genome Announcements**, v. 5, n. 8, 2017.
- KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. BACTERIOPHAGES Biology and Applications. 2005.
- LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 317–327, 2010.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, p. 115–175, 1991.
- LEIMAN, P. G. et al. **Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers** *Virology Journal*, 2010.
- LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12S, p. S122–S129, 2004.
- LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 371–387, 2013.
- LI, X. et al. Genome analysis of *Enterococcus faecalis* bacteriophage IME-EF3 harboring a putative metallo-beta-lactamase gene. **Virus Genes**, v. 49, n. 1, p. 145–151, 2014.
- LOUREIRO, R. J. et al. Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution. **Revista Portuguesa de Saude Publica**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.
- MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2018.
- MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M. Bacteriófagos: ferramenta para controle de bactérias patogênicas. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, p. 3180, 2014.
- MATSUZAKI, S. et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 211–219, 2005.
- MATTILA, S.; RUOTSALAINEN, P.; JALASVUORI, M. On-demand isolation of bacteriophages against drug-resistant bacteria for personalized phage therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, 2015.
- MCLELLAN, S. L. et al. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 378–392, 2010.
- MILLER, A. A.; MILLER, P. F. Emerging Trends in Antibacterial Discovery: Answering the Call to Arms. 2011.
- MIRZAEI, M. K.; MAURICE, C. F. Ménage à trois in the human gut: Interactions between host, bacteria and phages. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 397–408, 2017.
- MURPHY, J. et al. Bacteriophage Orphan DNA Methyltransferases: Insights from Their Bacterial Origin, Function, and Occurrence. v. 79, p. 7547–7555, 2013.
- NCBL. *Klebsiella phage vB_Kp1, complete genome*. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT367885.1>>. Acesso em: 5 fev. 2020.

NICOLAOU, K. C.; RIGOL, S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. **Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 2, p. 153–184, 2018.

O'FLAHERTY, S.; ROSS, R. P.; COFFEY, A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria: Review article. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 801–819, 2009.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **The Review on Antimicrobial Resistance**, n. December, p. 1–16, 2014.

O'SULLIVAN, L. et al. Bacteriophage-based tools: recent advances and novel applications. **F1000Research**, v. 5, p. 2782, 2016.

ORLOVA, E. V. Bacteriophages and Their Structural Organisation. **Bacteriophages**, n. March 2012, 2012.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Inhibitor resistance in the KPC-2 β -lactamase, a preeminent property of this class a β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 890–897, 2010.

PEREZ, F. et al. THE CONTINUING CHALLENGE OF ESBLs. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, n. 5, p. 459–469, 2008.

POTTKER, E. S. Genômica e caracterização fenotípica de bacteriófagos líticos para biocontrole de salmonella enterica. 2016.

POXLEITNER, M. et al. Phage Discovery Guide. **The Science Education Alliance-Phage Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science**, 2017.

PRATA, C. et al. Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters: Virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, n. 1, p. 64–70, 2012.

RAHIMZADEH, G.; GILL, P.; REZAI, M. S. Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Phages From Sewage at a Tertiary Pediatric Hospital. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2016.

RHOADS, D. D. et al. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. **Journal of Wound Care**, v. 18, n. 6, p. 237–243, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SEED, K. D. Battling Phages: How Bacteria Defend against Viral Attack. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004847, 2015.

SILVA, J. B.; STORMS, Z.; SAUVAGEAU, D. Host receptors for bacteriophage adsorption. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, p. 2, 2016.

SOZHAMANNAN, S. et al. Molecular characterization of a variant of *Bacillus anthracis*-

specific phage AP50 with improved bacteriolytic activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6792–6796, 2008.

SU, J. Q. et al. Metagenomics of urban sewage identifies an extensively shared antibiotic resistome in China. **Microbiome**, v. 5, n. 1, 2017.

SULAKVELIDZE, A. et al. Bacteriophage Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649–659, 2001.

SULAKVELIDZE, A.; MORRIS, J. Bacteriophages as therapeutic agents. **Annals of Medicine**, v. 33, n. 8, p. 507–509, 2001.

SUNDAR, M. M. et al. Isolation of Host-Specific Bacteriophages from Sewage Against Human Pathogens. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 163–170, 2009.

SYNNOTT, A. J. et al. Isolation from Sewage Influent and Characterization of Novel *Staphylococcus aureus* Bacteriophages with Wide Host Ranges and Potent Lytic Capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4483–4490, 2009.

VERMA, V.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Characterization of a T7-Like lytic bacteriophage of *klebsiella pneumoniae* b5055: A potential therapeutic agent. **Current Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 274–281, 2009.

VOUGA, M.; GREUB, G. Emerging bacterial pathogens: The past and beyond. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 1, p. 12–21, 2016.

WANG, Z. et al. SLPW: A Virulent Bacteriophage Targeting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In vitro and In vivo. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. June, p. 1–10, 2016.

WEBER-DABROWSKA, B. et al. Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–14, 2016.

WHO. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.** Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 15 jul. 2019.

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. 5, n. 1, p. 209–218, 2014.

WONG, C. Y.; RAO, P. V.; SOON, J. M. Identification of *Klebsiella pneumoniae* in microwavable chicken curries using 16s rRNA analysis. **International Food Research Journal**, v. 25, n. April, p. 620–625, 2018.

9 ANEXOS

Anexo 1 – Antibióticos testados para as bactérias utilizadas no estudo

	Número de isolados bacterianos (n)	Amoxicilina/ácido clavulânico	Ceftazidima	Cefotaxima	Cefepima	Aztreonam	Imipenem
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	S	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i> ATCC 13706	1	S	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	5	S	S	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i>	5	S	S	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i> KPC	11	R	R	R	R	R	R
<i>E. coli</i> ESBL	11	R	R	R	R	R	S
<i>K. pneumoniae</i> ESBL	11	R	R	R	R	R	S

R: Resistente; S: Sensível.

Anexo 2 - Características das proteínas descritas do genoma do fago FEC.ESBL.P1

ORF	Grupo	Posição CDS (Start/Stop)	BLAST HIT	E-Value	Hit mais próximo	Acesso Genbak
7	Phage-like protein	3123..3371	Late promoter transcription	1.08e-43	<i>Citrobacter</i> phage Mordin	NC_041977
8	Phage-like protein	3457..3660	Cytosine-specific methyltransferase	6.99e-38	<i>Salmonella</i> phage BPS15Q2	NC_031939
11	Phage-like protein	4680..5021	RNA ligase 1	1.20e-77	<i>Escherichia coli</i> O157 typing phage 1	NC_041979
15	Phage-like protein	8069..8617	Ribonucleotide reductase A subunit	2.19e-130	<i>Escherichia coli</i> O157 typing phage 1	NC_041979
31	Phage-like protein	16062..16223	Ssdna binding protein	8.34e-33	<i>Escherichia coli</i> O157 typing phage 1	NC_041979
34	Phage-like protein	21475..22032	DNA helicase	7.62e-131	<i>Escherichia coli</i> O157 typing phage 1	NC_041979
35	Phage-like protein	22484..23218	Dsdna binding protein	4.48e-172	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_Alf5	NC_031082
36	Phage-like protein	23615..23815	DNA helicase	6.61e-40	<i>Salmonella</i> phage Si3	NC_041922
39	Plate protein	26922..27422	Base plate hub	4.38e-119	<i>Salmonella</i> phage BPS17W1	NC_042097
40	Plate protein	27422..27754	Baseplate distal hub subunit	4.47e-75	<i>Salmonella</i> phage BPS17W1	NC_042097
41	Plate protein	27766..29112	Baseplate hub subunit	0.0	<i>Salmonella</i> phage BPS17W1	NC_042097
43	Head protein	29535..30638	Major capsid protein	0.0	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-VpaE1	NC_027337
48	Phage-like protein	32564..33916	Dihydrofolate reductase	0.0	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_Alf5	NC_031082

50	Phage-like protein	34452..34850	Ribonucleotide reductase A subunit	2.06e-92	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_Alf5	NC_031082
54	Phage-like protein	38117..38458	RNA ligase 1	1.34e-79	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_Alf5	NC_031082
57	Phage-like protein	40058..40477	Sliding clamp DNA polymerase	2.16e-99	<i>Salmonella</i> phage Si3	NC_041922
58	Phage-like protein	40477..41946	3'phosphatase, 5'polynucleotide kinase	0.0	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_Alf5	NC_031082
60	Phage-like protein	42806..43108	Loader of DNA helicase	8.78e-67	<i>Salmonella</i> phage Si3	NC_041922
62	Fiber protein	44345..46729	Putative tail fiber protein	0.0	<i>Escherichia</i> phage JH2	NC_029023
63	Phage-like protein	46890..47006	Rnaseh	6.46e-20	<i>Salmonella</i> phage BPS15Q2	NC_031939
67	Phage-like protein	48854..49114	Co-chaperonin for groel	3.19e-59	<i>Salmonella</i> phage BPS17W1	NC_042097
68	Phage-like protein	49115..49630	DCMP deaminase	6.21e-116	<i>Salmonella</i> phage BPS17W1	NC_042097
69	Phage-like protein	49644..50003	3'phosphatase, 5'polynucleotide kinase	3.26e-84	<i>Salmonella</i> phage BPS17L1	NC_042096
76	Phage-like protein	53863..54054	Dihydrofolate reductase	3.91e-41	<i>Salmonella</i> phage Si3	NC_041922
77	Phage-like protein	54051..54257	Thymidylate synthetase	3.82e-43	<i>Salmonella</i> phage Si3	NC_041922
80	Phage-like protein	54749..54928	RNA ligase 1	4.00e-36	<i>Salmonella</i> phage BPS15Q2	NC_031939
82	Phage-like protein	55226..57925	Cytosine-specific methyltransferase	0.0	<i>Escherichia coli</i> O157 typing phage 1	NC_041979
87	Phage-like protein	60414..62399	Recombination endonuclease subunit	0.0	<i>Salmonella</i> phage BPS17W1	NC_042097
88	Phage-like protein	62652..62801	DCMP deaminase	7.75e-28	<i>Salmonella</i> phage Si3	NC_041922
94	Phage-like protein	66058..66813	Dsdna binding protein	0.0	<i>Salmonella</i> phage BPS17W1	NC_042097
95	Phage-like protein	66794..67117	Late promoter transcription	3.48e-76	<i>Salmonella</i> phage BPS17L1	NC_042096
99	Plate protein	70036..71109	Baseplate hub subunit	0.0	<i>Escherichia coli</i> O157 typing phage 1	NC_041979
100	Head protein	71109..71351	Membrane-associated initiation of head vertex	2.79e-53	<i>Salmonella</i> phage Mushroom	NC_041923
101	Plate protein	71344..71550	Baseplate subunit	1.28e-40	<i>Escherichia coli</i> O157 typing phage 1	NC_041979
102	Plate protein	71599..73743	Baseplate subunit	0.0	<i>Escherichia coli</i> O157 typing phage 1	NC_041979
111	Plate protein	79309..79644	Baseplate hub subunit	9.24e-77	<i>Salmonella</i> phage BPS15Q2	NC_031939
112	Plate protein	79626..79802	Baseplate distal hub subunit	2.03e-36	<i>Salmonella</i> phage Si3	NC_041922
113	Plate protein	79831..82197	Base plate hub	0.0	<i>Salmonella</i> phage BPS15Q2	NC_031939
114	Plate protein	82277..83386	Baseplate subunit	0.0	<i>Salmonella</i> phage BPS15Q2	NC_031939
116	Plate protein	84013..84708	Baseplate hub assembly protein	8.58e-172	<i>Salmonella</i> phage BPS15Q2	NC_031939
119	Phage-like protein	85550..85747	Exonuclease A	8.56e-42	<i>Salmonella</i> phage BPS17L1	NC_042096

Anexo 3 – Características das proteínas descritas do genoma do fago FKP.KPC.P1.1

ORF	Grupo	Posição CDS Start/Stop	BLAST HIT	E-Value	Hit mais próximo	Acesso Genbak
1	Phage-like protein	283..447	Host RNA polymerase inhibitor	2.00e-31	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
7	Phage-like protein	1795..2841	DNA ligase	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
10	Phage-like protein	3478..6198	DNA-directed RNA polymerase	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
11	Phage-like protein	6281..6955	Protein kinase	4.43e-117	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688

12	Phage-like protein	6983..7105	Gene 0.65 protein	5.31e-16	Enterobacteria phage T3	NC_003298
13	Phage-like protein	7137..7334	Gp0.6A	6.12e-40	<i>Klebsiella</i> phage K11	NC_011043
15	Phage-like protein	7494..7961	S-adenosyl-L-methionine hydrolase	3.14e-108	<i>Klebsiella</i> phage K5	NC_028800
16	Phage-like protein	9408..11165	DNA packaging protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
17	Phage-like protein	11162..11608	Endopeptidase Rz	5.79e-102	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
18	Phage-like protein	11705..11962	DNA packaging protein A	4.84e-55	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
19	Phage-like protein	11996..12205	Class II holin	1.22e-42	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
20	Fiber protein	12216..15269	Tail fibers protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
21	Phage-like protein	15332..19300	Internal core protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
23	Phage-like protein	19708..21963	Internal core protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
24	Phage-like protein	21963..22553	Internal core protein	4.59e-136	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
25	Phage-like protein	22556..22966	Internal core protein	8.71e-100	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
26	Fiber protein	23042..25417	Tail fiber protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
27	Fiber protein	25880..26458	Tail fiber protein	9.81e-136	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
28	Head protein	26639..27673	Capsid and scaffold protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
29	Head protein	27858..28814	Capsid and scaffold protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
30	Collar protein	28930..30537	Collar protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
31	Tail protein	30549..30809	Tail assembly protein	2.14e-52	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
34	Phage-like protein	31444..32364	Exonuclease	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
36	Phage-like protein	32564..32773	HNS binding protein	4.79e-44	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
37	Phage-like protein	32770..33054	HNS binding protein	3.59e-48	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
38	Phage-like protein	33073..35187	DNA polymerase	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
42	Phage-like protein	36275..37801	Primase/helicase protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
43	Phage-like protein	38599..39054	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	1.25e-95	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
44	Phage-like protein	39056..39505	Endonuclease	1.03e-104	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
46	Phage-like protein	39918..40340	Ssdna-binding protein	1.83e-83	<i>Klebsiella</i> phage vB_Kp1	NC_028688
50	Plate protein	43650..44303	Baseplate assembly protein	2.58e-76	<i>Salmonella</i> phage SEN34	NC_028699
52	Portal protein	44737..45393	Putative portal protein	4.50e-84	<i>Salmonella</i> phage SEN34	NC_028699
53	Head protein	45428..45955	Putative head morphogenesis protein	2.50e-57	<i>Salmonella</i> phage SEN34	NC_028699
55	Tail protein	48319..49002	Tail tape measure protein	5.83e-103	<i>Salmonella</i> phage SEN34	NC_028699
59	Head protein	50119..51060	Putative major capsid protein	4.09e-13	<i>Vibrio</i> phage vB_VchM-138	NC_019518
61	Phage-like protein	51350..52723	Putative helicase	0.0	<i>Salmonella</i> phage Fels-1	NC_010391
62	Phage-like protein	52725..53114	Putative bacteriophage DNA primase	2.40e-59	<i>Salmonella</i> phage Fels-1	NC_010391
63	Integrase	53154..54335	Integrase	0.0	<i>Salmonella</i> phage SEN34	NC_028699
67	Phage-like protein	54989..55237	Holin	8.82e-09	Enterobacteria phage phi80	NC_021190
68	Phage-like protein	55240..55770	Endolysin	3.93e-101	Enterobacteria phage mEp460	NC_019716
69	Protease	55767..55949	Putative serine protease	9.36e-14	Enterobacteria phage phiP27	NC_003356

74	Tail protein	57573..58589	Tail tape measure protein	1.40e-151	<i>Salmonella</i> phage SEN34	NC_028699
76	Phage-like protein	59503..59616	Putative Rz1 lytic protein	6.29e-10	Enterobacteria phage SfV	NC_003444
80	Phage-like protein	60840..61508	Repressor protein	1.67e-92	Enterobacteria phage IME10	NC_019501
81	Plate protein	61606..62091	Putative baseplate-related protein	2.26e-11	<i>Pseudomonas</i> phage PAK_P5	NC_022966
84	Head protein	63535..64053	Capsid scaffolding protein	3.49e-97	<i>Salmonella</i> phage RE-2010	NC_019488
85	Head protein	64070..64465	Major capsid protein	1.28e-68	<i>Salmonella</i> phage RE-2010	NC_019488
91	Phage-like protein	66638..67078	Putative phage DNA primase	3.20e-63	<i>Cronobacter</i> phage ENT39118	NC_019934
102	Head protein	71533..71955	Putative head protein	3.25e-25	<i>Aeromonas</i> phage vB_AsaM-56	NC_019527
103	Portal protein	72008..72304	Putative portal protein	2.82e-15	<i>Aeromonas</i> phage vB_AsaM-56	NC_019527
105	Plate protein	73660..74208	Baseplate assembly protein V	2.40e-93	<i>Salmonella</i> phage RE-2010	NC_019488
111	Phage-like protein	76217..76654	Putative virion structural protein	1.35e-19	<i>Agrobacterium</i> phage Atu_ph07	NC_042013
112	Phage-like protein	76756..77487	Antitermination protein	3.54e-111	<i>Cronobacter</i> phage ENT39118	NC_019934
115	Tail protein	78845..79243	P2 gpu-like tail protein	7.60e-72	Enterobacteria phage Fels-2	NC_010463
121	Terminase	80798..81496	Terminase atpase subunit	8.71e-127	Enterobacteria phage Fels-2	NC_010463
131	Terminase	86034..86534	Terminase endonuclease subunit	4.31e-59	<i>Salmonella</i> phage RE-2010	NC_019488
135	Portal protein	88528..89088	Putative portal protein	1.07e-18	<i>Aeromonas</i> phage vB_AsaM-56	NC_019527
138	Fiber protein	89890..90267	Tail fiber protein	4.08e-11	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM-VpaE1	NC_027337
141	Terminase	91271..91783	Putative terminase large subunit	1.58e-56	<i>Edwardsiella</i> phage GF-2 DNA	NC_026611

Anexo 4 – Características das proteínas descritas do genoma do fago FKP.ESBL.P2

ORF	Grupo	Posição CDS Start/Stop	BLAST HIT	E-Value	Hit mais próximo	Acesso Genbak
2	Fiber protein	3226..3753	Distal long tail fiber assembly catalyst	1.54e-127	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
3	Phage-like protein	3870..4517	Holin	6.82e-160	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
11	Phage-like protein	6950..7387	Ndd	1.24e-104	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
17	Phage-like protein	11819..13105	DNA topoisomerase II large subunit	0.0	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
30	Phage-like protein	19237..19908	Exonuclease A	4.01e-166	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
33	Phage-like protein	20523..21851	DNA helicase	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
35	Phage-like protein	22320..22856	DCTP pyrophosphatase	5.70e-132	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
44	Head protein	26680..26955	Membrane-associated initiation of head vertex	3.10e-47	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
45	Phage-like protein	26999..28435	Reca-like recombination protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
46	Head protein	28445..28765	Membrane-associated initiation of head vertex	5.84e-72	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
47	Phage-like protein	28803..29960	Co-chaperonin for groel	0.0	<i>Klebsiella</i> phage Miro	NC_041981
48	Phage-like protein	30035..32734	DNA polymerase	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
49	Phage-like protein	32781..33110	Rega	1.47e-72	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
50	Phage-like protein	33107..33394	Clamp-loader subunit	4.37e-64	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138

51	Phage-like protein	33463..33825	Rega	3.51e-84	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
52	Phage-like protein	33829..34392	Sliding clamp DNA polymerase	4.22e-133	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
53	Phage-like protein	34395..35393	Clamp-loader subunit	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
54	Phage-like protein	35452..36117	Sliding clamp DNA polymerase	4.51e-157	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
55	Phage-like protein	36144..36413	RNA polymerase binding protein	5.22e-59	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
56	Phage-like protein	36469..37440	Ssdna binding protein	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
57	Phage-like protein	37456..38067	Loader of DNA helicase	2.57e-143	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
58	Phage-like protein	38112..38357	Late promoter transcription	4.85e-54	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
60	Phage-like protein	38634..39569	Rnaseh	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
64	Phage-like protein	40984..42015	Recombination endonuclease subunit	0.0	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
66	Phage-like protein	42273..43970	Recombination endonuclease subunit	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
72	Phage-like protein	46772..47350	Dihydrofolate reductase	7.98e-138	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
74	Phage-like protein	48267..50519	Ribonucleotide reductase A subunit	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
77	Phage-like protein	52252..52392	Endonuclease II	6.96e-27	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
78	Phage-like protein	52373..53530	RNA ligase I	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
82	Phage-like protein	54313..55197	3'phosphatase, 5'polynucleotide kinase	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
86	Phage-like protein	56053..56559	DCMP deaminase	2.81e-125	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
103	Phage-like protein	62020..63549	DNA ligase	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
107	Head protein	64662..64826	Head completion protein	4.10e-32	<i>Klebsiella</i> phage Miro	NC_041981
110	Plate protein	65506..65883	Baseplate hub subunit	5.48e-88	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
111	Plate protein	65880..66989	Baseplate distal hub subunit	0.0	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
112	Fiber protein	67059..67634	Short tail fibers	2.14e-137	<i>Klebsiella</i> phage Miro	NC_041981
113	Plate protein	67637..69421	Baseplate subunit	0.0	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
114	Tail protein	69432..70505	Tail sheath stabilizer and completion protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage Miro	NC_041981
115	Plate protein	70515..71378	Baseplate subunit	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
116	Tail protein	71407..72150	Tail tube protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage Miro	NC_041981
117	Plate protein	72147..72701	Baseplate hub subunit	6.98e-136	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
118	Head protein	72702..73094	Prohead core and protease	4.55e-91	<i>Klebsiella</i> phage Miro	NC_041981
119	Head protein	73129..73584	Major capsid protein	5.31e-110	<i>Klebsiella</i> phage Miro	NC_041981
144	Fiber protein	86312..86734	Distal long tail fiber assembly catalyst	7.73e-100	<i>Klebsiella</i> phage Miro	NC_041981
146	Phage-like protein	87503..88111	Tk thymidine kinase	1.13e-149	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
190	Phage-like protein	105580..105987	Nudix hydrolase	1.22e-97	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
191	Phage-like protein	105988..106233	Nudix hydrolase	1.09e-53	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
199	Fiber protein	108769..109029	Chaperone for tail fiber formation	3.49e-53	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
200	Fiber protein	109044..109739	Chaperone for tail fiber formation	2.30e-167	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
201	Phage-like protein	109739..110269	Deoxynucleoside monophosphate kinase	5.40e-130	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
203	Phage-like protein	111464..112318	DNA end protector protein	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980

204	Head protein	112334..112801	Head completion protein	1.62e-113	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
205	Plate protein	112852..113406	Baseplate wedge subunit	8.83e-135	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
206	Tail protein	113403..115172	Baseplate hub subunit and tail lysozyme	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
207	Tail protein	115177..117243	Baseplate hub subunit and tail lysozyme	0.0	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
208	Plate protein	117275..119200	Baseplate wedge subunit	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
209	Plate protein	119281..122367	Baseplate wedge subunit	0.0	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
210	Plate protein	122368..123360	Baseplate wedge subunit	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
211	Fiber protein	123370..124233	Baseplate wedge tail fiber connector	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
212	Tail protein	124230..126047	Baseplate wedge subunit and tail pin	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
213	Tail protein	126047..126715	Baseplate wedge subunit and tail pin	1.06e-162	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
214	Phage-like protein	126725..128110	Neck protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
215	Phage-like protein	128121..129671	Fibritin neck whiskers	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
216	Fiber protein	130203..130871	Hinge connector of long tail fiber distal connector	2.28e-160	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
217	Fiber protein	130921..132045	Hinge connector of long tail fiber proximal connector	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
218	Fiber protein	132045..135818	Long tail fiber proximal subunit	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
220	Phage-like protein	136194..136475	Glutaredoxin	1.02e-63	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
223	Phage-like protein	138184..138675	Anaerobic nucleotide reductase subunit	1.02e-118	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
226	Phage-like protein	139451..139702	Anaerobic nucleotide reductase subunit	1.46e-57	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
232	Phage-like protein	143349..143831	Recombination endonuclease VII	3.45e-118	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
233	Phage-like protein	143863..144138	Thioredoxin	9.27e-63	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
234	Phage-like protein	144147..144998	DNA adenine methylase	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
236	Phage-like protein	145284..146717	Nicotinamide phosphoribosyl transferase	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
239	Phage-like protein	147542..148060	Nicotinamide phosphoribosyl transferase	3.48e-127	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
241	Phage-like protein	148625..149644	RNA ligase 2	0.0	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
242	Phage-like protein	149648..150172	Postulated decoy of host sigma70 or sigmas	2.37e-127	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
244	Phage-like protein	150530..150856	RNA ligase 2	1.10e-73	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
245	Phage-like protein	150853..151029	Postulated decoy of host sigma70 or sigmas	1.48e-34	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
251	Phage-like protein	154284..154559	Whisker protein	4.97e-62	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
254	Head protein	156269..156580	Large outer capsid protein	8.88e-73	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
255	Phage-like protein	156673..157251	Whisker protein	8.95e-137	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
256	Phage-like protein	157322..158821	Helicase	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
259	Phage-like protein	159569..159988	Uvsy	8.50e-98	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
261	Head protein	161670..163238	Major capsid protein	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
262	Head protein	163258..164046	Prohead core protein	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
263	Head protein	164079..164726	Prohead core and protease	9.58e-154	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
264	Head protein	164729..165133	Prohead core protein	2.66e-90	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980

265	Head protein	165142..165384	Prohead core and protease	2.20e-47	<i>Klebsiella</i> phage Matisse	NC_028750
266	Portal protein	165384..166958	Portal vertex protein	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
267	Tail protein	167014..167499	Tail tube protein	4.53e-118	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
268	Terminase	167548..169539	Large terminase protein	0.0	<i>Klebsiella</i> phage PMBT1	NC_042138
269	Terminase	169559..171382	Large terminase protein	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
270	Terminase	171357..171896	Small terminase protein	1.77e-129	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
271	Tail protein	171896..172720	Tail sheath stabilizer and completion protein	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
272	Phage-like protein	172801..173547	Neck protein	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
273	Phage-like protein	173557..174483	Neck protein	0.0	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
274	Phage-like protein	174522..174707	Fibritin neck whiskers	9.77e-35	<i>Enterobacter</i> phage phiEap-3	NC_041980
276	Phage-like protein	175375..176055	Clamp-loader subunit	8.49e-12	<i>Listeria</i> phage LMTA-34	NC_042048