

UNIVERSIDADE FEEVALE
Mestrado Acadêmico em Virologia

TIAGO SFREDO SCHENKEL

**ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS EM EFLUENTES
HOSPITALARES E SUA ATIVIDADE CONTRA *Pseudomonas aeruginosa* E
Acinetobacter baumannii MULTIRRESISTENTES**

Novo Hamburgo
Fevereiro de 2021

UNIVERSIDADE FEEVALE
Mestrado Acadêmico em Virologia

TIAGO SFREDO SCHENKEL

**ISOLAMENTO DE BACTERÍÓFAGOS LÍTICOS EM EFLUENTES
HOSPITALARES E SUA ATIVIDADE CONTRA *Pseudomonas aeruginosa* E
Acinetobacter baumannii MULTIRRESISTENTES**

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 2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Schenkel, Tiago Sfredo.

Isolamento de bacteriófagos líticos em efluentes hospitalares e sua atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes / Tiago Sfredo Schenkel. – 2021.

48 f.; il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Virologia) – Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2021.

Inclui bibliografia.

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

1. Bacilos. 2. Ensaio de placa. 3. Fagos. I. Título.

CDU 578

Bibliotecária responsável: Tatiane de Oliveira Bourscheidt – CRB 10/2012

UNIVERSIDADE FEEVALE
Mestrado Acadêmico em Virologia

TIAGO SFREDO SCHENKEL

**ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS EM EFLUENTES
HOSPITALARES E SUA ATIVIDADE CONTRA *Pseudomonas aeruginosa* E
Acinetobacter baumannii MULTIRRESISTENTES**

Dissertação de Mestrado aprovada pela banca examinadora em 24 de fevereiro de 2021,
conferindo ao autor o título de Mestre em Virologia.

Componentes da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Simone Ulrich Picoli (Orientador)
Universidade Feevale

Prof. Dr. Andreia Henzel
Universidade Feevale

Prof. Dr. Gabriel Corteze Netto
Centro Universitário UNICNEC

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	5
1.1.1 INFECÇÕES POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> E <i>Acinetobacter baumannii</i>	5
1.1.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE AMPLO ESPECTRO..	6
1.1.3 BACTERIÓFAGOS	10
1.1.4 RECUPERAÇÃO DE FAGOS LÍTICOS E DE BACTÉRIAS EM EFLUENTES.....	13
1.1.5 TERAPIA COM BACTERIÓFAGOS	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>P. aeruginosa</i> E <i>A. baumannii</i>	20
3.2 IDENTIFICAÇÃO E TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA (TSA).....	21
3.3 TESTES FENOTÍPICOS DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	22
3.4 PESQUISA DE PRÓFAGOS	22
3.5 COLETA DE ESGOTO HOSPITALAR.....	23
3.6 ENSAIO DE PLACA EM SOBRECAMADA DE ÁGAR	25
3.7 ISOLAMENTO DAS PLACAS DE LISE E PURIFICAÇÃO.....	25
3.8 AMPLIFICAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS	26
3.9 TESTE DE SUSCETIBILIDADE “HOST RANGE”.....	26
3.10 TITULAÇÃO DOS FAGOS.....	27
4 RESULTADOS	29
4.1 TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA.....	29

4.2 PESQUISA DE PRÓFAGOS	30
4.3 TESTES FENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA	32
4.4 ENSAIO DE PLACA, ISOLAMENTO DA PLACA DE LISE E PURIFICAÇÃO	32
4.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE “ <i>HOST RANGE</i> ”	35
4.6 AMPLIFICAÇÃO E TITULAÇÃO EXATA.....	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO.....	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

RESUMO

Um dos maiores desafios de saúde pública dos dias atuais é o tratamento de infecções severas por bactérias oportunistas multi ou panresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Antibióticos de última linha amplamente utilizados, como os carbapenens, não são mais tão eficazes devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana. Outras classes com maior poder de debelar os patógenos, como as glicilciclinas e as polimixinas, também enfrentam o aumento exponencial de resistência, gerando um contingente de pacientes cujas infecções são simplesmente intratáveis. Conhecendo os mecanismos de resistência que essas duas espécies têm desenvolvido ao longo do tempo, é urgente a busca de alternativas ao uso dos antibióticos para o tratamento de infecções por isolados multirresistentes. Dentro dessa perspectiva, o emprego dos bacteriófagos tem se mostrado promissor, pois o desenvolvimento científico-tecnológico atual possibilita o isolamento de fagos líticos vislumbrando seu emprego na terapêutica adequada. O objetivo do presente trabalho foi isolar e caracterizar bacteriófagos líticos a partir de esgoto hospitalar, avaliando sua atividade diante de isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* multirresistentes (MDR). O esgoto foi coletado de um hospital localizado no litoral norte do Estado (RS). Os 22 isolados bacterianos oriundos de dois laboratórios tiveram o seu perfil de sensibilidade aos antibióticos determinado segundo *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) para checar a condição de MDR. A pesquisa de profago foi realizada para excluir as bactérias com fagos lisogênicos. Os demais isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (12) foram expostos ao filtrado do esgoto no ensaio em sobrecamada de ágar, para isolamento de fagos líticos. Laboratorialmente, foram encontrados cinco fagos líticos específicos para *P. aeruginosa*, oriundos de três diferentes amostras, mas nenhum fago para *A. baumannii*. Pode-se observar que o esgoto hospitalar é uma fonte interessante para o isolamento de fagos líticos ativos sobre bactérias de interesse clínico, como *P. aeruginosa* MDR. A caracterização molecular de fagos apropriados para biocontrole de patógenos é essencial para qualquer tratamento à base de bacteriófagos. A perspectiva é que tais fagos possam ter aplicabilidade como agentes para o controle de infecções não-complicadas.

Palavras-chave: fagos; bacilos não-fermentadores; ensaio de placa.

ABSTRACT

One of the biggest public health challenges of today is the treatment of severe infections by multi or pan-resistant opportunistic bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Broad spectrum antibiotics, such as carbapenems, are no longer effective due to the development of mechanisms of bacterial resistance. Other classes with greater power to quell pathogens, such as glycolcyclines and polymyxins, also face an exponential increase in resistance, generating a contingent of patients whose infections are simply intractable. Knowing the resistance mechanisms that these two species have developed over time, the search for alternatives to the use of antibiotics for the treatment of infections by multidrug-resistant isolates is urgent. Within this perspective, the use of bacteriophages has been defined as promising, as the current scientific and technological development allows the isolation of lytic phages, envisioning their use in the specialty. The aim of the present study was to isolate and characterize lytic bacteriophages from hospital sewage, evaluating its activity in the presence of multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* and *A. baumannii* isolates. The sewage collected from a hospital located on the north coast of RS. The 22 bacterial isolates from two laboratories had their antibiotic sensitivity profile determined according to the *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST)* to check the condition of MDR. The prophage search was performed to exclude bacteria with lysogenic phages. The 5 isolates of *P. aeruginosa* and 7 isolates of *A. baumannii* were exposed to the sewage filtrate in the agar overlay assay, for isolation of lytic phages. In the laboratory, five specific lytic phages were found for *P. aeruginosa*, from three different samples, but no phage for *A. baumannii*. It has been demonstrated that hospital sewage is an interesting source of the isolation of active lytic phages on bacterial of clinical interest, such as *P. aeruginosa* MDR. Molecular characterization of phages suitable for biocontrol of pathogens is essential for any treatment based on bacteriophages. The perspective is that such phages may have applicability in the treatment of uncomplicated infections.

Keywords: phages; non-fermenting bacilli; lysis plate assay.

1 INTRODUÇÃO

A descoberta, comercialização e administração de antibióticos, considerado uma das grandes invenções médicas da história, revolucionou a medicina moderna, alterando o paradigma terapêutico e dando sobrevida e cura a milhões de pacientes por décadas. Infelizmente o avanço da resistência bacteriana, considerado pela Organização das Nações Unidas – ONU, como um dos três maiores desafios em saúde pública do século 21, tem ameaçado vidas e colocado a comunidade médica em alerta. Além da associação com o aumento da mortalidade, a resistência antimicrobiana traz um impacto econômico de mais de 20 bilhões de dólares por ano somente nos Estados Unidos, com uma projeção de perdas na casa de 100 trilhões de dólares no mundo todo em 2050 (MUNITA; ARIAS, 2016).

A multirresistência é bastante comum entre bacilos Gram-negativos, em particular entre espécies clinicamente relevantes e essencialmente nosocomiais, tais como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. A definição de MDR (*multi-drug resistant*, ou multirresistente) é a não-sensibilidade bacteriana adquirida a pelo menos um agente em três ou mais classes de antibióticos. Normalmente, tais bactérias possuem vários mecanismos de resistência que podem, inclusive, levar a panresistência (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; VICKERS et al., 2018). Como consequência, infecções por MDR levam a uma redução nas opções terapêuticas e um desfecho desfavorável especialmente ao paciente crítico e imunocomprometido infectado por *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (BASSETTI et al., 2018; HAIDAR et al., 2017).

P. aeruginosa e *A. baumannii* são bactérias notoriamente conhecidas pela sua virulência e plasticidade genética, que permitem rapidamente a incorporação de novos mecanismos de resistência a praticamente todas as classes de antibióticos, desde beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, passando por antibióticos de último recurso como as polimixinas (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; VANEGAS-MÚNERA; RONCANCIO-VILLAMIL; JIMÉNEZ-QUICENO 2014; TOUSSAINT; GALLAGHER, 2015).

A terapia com bacteriófagos tem despertado interesse nas últimas décadas como alternativa à crescente onda de resistência bacteriana frente aos antibióticos, uma vez que a fagoterapia emprega fagos líticos com atividade para bactérias específicas, principalmente as com amplo espectro de resistência (CISEK et al., 2017; MACIEJEWSKA; OLSZAK; DRULIS-KAWA, 2018; BAHARUDDIN et al., 2017).

Bacteriófagos são vírus que possuem a capacidade de infectar somente procariotos, utilizando todo maquinário bioquímico bacteriano em seu favor. Descobertos de maneira independente por Twort em 1915 e por d'Hérelle em 1917, são os agentes mais abundantes do planeta e desempenham papel fundamental no equilíbrio microbiano (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014; ORLOVA, 2012; KURTBOKE, 2012). Os bacteriófagos são facilmente recuperados de esgoto, fezes e do solo, e seus números são tipicamente de 3 a 10 vezes maiores do que as contagens bacterianas, embora ocorram variações entre os ecossistemas (KURTBOKE, 2012; WHITHEY et al., 2005).

Assim como os demais vírus, os fagos são intracelulares obrigatórios e são divididos de acordo com o tipo de ciclo desenvolvido ao infectarem as bactérias: lítico ou lisogênico (ORLOVA, 2012; APREA et al., 2015). Para o emprego da fagoterapia, o interesse recai entre os fagos que realizam o ciclo lítico, especialmente os pertencentes à três famílias da ordem *Caudovirales*: *Myoviridae*, *Syphoviridae* e *Podoviridae* (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014; HARPER; ANDERSON; ENRIGHT, 2011).

No ciclo lítico, o fago realiza a adsorção à membrana externa bacteriana, libera seu DNA induzindo alterações na síntese proteica bacteriana visando a produção de novos fagos. Esta dinâmica consome praticamente todos os recursos celulares, levando a bactéria ao enfraquecimento, colapso e consequente lise, liberando os fagos no espaço extracelular. Estes irão infectar novas células e repetir o ciclo de replicação viral (ORLOVA, 2012, HARPER; ANDERSON; ENRIGHT, 2011).

Diante do exposto, o presente estudo buscou isolar bacteriófagos, a partir de esgoto hospitalar, que apresentassem atividade lítica sobre isolados multirresistentes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. A perspectiva é que a descoberta de fagos ativos sobre a bactéria possa contribuir para o melhor conhecimento desses vírus, representando uma alternativa futura em terapias isoladas, coquetéis de fagos ou como adjuvantes no tratamento de infecções não-complicadas por bactérias MDR.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 INFECÇÕES POR *Pseudomonas aeruginosa* E *Acinetobacter baumannii*

Um dos mais importantes desafios para os médicos é o tratamento eficaz das infecções causadas por bacilos Gram-negativos (BGNs) devido ao aumento da resistência antimicrobiana. Entre os BGNs envolvidos em infecções, *P. aeruginosa* tem um papel importante, especialmente em pacientes críticos e imunocomprometidos, pois a resistência aos antimicrobianos leva a uma séria restrição de opções terapêuticas (BASSETTI et al., 2018), somado ao prognóstico desfavorável nas infecções por cepas multirresistentes (HAIDAR et al., 2017). Além da virulência da própria bactéria, o desfecho da infecção é modulado por fatores relacionados ao tratamento (demora para instituir a terapia, utilização prévia de antibióticos) e também ao hospedeiro (doenças de base, colonização do trato digestivo, fonte da infecção e/ou severidade da apresentação da fase aguda da doença). *P. aeruginosa* também é a maior causa de bacteremia nosocomial, com uma taxa de mortalidade associada superior a 30% (JUAN; PEÑA; OLIVER, 2017).

Outra importante bactéria associada às infecções nosocomiais é *A. baumannii*. Tal microrganismo possui duas características críticas: habilidade de sobreviver em superfícies animadas e inanimadas por longos períodos (até 5 meses) podendo causar agravos endêmicos, e resistência a múltiplos antibióticos, incluindo os carbapenens, o que complica o tratamento (MARTÍN-ASPAS et al., 2018; ZHANG et al., 2017). Estima-se que, anualmente, há 45.000 casos de infecções por *A. baumannii* nos Estados Unidos, sendo 7.300 por MDR, resultando em 500 óbitos por ano, além de 1 milhão de casos em todo mundo (LOGAN et al., 2018). A propagação mundial de *A. baumannii* MDR, em especial os isolados resistentes aos carbapenens, é entendida como um fenômeno clonal. Em estudo molecular de meados dos anos 2.000, descobriu-se que metade dos 500 isolados de MDR coletados em todo o mundo pertenciam ao Clone Europeu II, também chamado de *Worldwide Clone 2* (DOI; MURRAY; PELEG, 2015).

Diante das opções terapêuticas disponíveis atualmente para tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, aquelas que são utilizadas em maior escala e que ainda apresentam menores taxas de resistência são a piperacilina-tazobactam, ceftazidima, aminoglicosídeos e carbapenens. Notadamente, isolados oriundos de escarro e sangue mostraram maior resistência

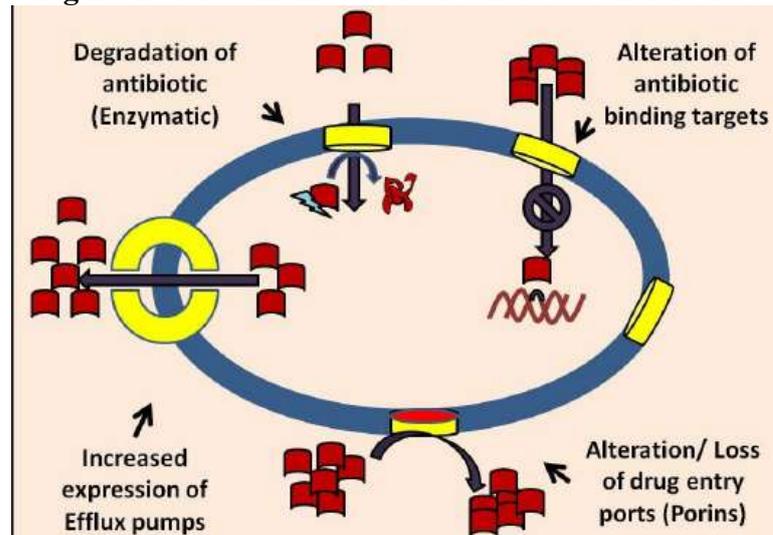
aos carbapenens comparado a isolados de outros sítios, sugerindo a necessidade de cautela na escolha do antibiótico utilizado para tratar infecções do trato respiratório (XIE et al., 2017). Mesmo a combinação de carbapenens ou piperacilina-tazobactam com adjuvantes no tratamento de infecções graves, como os aminoglicosídeos, se mostrou dificultosa devido à resistência cruzada entre essas classes de antimicrobianos (FIGUEIREDO et al., 2007).

Para o tratamento de infecções por *A. baumannii* multirresistentes atualmente não há consenso estabelecido. Vários antibióticos têm sido utilizados e percebe-se que a terapia combinada de colistina com sulbactam ou tigeciclina tem trazido benefícios adicionais no sucesso terapêutico do que o uso da colistina de maneira isolada, devido ao seu potencial nefrotóxico (KENGKLA, 2018).

1.1.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE AMPLO ESPECTRO

As bactérias em geral possuem marcante plasticidade genética que as permite responder a uma ampla gama de ameaças ambientais, inclusive os antibióticos. *A. baumannii* e *P. aeruginosa* ocupam um importante espaço entre as bactérias multirresistentes predominantemente isoladas em ambiente hospitalar, pelo fato de incorporarem com rapidez novos mecanismos de resistência. A resistência a múltiplas classes de antibióticos, em especial às cefalosporinas e carbapenems, está crescendo mundialmente (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016).

A partir de uma perspectiva evolucionária, a bactéria utiliza duas principais estratégias para evadir aos antibióticos. Primeiramente, a mutação em genes associados com a ação do fármaco, decorrendo de um dos seguintes mecanismos: *i*) alteração no sítio de ação, diminuindo a afinidade pela droga; *ii*) diminuição da absorção do fármaco por alteração nas porinas; *iii*) ativação de bombas de efluxo para expelir as moléculas nocivas à bactérias; *iv*) ou degradação enzimática (Figura 1). Em segundo lugar, pode também ocorrer a aquisição de DNA exógeno, através da transferência horizontal de genes (THG), que ocorre através de 3 estratégias principais: *i*) transformação, pela incorporação de DNA nu; *ii*) transdução, mediada por fagos e, *iii*) conjugação com outro DNA bacteriano por plasmídeos ou transposons (MUNITA; ARIAS, 2016; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; ANDERSEN, 2015).

Figura 1 - Mecanismos de resistência aos antibióticos

Fonte: ANDERSEN, 2015.

Os principais mecanismos de resistência encontrados em *A. baumannii* e *P. aeruginosa* conferem resistência a beta-lactâmicos (compreendem as classes de beta-lactamases A, B, C e D de Ambler) (Tabela 1), aminoglicosídeos (metilação do RNA ribossomal), fluoroquinolonas (mutação de topoisomerasas e bombas de efluxo), tigeciclina (também bombas de efluxo) e colistina (alteração na biossíntese de lipopolissacarídeos) (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; VANEGAS-MÚNERA; RONCANCIO-VILLAMIL; JIMÉNEZ-QUICENO 2014; TOUSSAINT; GALLAGHER, 2015).

Tabela 1 – Classificação das beta-lactamases segundo Ambler

Type	Ambler Molecular Class	Characteristics	Examples of Enzymes
Narrow-spectrum β -lactamases ^{12,18,19}	A	Hydrolyze penicillin; produced primarily by <i>Enterobacteriaceae</i>	Staphylococcal penicillinase, TEM-1, TEM-2, SHV-1
Extended-spectrum β -lactamases ²⁰	A	Hydrolyze narrow and extended-spectrum β -lactam antibiotics	SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
Serine carbapenemases ²⁰	A	Hydrolyze carbapenems	KPC-1, IMI-1, SME-1
Metallo- β -lactamases ^{21,22}	B	Hydrolyze carbapenems	VIM-1, IMP-1, NDM-1
Cephalosporinases ^{10,23,24}	C	Hydrolyze cephamycins and some oxyimino β -lactams; inducible; chromosomally mediated	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
OXA-type enzymes ²⁵⁻²⁷	D	Hydrolyze oxacillin, oxyimino β -lactams, and carbapenems; produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA enzymes

Fonte: TOUSSAINT; GALLAGHER, 2015.

Beta-Lactamases de Espectro Ampliado – ESBL's (Classe A de Ambler)

Essas enzimas são produzidas por algumas bactérias, que hidrolisam as pontes de amido dos anéis beta-lactâmicos. Confere resistência às penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e monobactams, mas possui modesta ou nenhuma atividade contra cefamicinas e carbapenems. As mais comuns em *A. baumannii* e *P. aeruginosa* são os subtipos PER-, GES- e VEB-, e

raramente TEM- e SHV- (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016; PATHAK et al., 2017).

Carbapenemases (Classe A de Ambler)

Chamadas de serina-carbapenemases, essas enzimas levam a uma diminuição da expressão de porinas na membrana, que são os canais por onde os carbapenems penetram na célula bacteriana. Confere resistência aos beta-lactâmicos e são inibidos por ácido clavulânico e tazobactam; hidrolisam o aztreonam, mas não as cefamicinas. As mais comumente encontradas nos não-fermentadores são a KPC e algumas variantes de GES-, como GES-5 e GES-18 (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015). No Brasil já foram identificadas as variantes GES-1, GES-5 e GES-11 (SILVA JÚNIOR et al., 2017).

Metallo-beta-lactamases – MBL's (Classe B de Ambler)

As MBL's são capazes de hidrolisar os carbapenens e outros beta-lactâmicos, com exceção dos monobactams, sem serem inibidas pelos inibidores de beta-lactamase. Sua capacidade de atacar os anéis beta-lactâmicos se dá pela utilização íons como cofator, principalmente o zinco. Pouco frequentes em *A. baumannii*, as enzimas mais comumente identificadas são IMP-, VIM-, SIM- e NDM-. Em *P. aeruginosa*, além dos anteriores, soma-se a SPM- (específica dessa espécie) e GIM- (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015).

Cefalosporinases (Classe C de Ambler)

Tanto *A. baumannii* quanto a *P. aeruginosa* naturalmente possuem um gene que codifica uma cefalosporinase do tipo AmpC, capaz de conferir resistência a todas penicilinas e beta-lactâmicos, incluindo cefamicinas, não sendo inibida pelo ácido clavulânico e possuindo pouca ação contra o aztreonam. Entretanto, normalmente o gene que codifica a AmpC está reprimido e com a exposição a baixas concentrações de antibióticos beta-lactâmicos – particularmente o imipenem – ocorre a produção reversa dessa enzima (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015).

Oxacilinases (Classe D de Ambler)

Diferentemente das penicilinases de classe A, as oxacilinases hidrolisam as oxacilinas, como o nome sugere. Muitas variantes são conhecidas, incluindo enzimas com a capacidade de

degradar cefalosporinas de terceira geração (por exemplo a OXA-11 da *P. aeruginosa*) e carbapenens, como a OXA-23 do *A. baumannii*, espécies nas quais são particularmente prevalentes. Inclusive, isolados dessa última que carregam enzimas OXA- normalmente apresentam alta resistência aos carbapenens devido à presença de outros mecanismos de resistência, como mutação das porinas ou bombas de efluxo. A maioria das oxacilinases de espectro ampliado é codificada por plasmídeos ou integrons, o que contribui para uma disseminação em nível global de maneira muito rápida (MUNITA; ARIAS, 2016; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; SIMNER et al., 2017; GOKMEN et al., 2016). Nos últimos anos, se observou a disseminação da variante OXA-24 no Brasil (ROCHA et al., 2017).

Ampla resistência a aminoglicosídeos e fluoroquinolonas

Aminoglicosídeos são amplamente utilizados no tratamento de infecções severas, e os mecanismos de resistência mais comuns são a metilação do RNA ribossomal, além da bomba de efluxo e diminuição da permeabilidade da membrana. Cepas de *A. baumannii* normalmente possuem o gene *ArmA* que codifica enzima responsável por alta resistência aos aminoglicosídeos, frequentemente identificada em OXA-23. Além de *ArmA*, isolados de *P. aeruginosa* expressam principalmente as enzimas AAC que conferem resistência a todos os aminoglicosídeos, exceto estreptomicina (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; VANEGAS-MÚNERA; RONCANCIO-VILLAMIL; JIMÉNEZ-QUICENO, 2014).

O mecanismo de resistência às fluoroquinolonas conhecido para as espécies acima são as mutações no sistema de regulação das bombas de efluxo e no gene *gyrA*, que codifica a DNA-girase e/ou topoisomerase IV (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; MUNITA; ARIAS, 2016; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015).

Resistência a tigeciclina e polimixinas

A tigeciclina, um semissintético derivado da minociclina, possui boa atividade contra *A. baumannii* e bons resultados clínicos têm sido reportados. Entretanto, há casos de resistência, possivelmente pela modulação positiva da bomba de efluxo AdeABC (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; VANEGAS-MÚNERA; RONCANCIO-VILLAMIL; JIMÉNEZ-QUICENO, 2014).

Colistina (Polimixina E), é um antibiótico policatiônico de polipeptídeos cíclicos, que interage com a membrana externa bacteriana lipopolissacarídica (LPS), solubilizando-a e alterando sua permeabilidade (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; ZHANG et al.,

2017). Anteriormente utilizada nas décadas de 1960 e 1970, as polimixinas acabaram sendo abandonadas devido à sua toxicidade, mas acabaram sendo reintroduzidas como último recurso terapêutico no tratamento de infecções graves por *Acinetobacter* sp. e *P. aeruginosa*. Entretanto, isolados panresistentes, incluindo aqueles resistentes a colistina, já foram observados, causando infecções possivelmente não-tratáveis (BECEIRO et al., 2013). Dois diferentes mecanismos de resistência à colistina foram caracterizados em *A. baumannii*: um envolve a completa inativação do caminho biossintético do Lipídeo A e perda da superfície do LPS. O outro é a mutação nos genes *pmrA* ou *pmrB*, que modificam as regiões do LPS em que se encontram o lipídeo A (VANEGAS-MÚNERA; RONCANCIO-VILLAMIL; JIMÉNEZ-QUICENO, 2014; BECEIRO et al., 2013).

1.1.3 BACTERIÓFAGOS

São chamados de bacteriófagos os vírus que infectam as bactérias e usam os seus recursos. A palavra “bacteriófago” vem do latim *comer bactéria*, isso porque bacteriófagos podem lisar completamente algumas bactérias. Frequentemente chamados de *fagos*, foram descobertos em 1915 por Frederick William Twort e também descritos e devidamente classificados por Félix Hubert d’Hérelle em 1917, através da observação da lise de culturas de *Shigella* com a adição de um filtrado livre de bactérias obtido a partir do esgoto. Além de cunhar o termo *bacteriófago*, este último postulou sobre a multiplicação intracelular dos vírus e introduziu a fagoterapia no tratamento de doenças infecciosas (KURTBOKE, 2012; ACKERMANN, 2003; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014; ORLOVA, 2012).

Assim como as bactérias, os bacteriófagos são ubíquos e estão diretamente relacionados com a quantidade de bactérias presente no ambiente. Representam a forma de vida mais abundante do planeta com uma estimativa de 10^{32} bacteriófagos, sendo de 10^4 a 10^8 vírions por mililitro nos sistemas aquáticos e cerca de 10^9 vírions por grama no solo. Além disso, desempenham um importante papel na manutenção do equilíbrio microbiano do planeta e são facilmente encontrados no solo, fezes e esgoto (KURTBOKE, 2012; WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

No início do século passado, a utilização experimental dos bacteriófagos na fagoterapia levou a muitos anos de resultados variáveis, por motivos como dificuldades no entendimento da biologia dos fagos, técnicas inadequadas, entre outros. Adicionalmente, a instauração da

antibioticoterapia nos anos 40 levou a um concomitante declínio em seu uso como alternativa terapêutica. Entretanto, a última década demonstra o ressurgimento no interesse pela utilização dos fagos como agentes antibacterianos, com o desenvolvimento do sequenciamento genômico das espécies e compreensão maior do seu potencial nessa tarefa (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009).

Caracterização e mecanismo de infecção por bacteriófagos

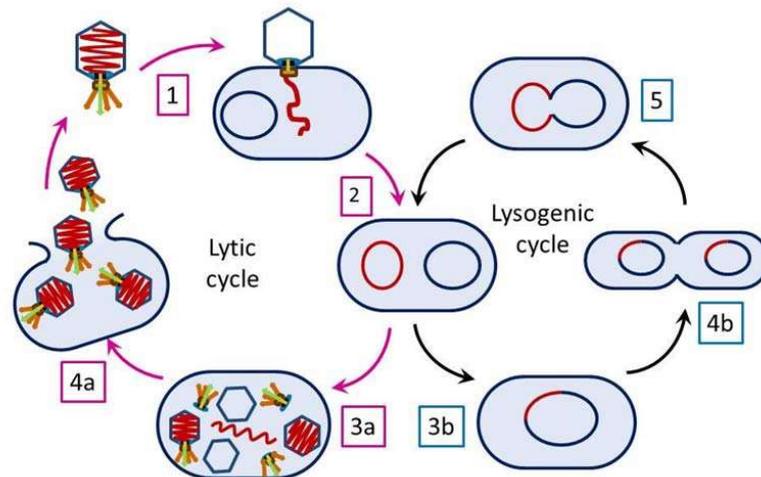
Bacteriófagos são vírus que reconhecem as bactérias como seus hospedeiros específicos, atuando como um parasita intracelular obrigatório. Todos os fagos conhecidos podem ser divididos em dois grupos principais, de acordo com o tipo de infecção que causam às bactérias: através do ciclo lítico ou do ciclo lisogênico (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014; ORLOVA, 2012; APREA et al., 2015).

Fagos líticos são inimigos naturais dos procariotos, pois uma vez que tenham infectado a célula, a lise é a consequência final de sua replicação (APREA et al., 2015). No ciclo lítico, a liberação do DNA do fago induz a mudança no maquinário proteico da bactéria em seu próprio benefício, para produção de 50 a 200 novos fagos em questão de poucos minutos, o que requer praticamente todos os recursos celulares, levando ao enfraquecimento e rompimento da bactéria, com subsequente liberação dos novos fagos no espaço extracelular (ORLOVA, 2012; HARPER; ANDERSON; ENRIGHT, 2011).

Já o ciclo lisogênico é caracterizado pela integração do DNA do fago ao genoma do hospedeiro (que pode ocorrer também por plasmídeo) e consequente replicação do DNA bacteriano com o genoma viral a ser herdado pelas novas bactérias (Figura 2). Essa transmissão pode ser levada a muitas gerações de bactérias sem qualquer dano metabólico, permanecendo em estado latente. Entretanto em determinado momento, através de algum evento externo como mudanças ambientais, alteração no metabolismo ou danos por agentes químicos, o fago pode reverter seu ciclo para o lítico, liberando novos fagos (ORLOVA, 2012; HARPER; ANDERSON; ENRIGHT, 2011; MIRZAEI; MAURICE, 2017).

Apesar de já terem sido descritos mais de 6 mil diferentes bacteriófagos, para a fagoterapia é mandatório o uso de fagos líticos, representados principalmente por 3 famílias da ordem *Caudovirales*, caracterizados por possuírem cauda e fita dupla de DNA (dsDNA): *Myoviridae* (com cauda longa, rígida e contrátil), *Syphoviridae* (cauda longa, flexível e não contrátil) e *Podoviridae* (cauda curta e não contrátil) (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014; HARPER; ANDERSON; ENRIGHT, 2011). A classificação taxonômica das famílias integrantes à ordem *Caudovirales* pode ser observada na Figura 3 (ICVT, 2021).

Figura 2 – Os dois principais ciclos de replicação dos fagos

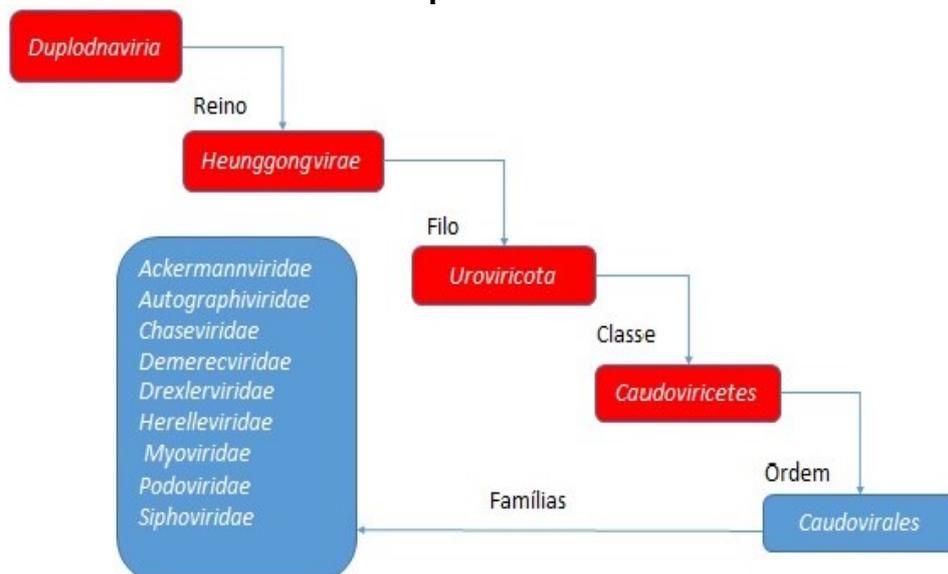


1- Fago se liga à célula hospedeira e injeta DNA (adsorção); 2- Fago entra no ciclo lítico ou lisogênico; 3a- DNA de novos fagos e proteínas são sintetizadas e vírions são montados; 4a- Lise celular e liberação de vírions; 3b e 4b- passos do ciclo lisogênico: integração do genoma do fago com o cromossomo bacteriano (prófago) com reprodução bacteriana normal; 5- Sob certas circunstâncias o prófago se separa do cromossomo bacteriano e inicia o ciclo lítico.

Fonte: ORLOVA, 2012.

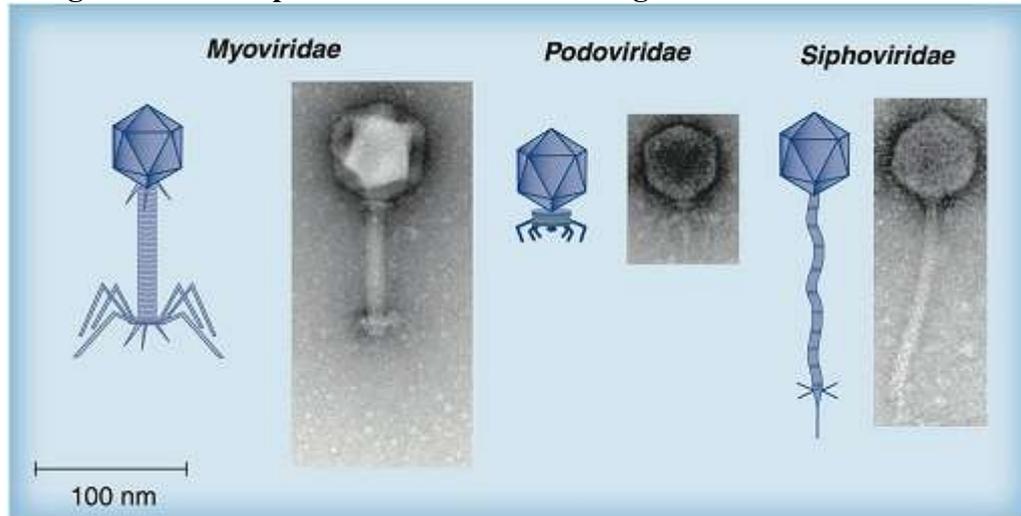
A descrição geral desses fagos pode ser resumida da seguinte forma: o material genético está contido dentro de uma cápsula protéica (capsídeo) de forma icosaédrica; sua cabeça é conectada a cauda através de um colar que pode ser contrátil ou não e cuja extremidade distal está em contato com fibras da cauda que reconhecem e se conectam a sítios nos receptores da superfície da célula bacteriana (Figura 4) (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

Figura 3 – Taxonomia das famílias pertencentes à ordem *Caudovirales*



Fonte: ICTV, 2021.

Figura 4 – Principais famílias de bacteriófagos da ordem *Caudovirales*



Fonte: HARPER; ANDERSON; ENRIGHT, 2011.

1.1.4 RECUPERAÇÃO DE FAGOS LÍTICOS E DE BACTÉRIAS EM EFLUENTES

Além da reconhecida aplicação na área médica, a utilização de bacteriófagos tem se estendido ao controle de infecções bacterianas na piscicultura, agricultura e no tratamento de animais domésticos. Um dos maiores avanços no uso de fagos como agentes de biocontrole ocorreu em 2006 quando o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso de um coquetel com 6 fagos, chamado LMP-102, para utilização no controle de contaminação por *Listeria monocytogenes* em carnes prontas para consumo nos Estados Unidos (O'FLAHERTY; ROSS; COFFEY, 2009; WHITHEY et al., 2005).

Para todas essas aplicações, os fagos precisam ser isolados da natureza. Considerados abundantes e ubíquos, os bacteriófagos são facilmente recuperados de esgoto, fezes e do solo, e seus números são tipicamente de 3 a 10 vezes maiores do que as contagens bacterianas, embora ocorra variações entre os ecossistemas (KURTBOKE, 2012; WHITHEY et al., 2005).

O objetivo primordial de uma estação de tratamento de esgoto é remover plásticos, reduzir carga microbiológica, química e biológica, direcionando o efluente a um local seguro. Entretanto, o processo de tratamento não remove ou inativa todos os microrganismos patogênicos. A depender de fatores ambientais, como temperatura, umidade, luz solar, os patógenos predominantemente encontrados no esgoto são bactérias como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Vibrio* sp., vírus (adenovírus, enterovírus, hepatovírus),

protozoários como *Cryptosporidium* sp. e *Giardia lamblia* e helmintos como *Ascaris lumbricoides* e *Taenia* sp. (GAUTAM et al., 2018).

Um estudo realizado no Nepal em 2017, que buscou isolar bactérias patogênicas e bacteriófagos provenientes de mesma estação de esgoto, demonstrou a capacidade dos fagos infectarem *Enterococcus faecalis*, *E. coli* e *Salmonella Typhi*. Em contra-partida, os fagos não foram ativos em isolados de *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *P. aeruginosa*. Efetivamente, esses isolados bacterianos que não foram lisados possivelmente não possuíam um receptor compatível com os bacteriófagos presentes na amostra, ou os fagos apresentavam somente o ciclo lisogênico (GAUTAM et al., 2018).

Um estudo recente divulgou o isolamento de 2 fagos líticos a partir de esgoto de um hospital iraniano. Segundo a microscopia eletrônica, um deles pertencia à família *Myoviridae* e outro à *Podoviridae*. Em contato com 43 isolados multirresistentes de *A. baumannii*, 27% demonstraram sensibilidade aos fagos. Tais fagos foram testados contra uma diversidade de outros microrganismos patogênicos, como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. faecalis*, sem qualquer sinal de sensibilidade, o que demonstra um grau de especificidade dos fagos contra receptores bacterianos (GHAJAVAND et al., 2017).

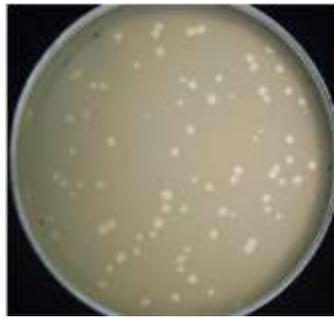
Estudos brasileiros demonstraram que esgotos hospitalares não tratados são graves problemas de saúde pública, pois apresentam níveis mais elevados de bactérias multirresistentes do que efluentes derivados de outras fontes, sugerindo uma pressão seletiva no desencadeamento de genes de resistência. Em amostras de efluente hospitalar e de uma rede de tratamento de esgoto no Espírito Santo foram isoladas *P. aeruginosa* multirresistentes de ambos os locais (SILVA JÚNIOR et al., 2014). Em um hospital gaúcho, das 30 cepas de *Acinetobacter* sp. isoladas do esgoto hospitalar, 60% foram consideradas resistentes, com produção de ESBL e metalo-beta-lactamase. A presença de bactérias com diferentes mecanismos de resistência atenta para a importância de um programa bem instituído de tratamento de efluente hospitalar para redução da disseminação dessas cepas para o meio ambiente (GUSATTI et al., 2009).

Isolamento laboratorial de fagos líticos

A técnica utilizada para detecção de bacteriófagos líticos baseia-se no método da placa de lise. Primeiramente, deve ser feito o isolamento e purificação da amostra que deve conter os fagos, inoculando-a em caldo de crescimento (normalmente *Brain Heart Infusion* - BHI) e incubando-a a 37°C por 24 horas. Posteriormente, deve ser feita a centrifugação a 5.500g por 10 minutos para remoção de materiais sólidos, e o sobrenadante é filtrado em membrana de

0,22 μm para o isolamento do fago. Esse filtrado é misturado ao inóculo da bactéria frente a qual se deseja testar e misturado em agar semi-sólido a 45°C. Essa mistura é depositada sobre uma camada de agar sólido em placa de Petri, que fornecerá os nutrientes para o desenvolvimento tanto da bactéria quanto do fago. Aguarda-se o esfriamento e incuba-se por 18 a 24 horas a 37°C. A ação lítica do fago é determinada através da presença de zonas claras no meio do crescimento bacteriano, indicando uma lise completa, como demonstrado na Figura 5 (JALIL et al., 2017; KARUMIDZE et al., 2012).

Figura 5 – Técnica de ensaio de placa



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

1.1.5 TERAPIA COM BACTERIÓFAGOS

Devido às dificuldades cada vez maiores no controle de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, o interesse terapêutico dos bacteriófagos tem sido trazido à tona nos últimos anos, seja ele utilizado sozinho ou combinado com tratamentos antibacterianos convencionais (CISEK et al., 2017; MACIEJEWSKA; OLSZAK; DRULIS-KAWA, 2018). A fagoterapia é definida como o emprego de bacteriófagos líticos para reduzir a atividade de bactérias específicas, principalmente as de amplo espectro de resistência, e pode consistir de um único fago, coquetéis de fagos, além de lisinas e holinas provenientes dos fagos (BAHARUDDIN et al., 2017).

O emprego dos bacteriófagos no tratamento de diversas infecções no início do século passado demonstrava a confusão e desconhecimento sobre o que eram os fagos e como eles atuavam. A exemplo disso, o material de divulgação de um laboratório farmacêutico de Londres (Figura 6) atribuiu erroneamente o termo “enterofagos” para os vírus presentes em sua formulação, além de afirmarem que o produto era indicado para o tratamento de doenças de

etiologia não-bacteriana como herpes, urticária e cálculos biliares (HARPER; ANDERSON; ENRIGHT, 2011).

Figura 6 – Material publicitário sobre uso de “enterofagos”

BACTERIOPHAGE THERAPY is indicated for—
APPENDICITIS, BACILLARY DYSENTERY, B. COLI INFECTIONS,
COLITIS, CONSTIPATION, DIARRHOEAS (Infantile, Senile, T.B.,
Mentally uncontrolled), ENTERITIS, ENTERO-COLITIS, FERMENT-
ATIONS, GALLSTONES, PARA-INTESTINAL INFECTIONS (Eczema,
Furunculosis, Herpes, Urticaria), PARATYPHOID FEVER, PERI-
TONITIS, SHELLFISH POISONING, TYPHOID FEVER, and all
bacterial infections due to the pathogenic microbes indicated.

ENTEROFAGOS POLYVALENT BACTERIOPHAGES.

Clear broth filtrate for ORAL administration	} Box of 50 ampoules 22/6
Non-peptone filtrate for INJECTION ...	
	" 10 " 5/-
	" 5 " 2/-
	(less professional discount)

Medico-Biological Laboratories, Ltd.
Cargreen Road
SOUTH NORWOOD, LONDON, S.E.25

Telegrams: Biomedic. Westner, London Telephone: LIVINGSTONE 3628

Fonte: HARPER; ANDERSON; ENRIGHT, 2011.

Contudo, o emprego de novas tecnologias no estudo dos fagos em nível microbiológico e molecular levou a possibilidade de conhecer melhor as relações de especificidade entre esses vírus e seus hospedeiros, fator imprescindível na resolutividade de questões práticas envolvendo as infecções bacterianas em humanos (ORLOVA, 2012). Observou-se que a utilização de fagos líticos da ordem *Caudovirales* seriam os mais indicados para a fagoterapia (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014).

Mesmo sendo utilizados por décadas na Europa oriental, em países como Geórgia, Polônia e União Soviética, até 2005 não existiam estudos sobre a segurança da administração de fagos em humanos. Naquele ano foi publicado trabalho no qual pacientes receberam fagos por via oral em altas concentrações, sem ocorrência de qualquer evento adverso. Em 2006, o FDA aprovou um ensaio clínico de fase I com 42 pacientes com úlceras cutâneas para avaliar a eficácia de um coquetel de 8 fagos capazes de lisar *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, com resultados excelentes em termos de segurança e eficácia terapêutica (DEBARBIEUX et al., 2010; REINA; REINA, 2018). Recentemente foram criados em laboratório fagos geneticamente editados, com um sistema de edição gênica CRISPR/Cas, capaz de detectar genes bacterianos de resistência e inativá-los. Por último, a Sociedade Americana de Microbiologia apresentou, em 2013, planos de utilização de fagos em pacientes queimados (REINA; REINA, 2018; BAHARUDDIN et al., 2017).

Há três grandes características que distinguem a fagoterapia da antibioticoterapia: os bacteriófagos multiplicam-se no local da infecção, atacam somente o hospedeiro específico, preservando a microbiota comensal, e podem se adaptar a bactérias resistentes (DEBARBIEUX et al., 2010). Ao contrário do que acontece com a resistência bacteriana aos antibióticos, os mecanismos de lise dos fagos não são afetados pelo maquinário bacteriano devido à especificidade em que se ligam aos hospedeiros (CISEK et al., 2017; MACIEJEWSKA; OLSZAK; DRULIS-KAWA, 2018). Alguns fagos ainda possuem a capacidade de penetrar em biofilmes, que sabidamente são extremamente resistentes aos antibióticos, além de serem uma alternativa economicamente mais barata que o uso de antibióticos (REINA; REINA, 2018).

Terapeuticamente, deve-se estabelecer qual a melhor via de administração da fagoterapia. A via oral se reservaria ao tratamento de diarreias, enquanto a via intraperitoneal parece trazer melhores resultados do que a via parenteral no tratamento de infecções sistêmicas. Outras formas de administração dos fagos, em estudos experimentais, são por via intramuscular, intragástrica, injeção medular e uso tópico (WITTEBOLE; DE ROOCK; OPAL, 2014; REINA; REINA, 2018). Além de serem utilizados como tratamento, os fagos também podem ter aplicabilidade profilática através de via inalatória na prevenção de afecções do sistema respiratório (DEBARBIEUX et al., 2010; GOLSHAHY et al., 2008).

Entretanto, há algumas desvantagens na aplicação da fagoterapia, dentre elas a necessidade de identificar rapidamente o agente etiológico da infecção, justamente pela alta especificidade dos fagos em relação aos seus hospedeiros. Outro problema a ser discutido é a transferência horizontal de DNA para as bactérias, aumentando sua virulência e patogenicidade e, por conseguinte, a resistência bacteriana. Há um outro desafio a ser considerado, que é a produção de anticorpos contra os fagos, uma vez que eles são partículas estranhas ao corpo, eliminando-os rapidamente do organismo. Por último, as próprias bactérias podem alterar sua permeabilidade na membrana, impedindo a adsorção dos fagos, num caráter de resistência induzida, embora tem sido demonstrado que os fagos têm a capacidade de mutar rapidamente para quebrar o sistema de defesa bacteriano, numa eterna batalha evolucionária entre os fagos e as bactérias (REINA; REINA, 2018; BAHARUDDIN et al., 2017).

Provavelmente a fagoterapia não terá aplicação ampla e estendida a todo tipo de infecção, mas que tenha aplicabilidade no tratamento de condições distintas, como em debelar patógenos MDR ou no uso em sítios anatômicos de fácil acesso. Alternativamente, para situações onde a identificação da bactéria causadora da infecção seja difícil, poderiam ser utilizados coquetéis de bacteriófagos líticos potentes, numa espécie de terapia empírica combinada (REINA; REINA, 2018; BAHARUDDIN et al., 2017).

Em um cenário onde há um aumento progressivo da resistência bacteriana, a comunidade médica e científica tem se obrigado a encontrar alternativas aos fármacos. Através da ampliação do conhecimento no campo da biologia sintética e outras práticas não-alopáticas, a fagoterapia, sem dúvidas, é uma alternativa bastante promissora para o futuro (REINA; REINA, 2018; BAHARUDDIN et al., 2017).

Embora diferentes estudos *in vivo* já tenham evidenciado a eficácia da fagoterapia no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, alguns aspectos devem ser considerados antes do seu uso clínico. Os estudos clínicos são restritos e escassos, e há inexistência de grandes ensaios clínicos randomizados que avaliem a segurança e eficácia da terapia com fagos, sendo uma importante limitação para o uso terapêutico desses vírus atualmente (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar bacteriófagos em amostras de esgoto hospitalar provenientes do Hospital Tramandaí, litoral norte do Rio Grande do Sul, e investigar sua capacidade lítica em isolados clínicos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de pacientes de dois laboratórios hospitalares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aos antibióticos em amostras de esgoto hospitalar.
- Pesquisar a presença de bacteriófagos líticos nessas mesmas fontes de esgoto hospitalar;
- Utilizar isolados clínicos dessas mesmas espécies MDR, provenientes dos laboratórios do Hospital Tramandaí e Laboratório Exame de Novo Hamburgo, e testá-los frente aos fagos isolados através da técnica da placa de lise;
- Realizar a caracterização (isolamento, extração do ácido nucléico e sequenciamento) desses fagos líticos através de técnicas de biologia molecular.
- Comparar as sequências dos isolados com banco de nucleotídeos do GenBank.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *P. aeruginosa* E *A. baumannii*

Para que se pudesse proceder com a obtenção de bactérias multirresistentes a partir dos isolados clínicos, foi necessário submeter o projeto para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Feevale, uma vez que seriam utilizadas também informações acerca dos pacientes, tais como: sexo, idade, unidade de internação hospitalar, sítio anatômico dos isolados e se havia co-infecção com outras bactérias. O parecer consubstanciado do CEP aprovando o projeto, número 3.645.948, foi emitido em 17 de outubro de 2019.

Isolados clínicos de pacientes hospitalizados foram obtidos junto ao Laboratório do Hospital Tramandaí, no litoral norte do Estado, e no Laboratório Exame em Novo Hamburgo, que atende hospitais da região do Vale do Sinos. O propósito foi de montar uma coleção de cepas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* e obter informações acerca dos pacientes dos quais foram obtidos os isolados. Durante o período de quatro meses, foram coletadas 11 amostras de *P. aeruginosa* e 11 de *A. baumannii*, as quais foram armazenadas a -20°C em caldo TSB glicerinado a 10% para uso futuro. A Tabela 2 mostra as informações acerca dos pacientes desses isolados.

Tabela 2 – Caracterização dos isolados clínicos

Caracterização dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i>											
	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P12
Idade (anos)	74	56	81	nd	nd	44	37	69	75	nd	nd
Sexo	F	M	M	nd	M	M	M	F	M	M	F
Sítio Anatômico	FO	TR	H	nd	U	U	FrOs	TR	U	TR	ES
Ala Hospitalar	AHT	UHT	ILE	nd	ALE	ILE	ILE	UHT	IHT	ILE	ILE
Co-Infecção	-	-	-	-	-	-	<i>S.ag.</i>	-	-	-	-
Caracterização dos isolados clínicos de <i>A. baumannii</i>											
	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11
Idade (anos)	80	32	nd	81	69	35	52	64	81	57	85
Sexo	F	F	nd	M	M	M	F	F	F	F	F
Sítio Anatômico	TR	TR	nd	H	TR	FO	LA	ES	TR	H	ES
Ala Hospitalar	IHT	UHT	nd	ILE	ULE	ILE	ULE	ILE	ILE	ILE	ILE
Co-Infecção	-	-	-	-	-	<i>S.au.</i>	<i>K.p.</i>	<i>K.p.</i>	-	-	<i>Pr.</i>

FO= Ferida operatória; TR= Trato Respiratório; H= Hemocultura; U= Urina; FrOs= Fragmento Ósseo; LA= Líquido Ascite; ES= Escara Sacra.

AHT= Ambulatório Hospital Tramandaí; IHT= Internado Hospital Tramandaí; UHT= UTI Hospital Tramandaí;

ALE= Ambulatório Laboratório Exame; ULE= UTI Laboratório Exame; ILE= Internado Laboratório Exame;

S.ag.= *Streptococcus agalactiae*; *S.au.*= *Staphylococcus aureus*; *K.p.*= *Klebsiella pneumoniae*; *Pr.*= *Providencia sp.*

nd= Dado Não Disponível; "-": Negativo; "F"= Feminino; "M" = Masculino

Fonte: Autor

3.2 IDENTIFICAÇÃO E TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA (TSA)

As amostras previamente armazenadas foram ressuspensas, semeadas em ágar sangue e testadas por disco-difusão segundo a norma do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) de 2019, com o intuito de determinar os isolados multirresistentes a serem utilizados no decorrer da pesquisa.

Antes da realização do teste de sensibilidade, os isolados de *P. aeruginosa* foram testados quanto à coloração da colônia, odor, teste de Oxidase e crescimento em ágar TSI. Já para os isolados de *A. baumannii*, além dos mesmos testes realizados para a outra bactéria do estudo, ainda foi observado o comportamento frente a coloração de Gram. Para todos os isolados, as respectivas identificações de espécie foram confirmadas fenotipicamente.

Para isolados de *P. aeruginosa*, foram testados antibióticos das classes: cefalosporinas, carbapenens, monobactams, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e beta-lactâmico com inibidor de beta-lactamase. Para *Acinetobacter* spp., as classes utilizadas foram: carbapenens, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamida. A Tabela 3 mostra os antibióticos representantes de cada classe e tamanho de halos de inibição para leitura (BrCAST, 2019).

Tabela 3 – Critérios de interpretação por disco difusão segundo BrCAST (2019)

<i>P. aeruginosa</i> - Halos de inibição em milímetros							
ANTIBIÓTICO	SIGLA	DOSAGEM	S	I	R	AIT	
Cefepima	CPM	30µg	21	-	<21	-	
Ceftazidima	CAZ	10µg	17	-	<17	-	
Imipenem	IM	10µg	20	-	<20	-	
Meropenem	MPM	10µg	24	18-23	<18	-	
Aztreonam	ATM	30µg	18		<18	-	
Ciprofloxacino	CIP	5µg	26	-	<26	-	
Levofloxacino	LEV	5µg	22	-	<22	-	
Gentamicina	GEN	10µg	15	-	<15	-	
Amicacina	AMI	30µg	18	15-17	<15	-	
Tobramicina	TOB	10µg	16	-	<16	-	
Piperacilina-Tazobactan	PIPT	30-8µg	18		<18	18-19	

<i>Acinetobacter</i> spp. - Halos de inibição em milímetros							
Ciprofloxacino	CIP	5µg	50	21-49	<21	-	

Levofloxacino	LEV	5µg	23	20-22	<20	-
Imipenem	IM	10µg	24	21-23	<21	-
Meropenem	MPM	10µg	21	15-20	<15	-
Gentamicina	GEN	10µg	17	-	<17	-
Amicacina	AMI	30µg	19	17-18	<17	-
Tobramicina	TOB	10µg	17	-	<17	-
Cotricomazol	SUT	23,75/1,25µg	14	11-13	<11	-

S= Sensível; I= Sensível, aumentando exposição; R= Resistente; AIT= Área de Incerteza Técnica

Fonte: BrCAST, 2019.

3.3 TESTES FENOTÍPICOS DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Foram realizados testes fenotípicos para detecção de metalo-beta-lactamases (MBL) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) para todas as amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Sob placa de petri com ágar Mueller Hinton, contendo inóculo bacteriano equivalente a 0,5 da escala McFarland, foram dispostos discos de Imipenem (IPM) e Meropenem (MPM), sendo que para identificação de MBL, foram acrescentados outros discos com os mesmos fármacos contendo adição de 10 µL de EDTA 0,5M. Para a pesquisa de KPC, também foram acrescentados os discos destes mesmos carbapenens com o acréscimo de 6 µL de ácido borônico (50 mg/mL).

Para ambos testes, as amostras são consideradas positivas quando os halos contendo EDTA e ácido borônico possuem uma diferença maior ou igual a 5mm no tamanho dos halos, quando comparado com os discos comerciais de IPM e MPM sem a adição desses inibidores enzimáticos (ANVISA, 2013).

3.4 PESQUISA DE PRÓFAGOS

O objetivo da pesquisa de prófagos é determinar se a bactéria já está infectada com bacteriófago lisogênico e, caso positivo, o isolado bacteriano deverá ser desconsiderado para os ensaios de placa de lise em sobrecamada de ágar, evitando, assim, subsequentes resultados falso positivos para presença de fagos líticos. O procedimento consiste em adicionar a placas de petri contendo uma camada fina de TSA (Tryptic Soy Agar), uma sobrecamada de 3 mL de

meio TSB (Tryptic Soy Broth) semi-sólido com inóculo de 100 µL da bactéria a ser testada em escala 0,5 McFarland. Após solidificação do meio, deposita-se sobre o agar gotas com 10 µL do inóculo da mesma bactéria (cerca de 50 gotas). As placas são incubadas invertidas por 24 horas a 37°C. Um resultado é considerado positivo quando há formação de placas de lise no local de dispensação das gotas com inóculo bacteriano (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2005).

Os isolados MDR isentos de prófagos foram posteriormente avaliados quanto à infecção por fagos líticos.

3.5 COLETA DE ESGOTO HOSPITALAR

Foram realizados três ensaios independentes, com amostras de esgoto hospitalar coletadas junto ao Hospital Tramandaí, na cidade de Tramandaí. A escolha desse hospital se deu por dois motivos principais, sendo o primeiro deles a proximidade domiciliar do autor do projeto, favorecendo a coleta e transporte das amostras realizadas de forma imediata até a Universidade Feevale; o segundo motivo é pelo caráter social de uma eventual descoberta relevante no estudo, que pudesse beneficiar e dar visibilidade à região.

Tais coletas foram realizadas em três momentos distintos: início de maio, final de maio e final de junho do ano de 2020. Cada uma das amostras foi obtida a partir de três locais diferentes do hospital: na primeira coleta foi obtido o esgoto oriundo da ala de internados, em caixa de passagem, conforme Figura 7; a segunda foi feita coletando esgoto em duas caixas de passagem diferentes, onde desembocavam todo o esgoto do hospital; e a terceira amostra foi coletada em caixa onde passava somente o esgoto da UTI (Figura 8). Cada coleta foi realizada em um frasco estéril de 500 mL, as amostras mantidas sob refrigeração entre 2°C e 10°C e imediatamente transportadas ao Laboratório de Biomedicina do CIES da Universidade Feevale.

Figuras 7 e 8 – Locais de coleta de Esgoto no Hospital Tramandai



Figura 7: Esgoto Ala Internados.



Figura 8: Esgoto ala UTI.

Fonte: Autor.

Imediatamente, as amostras de esgoto foram centrifugadas a 4410g por 20 minutos para decantação de sólidos em suspensão. As células bacterianas foram removidas das amostras através de filtração por bomba à vácuo em membrana de acetato de celulose, primeiramente com porosidade de 0,45 μm , para remoção dos elementos maiores, e posteriormente com 0,22 μm (adaptado de EL KHAL, 2016). Parte do filtrado resultante, que contém a fração viral, foi submetido a enriquecimento da fonte de isolamento, enquanto outra parte foi preservada em geladeira entre 2 e 8 °C. Paralelamente, antes do processo de centrifugação, a amostra de esgoto foi semeada em meios seletivos, ágar MacConkey e ágar Cetrimide, para tentativa de isolamento de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.

A fim de melhorar a sensibilidade na detecção de fagos, foi realizado enriquecimento da fonte de isolamento, ou seja, da amostra de esgoto. Para tanto, se acrescentou 10 mL do filtrado resultante e 100 μL de inóculo bacteriano equivalente a 0,5 da escala McFarland a 100 mL de meio TSB duplo em frasco estéril, incubando por 24 horas a 37 °C (SILLANKORVA, NEUBAUER, AZEREDO, 2010). Esse procedimento foi realizado individualmente para cada isolado bacteriano. Não foram realizados testes sem enriquecimento da amostra.

No dia seguinte, as amostras enriquecidas foram centrifugadas a 4410 g por 20 minutos e filtradas com filtro de seringa de 0,22 μm .

3.6 ENSAIO DE PLACA EM SOBRECAMADA DE ÁGAR

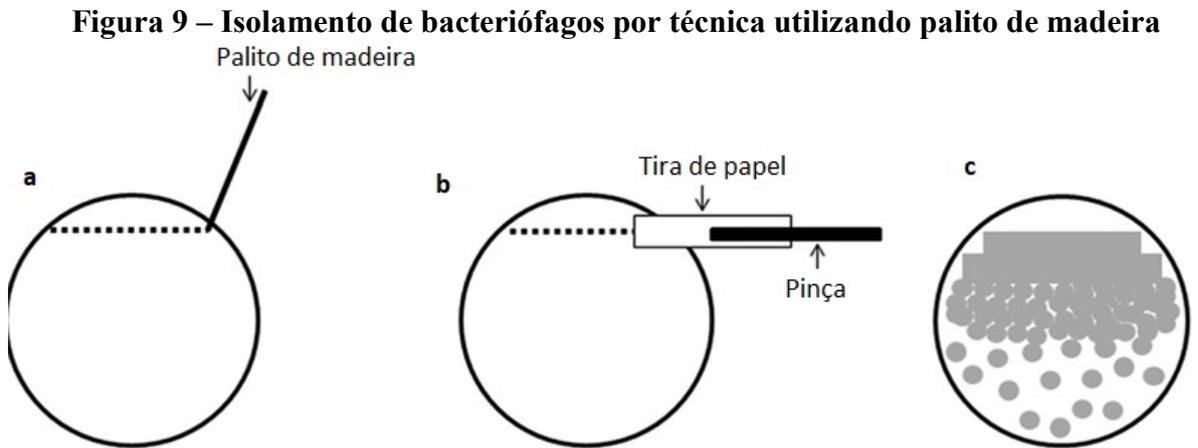
A capacidade de infecção das bactérias por fagos líticos foi avaliada pelo ensaio de placas de lise, onde 100 µL de cultura bacteriana em fase exponencial de crescimento foi misturada a 100 µL do filtrado viral enriquecido, e incubado a 37°C por 15 minutos para adsorção do fago à bactéria. A suspensão vírus-bactéria foi misturada em tubo tipo falcon de 15 mL contendo 3 mL de ágar TSB semi-sólido aquecido e, posteriormente, depositado sobre uma camada de ágar TSA (EL KHAL, 2016). Após a solidificação do meio em temperatura ambiente, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. A formação de placas de lise (zonas claras) dentro da camada de crescimento da bactéria indica as áreas de ocorrência de infecção pelo fago e lise celular bacteriana (ADAMS, 1959; KESIK-SZELOCH et al., 2013). Como controle positivo, foi realizado todo procedimento com cepa de *Escherichia coli* ATCC 13706, altamente permissiva a fagos. Esse procedimento foi realizado para todas as bactérias MDR que tiveram teste de prófagos negativo. Todas as amostras foram processadas em triplicata.

3.7 ISOLAMENTO DAS PLACAS DE LISE E PURIFICAÇÃO

Após a leitura das placas, no dia seguinte, é necessário verificar a presença de zonas de lise. Para a obtenção de um fago puro, os mesmos foram purificados através de passagens sucessivas. Cada passagem consiste na retirada de fragmento de ágar a partir do centro da placa de lise com auxílio de ponteira estéril. O fragmento é transferido para tubos plásticos de 2 mL com tampa contendo 1 mL de caldo TSB e agitados em vórtex para desprendimento das partículas virais. Após, é repetido o ensaio da placa de lise (item 4.6), utilizando-se desse material em tubo plástico com tampa, contendo a fração viral. Em geral, são necessárias de 3 a 7 passagens para obtenção de linhagens puras de fagos (EL KHAL, 2016).

Alternativamente, foi utilizada técnica que consistiu na seleção de unidade formadora de placa (UFP) isolada e, com a utilização de um palito de madeira estéril, realizou-se a picada no centro dela, inoculando em seguida em outra placa contendo tapete bacteriano, através de inúmeras picadas em sequência. Após, os fagos são espalhados pela placa com o uso de tiras finas de papel estéril, com o auxílio de uma pinça, conforme Figura 9. Após incubação por 24

horas a 37°C, são observadas ao final da placa a formação de UFP isoladas (adaptado de AZEREDO; SILLANKORVA; PIRES, 2014).



- a) Inoculação de bacteriófago em placa contendo bactéria, com uso de palito de madeira. b) Estriamento com tira de papel. c) formação de novas placas de lise isoladas, após 24 horas de incubação.

Fonte: Adaptado de AZEREDO; SILLANKORVA; PIRES 2014.

3.8 AMPLIFICAÇÃO DE BACTERIÓFAGOS

Essa técnica tem por objetivo aumentar os estoques dos bacteriófagos obtidos ao final do processo de purificação.

Em tubo do tipo Falcon de 15 mL contendo 5 mL de TSB duplo, foram adicionados 2 mL da bactéria hospedeira em escala equivalente a 0,5 McFarland e 1 mL do filtrado viral purificado, e incubados por 24 horas a 37°C. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 4.400 g por 20 minutos e filtrada em filtros de seringa de 0,22 µm, transferidos para outro tubo tipo falcon estéril e armazenados a 4°C para uso posterior (POTTKER, 2016).

3.9 TESTE DE SUSCETIBILIDADE “HOST RANGE”

O teste de suscetibilidade “*Host Range*” de um bacteriófago é definido pela sua habilidade de infectar uma variedade de cepas bacterianas da mesma espécie. Alguns fagos

apresentam ampla especificidade, infectando ou lisando bactérias, enquanto outras possuem uma faixa de hospedeiros mais restritiva (KUTTER, 2009).

O teste consiste em desafiar cada uma das bactérias da coleção contra os diferentes fagos isolados. Sobre uma placa com meio TSA com o inóculo bacteriano em escala equivalente a 0,5 McFarland é depositada uma gota de 5 μL de cada um dos bacteriófagos purificados e amplificados, e incubados por 24 horas a 37 °C. Uma bactéria é considerada sensível para determinado fago, quando a mesma apresenta formação de zonas de lise após incubação. Uma mesma bactéria pode ser permissiva a mais de um fago, assim como os fagos podem ter amplo espectro lítico, infectando diferentes cepas bacterianas. Como controle positivo é utilizado o bacteriófago e a respectiva bactéria hospedeira em que ele originalmente foi isolado (RIBEIRO et al., 2017; KUTTER, 2009).

3.10 TITULAÇÃO DOS FAGOS

A contagem de fagos é feita através de sucessivas diluições do fago purificado. Cada fago foi diluído até a diluição 10^{-9} , e as Unidades Formadoras de Placa (UFP) foram contadas (RIBEIRO et al., 2017).

Para determinar a titulação aproximada do fago, foi realizado o chamado “*spot test*”. Esse teste consiste na semeadura da bactéria na qual o fago foi isolado, em ágar TSA, e o gotejamento do fago puro e de diluições seriadas, com observação da formação de áreas de lise. As diluições foram feitas na proporção 1:10 (10 μL filtrado viral para 90 μL de caldo TSB), sendo essa a diluição 10^{-1} , realizada sucessivamente até a diluição final 10^{-9} . Em uma placa de TSA coberta com a bactéria hospedeira em escala equivalente a 0,5 McFarland, foram depositadas gotas de 3 μL de cada uma das diluições dos bacteriófagos, e incubada a 37°C por 24 horas. No dia seguinte, foi observada qual foi a menor diluição em que houve formação de placas de lise possíveis de serem quantificadas; esta diluição foi utilizada para realizar a titulação exata.

Na titulação exata, utilizou-se 100 μL da última titulação acrescido a 100 μL da bactéria em escala equivalente a 0,5 McFarland, realizando exatamente o mesmo protocolo do ensaio de placa de lise (item 4.5). Também foi feito o mesmo procedimento com a penúltima titulação

em que houve formação de lise, de forma a verificar se eventualmente o fago pudesse diminuir sua potência.

No dia seguinte à incubação, realizou-se a contagem das placas de lise, e a titulação, em UFP/mL, foi determinada conforme a seguinte equação (AZEREDO; SILLANKORVA; PIRES, 2014):

$$\text{UFP/mL} = \frac{n \text{ (número de placas de lise)} \times \text{fator de diluição}}{v \text{ (volume da amostra de fago em mL)}}$$

4 RESULTADOS

4.1 TESTES DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Antes da realização do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA), todos os isolados foram identificados seguindo os requisitos descritos no item 3.1. As características mais marcantes observadas em colônias de *P. aeruginosa* são o odor e coloração muito peculiares, além da prova de oxidase positiva em todas as amostras. Todos os isolados de *A. baumannii* apresentaram, além da morfologia, cor e odor característicos dessa espécie. Ainda, apresentaram-se ao Gram como cocos Gram-negativos arranjados aos pares, característico da espécie em questão.

Dentre os onze isolados clínicos de *P. aeruginosa* e onze de *A. baumannii* caracterizados no item 3.1, sete de cada espécie puderam ser definidas como MDR, ou seja, resistentes a pelo menos um representante de três classes distintas de fármacos. Nas amostras de esgoto não foi recuperado *Acinetobacter* sp., porém em cada uma das três amostras de esgoto foi obtido um isolado de *Pseudomonas* sp., denominados PESG01, PESG02 e PESG03. A realização do TSA demonstrou que apenas a primeira bactéria proveniente da primeira amostra de esgoto, PESG01, apresentava perfil MDR. As demais demonstraram ser selvagens, sem apresentar qualquer tipo de resistência a nenhuma das classes de antimicrobianos testadas.

Tabela 4 – Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* *

Antibiótico												PESG	PESG	PESG
	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P12	01	02	03
Cefepima	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
Ceftazidima	S	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S
Imipenem	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S
Meropenem	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Aztreonam	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S
Ciprofloxacino	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Levofloxacino	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Gentamicina	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
Amicacina	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S
Tobramicina	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S
Piper.-Tazob.	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
CONCLUSÃO	S	S	MDR	S	MDR	MDR	MDR	MDR	S	MDR	MDR	MDR	S	S

"S"= Sensível; "MDR"= Multirresistente; "R"= Resistente; "I"= Sensível, com aumento de exposição.

*De acordo com BrCAST 2019.

Fonte: Autor.

Cabe ressaltar que a bactéria PESG01, com os sucessivos repiques, foi adquirindo características fenotípicas um pouco diversas às observadas em *P. aeruginosa*, portanto os resultados obtidos a partir dessa amostra foram analisados com cautela, uma vez que testes confirmatórios de espécie não se encontravam disponíveis no momento.

Observa-se também, na Tabela 4, a presença de quatro amostras pan-resistentes de *P. aeruginosa* (P03, P05, P10 e P12), ou seja, resistente a todas as classes de antibióticos testadas. Dentre os isolados de *A. baumannii*, apenas um era pan-resistente (A01), conforme observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana dos isolados de *Acinetobacter baumannii* *

Antibiótico	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11
Imipenem	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Meropenem	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacino	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Levofloxacino	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicina	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Amicacina	R	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
Tobramicina	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
Sulfazotrim	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S
CONCLUSÃO	MDR	MDR	MDR	MDR	MDR	S	MDR	S	S	MDR	S

"S"= Sensível; "MDR"= Multirresistente; "R"= Resistente; "I"= Sensível, com aumento de exposição

* De acordo com BrCAST 2019.

Fonte: Autor.

Atendendo ao objetivo do projeto de utilizar somente amostras MDR, aquelas que demonstraram essa característica foram selecionadas para as etapas subsequentes. Exceção feita para o teste de susceptibilidade "*Host Range*", em que as amostras com perfil menos restritivo também puderam ser testadas quanto à atividade lítica dos fagos isolados.

4.2 PESQUISA DE PRÓFAGOS

A Tabela 6 mostra os isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* que foram selecionados para os ensaios de placa de lise. Foram considerados habilitados os isolados MDR (multirresistentes), cujo teste de prófago tenha sido negativo. Os testes de prófago só foram

realizados em bactérias MDR, sendo encontrado dois resultados positivos entre as amostras de *P. aeruginosa* e nenhum positivo entre as amostras de *A. baumannii*.

Tabela 6 – Isolados bacterianos habilitados após TSA e teste de prófagos

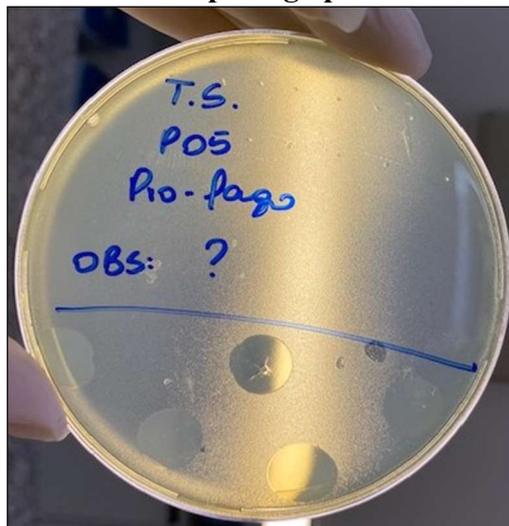
<i>P. aeruginosa</i>	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P12
TSA BrCAST	S	S	MDR	S	MDR	MDR	MDR	MDR	S	MDR	MDR
Prófago	NT	NT	-	NT	+	-	+	-	NT	-	-
HABILITADO			■			■		■		■	■

<i>A. baumannii</i>	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11
TSA BrCAST	MDR	MDR	MDR	MDR	MDR	S	MDR	S	S	MDR	S
Prófago	-	-	-	-	-	NT	-	NT	NT	-	NT
HABILITADO	■	■	■	■	■		■			■	

"S"= Sensível; "MDR"= Multirresistente; "NT"= Não Testado; "+" = Positivo; "-"= Negativo; "■" = Isolado Habilitado
 Fonte: Autor.

As amostras P05 e P07, cujo teste de prófago mostraram-se positivas, não puderam ser incluídas no ensaio de lise por já estarem infectadas por fago lisogênico. Da mesma forma, tais isolados também não puderam ser utilizados no teste de suscetibilidade “*Host Range*” dos fagos isolados no decorrer do estudo.

Figura 10 - Teste de prófago positivo na amostra P05



Fonte: Autor.

A Figura 10 ilustra um teste de prófago positivo. Na parte inferior da placa é possível observar grandes zonas de lise formadas.

4.3 TESTES FENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA

Os testes fenotípicos de mecanismos de resistência para KPC e MBL foram realizados somente para os isolados MDR de ambas as bactérias, conforme item 3.3, sendo que as duas amostras positivas para prófago também foram desconsideradas.

Tabela 7 - Testes Fenotípicos para MBL e KPC em isolados MDR

<i>P. aeruginosa</i>	P03	P05	P06	P07	P08	P10	P12
KPC	+	NT	-	NT	+	+	-
MBL	+	NT	-	NT	+	+	+
<i>A. baumannii</i>	A01	A02	A03	A04	A05	A07	A10
KPC	+	+	-	+	+	+	+
MBL	+	+	+	+	+	+	+

"NT"= Não Testado (amostras Pró-fago positivas); "+" = Positivo; "-"= Negativo

Fonte: Autor.

Conforme pôde ser observado na Tabela 7, somente a amostra P06 apresentou testes fenotípicos negativos. Essa amostra havia demonstrado sensibilidade ao Imipenem e resistência ao Meropenem, conforme descrito na Tabela 4. Ainda, as amostras P12 e A03 apresentaram teste KPC negativo e MBL positivo. Todas demais amostras testadas apresentaram ambos testes fenotípicos positivos.

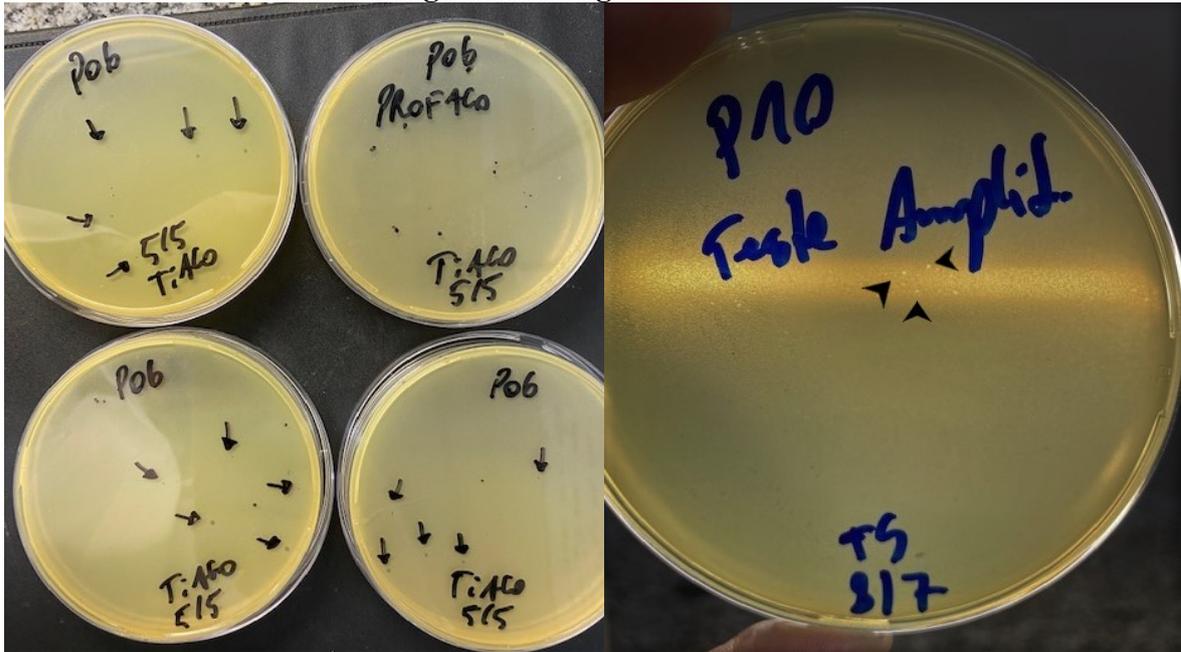
4.4 ENSAIO DE PLACA, ISOLAMENTO DA PLACA DE LISE E PURIFICAÇÃO

Conforme descrito nos itens 3.6 e 3.7, o ensaio de placa de lise foi realizado para todos os isolados clínicos MDR de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* habilitados, nas três amostras de esgoto coletadas, sempre em triplicata.

Na primeira amostra de esgoto obtida no início de maio do corrente ano, dois fagos foram isolados: um que infectou a amostra P06, designado P06.1, e outro que infectou P10, denominado P10.1. Ambos foram submetidos às passagens para isolamento e purificação, entretanto o P06.1, após a segunda passagem, não permaneceu mais viável e tampouco pôde

ser recuperado através de enriquecimento. Dessa forma, esse fago foi descartado do estudo. Já o fago P10.1 foi isolado e purificado após quatro passagens. A Figura 11 mostra a bactéria hospedeira P06 com placas de lise, conforme indicam as setas, e teste de prófago negativo. É possível ver, também, na mesma figura o fago P10.1 após purificação e amplificação, formando zonas de lise muito pequenas, visíveis contra luz direta.

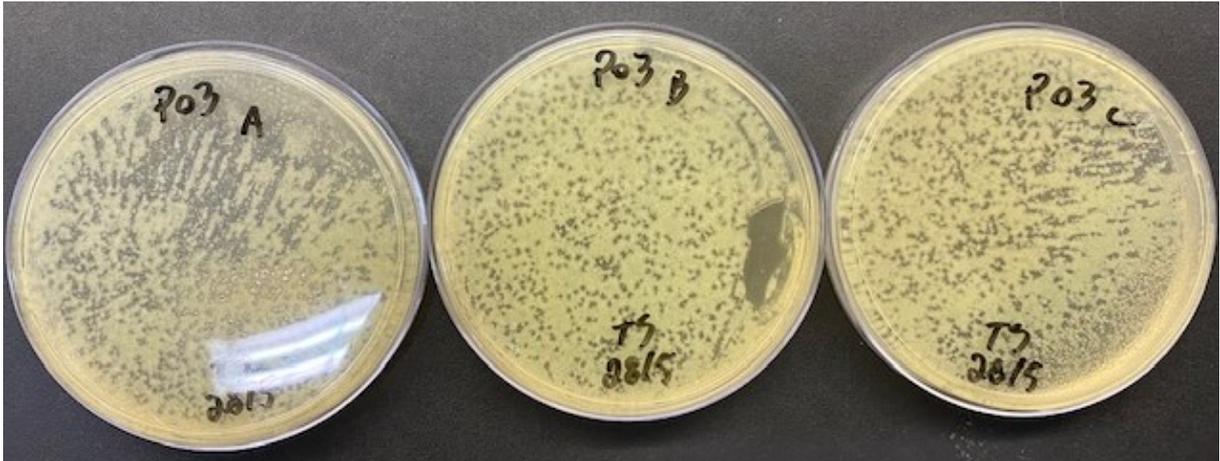
Figura 11 – Fagos P06.1 e P10.1



Fonte: Autor.

A segunda amostra de esgoto, coletada ao final do mês de maio de 2020, possibilitou o isolamento de um único fago, que infectou a amostra P03, nominado P03.2. Na Figura 12 observa-se o seu ensaio da placa de lise, em triplicata. Este fago pôde ser purificado após quatro passagens.

Figura 12 – Fago P03.2 em ensaio de placa de lise, triplicata



Fonte: Autor.

Com a última coleta de esgoto hospitalar, realizada no final do mês de junho, foram recuperados três fagos distintos: um infectando o isolado selvagem PESG02 (PESG02.3), outro a P03 (P03.3) e, por último, P08 (P08.3). Esse último fago, ao ser realizado ensaio da placa de lise após enriquecimento, praticamente não permitiu o desenvolvimento de colônias da bactéria hospedeira P08 (Figura 13, imagem à esquerda). Após a realização de diluição, ficou evidente que de fato o comportamento observado na ausência de tapete bacteriano confluyente era devido à grande potência do fago (Figura 13, imagem à direita), demonstrado também na Tabela 9.

Figura 13 – Fago P08.3



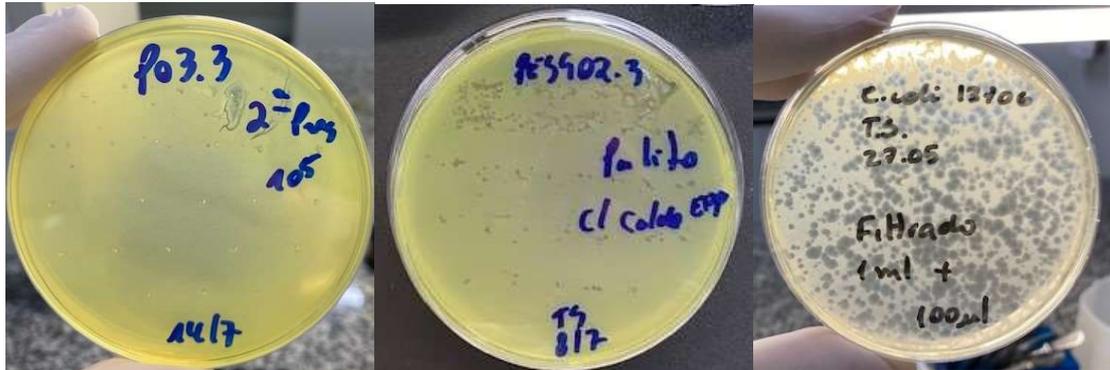
Fonte: Autor.

A Figura 14 mostra os outros dois fagos isolados e purificados, PESG02.3 e P03.3, durante passagem utilizando técnica do palito, além do controle positivo com *E. coli* ATCC 13706.

Nenhum bacteriófago foi isolado a partir das amostras de *A. baumannii* utilizadas no estudo, nas três amostras de esgoto coletadas.

Ao final dos três ensaios independentes, puderam ser isolados e purificados os seguintes fagos: P10.1, P03.2, P03.3, P08.3 e PESG02.3. Todos os fagos foram obtidos a partir de quatro passagens sucessivas.

Figura 14 – Fagos PESG02.3, P03.3 e Controle Viral Positivo



Fonte: Autor.

4.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE “HOST RANGE”

As amostras de *P. aeruginosa* do estudo foram desafiadas contra os fagos isolados, exceção feita às amostras de prófagos positivas P05 e P07, a amostra P01, que não se manteve viável mesmo sob congelamento, e a PESG01 por desenvolver perfil fenotípico diverso à *P. aeruginosa*, após repiques. Conforme observado na Tabela 8, em geral as bactérias foram sensíveis aos fagos, ou seja, foram permissivas ao ponto de formarem halos de lise. Também é possível observar que os fagos P03.2 e P03.3 presumivelmente se tratam do mesmo bacteriófago, em virtude de apresentarem perfil lítico idêntico frente às diferentes cepas bacterianas. Além disso, observa-se o amplo espectro lítico dos fagos P08.3 e P03.2/P03.3, que deixaram de infectar apenas um isolado bacteriano cada.

Tabela 8 - Teste de Suscetibilidade "Host Range"

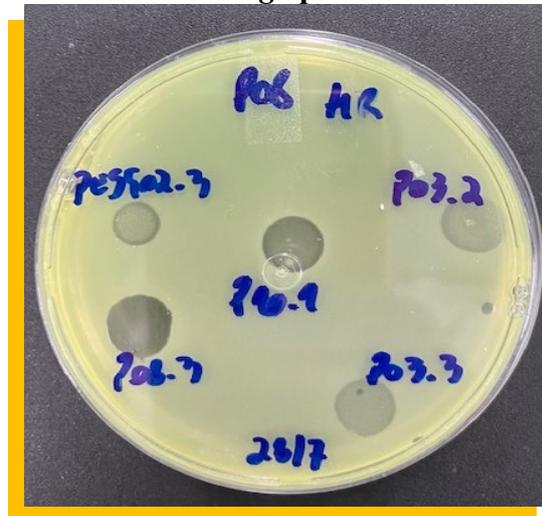
	P02	P03	P04	P06	P08	P09	P10	P12	PESG02	PESG03
P10.1	S	S	R	S	S	S	CP	R	R	S
P03.2	S	CP	S	S	S	S	S	R	S	S
P03.3	S	CP	S	S	S	S	S	R	S	S
P08.3	S	S	R	S	CP	S	S	S	S	S
PESG02.3	S	R	R	S	S	R	R	R	CP	S

"S"= Sensível ao bacteriófago; "R" = Resistente ao bacteriófago; "CP"= Controle Positivo

Fonte: Autor.

A Figura 15 ilustra o resultado da amostra P08, que foi sensível a todos os fagos, embora aparentemente o padrão de lise formado frente aos fagos P03.2/P03.3 e PESG02.3 não seja de lise completa. Observa-se a formação de halo de lise na região do controle positivo P08.3.

Figura 15 - Teste de *Host Range* positivo na amostra P08

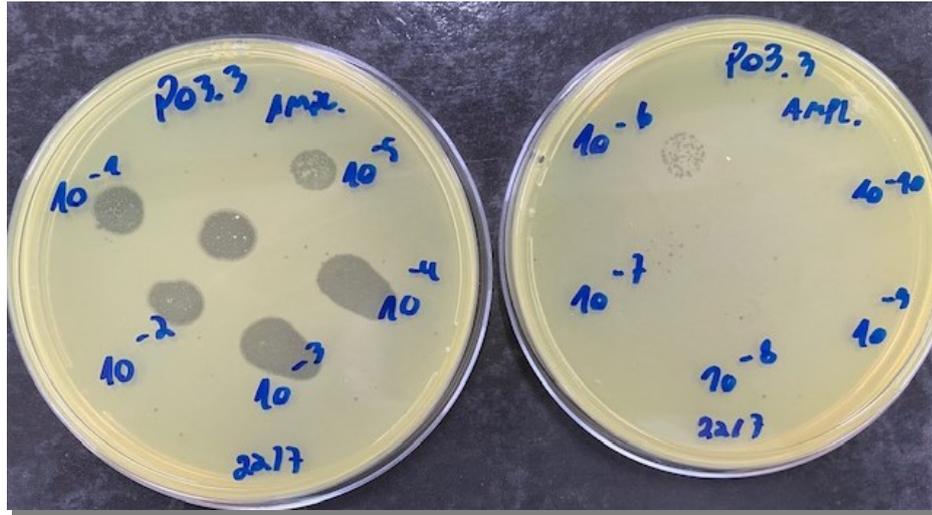


Fonte: Autor.

4.6 AMPLIFICAÇÃO E TITULAÇÃO EXATA

Com o uso dos fagos purificados e amplificados, foi realizada a diluição aproximada para determinar qual a melhor diluição a ser utilizada no teste de titulação exata. A Figura 16 mostra o “*spot test*” do fago P03.3 frente a bactéria hospedeira P03, demonstrando que a melhor diluição a ser utilizada era 10^{-6} , enquanto que a Figura 17 mostra o teste da titulação exata, utilizando a melhor diluição (10^{-6}) e a diluição imediatamente anterior a essa (10^{-5}). Cada placa de lise foi contada na placa com a melhor diluição para proceder ao cálculo da titulação exata.

Figura 16 – *Spot Test* fago P03.3



Fonte: Autor

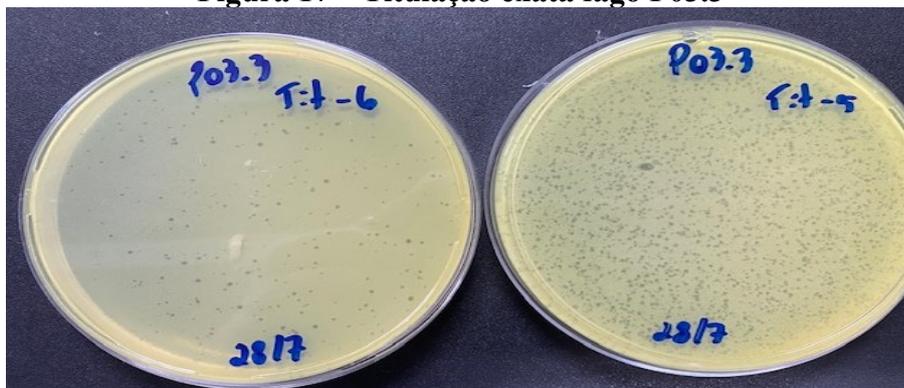
A titulação dos cinco fagos, expressa em UFP/mL (Unidades Formadoras de Placa/mL), está disposta na Tabela 9.

Tabela 9 - Titulação Exata dos fagos isolados

Bacteriófago	UFP/mL
P10.1	$9,00 \times 10^{10}$
P03.2	$3,14 \times 10^{11}$
P03.3	$3,92 \times 10^{11}$
P08.3	$2,50 \times 10^{11}$
PESG02.3	$2,50 \times 10^6$

Fonte: Autor.

Figura 17 – Titulação exata fago P03.3



Fonte: Autor.

5 DISCUSSÃO

P. aeruginosa e *A. baumannii* apresentam diversos mecanismos de resistência intrínseca e adquirida, o que, frequentemente, resulta em uma multirresistência, favorecida pelo intenso uso de antibióticos nos ambientes hospitalares (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015). Dentre os isolados clínicos obtidos, fica evidente o perfil de sensibilidade antimicrobiana reduzido em termos de opções, principalmente a resistência aos carbapenêmicos (imipenem, meropenem) no qual 90,9% das amostras clínicas de *P. aeruginosa* e 100% de *A. baumannii* apresentaram resistência a, pelo menos, um carbapenem.

Para entender melhor os mecanismos de resistência a essa classe de antimicrobianos, os testes fenotípicos para pesquisa de MBL e KPC foram aplicados. As enzimas MBLs hidrolisam carbapenens de maneira muito eficiente, e não são inibidas por inibidores de beta-lactamase, enquanto as KPCs conferem resistência a todos beta-lactâmicos e seus elementos genéticos estão localizados em elementos móveis, o que facilita sua dispersão horizontal (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). A presença de pelo menos um dos mecanismos nos isolados clínicos desse estudo (80% de *P. aeruginosa* e 100% de *A. baumannii*) indica a capacidade ostensiva dessas espécies em promover resistência ampla frente às principais classes de antibióticos utilizadas no tratamento de infecções complicadas. Entretanto, testes moleculares seriam oportunos para a confirmação desses resultados obtidos.

Bacteriófagos são vírus que hipoteticamente existem em qualquer lugar onde seus hospedeiros habitem. A vasta maioria dos bacteriófagos conhecidos, inclusive aqueles que infectam *Pseudomonas* sp., pertencem, essencialmente, a três famílias da ordem *Caudovirales*: *Syphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae* (AZEREDO; SILLANKORVA; PIRES, 2014). Em linhas gerais, os fagos podem ser classificados em duas categorias principais, baseadas no seu ciclo de vida: fagos estritamente líticos, ou virulentos, e fagos lisogênicos ou temperados (ORLOVA, 2012).

Para o emprego na fagoterapia, os fagos lisogênicos, ou temperados, são considerados indesejáveis, por isso é importante não utilizar isolados bacterianos hospedeiros que contenham profagos, uma vez que os mesmos tendem a manter um ciclo de lisogenia, inclusive protegendo seu hospedeiro da infecção por outros fagos (TOUCHON; BERNHEIM; ROCHA, 2016). Uma

célula bacteriana carregando um ou mais profagos é chamada de lisogênica e é “imune” a infecções por outros fagos líticos ou lisogênicos do mesmo grupo (FORTIER; SEKULOVIC, 2013; HYMAN, 2019). Os profagos são frequentemente identificados no sequenciamento do genoma bacteriano e podem corresponder a até 20% de todo DNA bacteriano, sendo que o número de profagos em um único genoma bacteriano pode variar de zero a algumas dezenas (KHAN; WAHL, 2020). Levando essas afirmações em consideração, a pesquisa de profagos se torna imprescindível para a detecção das bactérias lisogênicas já infectadas por profagos. No presente estudo, a pesquisa de profagos revelou a presença de duas amostras positivas dentre todos os isolados MDR, fator determinante para que ambas fossem excluídas da testagem contra possíveis fagos presentes nas amostras de esgoto.

O ambiente é a única fonte para todo os tipos de fagos, oferecendo a possibilidade de isolá-los para propósitos terapêuticos. O isolamento de fagos de fontes ambientais é mais frequentemente possível quando a amostra contém a bactéria alvo, sendo que o esgoto é uma ótima fonte para a descoberta de novos fagos (DABROWSKA et al., 2016). Dessa forma, o esgoto hospitalar foi escolhido como amostra ótima para o isolamento de fagos de interesse no estudo.

O método básico de isolamento de fagos tem permanecido praticamente inalterado desde que foi desenvolvido por d’Herelle. O procedimento de enriquecimento, no qual uma amostra da bactéria alvo é misturada com uma amostra ambiental e incubada ~~por uma noite~~ (HYMAN, 2019), foi o método de eleição para a obtenção de fagos, uma vez que muitas amostras podem não conter altas concentrações de fagos direcionados às bactérias alvo. Com esse método, puderam ser isolados seis bacteriófagos para *P. aeruginosa*, dos quais cinco permaneceram viáveis até a etapa de purificação, porém nenhum bacteriófago para *A. baumannii* foi isolado. O não isolamento de fagos para *A. baumannii* nas amostras de esgoto vai ao encontro do que é descrito na literatura. Alguns trabalhos demonstraram a grande dificuldade de se encontrar fagos ativos contra essa espécie, apesar de mais de 100 fagos contra *Acinetobacter* sp. já terem sido descritos (DABROWSKA et al., 2016; TURNER et al., 2018).

No que tange o aspecto morfológico das placas de lise, observou-se a diversidade nas características quando comparados os fagos e respectivas bactérias hospedeiras entre si. Enquanto as placas de lise formadas em P10 são pequenas e turvas, aquelas formadas em P08 e P03 são placas de tamanho médio, mas com bordas definidas e halos límpidos.

Para um bacteriófago ser útil para a terapia fágica ele deve ser isolado do ambiente e mostrar algumas características, além de apenas matar cepas bacterianas hospedeiras. Essas características desejáveis incluem o relativamente amplo espectro de infecção de hospedeiros,

e a falta de outras características, como a formação de lisógenos. Dentro das espécies bacterianas, um fago que infecta muitas, senão todas as cepas, é útil pois indica que muitas das infecções bacterianas causadas por aquela espécie poderiam ser tratadas de uma maneira empírica, isto é, presumivelmente, sem a necessidade de testar a sensibilidade da bactéria infectante em um teste de suscetibilidade ao fago. Essa mesma analogia pode ser feita com o uso de antibióticos de amplo espectro, antes da realização do teste de sensibilidade antimicrobiana (HYMAN, 2019). De acordo com os resultados do teste de suscetibilidade apresentados (Tabela 8), os fagos P03.2/P03.3 e P08.3 apresentaram 90% de infectividade contra os isolados de *P. aeruginosa* testados, enquanto que o fago P10.1 infectou 70% dos isolados e, por último, PESG02.3 conseguiu lisar somente 50% das bactérias alvo. Conclui-se, portanto, a alta capacidade lítica dos fagos P03.2/P03.3 e P08.3 quando testados isoladamente, mostrando complementariedade ao infectarem todos os isolados testados no estudo.

Algumas preparações de fagos estão na forma de coquetéis, e podem ser compostos por um ou mais fagos. Individualmente, cada fago pode ser ativo contra diferentes linhagens da mesma espécie bacteriana, mas a morte da bactéria alvo por um coquetel de fagos pode ser mais efetiva do que o esperado devido ao somatório das capacidades líticas de cada fago. Esse fenômeno é chamado de sinergismo e pode ser útil sob o ponto de vista terapêutico, já que ele aumenta o potencial de eficácia do tratamento. É possível obter tal sinergismo se um fago puder facilitar a infecção por outro fago na mesma bactéria (DABROWSKA et al., 2016; SCHMERER, M.; MOLINEUX, I.; BULL, J., 2014).

Para determinar qual a titulação exata de cada fago, o “*Spot Test*” foi assertivo em determinar qual a melhor diluição para realizar as contagens das placas de lise. Para os fagos P10.1, P02.3, P03.3 e P08.3, a melhor diluição foi de 10^{-6} , enquanto para PESG02.3 a diluição utilizada foi muito menor, 10^{-2} , denotando maiores e menores concentrações obtidas, respectivamente.

A caracterização molecular de fagos apropriados para biocontrole de patógenos é essencial para qualquer tratamento à base de bacteriófagos (TIAN et al., 2019), principalmente para impedir o uso de fagos lisogênicos (que carregam integrases e genes de virulência), por seu envolvimento na transdução bacteriana (ZHANG et al., 2015; ONG et al., 2020). Entretanto, em virtude do início da atual pandemia de SARS-CoV-2 em fevereiro de 2020, não foi possível a realização das etapas envolvendo biologia molecular previstas para o presente estudo, incluindo a extração de DNA e sequenciamento genômico dos fagos isolados. Isso foi consequência de restrições de acesso ao Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Feevale, cujos recursos humanos/financeiros foram direcionados para o apoio no

diagnóstico de infecções por SARS-CoV-2. O contingenciamento de recursos para pesquisa não estava inicialmente previsto. Entretanto, espera-se concluir futuramente essas etapas mesmo após o término do mestrado, com vistas à publicação. Todas as amostras bacterianas e dos fagos obtidas permanecem armazenadas para uso futuro.

A inexistência de grandes ensaios clínicos randomizados que avaliem a segurança e eficácia da terapia com fagos é uma importante limitação para o uso terapêutico desses vírus. Em todo mundo, há somente 7 ensaios clínicos direcionados ao tratamento de infecções por *P. aeruginosa* e *A. baumannii* por fagos, sendo que o único estudo concluído avaliou a atividade *in vitro* de um coquetel de fagos contra amostras de escarro coletadas de pacientes com fibrose cística. Os demais estudos intervencionais em andamento, todos eles patrocinados por indústrias farmacêuticas, visam a utilização de coquetéis de fagos através de *sprays* nasais e inalação ou de uso tópico, principalmente para pacientes com fibrose cística ou feridas, respectivamente (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2021).

Há a necessidade de fomentar estudos na área da fagoterapia, especialmente pelo cenário da crescente multirresistência bacteriana em nível mundial somada à escassez de novas drogas antimicrobianas.

6 CONCLUSÃO

O estudo pôde demonstrar a presença de fagos líticos para *P. aeruginosa* em matrizes de esgoto hospitalar, sendo possível seu isolamento, quantificação e verificação de espectro de infectividade frente a outros hospedeiros da mesma espécie bacteriana. Além disso, confirmou-se a dificuldade em encontrar fagos para *A. baumannii* nas amostras de esgoto utilizadas.

Evidenciou-se a importância da pesquisa de profagos como uma ferramenta fenotípica simples e muito útil para a triagem e, subsequente, exclusão dos hospedeiros lisogênicos. Em contrapartida, a impossibilidade de realizar o sequenciamento dos fagos encontrados impediu inferirmos que tais fagos são seguramente líticos, visto que eles poderiam conter a enzima integrase, vinculada à lisogenia.

Por fim, constatou-se que os estudos clínicos com bacteriófagos ativos sobre *P. aeruginosa* e *A. baumannii* são mundialmente escassos, reforçando a necessidade de fomentar pesquisas nesta área visando promover alternativas terapêuticas para tratamento de infecções por bactérias multidroga-resistentes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, H.-W. Bacteriophage observations and evolution. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 245-251, 2003.
- ADAMS, M. H. Bacteriophages. **Bacteriophages**. 1959.
- ANDERSEN, J. L. et al. Multidrug efflux pumps from *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, p. 1487-1547, 2015.
- ANVISA. **NOTA TÉCNICA Nº 01/2013 MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS MULTIRESISTENTES**, 2013.
Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec>>. Acesso em 25 de julho de 2020.
- APREA, G. et al. Bacteriophage morphological characterization by using Transmission Electron Microscopy. **Journal of Life Sciences**, v. 9, p. 214-220, 2015.
- AZEREDO, J.; SILLANKORVA, S.; PIRES, D. P. *Pseudomonas* bacteriophage isolation and production. **Pseudomonas Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**, v. 1149, p. 23-32, 2014.
- BAHARUDDIN, A. et al. Revitalizing phage therapy in combating multi-drug resistant bacteria. **Haya: The Saudi Journal of Life Sciences**, v. 2, n. 4, p. 122-130, 2017.
- BASSETTI, M. et al. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs in Context**, n. 7, p. 1–18, 2018.
- BECEIRO, A. et al. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 518-526, 2013.
- BRCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Manual de Antibiograma 2019 – Segundo BrCAST/EUCAST**. Disponível em <<http://brcast.org.br/documentos/>>. Acesso em 20 de novembro de 2019.
- CHÁVEZ-VELARDE, T. et al. Incidencia y factores de riesgo para bacteriemia en pacientes pediátricos con quemaduras en un Centro de Atención Especializado en México. **Revista Chilena de Infectología**, v. 34, n. 3, 2017.
- CISEK, A. et al. Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. **Current Microbiology**, v. 74, p. 277-283, 2017.
- DABROWSKA, B. W. et al. Bacteriophage procurement for therapeutic purposes **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

DEBARBIEUX, L. et al. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, p. 1096-1104, 2010.

DOI, Y.; MURRAY, G. L.; PELEG, A. Y. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance: treatment options. **Semin Respir Crit Care Med.**, v. 36, n. 1, p. 85-98, 2015.

EL KHAL, A. **Isolamento e caracterização genômica de bacteriófagos quanto ao seu potencial de uso terapêutico em infecções causadas por enterobactérias**. Tese de Doutorado. 2016

FIGUEIREDO, E. A. P. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n.4, p. 421–427, 2007.

FORTIER, L. C.; SEKULOVOC, O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 1-12, 2013.

GAUTAM, B. et al. Isolation of bacteriophage from Guheswori sewage treatment plant capable of infecting pathogens. **Research in Pharmacy and Health Sciences**, v. 4, n. 2, p. 465-470, 2018.

GHAJAVAND, H. et al. Isolation of bacteriophages against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Research in Pharmacy and Health Sciences**, v. 12, n. 5, p. 373-380, 2017.

GOKMEN, T. G. et al. The outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 and OXA-51 type carbapenemases in a state hospital. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 33, n. 6, p. 157-161, 2016.

GOLSHAHI, L. et al. Toward modern inhalational bacteriophage therapy: nebulization of bacteriophages of *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 21, n. 4, p. 351-359, 2008.

GUSATTI, C. S. et al. Resistência a β -lactâmicos em *Acinetobacter* spp isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 183-187, 2009.

HAIDAR, G. et al. Ceftolozane-tazobactam for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: clinical effectiveness and evolution of resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n.1, p. 110-120, 2017.

HARPER, D. R.; ANDERSON, J.; ENRIGHT, M. C. Phage therapy: delivering on the promise. **Therapeutic Delivery**, v. 2, n. 7, p. 935-947, 2011.

HURLEY, J. C. Severe burns: pathogenesis and prevention of infection. **Recent Clinical Techniques, Results, and Research in Wounds**, p. 1-20, 2017.

HYMAN, P. Phages for phage therapy: isolation, characterization and host range breadth. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 35, 2019.

International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV, c2021. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>> Acesso em: 31 de Janeiro de 2021.

JALIL, M. B. et al. Isolation and characterization of bacteriophages against multiple drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* with using the bacteriophage as a therapy in the mice model. **International Journal of Development Research**, v. 7, n. 12, p. 17989-17997, 2017.

JUAN, C.; PEÑA, C.; OLIVER, A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. S1, p. 44-51, 2017.

KARUMIDZE, N. et al. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. **Current Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 251-258, 2012.

KENGKLA, K. et al. Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and network meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 22-32, 2018.

KESIK-SZELOCH, A. et al. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 100, 2013.

KHAN, A.; WAHL, L. M. Quantifying the forces that maintain prophages in bacterial genomes. **Theoretical Population Biology**, v. 133, p. 168-179, 2020.

KURTBOKE, I. Bacteriophages. **InTech**, 2012.

KUTTER, E.; RAYA, R.; CARLSON, K. Molecular mechanisms of phage infection. In Kutter, E., Sulakvelidze, A. (ed.). **Bacteriophages: Biology and Applications**. 5th ed. CRC Press, 2005.

KUTTER, E. Phage host range and efficiency of plating. **Bacteriophages: Methods and Protocols**, v. 501, p. 141-149, 2009.

LIN, Y. W. et al. A proof-of-concept study of the efficacy of systemically administered polymyxins in mouse burn wound infection caused by multidrug-resistant Gram-negative pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, 2018.

LOGAN, L. K. et al. *Acinetobacter baumannii* resistance trends in children in the United States, 1999-2012. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, p. 1-7, 2018.

MACIEJEWSKA, B.; OLSZAK, T.; DRULIS-KAWA, Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 2563-2581, 2018.

MARTÍN-ASPAS, A. et al. Differential characteristics of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: risk factors, clinical picture, and mortality. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 861-872, 2018.

MIRZAEI, M. K.; MAURICE, C. F. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. **Nature Reviews**, v. 15, p. 397-408, 2017.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n 2, 2016.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH) - US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **ClinicalTrials.Gov**. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=phage+pseudomonas&term=&cntry=&state=&city=&dist=>>. Acesso em 01 de Fevereiro de 2021.

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

ONCUL, O. et al. Nosocomial infection characteristics in a burn intensive care unit: analysis of an eleven-year active surveillance. **Burns**, v. 40, n. 5, p. 835-841, 2014.

ONG, S. P. et al. Characterization of *Pseudomonas* lytic phages and their application as a cocktail with antibiotics in controlling *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 6, p. 693-699, 2020.

ORLOVA, E. V. Bacteriophages and their structural organisation. **Bacteriophages**, 2012.

PATHAK, P. et al. Prevalence of extended spectrum beta lactamases (ESBL) and metallo beta lactamases (MBL) mediated resistance in Gram negative bacterial pathogens. **Tribhuvan University Journal of Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 49-54, 2017.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45 n. 6, p. 568–585, 2015.

POTTKER, E. S. **Genômica e caracterização fenotípica de bacteriófagos líticos para biocontrole de *Salmonella enterica***. Dissertação de Mestrado, 2016.

REINA, J.; REINA N. Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? **Revista Española de Quimioterapia**, v. 31, n. 2, p. 101-104, 2018.

RIBEIRO, A. et al. Isolation and evaluation of the lytic spectrum of bacteriophages active against food-borne bacteria. **In: Bacteriophages**, p. 71-87, 2017.

ROCHA, L. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil: susceptibility profile and diversity of oxacillinases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n. 6, p. 358-361, 2017.

SANTOS, I. A. L.; NOGUEIRA, J. M. R.; MENDONÇA, F. C. R. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 47, n. 1-2, p. 5-11, 2015.

SCHMERER, M.; MOLINEUX, I. J.; BULL, J. J. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. **Peer J**, 2014.

SILLANKORVA, S.; NEUBAUER, P.; AZEREDO, J. Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*. **Biotechnology**, v. 8, n. 80, p. 1-11, 2008.

SILVA JÚNIOR, S. de A. et al. Perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de água superficial e efluente hospitalar: teste de sensibilidade a antimicrobianos e detecção de metalo- β -lactamase. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 16, n. 4, p. 97-104, 2014.

SILVA JÚNIOR, V. V. et al. Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring blaGES-1 and blaGES-11 in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 764-768, 2017.

SIMNER, P. J. et al. Carbapenemase detection among carbapenem-resistant glucose-nonfermenting Gram-negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, p. 2858-2864, 2017.

TIAN, C. et al. Identification and molecular characterization of *Serratia marcescens* phages vB_SmaA_2050H1 and vB_SmaM_2050HW. **Archives of Virology**, v. 164, p. 1085-1094, 2019.

TOUCHON, M.; BERNHEIM, A.; ROCHA, E. P. C. Genetic and life-history trait associated with the distribution of prophages in bacteria. **The ISME Journal**, v. 10, n. 11, p. 2744-2754, 2016.

TOUSSAINT, K. A.; GALLAGHER, J. C. β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: from then to now. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 49, n. 1, p. 86-98, 2015.

TURNER, D. et al. Comparative analysis of 37 *Acinetobacter* bacteriophages. **Viruses**, v. 10, n. 5, 2018.

VANEGAS-MÚNERA, J. M.; RONCANCIO-VILLAMIL G.; JIMÉNEZ-QUICENO, J. N. *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. **Revista CES Medicina**, v. 28, n. 2, p. 233-246, 2014.

VICKERS, M. L. et al. Risk factors for multidrug-resistant Gram-negative infection in burn patients. **ANZ J. Surg**, v. 88, n. 5, p. 480-485, 2018.

WANG, Y. et al. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 123, p. 3-17, 2018.

WARDHANA, A.; DJAN, R.; HALIM, Z. Bacterial and antimicrobial susceptibility profile and the prevalence of sepsis among burn patients at the Burn Unit of Cipto Mangunkusumo Hospital. **Annals of Burns and Fire Disasters**, v. 30, n. 2, 2017.

WITHEY, S. et al. Bacteriophages: potential for application in wastewater treatment processes. **Science of The Total Environment**, v. 39, n. 1-3, p. 1-18, 2005.

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. 226-235, 2014.

XIE, J. et al. A 16-year retrospective surveillance report on the pathogenic features and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from FAHJU in Guangzhou representative of Southern China. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 37–41, 2017.

ZHANG, J. et al. Physiological and molecular characterization of *Salmonella* bacteriophages previously used in phage therapy. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 12, p. 2143-2149, 2015.

ZHANG, W. et al. The role of LpxA/C/D and pmrA/B gene systems in colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Laboratory Medicine**, v. 1, p. 86-91, 2017.