



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE BIOMEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

LUCIANA FRANÇA DA SILVA

**BACTERIÓFAGOS AMBIENTAIS COM ATIVIDADE LÍTICA FRENTE A
KLEBSIELLA PNEUMONIAE MULTIRRESISTENTE: ESTUDO NA LAGOA DO
PORANGABUSSU, FORTALEZA-CE**

FORTALEZA

2025

LUCIANA FRANÇA DA SILVA

BACTERIÓFAGOS AMBIENTAIS COM ATIVIDADE LÍTICA FRENTE A *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* MULTIRRESISTENTE: ESTUDO NA LAGOA DO PORANGABUSSU,
FORTALEZA-CE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Clementino

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S581b Silva, Luciana França da.

Bacteriófagos ambientais com atividade lítica frente a klebsiella pneumoniae multirresistente: Estudo na lagoa do Porangabussu, Fortaleza-CE / Luciana França da Silva. – 2025.

89 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Marco Antônio de Freitas Clementino.

1. Bacteriófagos. 2. Klebsiella pneumoniae. 3. Infecção Hospitalar. I. Título.

CDD 616.9

LUCIANA FRANÇA DA SILVA

BACTERIÓFAGOS AMBIENTAIS COM ATIVIDADE LÍTICA FRENTE A *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* MULTIRRESISTENTE: ESTUDO NA LAGOA DO PORANGABUSSU,
FORTALEZA-CE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração Microbiologia.

Aprovada em: 21/05/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio de Freitas Clementino
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Karoline Aragão
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Rafaella N Della Guardia Gondim
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos Bacteriófagos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido força nos momentos difíceis e fé para não desistir do caminho que escolhi trilhar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Clementino, expresso minha sincera gratidão pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela confiança desde o início e pelo incentivo mesmo diante das incertezas. Agradeço pela disponibilidade, pelos conselhos e ensinamentos que fizeram toda a diferença. Sob sua orientação, cresci academicamente e amadureci pessoalmente. Minha profunda gratidão por tudo.

À minha mãe, Terezinha, mulher guerreira exemplo de força e dedicação; à minha irmã, Cristiane, companheira de todas as horas; e ao meu sobrinho Davi, cuja presença iluminou o caminho com ternura e alegria. Obrigada por cada palavra de incentivo, pelo cuidado nos dias difíceis, pela paciência diante da minha ausência e, sobretudo, pelo amor incondicional. Esta vitória não é apenas minha, mas nossa, pois sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao meu esposo, Wilker Vieira, meu amor e companheiro de todas as horas, agradeço profundamente pelo incentivo constante, pela paciência, compreensão e carinho incondicional. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos de insegurança, por me fortalecer nas dificuldades e celebrar comigo cada conquista. Sua presença foi essencial para que eu não desisse, mesmo nos dias mais desafiadores. Sou imensamente grata por dividir essa caminhada com você.

Aos participantes da banca examinadora de qualificação e de defesa, Profa. Dra. Karoline Aragão, Profa. Dra. Rafaella Gondim e Prof. Dr. Aldo Ângelo, registro minha profunda gratidão. Agradeço não apenas pela disponibilidade em aceitar o convite, mas, sobretudo, pela dedicação em realizar leituras atentas e oferecer contribuições valiosas que enriqueceram este trabalho e ampliaram minha formação acadêmica. Deixo também meu sincero reconhecimento ao Prof. Dr. Aldo Ângelo por ter me acolhido no grupo de pesquisa, o que foi fundamental para o desenvolvimento desta trajetória. A cada um de vocês, obrigada pelo tempo investido, pelas sugestões cuidadosas e pelo estímulo constante, que certamente levarei comigo em minha caminhada científica.

Ao Prof. Dr. Alexandre Havit Bindá, pela presença e apoio constante ao longo da minha caminhada. Agradeço pelas orientações valiosas nas reuniões e até mesmo pelos "carões" necessários, sempre acompanhados de conselhos que contribuíram de forma significativa para a execução desta pesquisa.

À equipe do Labiotec, Dra. Lyvia, Charliene e Tuane deixo minha sincera gratidão.

Fazer parte desse grupo foi essencial para meu crescimento pessoal e profissional. À Dra. Lyvia, pela orientação, compreensão e apoio nos momentos de conciliação entre o laboratório e o mestrado. À Charliene e Tuane, agradeço pela amizade, risadas, pela parceria no dia a dia e pelo acolhimento que tornaram a jornada mais leve e significativa.

Ao Charles Melo, à Kátia Lima Nogueira por sempre me receberem com tanto apoio, disponibilidade e palavras de incentivo e a todos que integram o NUBIMED —grupo que representa muito mais do que uma equipe de pesquisa uma família. É um espaço de crescimento, aprendizado, amizade e compromisso. Sinto-me profundamente honrada e grata por fazer parte desse grupo ao longo desses anos.

Ao grupo de pesquisa em bacteriófagos, por tornar esse ambiente tão enriquecedor. Karyne, Joyce e Otávio pela amizade, e pela parceria diária, idas na lagoa do porangabussu, experimentos e pelas trocas de experiências e apoio constante.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica e à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pelo suporte durante toda a trajetória.

Ao Santiago, minha sincera gratidão pela ajuda, pelas palavras de incentivo e por sempre me transmitir confiança nos momentos de maior dificuldade. Agradeço ainda pela paciência e disponibilidade, que foram fundamentais quando mais precisei.

Aos colegas dos Laboratórios de Doenças Infecciosas (LDI) e de Toxicologia Molecular (LTM), minha sincera gratidão. Em especial, a Thiago Alencar e Xaulla, pela amizade e apoio fundamental na etapa final dos experimentos da curva de crescimento e MIC. A Samilly, pela amizade, pelas risadas e pela parceria constante. Ao Davi e a todos os colegas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo meu reconhecimento e agradecimento por cada gesto de apoio, incentivo e companheirismo.

À minha amiga Carol, que mesmo distante fisicamente, sempre esteve presente. Obrigada pela disponibilidade constante, incentivo, por atender minhas mensagens e longos áudios, pela escuta atenta e pelas palavras de apoio que tantas vezes me deram força nos momentos em que eu mais precisava.

Ao Jeferson pelo cuidado e dedicação na limpeza e organização do nosso ambiente de trabalho. Seu empenho, alegria e carinho tornaram nossos dias mais leves e agradáveis.

Ao José que sempre está disponível e encontra uma solução para tudo.

Por fim, deixo meu sincero agradecimento a todos que, de alguma forma, contribuíram, incentivaram ou estiveram presentes durante essa caminhada. A cada um de vocês, o meu reconhecimento e gratidão.

“Em meio à dificuldade, encontra-se a oportunidade”

Albert Einstein

RESUMO

O aumento da resistência bacteriana representa um dos maiores desafios enfrentados pela saúde pública contemporânea devido ao surgimento de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos (MDR). Nesse cenário, torna-se essencial o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que sejam eficazes e economicamente viáveis para o controle dessas infecções. *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria Gram-negativa oportunista, está associada a infecções graves como pneumonia, septicemia e infecções do trato urinário. A terapia com bacteriófagos, que é uma abordagem preexistente que utiliza vírus específicos para infectar e destruir bactérias, ressurge como uma promissora alternativa terapêutica. Contudo, essa forma de tratamento, apesar de antiga, ainda é pouco explorada. O objetivo deste estudo foi isolar, identificar e caracterizar bacteriófagos com potencial líticos contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes. Para isso, foram coletadas amostras de água da lagoa do Porangabussu, em Fortaleza, Ceará, a qual foi submetida a tratamento com clorofórmio, centrifugação e filtração. A presença de bacteriófagos nos enriquecidos das amostras foi verificada por meio da técnica de *spot test*, através da formação de halo de inibição de crescimento bacteriano. Técnicas de bioinformática foram aplicadas para a identificação de genes alvos e o desenho de *primers* específicos para o diagnóstico molecular dos bacteriófagos. Foram desenhados três *primers*: *ter*, *cap* e *ack*. As amostras de bacteriófagos foram submetidas à extração de ácidos nucleicos utilizando o *kit* Ribospin™ vRD (GeneAll®). Realizou-se uma PCR em tempo real (qPCR), seguida de duas qPCR *nested* consecutivas para cada um dos genes selecionados. Os resultados indicaram a presença de bacteriófagos com potencial terapêutico contra cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* na água da lagoa avaliada. Os *primers* *cap* e *ack* foram eficazes no diagnóstico molecular precoce desses bacteriófagos e seu uso abre novas perspectivas para a otimização de metodologias voltadas ao isolamento de novos fagos.

Palavras-chave: Bacteriófagos. *Klebsiella pneumoniae*. Infecção Hospitalar.

ABSTRACT

The increase in bacterial resistance represents one of the greatest challenges faced by contemporary public health due to the emergence of multidrug-resistant (MDR) bacteria. In this context, the development of new therapeutic approaches that are both effective and cost-efficient for controlling these infections becomes essential. *Klebsiella pneumoniae*, an opportunistic Gram-negative bacterium, is associated with severe infections such as pneumonia, septicemia, and urinary tract infections. Phage therapy, a pre-existing approach that uses viruses specific to infecting and destroying bacteria, has reemerged as a promising therapeutic alternative. However, this form of treatment, despite being long-established, remains poorly explored. The aim of this study was to isolate, identify, and characterize bacteriophages with lytic potential against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. For this purpose, water samples were collected from the Porangabussu lagoon in Fortaleza, Ceará, which were treated with chloroform, centrifugation, and filtration. The presence of bacteriophages in the enriched samples was verified using the spot test technique, through the formation of bacterial growth inhibition halos. Bioinformatics techniques were applied for the identification of target genes and the design of specific primers for the molecular diagnosis of bacteriophages. Three primers were designed: ter, cap, and ack. Bacteriophage samples underwent nucleic acid extraction using the Ribospin™ vRD kit (GeneAll®). Real-time PCR (qPCR) was performed, followed by two consecutive nested qPCRs for each of the selected genes. The results indicated the presence of bacteriophages with therapeutic potential against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in the evaluated lagoon water. The cap and ack primers were effective in the early molecular diagnosis of these bacteriophages, and their use opens new perspectives for optimizing methodologies aimed at the isolation of novel phages.

Keywords: Bacteriophages, *Klebsiella pneumoniae*, Hospital Infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Representação esquemática da estrutura de um bacteriófago	19
Figura 2- Principais mecanismos de resistência	24
Figura 3- Bactéria <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
Figura 4 - Placa de cultura da bactéria <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
Figura 5- Principais marcos históricos da <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
Figura 6- Linha do tempo da história dos fagos	32
Figura 7- Frederick Twort (1877-1950) e Felix d'hérelle (1873-1949).	33
Figura 8- Tipos morfológicos de bacteriófagos.....	35
Figura 9- Representação de algumas famílias referidas para a classificação dos fagos	36
Figura 10 - Ciclo lítico e lisogênico dos bacteriófagos	37
Figura 11- Localização geográfica do local de coleta	46
Figura 12- Lagoa do Porangabussu	46
Figura 13- Filtragem da água.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 14- Técnica de plaqueamento em ágar dupla camada; um método para determinar o título viral como unidades formadoras de placa (PFU)	50
Figura 15- Diluição seriada e placa com zonas de lise.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 16 - “Bacteriófagos isolados da água do Açude do Porangabussu apresentação lítica contra <i>K. pneumoniae</i>	61
Figura 17 -Bacteriófago isolado da placa viral (BIPV) apresentam ação lítica contra isolados de <i>K. Pneumoniae</i>	63
Figura 18 - Ativida lítica dos BIPV1 e 2 frente a cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. Aerogenes</i> , <i>K oxytoca</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> e <i>Acinetobacter</i> provenientes de isolados clínicos humanos.....	65
Figura 19- Curva de crescimento bacteriano com quatro grupos: Controle só bactéria; Fago 100 ul; Fago 200 ul; Fago 300 ul.....	69
Figura 20- Porcentagem por família de bacteriófagos encontrados nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> . Proporção por família.....	70
Figura 21- Porcentagem por países encontradas nos isolados de <i>K. Pneumoniae</i> . Proporção por países.	71
Figura 22- Porcentagem por fontes de isolamento encontradas nos isolados de <i>K. Pneumoniae</i> . Proporção fontes de isolamento.....	71
Figura 23- -(A) Curva de amplificação e (B) Curva de dissociação dos primers CAP.....	72

Figura 24- (A) Curva de amplificação e (B) Curva de dissociação dos primers ACK.	73
Figura 25- (A) Curva de amplificação e (B) Curva de dissociação dos primers TER.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Função dos genes obtidos na análise genómica	54
Tabela 2- Temperatura de anelamento dos primers de bacteriófagos utilizados na <i>qPCR</i>	57
Tabela 3- Cepas bacterianas dos isolados clínicos	61
Tabela 4 - (Figura 16) Médias dos diâmetros dos halos de lise formados pelo fago no teste spot test contra cepa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistentes, medidos pelo programa ImageJ.	64
Tabela 5 – (Figura 17). Avaliação do diâmetro dos halos de lise em triplicata, obtidos após exposição das cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistentes ao fago BIPV.....	63
Tabela 6 - -(Figura 18) Avaliação do diâmetro dos halos de lise formados pelo fago, obtidos após exposição das cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistentes ao fago expostos frente a diferentes cepas bacterianas, determinados pelo programa ImageJ.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ESCAPE- Grupo de bactérias multirresistentes

EMB - do inglês Eosin Methylene Blue Agar

HUWC -Hospital Universitário Walter Cantídio

KPC -*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

LB - Meio Caldo Luria Bertani

MDR -Multirresistente a medicamentos

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NDM- New Delhi Metalobetalactamase

NPDM-Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

NUBIMED –Núcleo de Biomedicina

OD- Densidade óptica

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS- Phosphate-buffered saline (Solução salina tamponada com fosfato)

PES -Polietersulfona

PFU - Unidades formadoras de placa

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RAM - Resistência Antimicrobiana

RNA- Ácido ribonucleico

TSA- Triptic Soy Agar (Ágar Tríptico de Soja)

UFC -Universidade Federal do Ceará

UTIs - Unidades de Terapia Intensiva

XDR - Extensively Drug-Resistant Bactéria

LISTA DE SÍMBOLOS

β Beta

$^{\circ}$ C - Grau Celsius

ml Mililitro

ng Nanograma

μ g Micrograma

μ L Microlitros

% Porcentagem

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1 Introdução	18
1.2 Bactérias resistentes à antibióticos.....	20
1.3 Mecanismos de Resistência.....	23
1.4 Infecções Nosocomiais	25
1.5 Agente Etiológico Klebsiella pneumoniae.....	27
1.6 Histórico dos Bacteriófagos.....	31
1.7 Bacteriófagos.....	34
1.8 Uso clínico dos Bacteriófagos	38
1.9 Genômica dos Bacteriófagos.....	39
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral.....	43
3.2 Objetivos Específicos.....	43
4 METODOLOGIA.....	44
4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	44
4.2 Caracterização das cepas utilizados no projeto	44
4.3 Coleta de Amostras para isolamento de bacteriófagos	45
4.4 Enriquecimento da Amostra	48
4.5 Preparações de meios de cultura	Erro! Indicador não definido.
4.6 Verificação da presença de bacteriófagos por <i>spot-test</i> das amostras enriquecidas	49
4.7 Determinação de Unidades Formadoras de placa (PFU) pelo método de ágar em dupla camada	49
4.8 Diluição seriada de fagos para utilização no isolamento de bacteriófagos	Erro! Indicador não definido.
4.9 Isolamento, dos fagos das Unidades Formadoras de Colônias (PFU) para o Bacteriófago Isolado da Placa Viral (BIPV)	51
4.10 Análise de Bioinformática.....	51
4.10.1 Recuperação e Anotação do Genoma:.....	51
4.10.2 Limpeza e preparação de sequência:	52
4.10.3 Extração de sequência genética:.....	52

<i>4.10.4 Alinhamento de sequência:</i>	52
<i>4.10.5 Extração de sequência de consenso:</i>	52
<i>4.10.6 Análise BLAST para identificação de proteínas:</i>	53
<i>4.10.7 Desenho de Primer:</i>	53
<i>4.11 Extração de Ácidos Nucleico</i>	55
<i>4.12 Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR).</i>	56
<i>4.9.13 Avaliar a especificidade do bacteriófago frente a outras espécies bacterianas.</i>	56
<i>4.9.14 Curva de Crescimento da Bactéria Klebsiella pneumoniae expostas a diferentes concentrações de fagos</i>	57
5 RESULTADOS	58
5.1 Ensaio de placa	60
5.2 Título da suspensão fágica	64
5.3 Especificidade dos bacteriófagos isolados	64
5.4 Curva de crescimento da cepa de <i>K. pneumoniae</i> exposta a diferentes concentrações de fago	69
5.5 Bioinformática	70
5.6 Diagnóstico Molecular	72
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Introdução

Os primeiros casos clínicos de resistência começaram a surgir nas décadas de 1960 e 1970 por conta da ampla utilização de antibióticos após a descoberta da penicilina (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010). O uso indiscriminado de antibióticos favorece o surgimento e aumento da prevalência de bactérias multirresistentes (MDR). Dentre as MDR de importância médica há a *Klebsiella pneumoniae*. A *Klebsiella pneumoniae* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram negativo, encapsulado e imóvel causador de infecções oportunistas resistentes a antimicrobianos em pacientes hospitalizados (MURAI *et al.*, 2022). Esta bactéria geralmente coloniza as superfícies mucosas humanas da orofaringe e do trato gastrointestinal (TGI), causando pneumonia, infecção do trato urinário e sepse, sobretudo em populações vulneráveis, e frequentemente resultando infecções secundárias em pacientes ventilados ou cateterizados em ambientes hospitalares (FERREIRA, 2022).

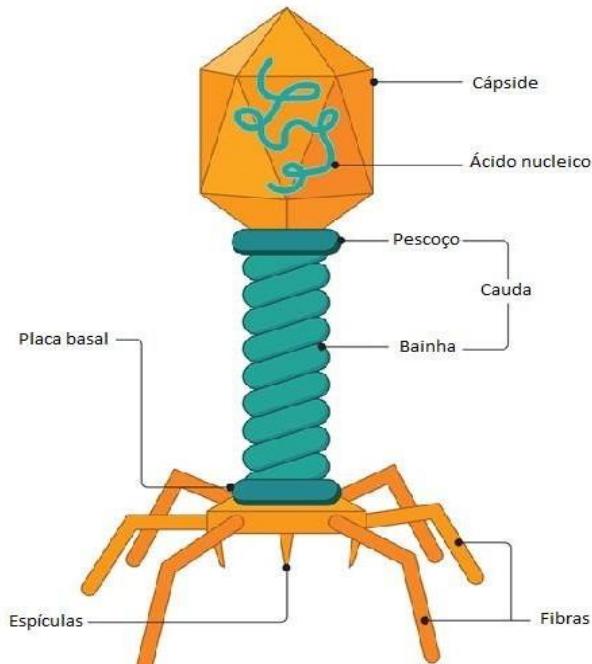
A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 700 mil pessoas morram anualmente de infecções não tratáveis provocadas por superbactérias, devido a elevada virulência e resistência antimicrobiana (OMS, 2024). A OMS projeta que, em 2050, o número de mortes anuais devido a infecções resistentes a antibacterianos ultrapassará o número de mortes causadas por câncer (OMS, 2024). Segundo Lima, embora as superbactérias predominem em ambientes hospitalares, a automedicação e o uso indiscriminado de antibióticos facilitam sua disseminação para fora desses ambientes. O surgimento de cepas resistentes a antibióticos compromete a eficácia de diversos tratamentos para infecções comuns, exacerbando os desafios enfrentados por médicos e cientistas globalmente (LIMA *et al.*, 2024).

Com o aumento da taxa de infecções bacterianas multirresistentes e o elevado custo associados à produção de novos antibióticos, torna-se decisivo desenvolver alternativas de tratamento eficazes para essas infecções. Uma das opções clássica para enfrentar essa crise é o uso de bacteriófagos, que se destaca como uma alternativa viável em prática especialmente em países da Europa Oriental (DA SILVA; ELEEN MARCIA MARTINS, 2011).

Bacteriófagos são vírus encontrados na natureza com a capacidade de infectar e causar a lise de células bacterianas. Estruturalmente, geralmente possuem um capsídeo icosaédrico, que abriga o material genético (RNA ou DNA), e uma cauda proteica helicoidal (**Figura 1**) (CRISCUOLO, ELENA, *et al.* 2017). Esses vírus variam em tamanho de aproximadamente 20 a 200 nm e podem ser encontrados não apenas em ambientes aquáticos,

mas também no microbiana de animais e seres humanos (DA SILVA, 2022).

Figura 1-Representação esquemática da estrutura de um bacteriófago



Fonte: Adaptado de Humagain (2020). Esquema ilustrativo da estrutura de um fago T2 e T4, mostrando o Capsídeo com material genético em seu interior DNA protegido pelo capsídeo viral; O pescoço faz a ligação entre o capsídeo e a cauda e as fibras da cauda são responsáveis pela ligação com receptores específicos da célula bacteriana.

A terapia por fagos tem grande potencial para a neutralização de bactérias resistentes a antimicrobianos (DA SILVA; NOGUEIRA, 2022). Além disso, esses bacteriófagos possuem enzimas que facilitam a entrada viral e destruição da célula bacteriana, apresentando grande potencial antimicrobiano. Dessa forma, este projeto visa isolar, identificar e determinar o mecanismo de ação de bacteriófagos para o manejo de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à antimicrobianos e a descoberta de novas moléculas com potenciais antimicrobianos.

Este estudo representa a primeira iniciativa do nosso grupo de pesquisa voltada para o isolamento, caracterização e análise do potencial terapêutico de bacteriófagos ativos contra cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*. A realização dessa pesquisa marca um avanço significativo na diversificação das abordagens investigativas do grupo, ampliando as possibilidades de atuação científica com foco em estratégias alternativas ao uso de antibióticos convencionais. Ao estabelecer uma base experimental para o uso de fagos como agentes antimicrobianos, este trabalho também abre caminhos para futuras investigações no campo da fagoterapia e sua aplicação clínica, especialmente no contexto de infecções por bactérias

resistentes

1.2 Bactérias resistentes à antibióticos

As bactérias são organismos unicelulares e elas foram primeiramente observadas em 1670 por Antonie van Leeuwenhoek (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010). Louis Pasteur identificou que apenas algumas linhagens bacterianas causavam doenças. Posteriormente, no final do século XIX, o microbiologista alemão Robert Koch desenvolveu os chamados "Postulados de Koch", um conjunto de critérios essenciais para determinar se um microrganismo específico é o agente causador de uma doença. Esses postulados são fundamentais na identificação de patógenos e estão divididos em quatro etapas: (1) identificar a doença e o patógeno, (2) isolar e cultivar o microrganismo em meio de cultura, (3) inocular o patógeno em organismos saudáveis, e (4) realizar o reisolamento para verificar se as características do microrganismo são mantidas (FUENTES CASTILLO, 2007).

Em 1928, Alexander Fleming descobriu o primeiro antibiótico, a penicilina, um marco na medicina moderna (BASTOS *et al.*, 2022). A penicilina foi amplamente usada durante a Segunda Guerra Mundial e era um medicamento de escolha para o tratamento das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* a qual era responsável por causar infecções graves em ferimentos em soldados (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010). Em 1942, foi descrito o primeiro caso de resistência a penicilina, devido ao aparecimento de um gene plasmidial que codifica a betalactamase ou penicilinase, uma enzima que destrói o anel beta-lactâmico da penicilina, levando a sua inativação (OLIVEIRA, 2014).

Os antibióticos podem ser classificados em dois grupos principais: bactericidas e bacteriostático (BASTOS *et al.*, 2022). Os bactericidas são aqueles que induzem a morte das bactérias, enquanto os bacteriostáticos atuam inibindo sua multiplicação. Além disso, os antibióticos de origem natural e semissintética podem ser categorizados em β-lactâmicos, tetraciclina, peptídeos cíclicos, aminoglicosídeos, estreptograminas, macrolídeos, entre outros. Já os antibióticos de origem sintética incluem as sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas. Os antibióticos atuam sobre as bactérias, promovendo sua morte ou impedindo sua proliferação, e o fazem por meio de diferentes mecanismos de ação. Entre os principais mecanismos de ação dos antibióticos estão: inibição da síntese proteica; alteração da parede celular bacteriana; alterações na membrana plasmática; inibição da síntese de RNA; e bloqueio da replicação e reparo do DNA. (DA CUNHA, IZABELLY SOUZA *et al.*, 2023)

Os beta-lactâmicos atuam por meio da inibição da síntese da parede celular bacteriana, sendo compostos por subclasses principais. As penicilinas, por exemplo,

enfraquecem a estrutura da parede celular bacteriana, levando, indiretamente, à sua lise. As cefalosporinas também inibem a síntese da parede celular ao se ligarem às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), interferindo na formação do peptidoglicano, um componente essencial da parede celular, resultando em Lise e morte bacteriana. (DE ARRUDA, C., *et al.*, 2019).

Os carbapenêmicos, de forma semelhante a outros beta-lactâmicos, ligam-se a múltiplas PBPs, interrompendo a formação do peptidoglicano, o principal componente estrutural da parede celular bacteriana, culminando em morte celular por lise, sendo, portanto, classificados como bactericidas. (DE ARRUDA, C., *et al.*, 2019). As sulfonamidas, introduzidas na década de 1930, foram a primeira classe de antibióticos a serem utilizadas clinicamente (ROCHA, 2011). Diferente dos beta-lactâmicos, elas são consideradas bacteriostáticas, ou seja, inibem o crescimento bacteriano sem causar diretamente a morte das células. De modo semelhante, as tetraciclinas são também bacteriostáticas, atuando por meio da interferência na síntese proteica bacteriana (SCHERER, BOTONI e COSTA-VAL 2016).

A descoberta dos antibióticos revolucionou a medicina, permitindo o tratamento eficaz de infecções que, anteriormente, eram fatais. Alguns antibióticos geralmente são usados para tratar uma ampla gama de infecções, sendo eficazes contra uma variedade de patógenos, enquanto outros são direcionados para tratar infecções causadas por tipos específicos de bactérias (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). A maioria dos antibióticos causam alguns efeitos colaterais (por exemplo, diarreia, dores de estômago), já alguns podem ter um risco maior de causar efeitos colaterais graves como por exemplo, danos à audição e aos rins.

Antibióticos, quando mal administrados, eliminam apenas as bactérias mais sensíveis às drogas enquanto as mais resistentes, sobrevivem devido à seleção natural e permanecem no corpo do indivíduo infectado. (OMS, 2022). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, bactérias multirresistentes são organismos que adquiriram resistência a múltiplos antibióticos devido a processos evolutivos, mutações genéticas e transferência horizontal de genes (TEIXEIRA, 2019). Essa resistência múltipla complica significativamente o tratamento das infecções bacterianas. A resistência aos medicamentos é agravada pelo uso inadequado de antibióticos sem orientação profissional e pela sua administração excessiva, contribuindo para a seleção de superbactérias. (BASTOS, 2022).

O saneamento precário, a pobreza, as faltas de água potável agravam a resistência antimicrobiana (RAM). Indivíduos que vivem em locais com acesso limitado à água, saneamento e higiene tem maior risco de contato com água contaminada que podem ter vários patógenos, incluindo bactérias resistentes a antibióticos (UNEP, 2023). Os animais também ficam mais susceptíveis a doenças em condições de higiene precárias. O surgimento de cepas

bacterianas resistentes, torna o tratamento cada vez mais difícil para as infecções, afirmando a necessidade urgente de estratégias alternativas e eficazes para combater a resistência antimicrobiana (OMS, 2020).

Segundo Gallego *et al.* (2018), o aumento dos números de bactérias resistentes coloca em risco muitos avanços da medicina atual. As infecções hospitalares são uma das principais causas de óbitos anuais, especialmente em hospitais com centros cirúrgicos e unidades de tratamento intensivo (UTI) e setores como de transplantes, cirurgias, quimioterapias (GALLEGOS, 2018). A falta de antibióticos eficazes para esses pacientes pode aumentar o risco de complicações e, consequentemente, aumentar também os custos e os números de pacientes hospitalizados. Devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos, tratar os pacientes tem se tornado extremamente difícil, principalmente para infecções causadas por organismos gram-negativos. (DE OLIVEIRA, 2023).

Os patógenos multirresistentes oportunistas mais comuns foram agrupados à sigla ESKAPE, que abrange *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* (D'ANDREA, 2017). Elas causam infecções em pacientes hospitalizados que se encontram com saúde debilitada. Quando esses microrganismos apresentam resistência, dificulta o controle da infecção, elevando o risco de óbito. Esse problema que já era bem relevante antes mesmo da COVID-19, mas tornou-se ainda mais evidente durante a crise sanitária de 2020 (FIOCRUZ, 2021).

Durante a pandemia de covid-19, observou-se um aumento significativo no número de pacientes internados em estado grave por períodos prolongados, o que resultou em um maior risco de infecções hospitalares (JUNIOR, 2023). Considerando que a COVID-19 era uma doença nova, altamente contagiosa e associada a uma elevada taxa de mortalidade, muitos profissionais de saúde enfrentaram incertezas sobre os protocolos de tratamento no início da pandemia. Como consequência, alguns médicos optaram pela administração de antibióticos com base nos sintomas apresentados pelos pacientes. Essa prática contribuiu para o aumento das taxas de resistência bacteriana após a pandemia (ZHANG, XUEYAN *et al.*, 2025).

A combinação de diferentes mecanismos de resistência em um mesmo patógeno é também motivo de aflição. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2018 publicou, um alerta sobre o registro de casos no Paraná e em Santa Catarina de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* capazes de produzir, ao mesmo tempo, as enzimas carbapenemases KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) e NDM (*New Delhi Metalobetalactamase*), que inativam antibióticos carbapenêmicos. A presença dessas duas enzimas inviabiliza a utilização

de um novo antimicrobiano, o fármaco ceftazidima-avibactam, que vem sendo usado nos hospitais brasileiros para combater bactérias produtoras de KPC (ANVISA, 2018).

Em agosto de 2020, foi identificado o primeiro caso dos genes de KPC e NDM em uma mesma cepa de *P. aeruginosa*. Em 2021, já tinham sido identificados 13 pacientes infectados com *P. aeruginosa* multirresistente (FIO CRUZ, 2021). Uma pesquisa global conduzida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no final de 2020 indicou que 35 dos 56 países participantes relataram um aumento na prescrição de antibióticos durante a pandemia. Esse crescimento está associado à vulnerabilidade do sistema imunológico dos pacientes, tornando-os mais suscetíveis à colonização por bactérias ambientais. Entre os patógenos mais prevalentes, destacam-se: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Clostridioides difficile*. (BORGES; ARAUJO, 2023).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu uma nota de extrema relevância destinada aos órgãos de saúde pública. Conforme o relatório, modificado em conformidade com as diretrizes da vigilância sanitária, foi notificado a presença de bactérias resistentes, características de acordo com as espécies de microrganismos, ressaltando-se a gravidade da situação em escala global. (OMS,2020).

Alguns tipos de infecções do trato urinário, sepse e infecções sexualmente transmissíveis, tem apresentado altas taxas de resistência aos antibióticos geralmente utilizado para o tratamento destas infecções. (HEILBER, I. P e SCHOR, N; 2003). A maior taxa de resistência foi vista para a ciprofloxacina, um antibiótico utilizado no tratamento de infecções do trato urinário das quais a resistência variou de 8,4% a 92,9% para *Escherichia coli* e de 4,1 % a 79,4% para *Klebsiella pneumoniae* (BASTOS *et al.*, 2022). Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022), cuidados exigentes são necessários quando os níveis de resistência se aproximam de 20%. As resistências bacterianas representam um problema de saúde pública de escala mundial, acometendo tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento.

1.3 Mecanismos de Resistência

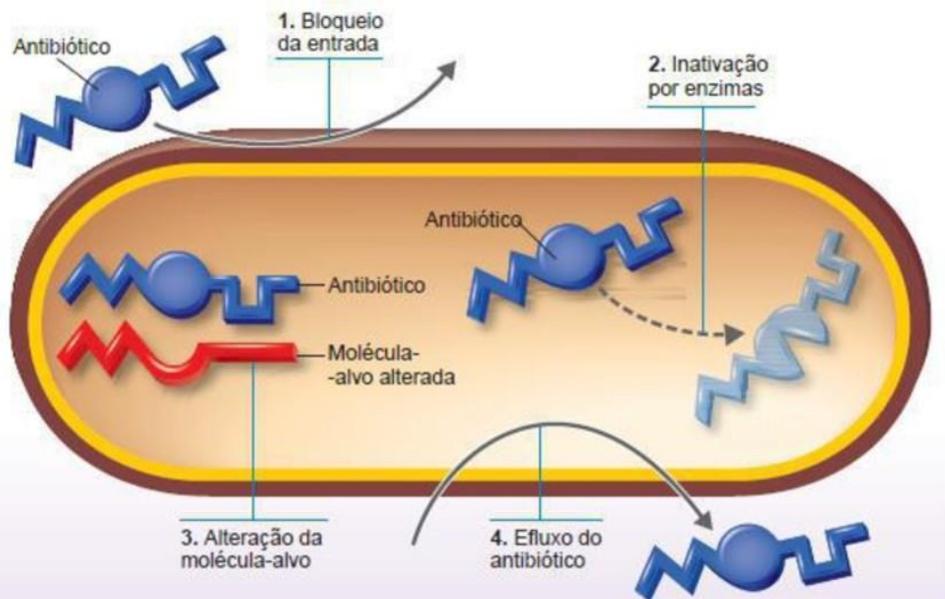
A resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno caracterizado pela expressão de genes que conferem resistência, os quais, de maneira isolada ou combinada, ativam mecanismos bioquímicos e/ou estruturais responsáveis pela ineeficácia da ação antimicrobiana. As bactérias podem apresentar resistência intrínseca, definida como um mecanismo natural de resistência específico a determinado gênero ou espécie, ou resistência

adquirida, que emerge por meio de mutações nos próprios genes bacterianos ou pela incorporação de genes de resistência de outras bactérias. Esta aquisição pode ocorrer por processos como conjugação (via plasmídeos ou transposons), transdução (mediada por bacteriófagos) ou transformação (captação de material genético do ambiente) (DE ANDRADE *et al.*, 2020).

Os principais mecanismos de resistência bacteriana incluem: a produção de enzimas que inativam ou modificam a ação dos antibióticos; a redução da permeabilidade da membrana externa, impedindo a entrada do fármaco; a hiperexpressão de sistemas de efluxo, que promovem a excreção de substâncias tóxicas, incluindo os antibióticos; e a modificação, bloqueio ou proteção do sítio alvo do antibiótico, dificultando sua ação (DE ANDRADE *et al.*, 2020).

Esses mecanismos representam barreiras significativas para o tratamento eficaz de infecções bacterianas, contribuindo para a crescente crise da resistência antimicrobiana. Observa-se na Figura 2, a resistência bacteriana aos antibióticos, que pode ocorrer por diversos mecanismos, entre eles: alteração do sítio alvo, bomba de efluxo, bloqueio de entrada da molécula na célula bacteriana e destruição ou inativação enzimática.

Figura 2- Principais mecanismos de resistência



Adaptado a: (da Silva, A. E. F., & Júnior, O. M. R. 2022). A resistência bacteriana aos antibióticos, que pode ocorrer por diversos mecanismos, entre eles: alteração do sítio alvo, bomba de efluxo, bloqueio de entrada da molécula na célula bacteriana e destruição ou inativação enzimática.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a falta de acesso a

antimicrobianos de qualidade continua a ser um problema significativo, e a escassez de antibióticos afeta países em todos os níveis de desenvolvimento. Dados da OMS indicam que o acesso inadequado a antibióticos resulta em aproximadamente seis milhões de mortes anuais, incluindo um milhão de crianças que morrem com infecções generalizadas evitáveis, como sepse e pneumonia (OMS, 2021).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos relata que mais de 2,8 milhões de infecções resistentes a antibióticos ocorrem anualmente no país, resultando em mais de 35 mil mortes. Na União Europeia, a resistência microbiana a antimicrobianos é responsável por cerca de 33 mil óbitos por ano, além de gerar um custo estimado de 1,5 bilhão de euros anuais em gastos com saúde e perda de produtividade. (OMS, 2021).

A falsificação de medicamentos, juntamente com a produção de medicamentos de baixa qualidade, também contribui significativamente para o aumento da resistência microbiana, pois esses produtos não desempenham as funções esperadas. Segundo a OMS (2021), entre 72 mil e 169 mil crianças morrem anualmente devido a pneumonia causada pelo uso de antibióticos falsificados.

Evidências científicas na área sugerem que um fator crucial para o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos é a inadequada administração das dosagens, bem como o uso incorreto ou excessivo desses fármacos. A prática de prescrever a mesma dosagem para todos os pacientes, sem levar em consideração suas características individuais, pode comprometer significativamente a eficácia terapêutica dos antibióticos. O uso inadequado desses medicamentos contribui para o surgimento e evolução de cepas bacterianas resistentes, comumente conhecidas como superbactérias. (BASTOS *et al.*, 2022).

1.4 Infecções Nosocomiais

As infecções nosocomiais, também chamadas de infecções hospitalares, são aquelas adquiridas ao longo de uma internação hospitalar ou relacionadas a procedimentos realizado no hospital que podem se manifestar mesmo após a alta (SABA *et al.*, 2023).

Essas infecções não são um fenômeno recente. O obstetra húngaro Ignaz Semmelweis, em 1847, observou que médicos, por meio de mãos contaminadas, transmitiam febre puerperal as mulheres após realizarem necropsia e, em seguida, atenderem parturientes sem a higienização devida (ALMEIDA, 2015). Ignaz Semmelweis enfrentou muitas críticas e rejeições de seus colegas estabeleceu um protocolo de desinfecção em sua unidade de saúde

que continham fervura instrumental e os médicos e estudantes tinham como obrigação lavar as mãos com uma solução de ácido clorídrico antes de entrarem na sala de parto. Com essas medidas bem simples, ele conseguiu reduzir em 83% a mortalidade por febre puérpera (PUCCINI, 2011). Essas infecções estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade. De acordo com o Ministério da Saúde (2022), a pandemia de COVID-19 e seus impactos sanitários reforçaram a importância da higienização adequada das mãos, que se tornou um hábito global com o objetivo de reduzir a propagação do novo coronavírus (OMS, 2022).

Segundo o Ministério da saúde grande parte das infecções hospitalares é causada por microrganismos presentes no próprio paciente. De acordo com Associação Médica Brasileira, mais de 45 mil brasileiros morrem anualmente devido essas infecções, e a OMS, estima que esse número possa chegar 100 mil por ano (BRASIL, 1998). Os microrganismos presentes no corpo humano ou no meio ambiente podem beneficiar a fragilidade do sistema imunológico de pacientes internados, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), ou em indivíduos idosos e outros grupos vulneráveis (BORGES *et al.*, 2023). Essas infecções nosocomiais também podem ser ocasionadas por falhas em procedimentos realizados por profissionais de saúde, sendo transmitidas através das mãos ou de materiais contaminados. Por essa razão, a higiene das mãos, antes e depois de uma visita ou contato com o paciente, é uma das recomendações mais básicas na prevenção de infecções.

Pacientes que se encontram em UTIs se expõem a um risco elevado de infecções hospitalares principalmente quando fazem uso de cateter venoso central, sabendo-se que, os conectores atuam intermediários, facilitando a entrada de microrganismos (CARVALHO *et al.*, 2014). É fundamental que todos os profissionais de saúde presentes nessas unidades sejam responsáveis pelo controle de infecções, principalmente a equipe de enfermagem, que mantém contato direto com os pacientes. Esses profissionais devem possuir conhecimento aprofundado sobre biossegurança e aplicar corretamente as técnicas assépticas, garantindo a prevenção da contaminação cruzada (PADOVEZE, *et al.*, 2014).

Outro fator relevante em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) adultas é a pneumonia nosocomial reconhecidas como uma das infecções mais presentes. Esta condição está associada sobretudo aos pacientes submetidos a cirurgias cardíacas, uma vez que o uso de ventilação mecânica eleva o risco de sua ocorrência. (AMARAL *et al.*, 2009). Conforme citado anteriormente, diversos microrganismos são causadores de infecções nosocomiais, com destaque para as bactérias.

Na Europa estima-se que ocorram cerca de 8,9 milhões de infecções nosocomiais anualmente, muitas dessas estão relacionadas ao desenvolvimento de multirresistência

bacteriana a antibióticos, resultando em 24 mil mortes no ano de 2018 (FERREIRA, 2022). O uso indiscriminado de antibióticos tem promovido mudanças nas características epidemiológicas das infecções hospitalares, favorecendo o surgimento de bactérias multirresistentes como *Staphylococcus coagulase negativo*, seguidas pelas bactérias Gram-negativas, incluindo a *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* (ARTHUR TIMERMN ,2017).

Em seguida os fungos de importância médica, são observados, sendo leveduras do gênero *Candida spp.* as mais frequentes, com variações entre as espécies *albicans* e não-*albicans* como os principais agentes (CARVALHO, et al.,2014). Além disso, infecções em recém-nascido (RN) são consideradas nosocomiais, exceto aquelas transmitidas por via transplacentária durante a gestação. De acordo com o *Center for Disease Control* (CDC), as infecções neonatais incluem aquelas adquiridas no período intraparto, de origem materna, ocorrendo até 48 horas de vida, durante a hospitalização ou até 48 horas após a alta. Essas infecções representam uma das principais causas de mortalidade em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) (BRASIL, 1998; MOURA et al., 2007).

Essas infecções adquiridas em ambiente hospitalar são monitoradas por diferentes agências internacionais de vigilância, tais como a National Healthcare Safety Network (NHSN), sistema norte-americano de monitoramento de eventos adversos e infecções relacionadas à assistência à saúde; o National Institute for Health and Care Excellence (NICE), responsável pela elaboração de diretrizes baseadas em evidências para prevenção e controle de infecções no Reino Unido; e o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), que coordena programas de vigilância, prevenção e controle de infecções em âmbito internacional (CDC, 2020).

Em 15 de maio, celebra-se o Dia Nacional do Controle das Infecções Hospitalares, instituído pela Lei nº 11.723/2008, com o objetivo de conscientizar a sociedade sobre a importância das ações de prevenção e controle das infecções relacionadas à assistência à saúde (ANVISA, 2024). Dentre as principais medidas de prevenção, destaca-se a higienização das mãos, considerada uma das ações mais eficazes para reduzir a transmissão de microrganismos em serviços de saúde. A higienização pode ser realizada tanto com água e sabão quanto com preparações alcoólicas a 70%, sendo recomendada para profissionais da saúde, visitantes e pacientes. Essa orientação é amplamente reforçada nas campanhas nacionais de prevenção e controle de infecções (MINISTERIO DA SAÚDE, 2024).

1.5 Agente Etiológico *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria gram-negativa, imóvel, encapsulada, fermentadora de lactose, anaeróbica facultativa, tem forma de bastonete, considerada um patógeno oportunista encontrada na flora normal dos intestinos, mas podendo causar diversas infecções, principalmente em indivíduos hospitalizados ou imunocomprometidos (Figura 3). De acordo com Brisse e Grimont (2021), o gênero *Klebsiella* recebeu esse nome em homenagem ao microbiologista Edwin Klebs, sendo designado por Trevisan, em 1885, durante a classificação inicial do grupo bacteriano.

Figura 4- Bactéria *Klebsiella pneumoniae*

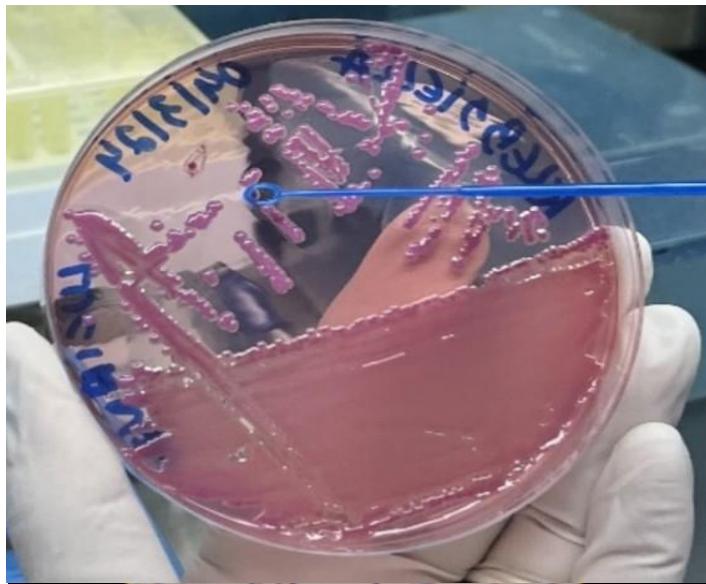


Figura 3 - Placa de cultura da bactéria *Klebsiella pneumoniae* Fonte: Próprio autor



Cultura de bactéria *Klebsiella pneumoniae* em uma placa de Petri no meio ágar Mac conkey.

Fonte: (Leme, Gabriel,2024). *Klebsiella pneumoniae* encapsulada, gram negativa, importante membro da família das enterobactérias em forma de bastonete.

As culturas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* apresentam aspecto mucoide, devido à produção de cápsula polissacarídica, e exibem rápido crescimento em meios convencionais utilizados para o isolamento de Enterobacteriaceae, como ágar nutritivo, ágar sangue e ágar TSA (Tryptic Soy Agar). A bactéria também cresce eficientemente em meios diferenciais, como o ágar MacConkey (Figura 4), no qual forma colônias grandes, brilhantes e de coloração rósea, resultado da fermentação da lactose, característica marcante da espécie. Outro meio seletivo e diferencial amplamente utilizado é o ágar EMB (Eosin Methylene Blue Agar), que favorece o crescimento de bacilos Gram-negativos. Nesse meio, *K. pneumoniae* forma colônias rosadas, de consistência mucoide e com aspecto brilhante, refletindo sua capacidade fermentadora (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; BRISSE& GRIMONT, 2021).

De acordo com a Agência FAPESP, bactérias da espécie *Klebsiella pneumoniae* estão entre os microrganismos que mais causam infecções hospitalares no Brasil e figuram entre aqueles com maior avanço em resistência a antibióticos nos últimos anos. Esse patógeno está associado a quadros clínicos graves, especialmente em ambientes hospitalares, incluindo pneumonia, infecções da corrente sanguínea, meningite, entre outras infecções relacionadas à assistência à saúde (FAPESP, 2019).

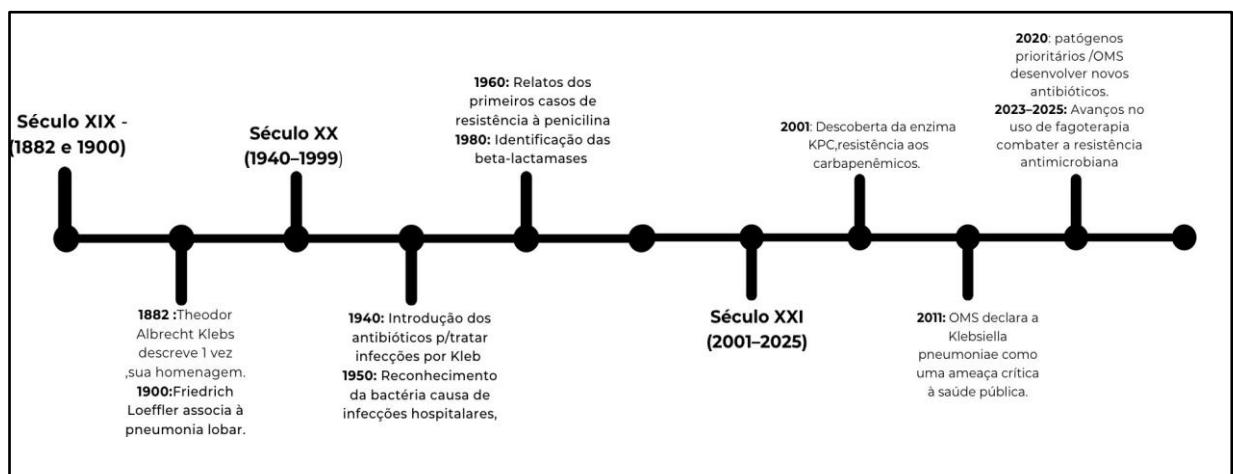
No ambiente hospitalar, *Klebsiella pneumoniae* pode ser transmitida principalmente pelo contato direto, seja de pessoa para pessoa ou de paciente para paciente, por meio das mãos contaminadas de profissionais de saúde ou visitantes. A transmissão por superfícies e dispositivos contaminados também pode ocorrer, embora de forma menos frequente. Importante ressaltar que *K. pneumoniae* não se dissemina pelo ar, mas pode colonizar o organismo de pacientes internados que utilizam ventilação mecânica, cateteres intravenosos ou que apresentam feridas cirúrgicas, uma vez que a bactéria é capaz de aderir e se multiplicar em tubulações e superfícies internas desses dispositivos médicos (CDC, 2019).

Diversos estudos demonstram que espécies do gênero *Klebsiella* podem apresentar resistência aos carbapenêmicos, uma classe de antibióticos amplamente utilizada no tratamento de infecções graves, especialmente em pacientes críticos internados em Unidades de Terapia Intensiva. Esses antimicrobianos constituem, muitas vezes, a terapia de última linha para infecções hospitalares severas (HILAL-DANDAN & BRUTON, 2014). Os carbapenêmicos tornam-se ineficazes quando a bactéria produz enzimas β -lactamases, em especial as carbapenemases, capazes de hidrolisar seu anel β -lactâmico. Essas enzimas são classificadas em três grupos principais: classe A – serina carbapenemases, classe B – metalo- β -lactamases e

classe D – oxacilinases (GUPTA; NAGARA; DOUGLAS, 2023; ROCHA, 2021).

Entre as carbapenemases classe A, destaca-se a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), amplamente disseminada em ambientes hospitalares. Até o momento, já foram identificadas diversas variantes da enzima KPC, designadas numericamente conforme sua ordem de descoberta, como KPC-1, KPC-2, KPC-3, KPC-4, entre outras. Contudo, KPC-2 e KPC-3 são as variantes de maior relevância clínica, estando entre as mais prevalentes em isolados de *K. pneumoniae* associados a surtos e infecções hospitalares no Brasil e em outros países (BIBERG; RODRIGUES; CARMO, 2015, BRISSE; GRIMONT, 2021).

Figura 5- Principais marcos históricos da *Klebsiella pneumoniae*



Fonte; Silva, J. A.; Souza, M. F.; Oliveira, R. T., 2023. Linha do tempo dos principais marcos históricos da *Klebsiella pneumoniae*.

Os primeiros casos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) foram identificados no final da década de 1990, em amostras clínicas de pacientes no estado da Carolina do Norte, nos Estados Unidos (Figura 5). Posteriormente, múltiplos surtos foram documentados no Nordeste norte-americano, especialmente na cidade de Nova York, seguida por rápida disseminação internacional, com registros em países como Israel, Grécia, Alemanha e Itália. No Brasil, os primeiros relatos de KPC surgiram em 2006, no estado de Pernambuco, marcando um desafio emergente para o controle de infecções hospitalares (BIBERG; RODRIGUES; CARMO, 2015).

A evolução da resistência tem se intensificado nos últimos anos. Já foram identificadas variantes de KPC capazes de conferir resistência a praticamente todos os β-

lactâmicos disponíveis, agravando o cenário terapêutico atual (FERREIRA, 2022). Em resposta ao avanço dessas infecções, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou, em 2018, o uso da combinação ceftazidima-avibactam, uma alternativa eficaz contra bactérias produtoras de KPC, devido à ação inibitória do avibactam sobre essa carbapenemase (ANVISA, 2018).

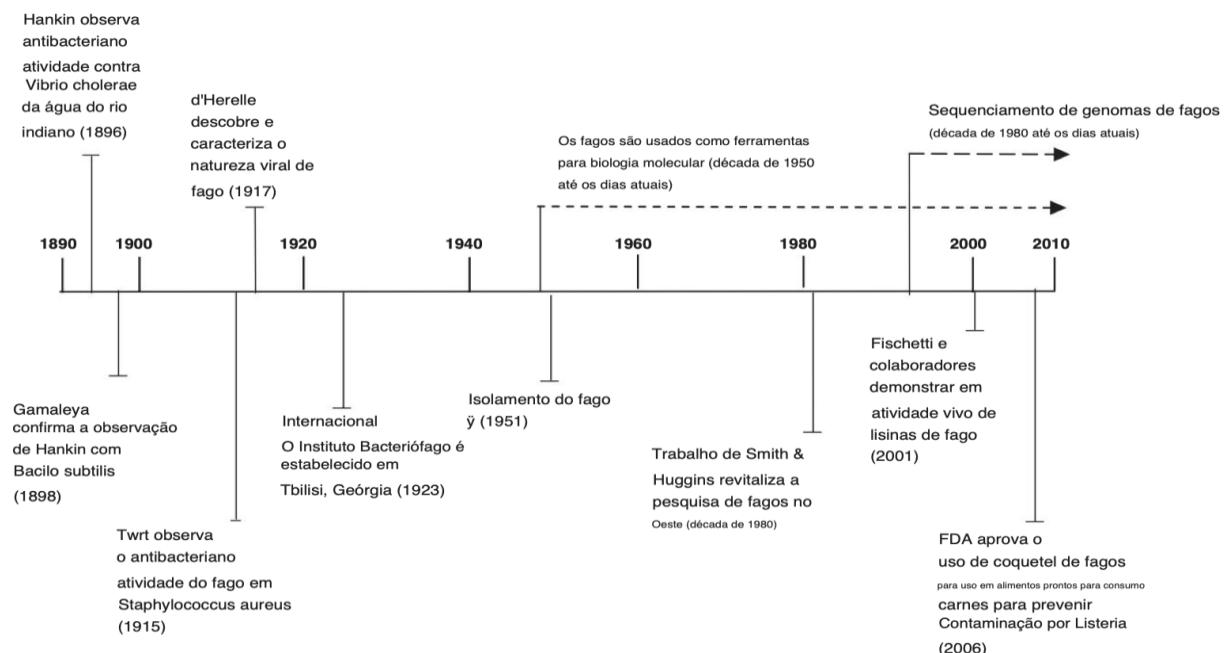
Entre 2019 e 2021, um estudo de coorte prospectivo realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio, na cidade de Fortaleza/CE, isolou 258 bactérias Gram-negativas de pacientes internados em unidades de terapia intensiva. Os fenótipo e genótipos de resistência desses isolados foram investigados. Os resultados mostraram que muitas dessas bactérias, especialmente *Klebsiella pneumoniae*, são multirresistentes, o que dificulta a escolha de antibióticos adequados para o tratamento (ALMEIDA V. V. P., 2013). Esses achados reforçam a necessidade de alternativas terapêuticas inovadoras para o enfrentamento das infecções causadas por patógenos resistentes.

1.6 Histórico dos Bacteriófagos

O uso de bacteriófagos como agente de bio controle teve início em 1896, quando Ernest Hankin descreveu a presença de uma substância com atividade antibacteriana contra *Vibrio cholerae*, agente etiológico da cólera, uma das doenças mais letais da época (HAQ *et al.*, 2012). Em 1915, o bacteriologista Frederick Twort (Figura 7) realizou uma descoberta fundamental ao observar um agente filtrável capaz de lisar colônias bacterianas, posteriormente reconhecido como bacteriófago vírus capaz de infectar e destruir bactérias (DA SILVA, 2011).

Twort buscava desenvolver métodos de cultivo viral independentes de células animais e, durante suas tentativas de cultivar vírus em meios artificiais, inoculou uma placa de ágar nutritivo. Durante esse processo, observou o surgimento de colônias bacterianas com alterações morfológicas características, incluindo aparência aquosa, transparência e, em alguns casos, perda da capacidade de crescimento, sugerindo a presença de um agente lítico bacteriano (LOBA *et al.*, 2014).

Figura 6- Linha do tempo da história dos fagos



Adaptado a: (O'Flaherty; Ross; Coffey, 2009). Linha do tempo dos principais marcos na história dos fagos.

Esse fenômeno foi denominado por ele como "transformação transparente". Twort publicou suas observações, sugerindo a existência de um vírus capaz de infectar e destruir bactérias. No entanto, o progresso de sua pesquisa foi interrompido com surgimento da Primeira Guerra Mundial, o que dificultou o avanço de suas descobertas (DERESINSKI, 2009). Dois anos depois, em 1917, o microbiologista francês Félix d'Hérelle identificou o agente causador desse fenômeno e nomeou-o como "bacteriófago" (do grego "fago", que significa "devorar") (VIEIRA *et al.*, 2021). Félix d'Hérelle vinculou sua descoberta dos bacteriófagos aos surtos de hemorragias graves e disenteria que afetaram as tropas francesas durante a Primeira Guerra Mundial.

Figura 7- Frederick Twort (1877-1950) e Felix d'hérelle (1873-1949).



F. Twort descobriu os bacteriófagos em 1915. O microbiologista Felix d' Herelle também descobriu os bacteriófagos em 1917.

Em 1920, logo após a identificação dos bacteriófagos, d'Hérelle introduziu a terapia fágica no tratamento de um menino que sofria de disenteria, demonstrando resultados promissores, com a rápida interrupção dos sintomas após uma única administração de fagos (BRÜSSOW, H. 2017). A partir das evidências de eficácia obtidas em seus experimentos, d'Hérelle passou a comercializar bacteriófagos como agentes terapêuticos para o tratamento de diversas doenças infecciosas. Entre os produtos desenvolvidos pela *Société Française de Bactériophagie* estavam o Bacte'-coli-phage, Bacte'-phage-intesti, Bacte'-pyo-phage e Bacte'-Staphy-phage, cada um direcionado a patógenos específicos (DERENSINSKI, 2009).

Com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, a terapia fágica perdeu espaço no Ocidente. Entretanto, o surgimento de infecções causadas por bactérias multirresistentes e a escassez de novos antibióticos recolocaram os fagos em destaque como alternativa terapêutica promissora (FRUICIANO; BOURNE, 2007). A partir da década de 1960, o uso indiscriminado de penicilina favoreceu o aumento da resistência bacteriana: cerca de 50% das cepas de *Staphylococcus aureus* passaram a produzir penicilinase, enzima capaz de destruir a molécula do antibiótico — considerado o primeiro relato documentado de resistência antimicrobiana (GUIMARÃES *et al*, 2010).

Com o passar dos anos, observou-se redução progressiva da eficácia dos antimicrobianos disponíveis, levando ao surgimento de superbactérias, resistentes a múltiplas classes de antibióticos. Em resposta a esse cenário, diversas estratégias terapêuticas têm sido

exploradas globalmente, incluindo a fagoterapia, reconhecida como uma alternativa viável para o controle de infecções por bactérias multirresistentes (MARCHIOTTI *et al.*, 2016).

No Brasil, os registros históricos sobre o uso de fagos datam do início do século XX. Em 1915, o pesquisador Gabriel (Instituto Oswaldo Cruz) realizou estudos pioneiros com bacteriófagos, publicados em 1921 (FIOCRUZ, 2021). Nas décadas seguintes, especialmente nos anos 1940, resultados inconsistentes e o advento dos antibióticos levaram ao declínio da fagoterapia no país. Apesar disso, o uso clínico de fagos permanece ativo em países do Leste Europeu e da Ásia, como Rússia, Geórgia e Polônia, onde a tecnologia continua a ser empregada com sucesso até os dias atuais.

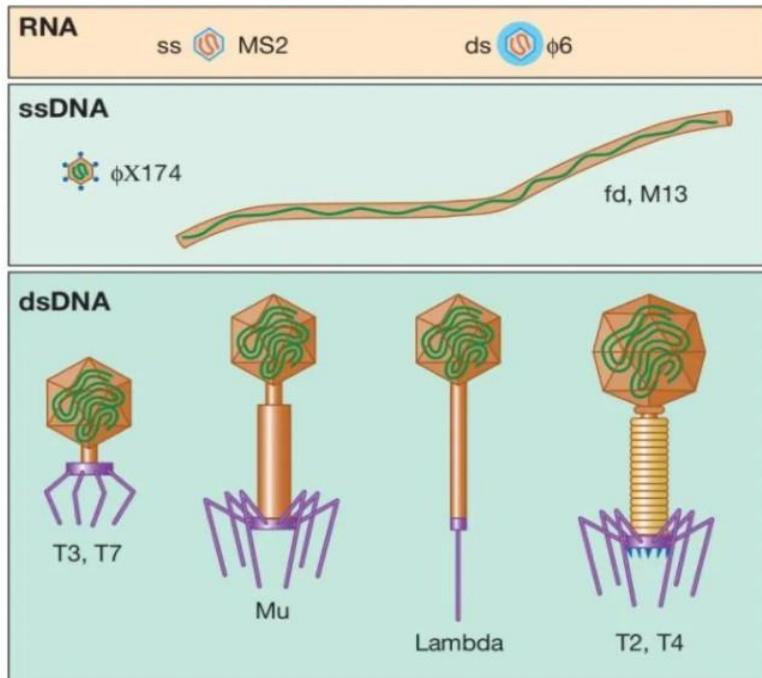
1.7 Bacteriófagos

Os bacteriófagos apresentam ampla diversidade em relação à especificidade, morfologia e tipo de material genético. A maior parte deles possui genoma constituído por DNA de fita dupla (dsDNA), embora existam fagos com DNA de fita simples (ssDNA), RNA de fita dupla (dsRNA) ou RNA de fita simples (ssRNA), refletindo a grande variabilidade genética presente nesse grupo viral.

Estruturalmente, os fagos possuem um capsídeo, que pode apresentar forma icosaédrica, filamentosa ou cabeça-cauda. Esse capsídeo envolve o material genético e, nos fagos tailed (Caudoviricetes), está associado a estruturas como bainha contrátil, placa basal e fibras caudais, que desempenham papel essencial no processo de adsorção e injeção do genoma viral na célula hospedeira (ACKERMAN, 2007; RIOS *et al.*, 2016).

Os fagos de dsDNA geralmente apresentam cauda, como os clássicos T2, T4 e Mu, pertencentes aos grupos históricos dos bacteriófagos caudados. A cauda pode ser contrátil, característica essencial para a penetração do material genético no interior da bactéria. Em outros casos, como no bacteriófago λ (lambda), a cauda é flexível e não contrátil, apresentando morfologia distinta, como ilustrado na Figura 8.

Figura 8- Tipos morfológicos de bacteriófagos

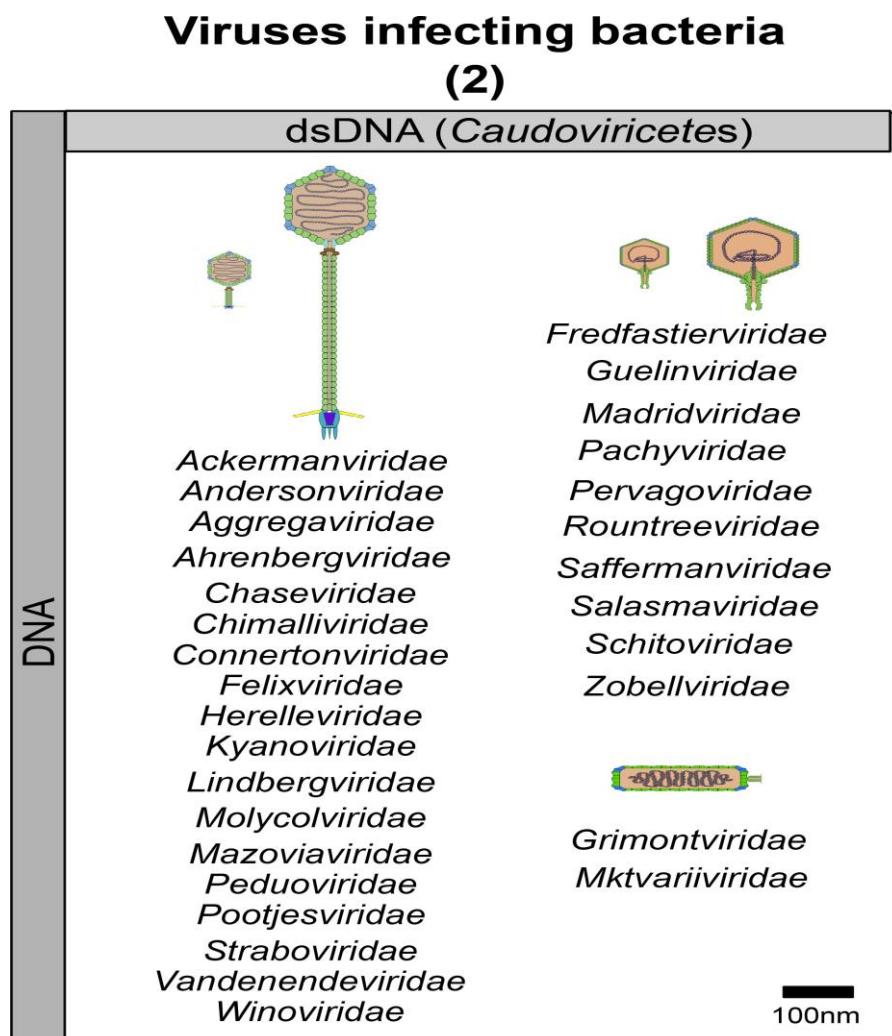


Fonte: (Madigan *et al.*, 2010). RNAss de fita simples MS2 23nm; de fita dupla segmentado; ssDNA de fita simples filamentosos 85-1950 de comprimento; dsDNA de dupla fita, apresentam uma cauda como os fagos T2, T4 e MU; fago lambda.

Historicamente, os bacteriófagos foram agrupados em diferentes famílias com base em características morfológicas, genômicas e estruturais. Os fagos que apresentam cauda constituíam a antiga ordem Caudovirales, que representava aproximadamente 96% dos bacteriófagos descritos. Dentro desse grupo, cerca de 60% dos fagos possuíam cauda longa e não contrátil (tradicionalmente classificados como Siphoviridae), aproximadamente 25% apresentavam cauda contrátil (Myoviridae), e uma parcela menor possuía cauda curta e não contrátil (Podoviridae), enquanto os demais fagos eram distribuídos entre outras famílias menos frequentes (MADIGAN et al, 2008; ACKERMANN, 2007).

Entretanto, com os avanços nas análises genômicas e filogenéticas, a taxonomia viral passou por profunda reestruturação. Na classificação mais recente publicada pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), em 2024, as antigas famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* deixaram de ser reconhecidas formalmente. Atualmente, os bacteriófagos caudados são classificados dentro da classe Caudoviricetes, que engloba diversas novas ordens e famílias definidas com base em critérios genômicos mais robustos (ICTV, 2024) (Figura 9).

Figura 9- Representação de algumas famílias referidas para a classificação dos fagos



Fonte: (ICTV; 2024). Representação de alguns bacteriófagos. Os bacteriófagos da classe *Caudoviricetes* estão localizados entre os vírus de DNA de fita dupla (dsDNA), como indicado na figura.

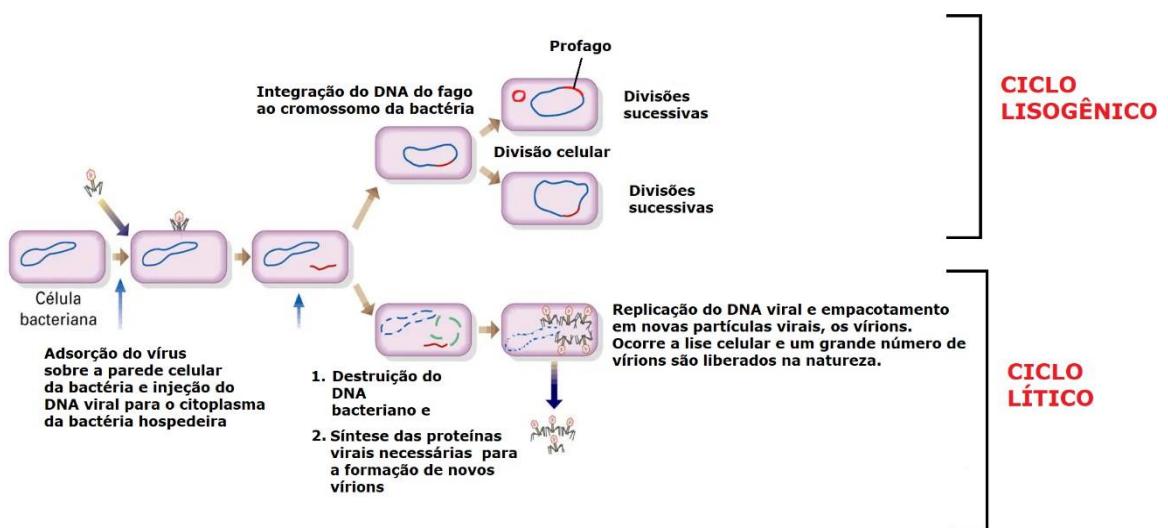
Os bacteriófagos podem apresentar diferentes ciclos biológicos, sendo os dois principais o ciclo lítico e o ciclo lisogênico (Figura 10) (ACKERMANN, 2003). Independentemente do ciclo, o primeiro passo na infecção do hospedeiro é a adsorção viral, na qual o fago se liga à superfície da bactéria através de proteínas localizadas nas fibras da cauda que interagem com receptores específicos presentes na membrana externa da bactéria. Após a ligação irreversível aos receptores, inicia-se o processo de injeção do material genético, no qual o fago induz a formação de um poro na membrana celular com o auxílio de enzimas, permitindo a introdução do material genético na célula. (BRUSSOW, *et al*, 2002).

O processo de replicação do fago ocorre de maneira distinta dependendo do tipo de cauda presente. No ciclo lítico, o fago se apodera da célula hospedeira e utiliza seus recursos para a produção de numerosos novos fagos, levando à lise (ruptura) e morte da célula

hospedeira. Este ciclo pode ser dividido nas seguintes etapas:

- a) Adsorção- proteínas da cauda do fago se ligam a receptores específicos, da superfície bacteriana, transportadores de açúcares ou proteínas de membrana;
- b) Entrada - o genoma do fago é injetado no citoplasma da célula bacteriana;
- c) Replicação e síntese - O genoma do fago é replicado e seus genes são expressos, resultando na síntese de proteínas, incluindo aquelas que compõem o capsídeo do fago. Consequentemente a montagem dos novos fagos ocorre após a replicação do material genético e a síntese das proteínas. Durante esta fase os capsídeos são montados a partir das proteínas virais e são preenchidos com o DNA, resultando na produção de numerosas novas partículas virais.
- d) Lise celular - ao final do ciclo, o fago expressa genes que codificam proteínas líticas, como holinas e endolisinas. As holinas formam poros na membrana interna da bactéria, permitindo que as endolisinas alcancem o periplasma, onde degradam o peptidoglicano da parede celular. Esse processo resulta na lise da célula bacteriana e na liberação de novos fagos, capazes de iniciar novos ciclos de infecção em bactérias suscetíveis (YOUNG, 2013; PUJATO *et al.*, 2018).

Figura 10 - Ciclo lítico e lisogênico dos bacteriófagos



Adaptado: (A Alsubhi, Ghadah, 2021).1) Ligação a bactéria e injeção do DNA. O DNA do fago entra na célula hospedeira, podendo iniciar o ciclo lítico ou lisogênico; 2) Fago entra no ciclo lítico: multiplica-se na bactéria hospedeira; a célula sofre lise e os fagos são liberados. O bacteriófago liga-se à bactéria para iniciar um novo ciclo. Ciclo lisogênico; 3 e 4) o DNA do fago integra-se ao cromossomo bacteriano, tornando-se um profago; bactéria se reproduz normalmente passando o profago para suas células-filha. Replicação do fago e síntese de proteínas; 5) Montagem de novos vírions; 6) Lise celular e liberação de vírions.

No ciclo lisogênico, também característico de fagos temperados, após a adsorção e

a injeção do material genético na célula bacteriana etapas semelhantes às observadas no ciclo lítico, o DNA do fago não é imediatamente replicado nem expresso para a produção de novas partículas virais. Em vez disso, o genoma fágico integra-se a uma região específica do cromossomo bacteriano, passando a ser denominado profágico (ACKERMANN, 2003; MADIGAN *et al.*, 2008).

O DNA fágico integrado permanece, em geral, metabolicamente inativo, com seus genes silenciados, não ocorrendo a síntese de proteínas virais nem a formação de novos fagos. Durante as divisões celulares da bactéria hospedeira, o profágico é replicado juntamente com o DNA bacteriano, garantindo sua manutenção ao longo das gerações celulares (BRÜSSOW & HENDRIX, 2002). Em determinadas condições, como exposição a agentes estressores, danos ao DNA ou alterações ambientais, o profágico pode ser induzido a excisar-se do cromossomo bacteriano. Esse processo desencadeia a transição para o ciclo lítico, no qual ocorrem a replicação do genoma viral, a síntese das proteínas estruturais, a montagem das partículas virais e, por fim, a lise da célula hospedeira (WITTEBOLE *et al.*, 2014)

1.8 Uso clínico dos Bacteriófagos

A terapia fágica constitui uma estratégia antibacteriana alternativa ou complementar à antibioticoterapia convencional, baseada na utilização de bacteriófagos estritamente líticos no tratamento de infecções bacterianas. O interesse por essa abordagem foi renovado em função do aumento expressivo da resistência bacteriana a múltiplos antibióticos. Nesse contexto, os fagos apresentam potencial para substituir ou atuar como agentes terapêuticos adjuvantes, ampliando as opções disponíveis para o manejo de infecções bacterianas difíceis de tratar (VIERTEL *et al.*, 2014).

A fagoterapia já vem sendo aplicada em alguns países, especialmente na Europa Oriental, como Rússia e Geórgia, onde o uso de coquetéis de bacteriófagos é uma prática consolidada (PEARLY JACOB, BBC, 2021). Estudos clínicos clássicos demonstraram resultados promissores, como o trabalho de (CISLO *et al.*, 1987), que relataram 74% de sucesso terapêutico no tratamento de infecções cutâneas supurativas crônicas causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Staphylococcus spp.*, em um grupo de 31 pacientes. Os bacteriófagos podem ser administrados por diferentes vias, incluindo tópica, oral, inalatória, enteral, intravenosa e intramuscular, dependendo do tipo e da localização da infecção. Entre essas, a via oral destaca-se por apresentar boa tolerabilidade e ampla distribuição no organismo, especialmente em infecções do trato gastrointestinal (GILL &

HYMAN, 2010).

Um estudo conduzido em 2012 identificou um bacteriófago capaz de inibir simultaneamente o crescimento de *Salmonella enterica* (sorovar Typhimurium) e *Escherichia coli*, constituindo o primeiro relato na literatura de um fago com capacidade de infectar e inibir duas espécies bacterianas distintas (PARK *et al.*, 2012). Os bacteriófagos apresentam elevado potencial para diversas aplicações biotecnológicas, incluindo a agricultura animal, a indústria de alimentos, a medicina veterinária, a medicina humana e as ciências ambientais. Destaca-se, nesse contexto, o papel dos fagos como agentes terapêuticos na eliminação de bactérias patogênicas, especialmente aquelas envolvidas na formação de biofilmes (SOUZA, 2012).

No enfrentamento de infecções causadas por bactérias resistentes, têm sido desenvolvidos coquetéis de bacteriófagos, compostos por múltiplos fagos específicos para uma determinada espécie ou grupo bacteriano (DOMINGO-CALAP *et al.*, 2018). A terapia fágica pode ser administrada diretamente ao paciente utilizando bacteriófagos virulentos, ou seja, de ciclo lítico, com o objetivo de promover a lise das bactérias patogênicas responsáveis pela infecção. Os fagos líticos são preferencialmente selecionados para essa abordagem terapêutica por duas razões principais: primeiramente, promovem a destruição eficiente da célula hospedeira; além disso, diferentemente dos fagos temperados, não apresentam risco de transferência de genes de virulência ou resistência, uma vez que não se integram ao genoma bacteriano (WITTEBOLE *et al.*, 2014).

Os fagos líticos apresentam características intrínsecas relevantes para aplicações clínicas, como elevada especificidade ao receptor bacteriano e capacidade de lise celular com liberação de novas partículas virais, o que favorece sua eficácia terapêutica (CRISCUOLO *et al.*, 2017). Para ampliar o espectro de ação e reduzir o surgimento de resistência bacteriana, esses fagos podem ser formulados em coquetéis, contendo múltiplos isolados direcionados contra diferentes cepas de uma mesma espécie bacteriana.

Além do uso direto dos fagos, diversos estudos demonstraram o sucesso da aplicação de enzimas derivadas de bacteriófagos, como endolisinas, na destruição de bactérias patogênicas (FATHIMA & ARCHER, 2021). De modo geral, a fagoterapia apresenta vantagens em relação à antibioticoterapia convencional, uma vez que os bacteriófagos atuam de forma altamente específica, reduzindo o risco de efeitos colaterais, infecções secundárias e disbiose, sem comprometer a microbiota do hospedeiro (VIERTL *et al.*, 2014).

1.9 Genômica dos Bacteriófagos

Os bacteriófagos com potencial terapêutico necessitam de uma caracterização biológica e genômica rigorosa antes de sua aplicação clínica. O uso desses vírus, especialmente aqueles que não são estritamente líticos, pode induzir a expressão de fatores de virulência bacterianos como resposta adaptativa à infecção fágica. Um exemplo emblemático é a cepa O104:H4 de *Escherichia coli*, que, após a aquisição de genes transportados por bacteriófagos, passou a expressar a toxina Shiga, associada a quadros graves de diarreia hemorrágica e lesões renais, culminando na síndrome hemolítico-urêmica (MUNIESA *et al.*, 2012). Dessa forma, a transferência gênica mediada por fagos pode transformar bactérias previamente comensais em patógenos altamente virulentos (TURNER, 2011; MUNIESA *et al.*, 2012).

Diante desse cenário, a caracterização genômica dos bacteriófagos torna-se indispensável antes de qualquer ensaio pré-clínico ou uso terapêutico. Essa abordagem permite determinar se o fago é estritamente lítico ou se possui capacidade de integrar-se ao genoma bacteriano, o que representa um potencial risco biológico. Nesse contexto, é fundamental investigar a presença de genes que codificam a integrase (Int), enzima responsável por mediar a recombinação sítio-específica entre o DNA do fago e o do hospedeiro, envolvendo os sítios attP (no bacteriófago) e attB (na bactéria). Bacteriófagos que codificam integrases não são indicados para uso em fagoterapia, devido ao risco de transferência de genes indesejáveis e de modulação da virulência bacteriana (GROTH & CALOS, 2004).

O avanço nas plataformas de sequenciamento, aliado à redução dos custos dessa tecnologia, tem impulsionado significativamente o campo da genômica de bacteriófagos. A bioinformática desempenha um papel crucial ao permitir a identificação e caracterização de genes fagos ainda não descritos, o que é fundamental para a compreensão da diversidade e função desses vírus. Embora recentes, os estudos genómicos de bacteriófagos têm sido fundamentais para ampliar o conhecimento sobre a diversidade molecular e as estratégias utilizadas pelos fagos caudados (CASJENS, 2005).

A genômica funcional envolve o sequenciamento do material genético dos bacteriófagos, seguido da montagem e anotação dos genomas, com a atribuição de funções aos produtos gênicos identificados. Essa abordagem, pode ser realizada por meio de previsões *in silico* ou acoplada a análises experimentais *in vitro*, possui grande potencial para aprimorar a anotação de genomas de fagos e, consequentemente, sua caracterização biológica. Estima-se que aproximadamente 50% das cepas bacterianas com genomas sequenciados contenham prófagos, que podem representar até 20% do conteúdo genômico total da bactéria hospedeira, evidenciando a relevância dos fagos na evolução bacteriana (KLUMPP *et al.*, 2013).

A especificidade de um bacteriófago pelo seu hospedeiro, em *Caudovirales*, é determinada por genes que codificam as proteínas da cauda, e sabe-se que a fagoterapia é limitada pela gama de hospedeiros que um bacteriófago isolado pode infectar. Essa alta especificidade constitui uma das principais limitações da fagoterapia, uma vez que um bacteriófago isolado apresenta, em geral, uma gama restrita de hospedeiros suscetíveis. No entanto, estudos comparativos de genomas têm permitido a identificação de possíveis hospedeiros e o entendimento da especificidade fágica por meio da análise dos genes da cauda, além de apontarem o potencial de recombinação e modularidade dessas regiões genômicas (BRÜSSOW & HENDRIX, 2002; SHIN *et al.*, 2012).

Na antiga ordem *Caudovirales*, muitos bacteriófagos compartilham genes altamente conservados, como aqueles que codificam terminases, proteínas de entrada do DNA e proteínas estruturais do capsídeo, além das proteínas principais da cauda e da bainha. Entretanto, a intensa recombinação genética entre fagos, que resulta em genomas altamente mosaicos, dificulta a reconstrução filogenética e a delimitação taxonômica desses vírus (CASJENS, 2005; REYES *et al.*, 2012).

Esse mosaicismo genômico contribui para a ausência de uma definição precisa de espécies de bacteriófagos e para a dificuldade de estabelecer um sistema de classificação padronizado (CASJENS, 2005; LOPES, 2014). Dessa forma, abordagens baseadas em genômica comparativa são fundamentais para elucidar os mecanismos de infecção dos bacteriófagos, suas estratégias de evasão das defesas bacterianas, bem como aspectos do ciclo de vida viral e dos processos de replicação do material genético (KLUMPP *et al.*, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

A frequência de microrganismos resistentes a antimicrobianos tem crescido nas últimas décadas, culminando com o aumento na incidência de cepas bacterianas multirresistentes, como *Klebsiella pneumoniae*. É necessário o desenvolvimento de tratamentos alternativos seguros e eficazes, para contornarmos esse problema. Nesse contexto, a fagoterapia destaca-se como uma abordagem promissora, especialmente em termos de custo-benefício. Os bacteriófagos, agentes naturais capazes de destruir bactérias, são considerados alternativas atrativas aos antibióticos químicos convencionais. Eles vêm demonstrando alta eficácia, sobretudo no cenário atual, em que a resistência bacteriana aos antibióticos atingiu proporções alarmantes. A terapia fágica se apresenta, portanto, como uma alternativa antimicrobiana viável frente aos antibióticos tradicionais, oferecendo uma solução potencial para o problema da ineeficácia dos tratamentos convencionais.

No entanto, a fagoterapia como forma de tratamento ainda é pouco explorada. Nesse estudo foi avaliado potencial lítico bacteriófagos isolados de um reservatório de água urbano contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes a antibióticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar, identificar e determinar o potencia lítico de bacteriófagos contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistente.

3.2 Objetivos Específicos

1. Isolar e enriquecer bacteriófagos isolados da água da Lagoa do Porangabussu para *Klebsiella pneumoniae* multirresistente a antibióticos.
2. Detectar a presença de bacteriófagos isolados por meio da técnica de *spot-test* em amostras enriquecidas.
3. Selecionar bacteriófagos de ciclo lítico pela identificação de genes específicos utilizando *qPCR*.
4. Determinar o título viral em unidades formadoras de placa (PFU) das amostras.
5. Avaliar a especificidade dos bacteriófagos isolados frente a outras espécies bacterianas do gênero *Klebsiella* (*K. aerogenes*, *K. oxytoca*), além de *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*.
6. Determinar a Curva de Crescimento da Bactéria *Klebsiella pneumoniae* expostas a diferentes concentrações de fagos.

4 METODOLOGIA

4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

Entre os anos de 2018 e 2021 um ensaio clínico foi realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), na cidade de Fortaleza, Ceará. Neste ensaio clínico, foram isoladas 259 bactérias gram-negativas resistentes a um ou mais grupos dos antimicrobianos β -lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, polimixinas e glicilciclinas de pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Isolados de *K. pneumoniae* (N=122) foram obtidos de amostras clínicas no período de 23 de abril de 2019 a 29 de maio de 2021 do Projeto Resistência.

O cultivo bacteriano foi realizado no Laboratório de Nível de Biossegurança 2 (NB2) do Núcleo de Biomedicina (NUBIMED) da Universidade Federal do Ceará (UFC). O cultivo foi realizado em Meio Caldo Luria Bertani (LB) (Kasvi) para reativação dos microrganismos. Alíquotas dessa cultura foram conservadas em meio TSB com glicerol à 20%, à -80°C, para uso futuro.

4.2 Caracterização das cepas utilizados no projeto

As cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* utilizadas neste estudo foram isoladas a partir de amostras clínicas provenientes de diferentes sítios anatômicos, como aspirado traqueal e hemoculturas. Das 259 amostras isoladas foram caracterizadas 6 espécies clínicas. A identificação das espécies bacterianas do gênero *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca*), além de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*, foi realizada no próprio Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) por meio de métodos microbiológicos padronizados. Inicialmente, os isolados foram cultivados em meios seletivos e diferenciais, permitindo o crescimento e a caracterização fenotípica preliminar.

Em seguida, foram submetidos a testes bioquímicos, manuais ou automatizados, por meio de sistemas comerciais como VITEK® 2, BD Phoenix™ ou API® 20E, com base no perfil metabólico. Quando disponível, utilizou-se a espectrometria de massa por MALDI-TOF MS como método complementar para uma identificação rápida e precisa das espécies bacterianas. Testes de suscetibilidade antimicrobiana por meio do método de difusão em disco, conforme padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023). Discos contendo diferentes classes de antibióticos foram aplicados em placas de ágar Mueller-Hinton

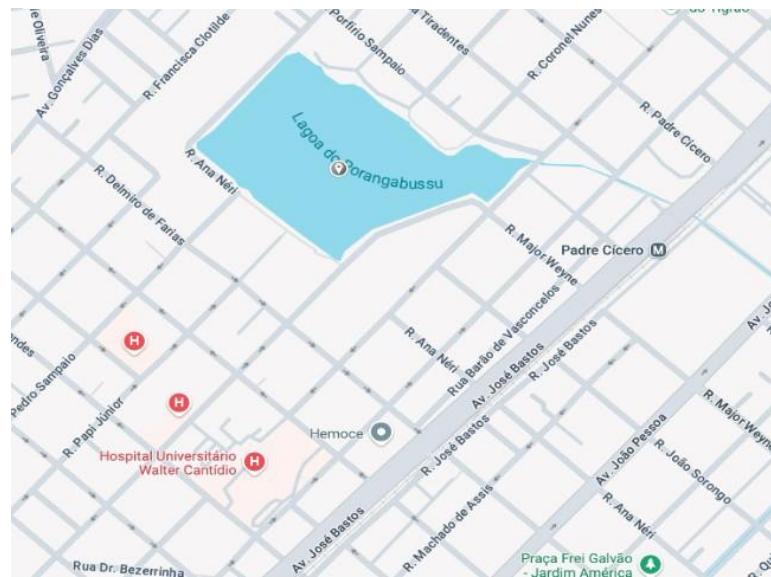
inoculadas com a suspensão bacteriana padronizada (0,5 na escala de Macfarland). Após incubação a 35 ± 2 °C por 18 a 24 horas, os halos de inibição foram medidos e interpretados de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI.

Foram testados antibióticos representando diversas classes, incluindo betalactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefoxitina), carbapenêmicos (imipenem, meropenem), aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina), quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina), polimixinas (colistina), sulfonamidas (trimetoprim/sulfametoxazol), além de agentes como tigeciclina e piperacilina/tazobactam. A interpretação dos resultados permitiu classificar as cepas como sensíveis (S), resistentes (R) ou intermediárias (*), conforme indicado na (Tabela 1). Essa caracterização foi fundamental para selecionar as cepas multirresistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR) para os ensaios com bacteriófagos, garantindo a relevância clínica dos isolados utilizados nos experimentos.

4.3 Coleta de Amostras para isolamento de bacteriófagos

Amostras de água foram coletadas em um frasco esterilizado de 1 litro na lagoa do Porangabussu, uma lagoa urbanizada situada no bairro Rodolfo Teófilo, em Fortaleza, Ceará (Figuras 11 e 12). Nas proximidades da área de coleta encontram-se o Restaurante Universitário do Campus Porangabussu da Universidade Federal do Ceará (UFC), o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) e o Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

Figura 11- Localização geográfica do local de coleta



Fonte: Adaptado Google Maps

Figura 12- Lagoa do Porangabussu

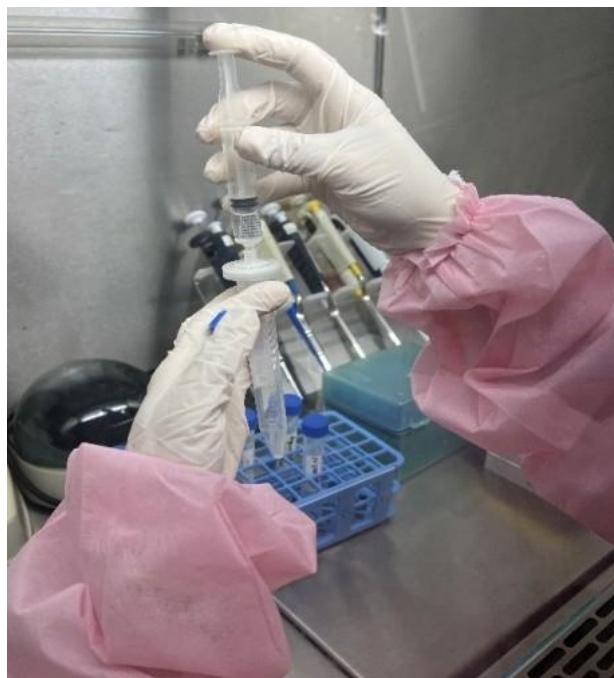


Lagoa do Porangabussu localizada na cidade de Fortaleza, Brasil, no bairro Rodolfo Teófilo. Fonte: Próprio Autor.

Foram realizadas quatro coletas semanais de água entre os meses de maio, junho e julho. As amostras foram transportadas ao laboratório do Núcleo de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará (NUBIMED/UFC) para processamento e enriquecimento.

Alíquotas de 15 ml de cada amostra foram transferidas para tubos Falcon e submetidas à centrifugação a $900 \times g$ por 10 minutos, a 4 °C, com o objetivo de remover partículas sólidas em suspensão. Em seguida, foi adicionado clorofórmio à solução na proporção final de 0,05% (v/v), e as amostras foram mantidas a 4 °C por 24 horas, conforme metodologia descrita por (HYMAN, 2019), com a finalidade de inativar células bacterianas remanescentes sem comprometer a viabilidade dos bacteriófagos.

A amostra coletada no dia 08 de maio de 2024 apresentou melhor formação de halos de lise nos testes iniciais e, por esse motivo, foi selecionada para os experimentos subsequentes realizados no laboratório. Após o período de incubação com clorofórmio, as amostras foram filtradas utilizando filtros de polietersulfona (PES) com poros de 0,22 µm, visando à remoção de células bacterianas e outros contaminantes celulares (Figura 13). O filtrado, contendo a fração viral, foi armazenado a 4 °C até o momento do processamento. A partir desses filtrados, foram realizadas quatro etapas adicionais de enriquecimento, denominadas E1, E2, E3 e E4, que foram utilizadas nos testes subsequentes.



Fonte: Autoral. Filtragem da água da lagoa do Porangabussu, Fortaleza/CE, no laboratório do núcleo de Biomedicina, da Universidade Federal do Ceará, em um tubo *Falcon* de 15 ml com filtro 0,22um acoplado em seringa de 10 ml.

4.5 Preparações de meios de cultura

A preparação dos meios de cultura foi conduzida de acordo com os procedimentos e diretrizes estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para

microbiologia clínica (Brasil, 2013), bem como em conformidade com as recomendações dos respectivos fabricantes. Todos os meios de cultura, assim como as soluções e materiais utilizados nos ensaios microbiológicos, incluindo tubos estéreis, placas de Petri descartáveis estéreis, tubos *Falcon* estéreis de 15 mL, micropipetas, ponteiras e fitas de papel, entre outros, foram rigorosamente preparados e selecionados para assegurar a precisão dos resultados.

Foi utilizado o meio líquido Luria Broth (LB), desidratado indicado para manutenção e cultivo de cepas além do ágar-ágar bacteriológico amplamente utilizado em microbiologia para o cultivo de bactérias, fungos e outros microrganismos. Todos os meios foram esterilizados em autoclave por 30 minutos a 121 °C sob pressão de 1 atm, garantindo condições assépticas adequadas para a realização dos ensaios microbiológicos.

4.4 Enriquecimento da Amostra

Para o enriquecimento dos bacteriófagos presentes nas amostras culturas em caldo foram preparadas em tubos *Falcon* de 15 mL, contendo 1 mL do filtrado da amostra, 1 mL da bactéria *Klebsiella pneumoniae* em fase exponencial de crescimento e 8 mL de meio LB estéril. A cepa bacteriana utilizada é proveniente do projeto de resistência antimicrobiana desenvolvido pelo grupo de pesquisa e foi isolada de amostras clínicas de aspirado traqueal de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), no período de 23 de abril de 2019 a 29 de maio de 2021, estando atualmente disponível no biobanco do NUBIMED.

Após o período de incubação, a mistura foi submetida à centrifugação a 900 x g, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e filtrado através de filtros de polietersulfona (PES) com porosidade de 0,2 µm. O filtrado obtido, denominado Enriquecimento 1 (E1), foi utilizado como amostra viral para uma nova rodada de enriquecimento, seguindo a mesma metodologia previamente descrita.

Esse procedimento foi repetido quatro vezes consecutivas, utilizando-se o produto resultante de cada etapa como inóculo viral para a etapa subsequente, resultando na obtenção dos enriquecimentos E1, E2, E3 e E4. Conforme observado por (HYMAN,2019), a realização de múltiplas etapas de enriquecimento tem como objetivo aumentar a concentração de partículas fágicas no meio, uma vez que elevadas concentrações de bacteriófagos são necessárias para a condução adequada dos ensaios experimentais.

4.6 Verificação da presença de bacteriófagos por *spot-test* das amostras enriquecidas

Para verificação da presença de bacteriófagos e da ocorrência de infecção bacteriófágica *in vitro*, foi realizado o teste conhecido como *spot test*. Inicialmente, 600 µL da cultura bacteriana, no caso *K. pneumoniae*, em fase exponencial, foram inoculados em placas contendo meio de cultura Luria Broth (LB) suplementado com 0,7% de ágar formando uma camada bacteriana uniforme. Após incubação inicial e a formação do tapete bacteriano, 20 µL de cada um dos filtrados provenientes das etapas de enriquecimento (E1, E2, E3 e E4), bem como PBS como controle negativo, foram cuidadosamente depositados sobre a superfície do tapete bacteriano, formando gotas individualizadas. Essa técnica permite avaliar a capacidade lítica dos bacteriófagos por meio da observação de zonas de lise nas áreas correspondentes à aplicação das amostras, conforme descrito por (KUTTER & SULAKVELIDZE, 2005) e (CLOKIE & KROPINSKI, 2009).

O ensaio foi realizado em triplicata e as placas foram mantidas à temperatura ambiente até a completa absorção das amostras e, posteriormente, incubadas a 37°C durante 24 horas para análise dos resultados. Após a incubação, as placas de Petri foram examinadas quanto à presença de halos transparentes nas zonas de aplicação das gotas, indicando lise bacteriana e a presença de bacteriófagos. Com o avanço dos ciclos de infecção, observa-se a formação de uma zona clara (placa de lise) sobre a superfície da camada bacteriana turva, evidenciando a ação lítica de uma partícula inicial de bacteriófago.

A atividade lítica dos bacteriófagos foi avaliada por meio da formação de halos de lise sobre as culturas bacterianas. Após a incubação, os halos foram registrados fotograficamente e submetidos à análise digital. A mensuração do diâmetro dos halos foi realizada utilizando o software ImageJ, que permite a conversão de pixels em medidas reais (milímetros) a partir de uma escala de referência inserida nas imagens.

Cada amostra foi analisada em triplicata, e os resultados foram expressos como a média dos diâmetros dos halos de lise. Para a interpretação dos dados, halos com diâmetro superior a 10 mm foram considerados indicativos de atividade lítica significativa, enquanto halos com diâmetro inferior foram classificados como representativos de baixa sensibilidade da cepa bacteriana ao fago, conforme descrito em protocolos de avaliação da atividade fágica (MIRZAEI & NILSSON, 2015; HYMAN & ABEDON, 2010).

4.7 Determinação de Unidades Formadoras de placa (PFU) pelo método de ágar em dupla camada

O método de ágar em dupla camada é amplamente utilizado para a quantificação de bacteriófagos e outros vírus que infectam bactérias, sendo os resultados expressos como Unidades Formadoras de Placa (UFP ou PFU – *Plaque Forming Units*). Essa técnica baseia-se na capacidade dos bacteriófagos de infectar células bacterianas suscetíveis, levando a formação placas de lise visíveis em uma camada de semissólida de ágar resultantes da lise sucessiva das bactérias infectadas (KROPINSKI *et al.*, 2009). Para a realização do ensaio, foram utilizados: meio de cultura sólido (ágar base) e meio semissólido (ágar mole, contendo geralmente 0,7% de ágar); cultura bacteriana hospedeira em fase logarítmica de crescimento; amostras contendo bacteriófagos previamente diluídas em série; placas de Petri estéreis; pipetas estéreis; banho-maria para manutenção do ágar mole a aproximadamente 60°C.

O procedimento experimental iniciou-se com a preparação da camada base, vertendo-se aproximadamente 15–20 mL de ágar sólido em placas de Petri estéreis, que foram mantidas em condições assépticas até completa solidificação. Em seguida, 0,1 mL da cultura bacteriana em fase logarítmica foi adicionado a tubos contendo 3,4 mL de ágar mole previamente mantido a 60°C. À mistura, foi incorporado 1 mL da amostra contendo bacteriófagos na diluição apropriada. A suspensão foi homogeneizada suavemente e imediatamente vertida sobre a camada base já solidificada. As placas foram levemente inclinadas para que a camada superior se distribuísse uniformemente e, em seguida, incubadas em posição invertida a 37°C por 18–24 horas. Após a incubação, foram observaram-se placas de lise, caracterizadas por zonas claras no ágar, sendo cada placa indicativa da presença de um bacteriófago viável na amostra. A concentração de bacteriófagos na amostra original foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{PFU/mL} = \frac{N \times F}{V}$$

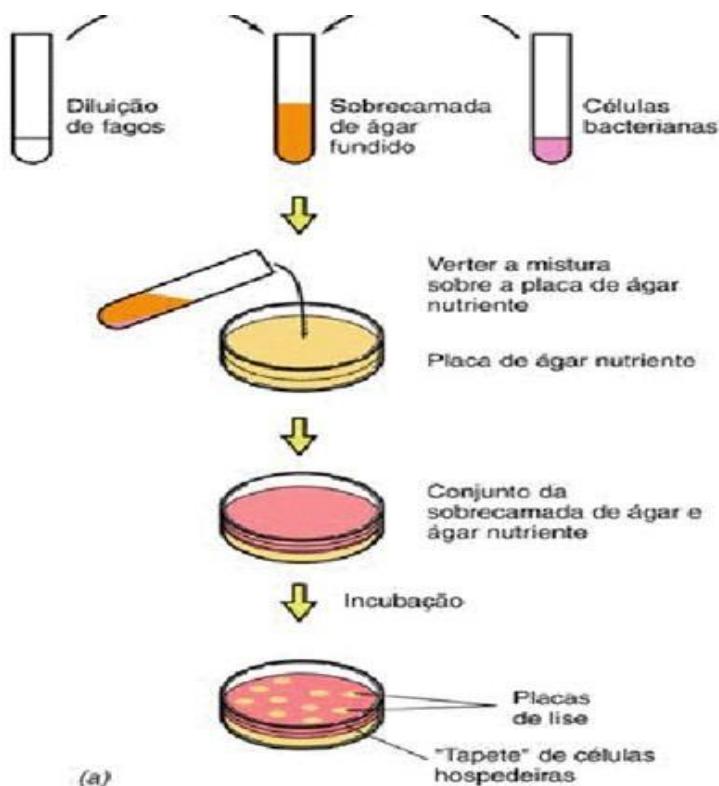
Onde:

N = corresponde ao número médio de placas contadas;

F = ao fator de diluição;

V = ao volume inoculado, expresso em mililitros (mL).

Figura 13- Técnica de plaqueamento em ágar dupla camada; um método para determinar o título viral como unidades formadoras de placa (PFU)



Adaptado à (Savedra, 2014). Procedimento para a cultura de bacteriófagos, Lb +ágar dupla camada, com bactéria e vírus. Placas formadas de Lise após 24 hrs de incubação.

4.9 Isolamento, dos fagos das Unidades Formadoras de Colônias (PFU) para o Bacteriófago Isolado da Placa Viral (BIPV)

Para a purificação dos bacteriófagos foram realizadas três passagens sucessivas. Para cada passagem foi retirado, com o auxílio de uma alça bacteriológica, um pequeno pedaço de ágar do centro da placa de lise. Para realização do isolamento do bacteriófago a partir da placa viral (BIPV) teve como principal objetivo selecionar uma partícula viral individual com alta capacidade lítica e especificidade contra *Klebsiella pneumoniae*.

4.10 Análise de Bioinformática

4.10.1 Recuperação e Anotação do Genoma:

Os genomas dos bacteriófagos foram recuperados do banco de dados NCBI RefSeq/GenBank usando a ferramenta ncbi-acc-download, coletando 749 genomas completos para a análise. Para anotar os genomas, foi usado o Prokka, uma ferramenta especializada para

anotação de genoma. O comando usado para o Prokka foi: prokka --kingdom Viruses --proteins combined_phrogs.faa-outdir-prokka_output-prefix-annotated_genomes-your-sequences fasta. Este comando processou as sequências do genoma, usando o banco de dados de proteínas PHROG para aumentar a precisão da anotação ao prever genes codificadores de proteínas e suas funções. A saída incluiu arquivos GenBank, arquivos no formato GFF3 para visualização de características genômicas, sequências de proteínas no formato FAA e sequências de nucleotídeos no formato FNA.

4.10.2 Limpeza e preparação de sequência:

Para garantir exclusividade e consistência nas IDs de sequência, um *script* Python personalizado foi empregue para limpar as sequências do genoma renomeando duplicatas e removendo quaisquer descrições estranhas. O *script* utilizou o módulo SeqIO do Biopython para analisar e modificar os identificadores de sequência.

4.10.3 Extração de sequência genética:

Após a anotação do genoma, um *script* Python foi usado para extrair as sequências de nucleotídeos correspondentes a cada gene codificador de proteína. Usando o arquivo. gff para coordenadas genômicas e o arquivo. faa para sequências de proteínas, as sequências de nucleotídeos foram extraídas do genoma e salvas em arquivos FASTA separados para cada produto genético. O *script* garantiu que a sequência de cada gene fosse corretamente correspondida ao seu produto proteico, e os arquivos foram nomeados de acordo com a descrição do produto para fácil identificação.

4.10.4 Alinhamento de sequência:

Para o alinhamento das sequências, a ferramenta MAFFT foi empregada. Um *script* Python personalizado foi usado para automatizar o alinhamento de várias sequências de genes, executando MAFFT para cada conjunto de sequências e salvando as sequências alinhadas em um novo diretório.

4.10.5 Extração de sequência de consenso:

Uma vez que as sequências foram alinhadas, um limite de 95% de similaridade de sequência foi definido para gerar sequências de consenso. Esta etapa usou um *script Python* personalizado que analisou as sequências alinhadas, identificando o nucleotídeo mais comum em cada posição e construindo uma sequência de consenso para cada gene relacionados ao ciclo líítico dos bacteriófagos.

4.10.6 Análise BLAST para identificação de proteínas:

Para identificar as funções das sequências de consenso geradas, uma busca BLAST foi conduzida. O comando *blast* foi usado para comparar as sequências de consenso com o banco de dados de nucleotídeos do NCBI. Para sequências de proteínas, *blast* foi usado, consultando o banco de dados de proteínas não redundantes (NR). Os resultados foram analisados e filtrados para limites de similaridade, e os acertos foram registrados para identificar a anotação funcional de cada gene. Na tabela explica a função dos genes e proteínas essenciais para o ciclo líítico dos bacteriófagos isolados de *klebsiella pneumoniae*, obtidos na análise genômica

Tabela 1- Função dos genes obtidos na análise genómica

GENE	FUNÇÃO
Cap	Major capsid protein: proteína estrutural essencial que forma a cápside do fago , protege o material genético e facilita a adesão à célula bacteriana.
Ack	<i>Primer</i> da Família <i>Ackermannviridae</i> , codifica proteínas estruturais cápside viral crucial na proteção do genoma, de cauda longa importante p/ reconhecimento e infecção do hospedeiro.
Ter	Terminase Codifica proteínas envolvidas no empacotamento do DNA viral dentro do cápside.

4.10.7 Desenho de *Primer*:

Com as sequências anotadas e alinhadas em mãos, os *primers* para amplificação por *PCR* foram projetados visando regiões conservadas dentro dos genes identificados. O desenho do *primer* foi baseado em sequências conservadas de codificação de proteínas, garantindo que os *primers* amplificariam regiões específicas de interesse para detecção de bacteriófagos. Ferramentas como o *Primer3* foram empregues para gerar sequências de *primers*

ideais com base no consenso alinhado.

As proteínas selecionadas a partir da análise BLAST incluíram uma região consenso característica da família *Ackermannviridae*, além de duas proteínas associadas ao ciclo lítico do bacteriófago: a *major capsid protein* (proteína principal do capsídeo), envolvida na montagem de novas partículas virais, e a *terminase small subunit* (subunidade pequena da terminase), responsável pela iniciação do empacotamento do DNA nas novas partículas virais formadas após a replicação do genoma do bacteriófago infectante.

Na análise realizada com o *software* Oligo Analyzer, descrito na (Tabela 2) a temperatura de *melting* (Tm) predita para o amplicon do *primer ‘ack’* apresentou um intervalo de valores, sendo a mínima de 80,1 °C, a média de 79,5 °C e a máxima de 79,1 °C. Para o *primer ‘cap’*, a Tm predita do *amplicon* foi de 78,2 °C, enquanto, para o *primer ‘ter’*, a temperatura estimada foi de aproximadamente 80,8 °C.

Tabela 2- Temperatura de anelamento dos primers de bacteriófagos utilizados na qPCR

Gene	Primer	Sequencia	Produtos de Amplificação
CAP	KlebBac Cap _F	CTGATGCCTAACGCTCGAA	152bp
	KlebBac Cap _R	GAAGGCGTGCTTCTGGTTGT	
ACK	KlebBacAcker_F	GCTGATAAGAAACCCGGCGAT	187 bp
	KlebBacAcker_R	TTACTCGGTTGTGTGCCGTT	
TER	KlebBac Ter _F	GGGCGAAGAGAACGCAATCA	111 bp
	KlebBac Ter _R	CGCCGCAAAACAGGCTTAAC	

Apresenta os pares de *primers* usados para a amplificação dos genes CAP, ACK e TER

de *Klebsiella spp.*, A tabela apresenta os nomes dos *primers* (F: forward; R: reverse), suas sequências de nucleotídeos, os tamanhos esperados dos produtos de amplificação (em pares de bases, pb) e as temperaturas de fusão (MT) associadas em graus Celsius (°C). Para o *primer* do gene CAP, o Tm é 78,2 °C e para o *primer* do gene ACK, o Tm é 80,1 °C e para o *primer* TER, o Tm é 80,8 °C.

4.11 Extração de Ácidos Nucleico

As amostras consideradas positivas no *spot test*, ou seja, aquelas que apresentaram formação de halo de lise, foram denominadas BIPV1 e BIPV 2 (correspondendo a E1 e E2, respectivamente). Essas amostras foram submetidas à extração de ácidos nucleico visando à obtenção do genoma viral. Para a extração do material genético dos bacteriófagos, as amostras passaram por uma nova rodada de enriquecimento, contendo 100 ul da amostra, 1 mL da bactéria indicadora e 4 mL de meio LB. A incubação ocorreu por 48 horas sob agitação a 37°C.

Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 900 G por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e filtrado utilizando membranas de PES com poros de 0,22 µm. As amostras foram então armazenadas a 4°C. A extração do material genético foi realizada utilizando o kit Ribospin™ vRD (GeneAll®), projetado para extrair moléculas de DNA e RNA de diferentes tipos de amostras.

Para o procedimento, 300 µL de amostra foram transferidos para um tubo de 1,5 mL, seguido da adição de 500 µL do tampão VL, com o objetivo de lisar as partículas presentes na amostra. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 700 µL do tampão RBI e a amostra foi homogeneizada. A partir dessa mistura, 750 µL foram transferidos para uma mini coluna de separação tipo V, seguida de centrifugação a 10.000 G por 30 segundos, em temperatura ambiente.

Posteriormente, 500 µL do tampão RBW foram adicionados à mini coluna e uma nova centrifugação foi realizada sob as mesmas condições. A mini coluna foi, então, inserida em um novo tubo de 1,5 mL, e 40 µL de água livre de nuclease foram aplicados sobre a membrana de separação. Após repouso de 1 minuto, foi realizada uma última centrifugação a 10.000 G por 1 minuto, em temperatura ambiente.

A concentração e a qualidade do DNA extraído foram determinadas por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific), com leitura da razão de absorbância 260/280, que deve estar entre 1,7 e 1,9 para confirmar a qualidade da amostra. As amostras foram armazenadas a -80°C para análises subsequentes.

4.12 Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR).

Os reagentes para a qPCR convencional foram preparados em um volume total de 15 µL, composto por 7,5 µL de GoTaq™ qPCR Master Mix (Promega™), 1,5 µL de primers senso e antissenso a 2 µM, 2,5 µL da amostra de DNA (concentração de 50 ng/µL) e 2,0 µL de água livre de RNase e DNase. Para as reações de qPCR *nested*, utilizou-se a mesma composição base, mas com 1 µL da amostra de DNA (concentração de 50 ng/µL) e 3,5 µL de água livre de RNase e DNase, totalizando 15 µL por reação. As microplacas foram seladas e centrifugadas antes de serem submetidas ao termociclador QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

As condições térmicas e o tempo de cada etapa foram configurados com uma fase inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos para ativação da enzima. Em seguida, foram realizados 40 ciclos de amplificação, consistindo em desnaturação a 95°C por 2 minutos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Posteriormente, foi executada a curva de dissociação, com aumento gradual de temperatura (0,15°C por segundo), variando entre 60°C e 95°C. Após cada uma das reações de qPCR, a qualidade do DNA amplificado foi avaliada por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific), para quantificar a concentração do material amplificado. A qualidade da amostra pós-amplificação foi determinada por meio da razão de absorbância 260/280, que deve estar entre 1,7 e 1,9, indicando a pureza do DNA.

4.9.13. Avaliar a especificidade do bacteriófago frente a outras espécies bacterianas.

A especificidade dos bacteriófagos isolados da água da lagoa do Porangabussu foi avaliada frente a outras espécies bacterianas-alvo provenientes do mesmo estudo envolvendo pacientes da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital das clínicas (HUWC). As cepas testadas incluem bactérias multirresistentes (MDR) dos gêneros *Klebsiella spp*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*, as quais foram cultivadas até a fase logarítmica de crescimento. Para a avaliação da atividade lítica e da especificidade do bacteriófago, foi realizado o ensaio de spot test, no qual 20 µL da suspensão fágica, previamente padronizada, foram aplicados em forma de gotas sobre o tapete bacteriano formado nas placas de ágar.

As culturas bacterianas-alvo foram previamente inoculadas nas placas, garantindo uma distribuição homogênea das células bacterianas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, conforme a metodologia descrita anteriormente (item 4.5). Após o período de incubação, a presença de zonas de lise nas áreas correspondentes à aplicação das gotas foi interpretada como indicativa de susceptibilidade bactéria consequentemente, dada especificidade do bacteriófago para aquela espécie bacteriana. Por outro lado, a ausência de lise foi considerada indicativa de resistência bacteriana ao bacteriófago avaliado.

4.9.14. Curva de Crescimento da Bactéria *Klebsiella pneumoniae* expostas a diferentes concentrações de fagos

O método utilizado para definição da curva de crescimento foi o cultivo em meio líquido, com a coleta de alíquotas ao longo do tempo de incubação. O ensaio foi repetido em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo: uma colônia isolada de *Klebsiella pneumoniae* foi cultivada em ágar Mueller Hinton a 37 °C por 24 horas. Em seguida, a cultura foi transferida para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Mueller Hinton autoclavado. O pré-inóculo foi mantido a 37 °C sob agitação a 180 RPM durante 24 horas. Após esse período, uma alíquota de 100 µL do pré-inóculo (com densidade aproximada de 0,5 McF, cerca de 10⁸ células/mL) foi inoculada assepticamente em 6 tubos de ensaio, cada um contendo 10 mL de caldo Mueller Hinton autoclavado. A cada intervalo de 2 horas, desde o tempo zero até 12 horas, foi coletada uma alíquota de 1 mL e analisada em um espectrofotômetro para determinar a densidade óptica (DO) a 600 nm.

Durante o experimento, bacteriófagos foram adicionados às culturas em diferentes concentrações: 100 µL, 200 µL e 300 µL. As culturas foram então reincubadas sob as mesmas condições de 37 °C e 180 RPM. Alíquotas de 1 mL foram coletadas a cada duas horas, ao longo de 12 horas, para medições de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. Os valores de DO foram registrados e utilizados para a construção da curva de crescimento. A curva de crescimento foi representada graficamente, com o eixo X correspondente ao tempo de incubação e o eixo Y à densidade óptica (DO). O experimento foi conduzido sob quatro condições experimentais:

- Controle: Bactéria sem adição de fago
- Grupo 1: Bactéria + Fago 100 µL
- Grupo 2: Bactéria + Fago 200 µL
- Grupo 3: Bactéria + Fago 300 µL

RESULTADOS

A Tabela 3 apresenta o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de diferentes sítios clínicos, incluindo aspirado traqueal, sangue, líquido abdominal, com destaque para as amostras 50, 91, 99, 150, 193, 205, 226, 251 e 202. Observa-se um padrão de multirresistência em grande parte das cepas analisadas, caracterizados por resistência predominante a antibióticos amplamente utilizados na prática clínica, como os betalactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona), os carbapenêmicos (imipenem, meropenem), as quinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) e os aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), além de outros fármacos de uso comum. Notadamente, apenas um número restrito de antibióticos apresentou atividade frente a algumas cepas, destacando-se a colistina (T), a tigeciclina (U) e, em menor proporção, a associação ampicilina/sulbactam (W). Esse perfil de suscetibilidade limitada evidencia o esgotamento das opções terapêuticas convencionais para o tratamento dessas infecções.

O padrão fenotípico observado sugere a presença de mecanismos de resistência complexos, incluindo a produção de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases do tipo KPC, caracterizando essas cepas como multirresistentes (MDR) ou, em alguns casos, extensivamente resistentes (XDR). Esses resultados justificam a seleção dessas cepas como alvos prioritários para os ensaios com bacteriófagos, uma vez que representam um desafio terapêutico significativo no contexto hospitalar. Ademais, reforçam a relevância da investigação de estratégias terapêuticas alternativas, como a fagoterapia, no enfrentamento de infecções causadas por patógenos resistentes aos antimicrobianos disponíveis.

Tabela 3- Cepas bacterianas dos isolados clínicos

Isolado clínico			Susceptibilidade a antibióticos																								
Pid	Origem	Especie	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Z
50	Aspirado Traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	S	*	R	*	R	R	R	R	R	R	R	R	*	*	R	*	R	R	*	R	R	*		
91	Aspirado Traqueal	<i>Klebsiella aerogenes</i>	*	S	*	*	*	S	S	S	RS	S	S	S	S	*	*	S	*	*	S	*	*	R	*		
99	Aspirado Traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	S	*	R	*	R	R	R	R	S	R	S	*	*	R	*	*	S	*	R	*	*			
150	Sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	S	*	R	*	R	R	R	R	*	R	R	*	*	R	*	*	R	*	R	*	*			
193	Aspirado Traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	S	*	R	*	R	R	R	R	*	S	R	*	*	R	*	*	R	*	R	*	*			
205	Aspirado Traqueal	<i>Klebsiella oxytoca</i>	*	S	*	R	*	R	R	R	R	*	R	R	*	*	R	*	*	R	*	R	*	*			
226	Sangue	<i>Klebsiella aerogenes</i>	*	S	*	*	*	R	R	R	*	S	*	S	R	*	*	R	*	*	R	*	*	*			
251	Aspirado Traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	S	*	R	*	*	R	R	R	R	*	R	R	*	*	R	*	*	R	*	R	*			
202	Aspirado Traqueal	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	R	*	R	*	*	R	R	R	R	*	R	R	*	*	R	*	*	R	*	R	*			
25	Líquido abdominal	<i>Acinetobacter Baumanii</i>	*	S	*	R	*	R	R	R	*	*	*	R	*	*	*	*	*	*	S	R	*	R	R		

40	Aspirado Traqueal	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*	S	*	*	*	*	R	R	R	*	*	*	*	R	R	*	*	*	*	S	R	R	*	R	R
115	Aspirado Traqueal	<i>Enterobacter cloacae</i>	*	S	*	*	*	*	R	R	R	R	*	*	R	S	*	*	R	*	*	*	S	*	*	R	R

S: sensível; **R:** resistente; *****: intermédio; **-**: antibiótico não testado; **A:** ácido nalidíxico; **B:** amicacina; **C:**amoxicilina / ácido clavulânico; **D:** ampicilina ; **E:** beta-lactamases de espectro alargado (ESBL); **F:**cefalotina; **G:**cefepima; **H:** ceftriaxona; **I:** ceftazidima; **J:** cefuroxima ; **K:** ciprofloxacina; **L:** ertapenem; **M:** gentamicina; **N:**meropenem; **O:** nitrofurantoína; **P:** norfloxacina; **Q:** piperacilina / tazobactam; **R:** trimetoprim / sulfametoaxazole; **S:** ceftazidime; **T:** colistina; **U** imipenem; **V:** tigeciclina; **W:** ampicilina sulbactam; **X:** cefoxitina; **Z:** ceftriaxone.

A linhagem de *Klebsiella pneumoniae* PID202 selecionada dos ensaios deste estudo, apresentou alto nível de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, com elevada prevalência de resistência a penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos entre os isolados avaliados. A cepa demonstrou resistência aos seguintes antibióticos: Amicacina, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefepima, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Ceftriaxona, Cefuroxima, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Piperacilina/ Tazobactam.

Em contraste, observou-se sensibilidade à combinação ceftazidima/avibactam, antibiótico considerado de última linha para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases. A elevada resistência apresentada por *K. pneumoniae* reforça sua importância como patógeno de grande relevância clínica, especialmente em infecções do trato respiratório e da corrente sanguínea, frequentemente associadas a ambientes hospitalares e unidades de terapia intensiva.

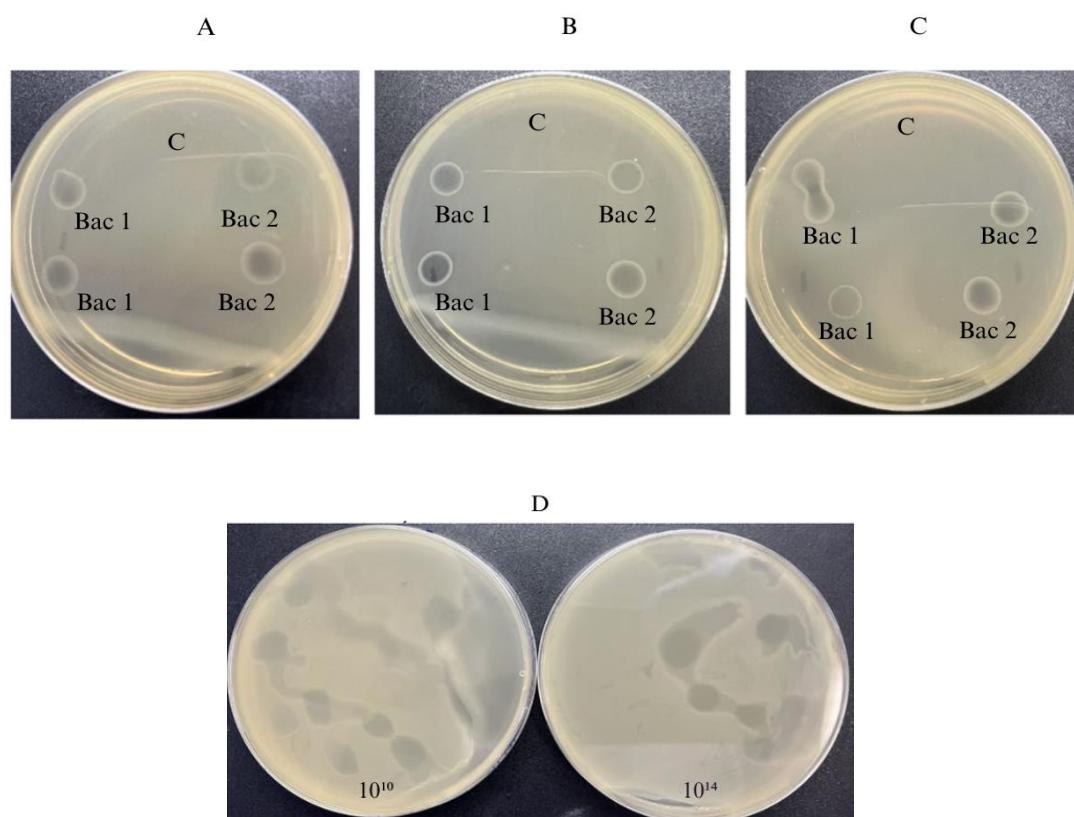
A análise dos perfis de suscetibilidade evidenciou altos níveis de resistência a múltiplos antimicrobianos, com variações observadas entre as diferentes espécies bacterianas avaliadas no estudo. Observou-se resistência generalizada aos antibióticos β -lactâmicos, incluindo penicilinas e cefalosporinas, e, em alguns isolados, um perfil compatível com multirresistência, sugerindo a possível produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e/ou carbapenemases como principais mecanismos envolvidos. Apesar desse cenário, determinados isolados mantiveram sensibilidade residual a algumas classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e quinolonas, embora essa sensibilidade tenha variado conforme a espécie bacteriana analisada.

5.1 Ensaio de placa

A presença de bacteriófagos nas amostras de água foi confirmada por meio do ensaio de método Spot test. Os resultados evidenciaram a formação de halos de inibição nos locais onde as amostras correspondentes a BAC1 e BAC2 foram inoculadas conforme ilustrado na Figura 16 (A, B e C). A formação dos halos foi confirmada pela repetição do experimento em três dias distintos, sendo observado resultados consistentes em todas as repetições. Dessa forma, os dados apresentados correspondem a três replicações independentes positivas, confirmando a presença de bacteriófagos capazes de infectar a cepa de *Klebsiella Pneumoniae* isolada de paciente internado em Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

Adicionalmente, foi avaliada a capacidade do bacteriófago isolado de formar zonas de lise bem definidas sobre a cepa de *Klebsiella pneumoniae*, utilizando-se o método de ágar em dupla camada, amplamente empregado para a investigação da eficácia da infecção fágica. Observou-se atividade lítica positiva para a amostra BAC2, nas diluições seriadas 10^{10} e 10^{12} , evidenciada pela formação de zonas claras de lise, conforme apresentado na Figura 16 (D). Esses resultados confirmam a presença de partículas bacteriófágicas viáveis com capacidade de infecção e lise da bactéria hospedeira.

Figura 14 - “Bacteriófagos isolados da água do Açude do Porangabussu apresentação lítica contra *K. pneumoniae*.



Fonte: Próprio Autor. *Spot test*: Ação lítica de fagos isolados de *K. pneumoniae* figura (A, B e C): Placas com formação de halo e lise gerada por bacteriófagos. Ampliação das áreas de lise nas placas, destacando a formação

de zonas claras correspondentes à lise bacteriana e formação de halo por BAC 1 e BAC 2. Utilizando a técnica de spot teste em enriquecimentos triplicados de bacteriófagos isolados da Lagoa Porangabussu. Na figura (D), placa comparativa com diferentes concentrações de bacteriófagos, demonstrando variações no tamanho e número de zonas de lise. Teste com diluições BAC 2– 10^{10} e BAC 2– 10^{14} PFU: Atividade lítica de bacteriófagos isolados de *K. pneumoniae*.

Tabela 4 - Médias dos diâmetros dos halos de lise formados pelo fago no teste spot test contra cepa de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, medidos pelo programa *ImageJ*.

A- Bac 1	A- Bac 2	B- Bac 1	B-Bac 2	C- Bac 1	C- Bac 2
16,02	16,86	12,66	14,38	12,48	15,7
17,67	19,38	14,34	16,72	15,09	16,86

A atividade lítica dos bacteriófagos foi avaliada por meio da formação de halos de lise sobre as culturas bacterianas. As áreas de inibição foram mensuradas utilizando o software ImageJ, permitindo a obtenção dos valores do diâmetro dos halos em milímetros. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como a média das medições obtidas. Considerou-se que halos com diâmetro superior a 10 mm representavam atividade lítica significativa, enquanto valores inferiores indicavam lise parcial ou baixa sensibilidade da cepa ao fago, de acordo com critérios previamente descritos na literatura (MIRZAEI & NILSSON, 2015; HYMAN & ABEDON, 2010).

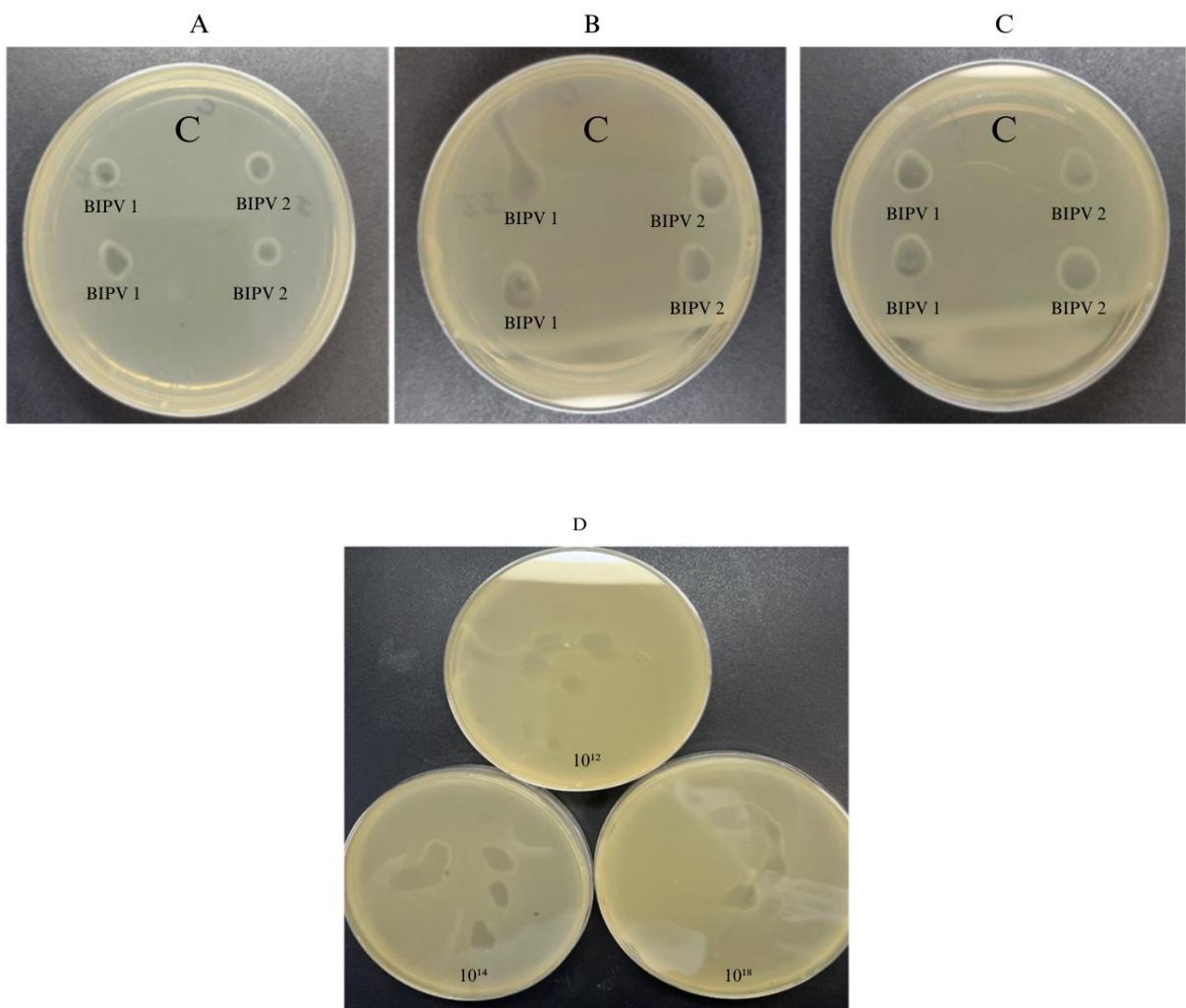
Na Figura 16, observa-se o efeito lítico do bacteriófago frente a cepa de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, avaliado por meio da mensuração dos halos de lise em triplicata. As placas A, B e C apresentaram valores médios variando de 12,66 mm a 16,86 mm evidenciando atividade lítica consistente do bacteriófago contra as cepas testadas.

O isolamento do bacteriófago a partir da placa viral denominado Bacteriófago Isolado da Placa Viral (BIPV) (Figura 17D), teve como principal objetivo a seleção de uma partícula viral individual com elevada capacidade lítica e alta especificidade frente a *Klebsiella pneumoniae*. Diferentemente do uso direto de amostra ambientais, como aquelas provenientes da Lagoa do Porangabussu, o isolamento a partir de uma zona de lise bem definida permite maior controle experimental, assegurando que o fago selecionado apresente atividade lítica comprovada, estabilidade genética e possibilidade de quantificação precisa em unidades formadoras de placa (PFU).

Observam-se, na Figura 17D, placas de lise, caracterizadas por zonas circulares claras, resultantes da destruição das células bacterianas em decorrência da replicação viral. Esse procedimento contribui para o aumento da segurança e reproduzibilidade dos ensaios, alem de

favorecer a aplicação futura do bacteriófago em estratégias terapêuticas mais eficazes.

Figura 15 -Bacteriófago isolado da placa viral (BIPV) apresentam ação lítica contra isolados de *K. pneumoniae*



Fonte: Próprio Autor. Figura 17 (A, B e C): BIPV 1 (Bacteriófago Isolado de Placa Viral 1) e BIPV 2 (Bacteriófago Isolado de Placa Viral 2). Na Figura 17 Observamos a Formação de Halos Confirmando a Atividade do Bacteriófago Contra Bactérias-Alvo Utilizando o Teste Spot; (D): Diluições 10^{12} , 10^{14} e 10^{18} . Resultados Positivos Foram Obtidos em Placas de BIPV (Bacteriófagos Isolados de Placas Virais). Cada Zona de Lise Indica a Área de Ocorrência de Infecção Fágica Devido à Lise de Células Bacterianas Utilizando a Técnica de Ágar Dupla Camada, evidenciando a Formação de Zonas de Lise.

Tabela 5 – (Figura 17). Avaliação do diâmetro dos halos de lise em triplicata, obtidos após exposição das cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes ao fago BIPV.

A- Bac 1	A- Bac 2	B- Bac 1	B-Bac 2	C- Bac 1	C- Bac 2
16.58	16.96	15.52	13.61	13.05	13.96
18.43	16.81	14.43	14.25	14.35	12.40

Na Figura 17, observa-se o efeito lítico do bacteriófago BIPV frente cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, avaliado por meio da mensuração dos halos de lise em triplicata. As placas A, B e C apresentaram valores médios de diâmetro variando de 12,40 mm a 18,43 mm, evidenciando atividade lítica consistente do bacteriófago contra as cepas testadas. A realização dos ensaios em triplicata demonstra a reproduzibilidade dos resultados, reforçando a capacidade de lise do BIPV frente às diferentes amostras bacterianas analisadas.

Observou-se que, em altas concentrações de bacteriófagos, o efeito lítico tornou-se menos evidente, resultando na formação de áreas de lise mais difusas ou até mesmo em uma lise confluente, o que dificulta a visualização individual das zonas de lise. Em contrapartida, nas diluições de 10^{-12} e 10^{14} , a formação de zonas de lise bem definidas tornou-se claramente visível, conforme ilustrado na Figura 17 D.

Esses resultados sugerem que tais concentrações de bacteriófagos foram ideais para promover a infecção das células bacterianas de maneira eficiente, sem que ocorresse a lise simultaneamente de todas as células presentes. Dessa forma, observaram-se zonas de lise isoladas, correspondentes a unidades formadoras de placa (PFU) em cada diluição. A contagem de placas fágicas foi possível apenas nas diluições superiores a 10^{12} , especificamente em 10^{14} e 10^{18} , as quais foram selecionadas para a quantificação final da suspensão fágica.

5.2 Título da suspensão fágica

Para a determinação do título fágico foram realizadas diluições decimais seriadas da suspensão concentrada do fago BAC 1, as quais foram plaqueadas utilizando o método da gota em ágar de dupla camada. O número de Unidades Formadoras de Placas (PFU – *Plaque Forming Units*) foi determinado para cada diluição testada. Observou-se que a contagem de placas fágicas individualizadas foi possível apenas nas diluições superiores a 10^{10} , nas quais as zonas de lise se apresentaram bem definidas e passíveis de quantificação. Os Bacteriófagos Isolados de Placa Viral (BIPV) foram submetidos ao ensaio de Unidade Formadora de Placa (PFU) com o objetivo de determinar a concentração de partículas bacteriófágicas viáveis no isolado viral, conforme ilustrado na Figura 17D. Os resultados obtidos indicaram um título fágico de 6×10^{19} PFU/ μ L, evidenciando uma elevada concentração de bacteriófagos viáveis na suspensão analisada.

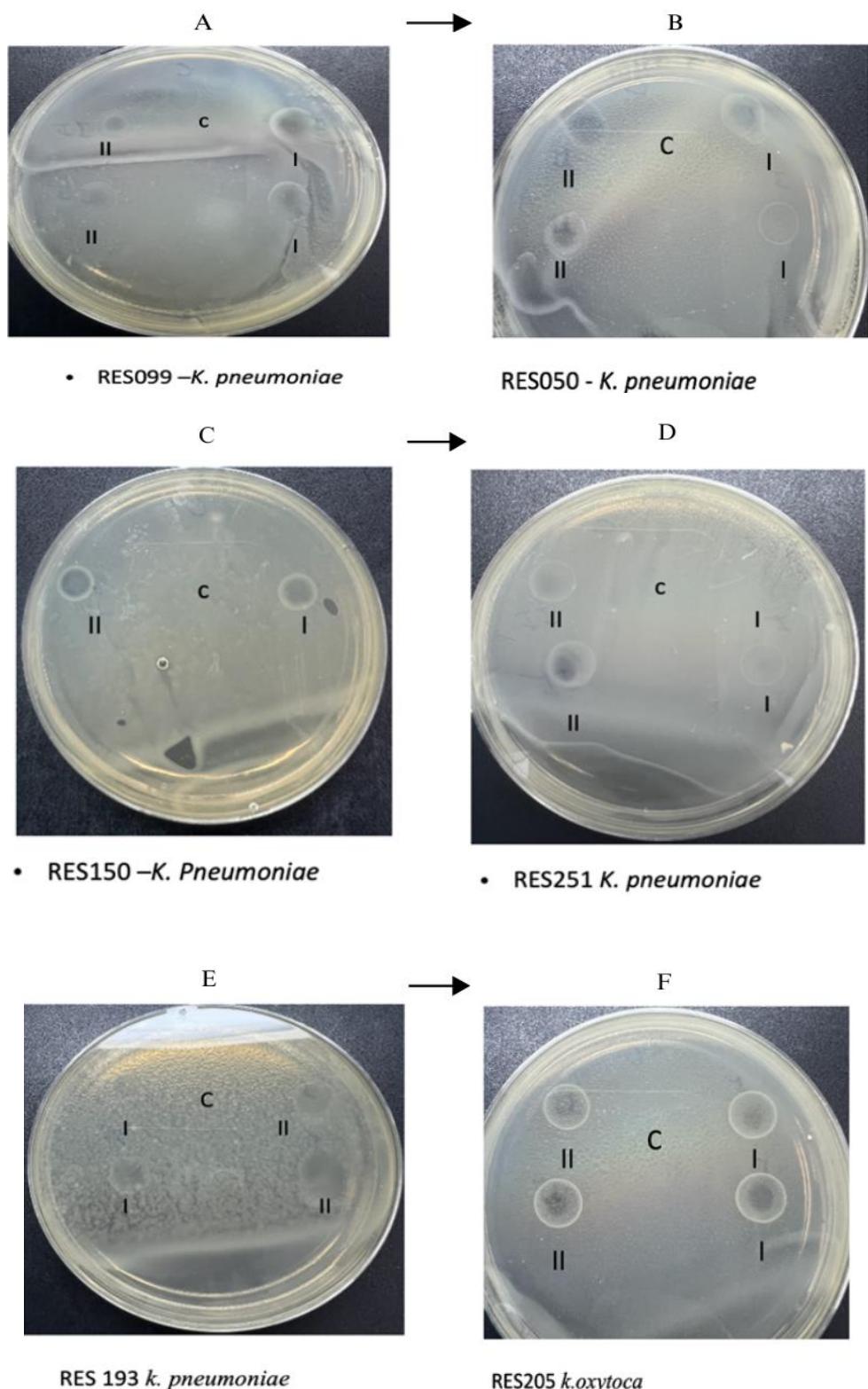
5.3 Especificidade dos bacteriófagos isolados

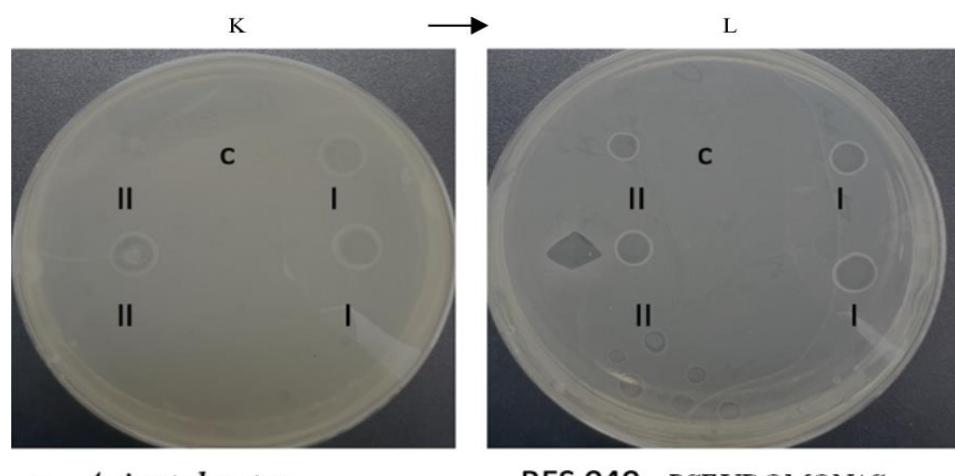
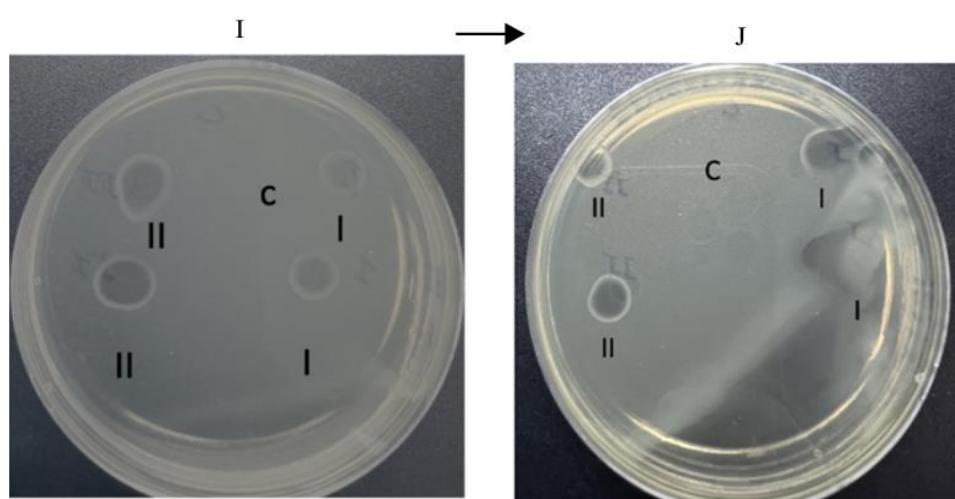
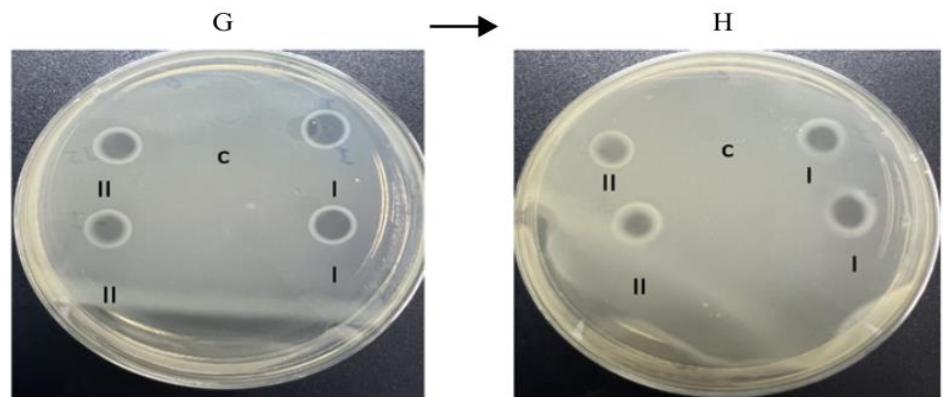
A especificidade dos bacteriófagos foi avaliada frente a diferentes cepas bacterianas, conforme apresentado na Figura 18, incluindo cepas do mesmo gênero, como *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, e outras espécies de *Klebsiella* bem como isolados de outros gêneros bacterianos. Os isolados de *Enterobacter* e *Acinetobacter* (Figura 18 I, J, K e L) também apresentaram halos de lises, demonstrando assim os bacteriófagos isolados exibem uma ampla gama de hospedeiros, não sendo estritamente específicos para *Klebsiella pneumoniae*. Os bacteriófagos isolados, BAC 1 e BAC 2, promoveram a formação de zonas claras de lise nos locais de aplicação das gotas de ensaio de *spot test* (10 µL da suspensão fágica). As cepas bacterianas testadas apresentaram diferentes perfis de resistência a antibióticos, variando de multirresistentes (MDR) a extensivamente -resistentes (XDR), sem que essa característica interferisse na ocorrência da lise bacteriana.

Todas as cinco cepas de *K. pneumoniae* avaliadas apresentaram lise quando expostas a ambas preparações fágicas. Placas de lise bem definidas foram observadas com os isolados BIVP I e BIPV II (Figura 18A–L). A formação dos halos líticos ocorreu independentemente do perfil de resistência antimicrobiana das cepas, indicando que a infectividade dos bacteriófagos não foi influenciada pelo status MDR ou XDR do hospedeiro bacteriano. Além disso, a lise bacteriana foi observada no isolado único de *K. oxytoca* (RES205) (Figura 18 F) e em qualquer um dos dois isolado de *K. aerogenes* (RES226, RES091) (Figura 18 G e H). O isolado de *Enterobacter* (RES115) e o isolado de *Acinetobacter* (RES040) (Figura 18 I, J e K) também apresentaram halos líticos reforçando que os bacteriófagos isolados possuem um espectro de hospedeiros relativamente amplo, não restrito a espécie *Klebsiella. pneumoniae*.

Figura 16 - Atividade lítica dos BIPV1 e 2 frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *K. Aerogenes*, *K oxytoca*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* provenientes de isolados

clínicos humanos.





Fonte: Elaboração própria. Teste de especificidade de lise de bacteriófagos associados a infecção de *Klebsiella*

pneumoniae. A técnica *Spot test de bacteriófagos* associados a infecção de *Klebsiella pneumoniae* expostos a outras espécies do gênero *Klebsiella* e outras cepas de *Klebsiella pneumoniae* (**Figura A, B, C, D e E**), *K. Oxytoca* (**Figura F**), *K. Aerogenes* (**Figura G e H**), *Enterobacter cloacae* (**Figura I e J**) e (**Figura K** *Acinetobacter baumannii*) (**Figura L** *Pseudomonas*).

Tabela 6 - -(Figura 18) Avaliação do diâmetro dos halos de lise formados pelo fago, obtidos após exposição das cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes ao fago expostos frente a diferentes cepas bacterianas, determinados pelo programa *ImageJ*.

A- RES099-Bac1	A RES099-Bac 2	B-RES050-Bac 1	B- RES050-Bac 2
15.13	----	12.36	14.31
16.12	----	14.14	10.05
C- RES 150-Bac 1	C- RES 150-Bac 2	D- RES251 Bac 1	D- RES251 Bac 2
12.04	11.04	----	13.34
----	----	----	13.15
F- RES 205-Bac 1	F- RES 205-Bac 2	G- RES226-Bac1	G-RES226- Bac 2
17.46	14.03	14.04	11.18
15.29	13.03	15.03	14.14
H- RESS091 Bac 1	H- RESS091 -Bac 2	I- RES 115 - Bac 1	I- RES 115 - Bac 2
14.03	11.00	10.05	18.24
12.16	15.27	12.16	22.00
J-RES 115 - Bac 2	K- Acineto- Bac 1	K- Acineto-Bac 2	L- RES040 - Bac 1
			42.42 -48.50
8.24	51.15	43.29	L- RES040 - Bac2
13.5	47.51	----	37.33- 44.18

Na Figura 18, que avalia a especificidade do bacteriófago, observaram-se diferenças na susceptibilidade entre as cepas bacterianas testadas. Algumas cepas de *Klebsiella. Pneumoniae*, apresentaram halos de lise expressivos, com valores médios superiores a 15 mm como observado para as cepas RES099, RES205 e RES040, indicando elevada atividade lítica do bacteriófago.

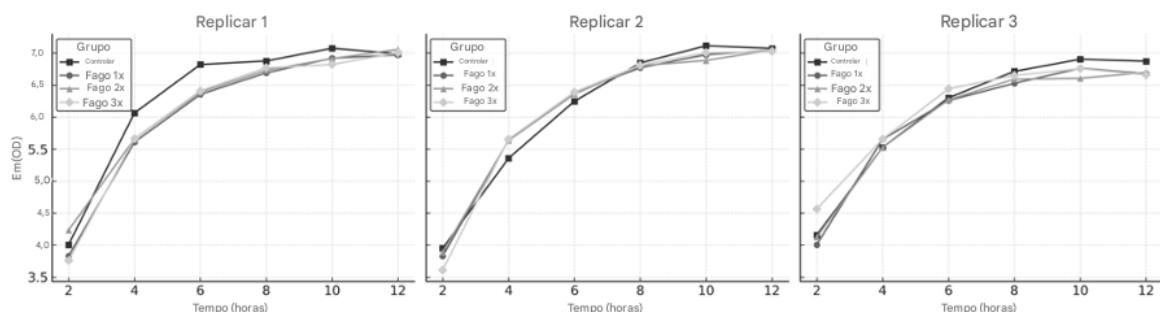
Em contraste, outras apresentaram menor susceptibilidade, evidenciada por halos reduzidos (< 12 mm) ou mesmo pela ausência de lise visível como observado nas cepas RES150-BAC 2 e RES251-BAC 1. Além disso, não foi observada formação de halos frente a cepas pertencentes a outros gêneros bacterianos, como *Acinetobacter sp.* (placas K), indicando que o bacteriófago BIPV apresenta alta atividade lítica direcionada principalmente às cepas

de *K. pneumoniae*, evidenciando um perfil de especificidade relativamente restrito, característica desejável para aplicações terapêuticas.

5.4 Curva de crescimento da cepa de *K. pneumoniae* exposta a diferentes concentrações de fago

A curva de crescimento bacteriano demonstrou que todas as culturas entraram na fase exponencial na Figura 19. O grupo controle, não tratado com bacteriófagos, apresentou valores mais elevados de ln (DO) durante as fases exponencial e estacionária inicial quando comparado aos grupos tratados com fagos. Embora as diferentes concentrações de bacteriófagos (100 ul, 200 ul e 300 ul) tenham promovido uma leve redução na densidade óptica ao longo do tempo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados (ANOVA unidirecional, $p > 0,05$). Dessa forma nas condições experimentais testadas, a exposição à fagoterapia não resultou em inibição significativa do crescimento bacteriano.

Figura 17- Curva de crescimento bacteriano com quatro grupos: Grupo: 1×10^3 ; Grupo 2: 1×10^5 ; Grupo 3: 1×10^7 PFU/mL.



Efeito da aplicação de diferentes concentrações de bacteriófagos no crescimento de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente ao longo de 12 horas. Cada gráfico representa um dos três experimentos independentes (Replicatas 1, 2 e 3). As culturas foram tratadas com bacteriófagos nas concentrações de 10^3 , 10^5 e 10^7 , em comparação com o grupo controle (sem adição de fago). O crescimento bacteriano foi monitorado pela leitura da densidade óptica (OD) a 600 nm e os dados foram transformados para o logaritmo natural (ln(OD)). Observa-se tendência de redução do crescimento bacteriano com o aumento da concentração de bacteriófagos, especialmente nas primeiras horas de incubação."

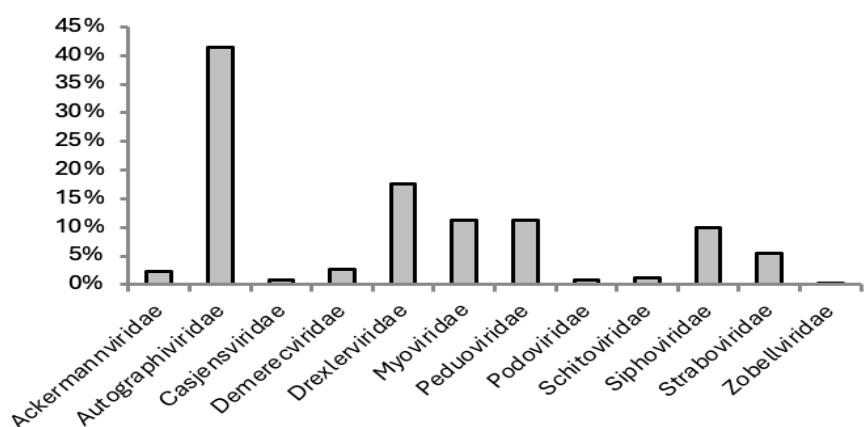
Esses dados indicam que, nas condições experimentais avaliadas e para as multiplicidades de infecção testadas, a presença dos bacteriófagos não interferiu de forma

significativa no crescimento da cultura bacteriana ao longo de 12 horas de incubação. Estudos futuros poderão considerar a utilização concentrações fágicas mais elevadas, a avaliação de diferentes tempos de exposição, bem como a aplicação de metodologias complementares, como ensaios de *time-kill*, determinação de MOI ideal ou análises de viabilidade celular, a fim de aprofundar a compreensão da interação fago–hospedeiro.

5.5 Bioinformática

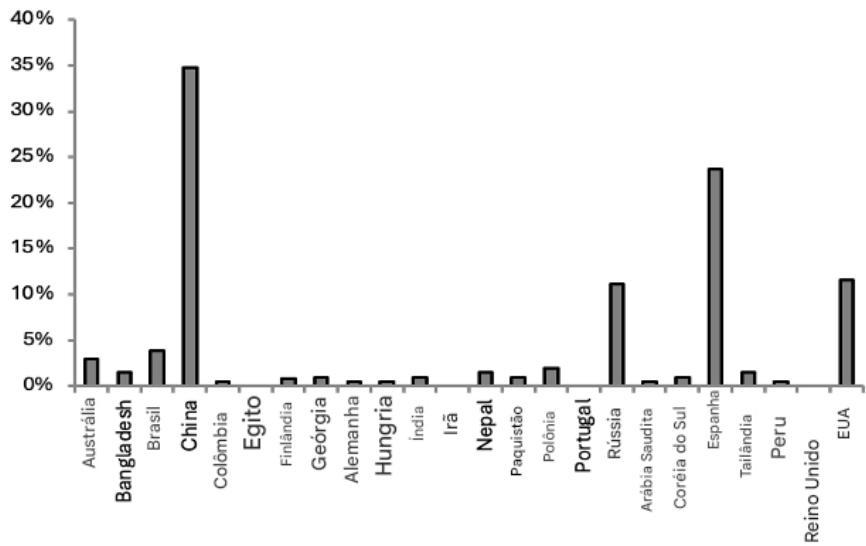
O estudo analisou 531 sequências de genomas completos de bacteriófagos associados à *Klebsiella pneumoniae*, com o objetivo de avaliar a diversidade percentual em relação às famílias virais, países de isolamento e fontes de origem. As principais famílias de fagos representadas nas sequências analisadas foram Autographiviridae (36,91%), Drexlerviridae (15,63%), Peduoviridae (9,98%), Siphoviridae (8,85%) e Myoviridae (5,27%) (Figura 20). Em relação ao país de origem dos bacteriófagos cujas sequências genómicas foram analisadas, observou-se maior representatividade da China (19,77%), seguida por Espanha (9,42%), Rússia (7,91%), Estados Unidos (5,84%) e Reino Unido (3,77%) (Figura 21). No que se refere ao Brasil, apenas 1,51% das sequências corresponderam a bacteriófagos isolados em território nacional evidenciando a escassez de estudos genómicos de fagos associados a *k.pneumoniae* no país. Quanto às fontes de isolamento, a maioria dos bacteriófagos foi proveniente de águas residuais, esgotos hospitalares e ambientes urbanos (Figura 22), o que evidencia a ampla distribuição ambiental desses vírus e reforça o papel desses ambientes como importantes reservatórios naturais de bacteriófagos com potencial terapêutico.

Figura 18- Porcentagem por família de bacteriófagos encontrados nos isolados de *K. pneumoniae*. Proporção por família.



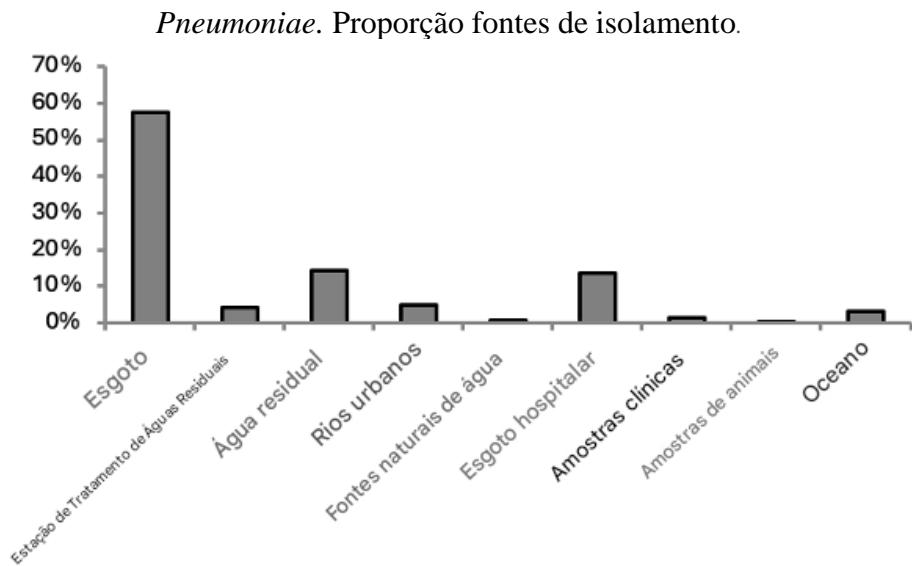
A maioria dos bacteriófagos dos quais essas sequências se originaram, pertencem às seguintes famílias: Autographiviridae (36,91%), Drexlerviridae (15,63%), Peduoviridae (9,98%), Siphoviridae (8,85%) e Myoviridae (5,27%).

Figura 19- Porcentagem por países encontradas nos isolados de *K. pneumoniae*. Proporção por países.



Distribuição percentual de ocorrências para diferentes países (Austrália, China, Finlândia, Hungria, Nepal, Portugal, Coreia do Sul e Turquia). Os dados mostram uma predominância significativa da China com mais de 30%, seguida por Coreia do Sul, Portugal e Turquia, enquanto os demais países apresentam valores inferiores a 10%. Países como Austrália, Finlândia, Hungria e Nepal exibem percentuais menores.

Figura 20- Porcentagem por fontes de isolamento encontradas nos isolados de *K.*



Ocorrências e percentagens de identificação viral em diferentes tipos de amostras. Amostras de esgoto apresentaram o maior número de ocorrências (196; 57,48%), seguidas de rios urbanos (49; 14,37%) e amostras clínicas (46; 13,49%). Outras categorias apresentaram percentuais significativamente menores, como rios urbanos com 4,99% e amostras clínicas com 3,23%.

5.6 Diagnóstico Molecular

Foi realizado um ensaio de diagnóstico molecular utilizando iniciadores específicos para os genes *cap* (capsídeo), *ter* (terminase) e *ACK*, com o objetivo de detectar bacteriófagos associados a *Klebsiella pneumoniae*. O ensaio baseou-se na obtenção de curvas de amplificação e de dissociação conforme ilustrado na (Figura 23), para cada conjunto de *primers* aplicados às amostras BAC 1 e BAC 2.

Para os primers direcionados ao gene do capsídeo (*cap*), ambas as amostras apresentaram amplificação positiva, com valores de Cq (quantification cycle) de 18 para a amostra BAC1 e 16 para a amostra BAC2, indicando alta carga de DNA fágico nessas amostras e confirmando a presença de bacteriófagos associados a *K. pneumoniae*.

Figura 21- -(A) Curva de amplificação e (B) Curva de dissociação dos *primers* CAP.

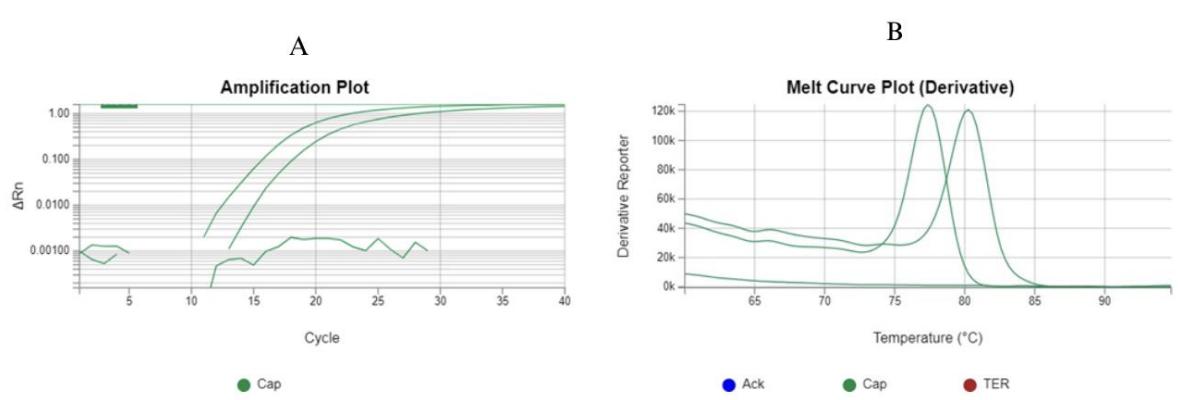


Figura 23 (A) Curva de amplificação dos primers CAP; (B) Curva de dissociação dos primers CAP para a detecção de bacteriófagos de *K. pneumoniae*. Com relação às curvas de dissociação dos primers cap. Nota-se que a formação de um único pico para ambas as amostras, indicando a presença de um produto único. Destaca-se uma variação entre 77 °C e 80 °C na temperatura de dissociação entre as amostras BAC 1 e BAC 2.

Para os primers direcionados ao gene *ack*, associado à família *Ackermannviridae*, a curva de amplificação (Figura 24A) demonstrou amplificação precoce e robusta em ambas as amostras BAC1 e BAC2, com valores de Cq (quantification cycle) de 5. Esses resultados indicam uma alta abundância do alvo genético, reforçando a presença de bacteriófagos pertencentes à família *Ackermannviridae* nas amostras analisadas.

Figura 22- (A) Curva de amplificação e (B) Curva de dissociação dos primers ACK.

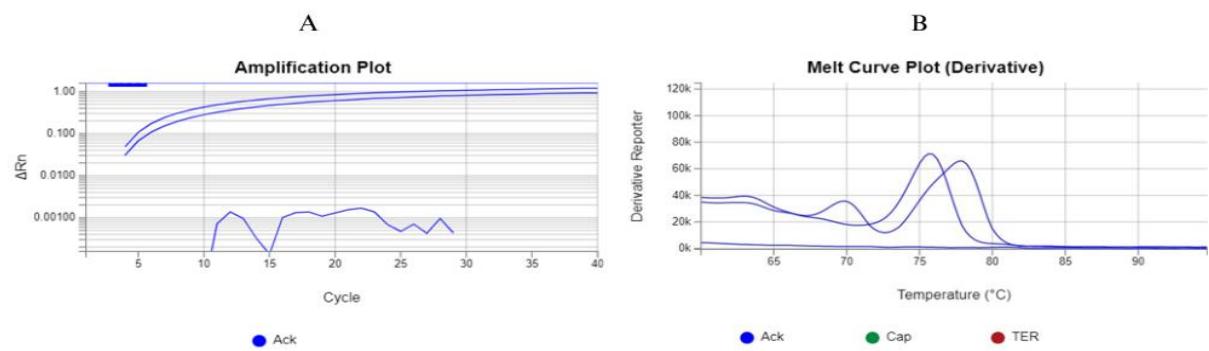
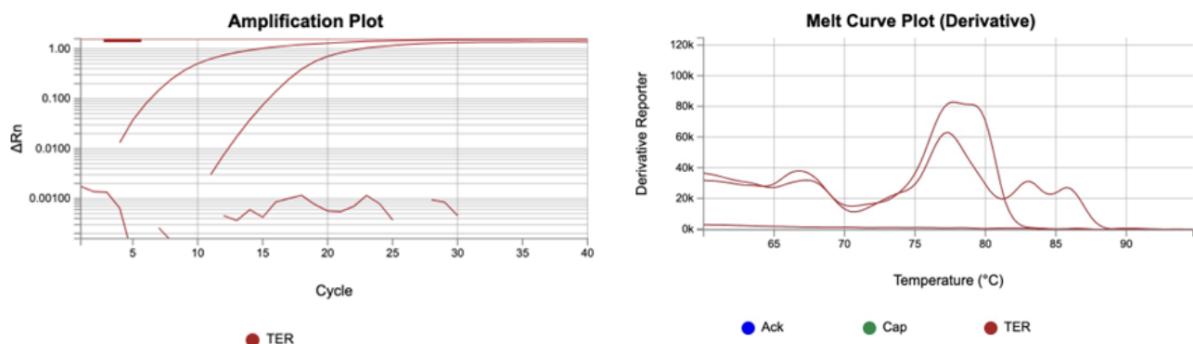


Figura 24(A) Curva de amplificação dos primers ack para a detecção de bacteriófagos de *K. pneumoniae*. (Figura 24 B) Curva de dissociação dos primers ack para a detecção de bacteriófagos de *K. pneumoniae*. às curvas de dissociação, observou-se a presença de um único pico na amostra correspondente à BAC 1 (Figuras 24) cuja temperatura de melting foi de 76 °C. Em relação à BAC 2, verificou-se a formação de um pico próximo à região correspondente ao pico de BAC 1, além do surgimento de um segundo pico, sugerindo a formação de um produto secundário. A temperatura de melting para BAC 2 foi de aproximadamente 78 °C.

Figura 23- (A) Curva de amplificação e (B) Curva de dissociação dos *primers* TER.

A

B



Primers de qPCR Terminases (TER) com relação à curva de amplificação para o TER (Figura 25A), as amostras apresentaram Cq (*Cycle quantitative*) de 8 para BAC 1 e 18 para BAC 2 (Figura 25 B). Com relação as curvas de dissociação dos *primers* TER, (Figura 25 B) BAC 1 e BAC 2, é possível notar a formação de múltiplos picos. Isso é indicativo a presença de diferentes produtos secundário ao amplicon de interesse. A temperatura de *melting* para ambas a amostra foi de cerca de 77 °C.

Os ensaios de PCR quantitativa (*qPCR*) realizado com as amostras ambientais demonstraram amplificação robusta caracterizada pela presença de picos únicos nas curvas de dissociação, para os conjuntos de *primers* CAP (Figura 23) e ACK (Figura 24). Esses resultados indicam alta especificidade dos iniciadores utilizados, confirmando a amplificação de alvos genéticos específicos de bacteriófagos associados a *Klebsiella pneumoniae* nas amostras analisadas.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo destacam o potencial terapêutico de bacteriófagos isolados da Lagoa do Porangabussu frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes (MDR/XDR), evidenciando sua aplicabilidade no atual cenário crítico de resistência antimicrobiana. Os isolados avaliados demonstraram capacidade de lisar eficientemente cepas clínicas de *k. pneumoniae* provenientes da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), oriundas de sítios infecciosos relevantes, como aspirado traqueal e hemoculturas. Esse aspecto confere ao estudo uma perspectiva translacional, uma vez que os ensaios foram conduzidos com isolados bacterianos clínicos reais, frequentemente associados a infecções nosocomiais de difícil tratamento.

Estudos prévios, como os conduzidos por (ABEDON *et al*, 2011) e (DOSS *et al*, 2017), já haviam demonstrado o potencial de bacteriófagos isolados de ambientes aquáticos,

esgotos e outras fontes naturais contra membros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *k. pneumoniae*. De forma semelhante, os fagos isolados neste estudo apresentaram halos de lises bem definidos nos ensaios de testes *spot test*, reforçando sua atividade lítica específica frente as cepas MDR avaliadas. A predominância de placa de lise claras sugere que os fagos isolados possuem um ciclo estritamente lítico, em contraste com fagos temperados, que tipicamente formam placas turvas em decorrência da integração parcial do genoma viral ao genoma do hospedeiro. (ABEDON, 2011).

Os halos de lise observados nas análises de *spot test*, reforçam tanto a especificidade quanto a potência lítica dos fagos isolados. Em comparação com estudos como o de (LIN *et al*, 2017), que também relataram a formação de halos de lise conta *K. pneumoniae*, os resultados obtidos neste trabalho indicam uma performance lítica semelhante, sugerindo o potencial desses isolados para o desenvolvimento de formulações terapêuticas futuras baseadas em fagoterapia.

A eficácia lítica dos bacteriófagos foi ainda confirmada pelo método de ágar em dupla camada, que permitiu a quantificação das partículas virais em unidades formadoras de placa (PFU/mL). As contagens obtidas neste estudo evidenciaram títulos elevado, variando conforme a amostra e o tempo de incubação, com valores da ordem de 10^{10} e 10^{14} PFU/ml, indicando alta capacidade replicativa e estabilidade viral dos fagos isolados. Esses valores são compatíveis com aqueles descritos por (MIRZAEI & NILSOO, 2015) e (OLIVEIRA *et al*, 2019), cujos estudos realizados em ambientes urbanos e amostras ambientais também relataram títulos superiores de 10^9 PFU/mL reforçando a robustez dos resultados obtidos.

O isolado BIPV (bacteriófago isolado da placa viral) apresentou halos de lise bem definidos, evidenciando forte atividade lítica contra a cepa multirresistente de *Klebsiella pneumoniae*. A morfologia das placas sugere um ciclo lítico típico, característica desejável em fagos com potencial terapêutico. Além disso, a elevada concentração obtida, com título de aproximadamente 6×10^{19} PFU/ μ L, reforça a capacidade replicativa e o efeito lítico do isolado, demonstrando sua eficácia na infecção e lise bacteriana. Esses achados indicam que o BIPV possui características promissoras para aplicação em estratégias de fagoterapia, uma vez que fagos altamente líticos e com elevada produção de partículas virais tendem a apresentar melhor desempenho terapêutico (ABEDON, 2012; MIRZAEI & NILSOON 2015).

Os resultados obtidos demonstram que o bacteriófago BIPV apresenta atividade lítica consistente contra cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes, ainda que com variação no perfil de suscetibilidade. Essa variabilidade entre cepas de uma mesma espécie é amplamente relatada na literatura e pode ser atribuída a diferenças na composição e disponibilidade de receptores bacterianos, como lipopolissacarídeos e cápsula polissacarídica, que funcionam

como pontos de reconhecimento para os fagos (HYMAN & ABEDON, 2010; LABRIE *et al*, 2010).

O maior diâmetro dos halos observado em determinadas cepas sugere maior eficiência de adsorção e lise, possivelmente associada à maior acessibilidade dos receptores bacterianos. Por outro lado, a ausência de lise em algumas cepas pode estar relacionada a mecanismos de defesa bacterianos contra fagos, incluindo alterações estruturais da cápsula, restrição-modificação e outros sistemas de resistência descritos na literatura (HYMAN & ABEDON, 2010; LABRIE *et al*, 2010).

Resultados semelhantes foram relatados por (ABEDON, 2012), que destacou a correlação entre placas de lise bem definido a e alta especificidade lítica em fagos isolados de ambientes aquáticos. O isolamento direto de fagos a partir de fontes ambientais, como realizado neste estudo com amostras da Lagoa do Porangabussu tem se mostrado uma abordagem promissora na busca por fagos ativos contra patógenos multirresistentes (DOSS *et al*, 2017; OLIVEIRA *et al*, 2019). Considerando que a cepa *K. pneumoniae* analisada apresenta perfil XDR, a aplicação de fagos líticos representa uma alternativa terapêutica promissora frente à limitada eficácia dos antibióticos convencionais.

A especificidade demonstrada pelos bacteriófagos isolados representa um avanço significativo, diante do crescente problema de resistência antimicrobiana. Estudos prévios já relataram que determinados bacteriófagos isolados contra *Klebsiella. pneumoniae* podem apresentar atividade cruzada contra espécies filogeneticamente relacionadas, como *Klebsiella. oxytoca*, possivelmente em decorrência de similaridades nos receptores de membrana externa, incluindo estruturas capsulares e proteínas de membrana (OLIVEIRA *et al*, 2019). Esses achados são consistentes com os resultados observados no presente estudo, no qual os fagos isolados apresentaram atividade lítica contra cepas relacionadas, ampliando seu potencial terapêutico.

A atividade observada frente a outras bactérias gram-negativas clinicamente relevantes, como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 18 K-L) é particularmente relevante, uma vez que essas espécies estão associadas a elevados índices de resistência antimicrobiana e compõem o grupo de patógenos prioritários em ambientes hospitalares. A presença de halos de lise em diferentes espécies bacterianas pode refletir a atuação de fagos com espectro de hospedeiro mais amplo, fenômeno já descrito na literatura para isolados ambientais (DOSS *et al*, 2017; OLIVEIRA *et al*, 2019). No entanto, é importante ressaltar que a especificidade fágica pode ser influenciada por fatores experimentais, como a fase de crescimento bacteriano, as condições de incubação e o meio de cultura utilizado.

A análise da curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente demonstrou que todas as culturas atingiram a fase exponencial entre 2 e 6 horas, alcançando um platô por volta de 8 horas, padrão compatível com descrições clássicas do crescimento bacteriano em meio líquido. O grupo controle, não tratado com bacteriófagos, apresentou valores mais elevados de ln (OD) nas fases exponencial e estacionaria inicial, quando comparado aos grupos tratados, sugerindo um possível efeito inibitório inicial da presença dos fagos. Entretanto, as reduções observadas no crescimento bacteriano nas culturas tratadas com diferentes concentrações de fagos (100, 200 e 300 µL) não foram estatisticamente significativa (ANOVA unidirecional, $p > 0,05$).

Esses resultados indicam que, nas condições experimentais avaliadas, a aplicação dos fagos não promoveu inibição efetiva da multiplicação bacteriana ao longo de 12 horas. Estudos prévios destacam que a eficácia da fagoterapia depende de fatores como a multiplicidade de infecção (MOI), o tempo de contato fago–bactéria e a taxa de adsorção, os quais podem limitar a atividade lítica observada em ensaios *in vitro* (ABEDON, 2012; HYMAN & ABEDON, 2010).

Resultados semelhantes foram descritos por (AZEREDO & SUTHERLAND, 2008) e ABEDON (2012), que destacam a importância da multiplicidade de infecção (MOI), do tempo de contato e da taxa de adsorção dos fagos como fatores determinantes para eficácia da fagoterapia. A ausência de efeito estatisticamente significativo pode estar relacionada a diferentes fatores experimentais. Primeiramente, a concentração de fagos utilizada pode ter sido insuficiente para garantir um contato adequado entre vírus e células bacterianas, o que limita a eficácia do processo infeccioso (HYMAN & ABEDON, 2010). Além disso, a ausência de efeito significativo pode estar relacionada à presença de mecanismos de resistência bacteriana aos fagos, incluindo barreiras estruturais como a cápsula polissacarídica e outros sistemas de defesa bacterianos, conforme descrito na literatura (LABRIE *et al.*, 2010; HYMAN & ABEDON, 2010).

Outro ponto relevante a ser considerado é que a análise baseada exclusivamente na densidade óptica pode não refletir integralmente o efeito dos bacteriófagos sobre a viabilidade celular, uma vez que fragmentos celulares resultantes da lise bacteriana podem contribuir para a turbidez do meio sem necessariamente representar células. Dessa forma, a utilização de métodos complementares, como a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) ou ensaios de viabilidade celular, pode fornecer informações mais precisas sobre a atividade lítica dos fagos, conforme discutido em estudos metodológicos sobre avaliação da eficácia fágica (MIRZAEI & NILSSON, 2015; ABEDON, 2012).

Em síntese, embora os resultados indiquem uma tendência na redução no crescimento bacteriano após a exposição aos fagos, não foi observado efeitos estatisticamente significativo sob as condições experimentais avaliadas. Estudos futuros devem considerar o uso de concentrações fágicas mais elevadas, variação da multiplicidade de infecção (MOI), ajustes no tempo de incubação e a aplicação de metodologias complementares, a fim de aprofundar a avaliação da lise bacteriana.

A aplicação de ferramentas de bioinformática neste estudo foi fundamental para identificação de genes específicos de bacteriófagos com potencial lítico contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistente. A utilização de sequências genómicas disponíveis em bancos de dados públicos, seguida da predição regiões codificadoras e da análise de similaridade por meio de ferramentas como BLAST, possibilitou a seleção de genes-alvo estratégicos como *ter*, *cap* e *ack*, para o desenho de *primers* moleculares. Esses genes estão associados a funções estruturais e líticas essenciais para a ação eficiente dos bacteriófagos. (OLIVEIRA *et al*, 2019; HYMAN, 2019).

O gene *ter* codifica proteínas relacionadas no empacotamento do DNA viral no interior do cápside; o gene *o cap* está associado à proteína majoritária do cápside essencial para a proteção do material genético e estabilidade viral; enquanto o gene *ack* relacionado à família *Ackermannviridae*, está envolvido em componentes estruturais importantes da cápside e da cauda viral, fundamentais para o reconhecimento e infecção da célula hospedeira.

A detecção desses genes corrobora a presença de bacteriófagos com capacidade de infecção eficiente e estabilidade genômica, características desejáveis em candidatos a fagoterapia (OLIVEIRA *et al*, 2019; HYMAN, 2019). Além disso a abordagem bioinformática permitiu a comparação dos fagos isolados com genomas previamente descritos na literatura, hospedeiro e modularidade genômica, aspectos relevantes no contexto da fagoterapia direcionada.

O uso de alinhamentos múltiplos e da geração de sequências consenso, como realizado neste estudo, contribui para o desenvolvimento de *primers* altamente específicos, reduzindo o risco de amplificações inespecíficas em reações de *qPCR*. A eficácia dos *primers* foi confirmada pela obtenção de curvas de amplificação bem definidas e curvas de dissociação com pico único, com exceção do *primer* *ter*, que apresentou amplificação inespecífica indicando a necessidade de redesenho desse iniciador.

Essas estratégias possibilitam uma triagem pré-clínica mais segura e direcionada de bacteriófagos candidatos à terapia além de contribuírem para a expansão do conhecimento sobre a diversidade genômica fágica em ambientes naturais, como a Lagoa do Porangabussu. A

integração da bioinformática com técnicas moleculares, como a *qPCR*, representa uma abordagem promissora para o avanço da fagoterapia e da vigilância de fagos em contextos ambientais e clínicos, especialmente em países como o Brasil, onde a representatividade de isololados fágicos ainda é limitada (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A análise das reações de PCR em tempo real (*qPCR*) realizada neste estudo permitiu a validação da presença de genes específicos de bacteriófagos isolados da Lagoa do Porangabussu, com base em três alvos: *ter*, *cap* e *ack*. As curvas de amplificação obtidas apresentaram o perfil esperado, indicando elevada especificidade e eficiência dos primers desenhados na detecção e amplificação dos fragmentos genéticos de interesse. Os valores do Cq observados, situados entre 15 e 30 ciclos indicam que a carga genética dos fagos presentes nas amostras foi suficiente para detecção por qPCR refletindo um processo de amplificação eficiente e consistente. Esse comportamento sugere, ainda, a ausência de interferência significativa por inibidores da reação, conforme evidenciado pela uniformidade e reproduzibilidade das curvas de amplificação obtidas no presente estudo, em concordância com protocolos clássicos de detecção molecular de bacteriófagos (KROPINSKI *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2009).

A análise das curvas de dissociação (*melting curves*) revelou a presença de um único pico bem definido para os primers *cap* e *ack*, indicando alta especificidade e ausência de produtos inespecíficos ou dímeros de primers. Em contraste, o primer *ter* apresentou múltiplos picos na curva de dissociação, sugerindo a amplificação de produtos inespecíficos, o que evidencia a necessidade de redesenho desse oligonucleotídeo para aprimorar sua especificidade analítica. A avaliação das curvas de dissociação constitui uma etapa fundamental na validação de ensaios de qPCR, permitindo confirmar que o produto amplificado corresponde ao alvo genético esperado (CLOKIE & KROPINSKI, 2009).

A eficiência dos primers *cap* e *ack*, foi corroborada não apenas pela nitidez das curvas de amplificação, mas também pela baixa variação dos valores de Ct entre as amostras analisadas, indicando desses oligonucleotídeos. A detecção de produtos amplificados específicos para esses genes, que codificam componentes estruturais dos bacteriófagos, é indicativa de fagos líticos, os quais apresentam elevado potencial de aplicação terapêutica no controle de cepas multirresistentes de *Klebsiella. pneumoniae*, conforme descrito na literatura especializada (SILLANKORVA, 2018). De forma complementar, os resultados obtidos pelas curvas de amplificação e dissociação associados as observações de halos de lise nos ensaios microbiológicos confirmam a eficiência dos bacteriófagos isolados e validam a abordagem molecular empregada para triagem e confirmação da presença de fagos em amostras ambientais.

A combinação de métodos fenotípicos e moleculares tem se mostrado uma estratégia robusta para a caracterização de fagos com potencial terapêutico (CLOKIE & KROPINSKI *et al.*, 2009). Apesar dos resultados promissores, este estudo apresenta algumas limitações. A avaliação do potencial lítico dos bacteriófagos foi realizada exclusivamente *in vitro*, o que não permite extrapolar diretamente sua eficácia para sistemas biológicos, mais complexos, como modelos animais ou contextos clínicos.

Além disso, embora a detecção de genes estruturais tenha sido bem-sucedida, a caracterização genômica completa do fago BIPV ainda se faz necessária a fim de assegurar a ausência de genes associados à virulência bacteriana ou resistência antimicrobiana, requisito essencial para a aplicação segura da fagoterapia. Por outro lado, destaca-se com aspecto positivo a demonstração clara da atividade lítica do fago isolado contra uma cepa XDR de *K. pneumoniae*, aliada a confirmação molecular de genes estruturais relevantes, o que reforça o potencial desse isolado como candidato promissor para aplicações terapêuticas futuras.

Esses achados contribuem para o avanço do conhecimento acerca da diversidade e aplicabilidade de bacteriófagos ambientais no enfrentamento de patógenos multirresistentes, abrindo perspectivas para estudos futuros que envolvam abordagens *in vivo* e estratégias de co-terapia associada ao uso de antibióticos. Entretanto, desafios adicionais permanecem, incluindo a avaliação da eficácia dos bacteriófagos frente a diferentes espécies bacterianas resistentes e em distintos contextos clínicos, bem como a ampliação do escopo amostra para contemplar maior diversidade de ambientes e cepas bacterianas.

Por fim, o uso de ferramentas bioinformáticas mostrou-se essencial para a caracterização genética e funcional dos bacteriófagos, permitindo avanços no desenvolvimento de novas estratégias de isolamento, detecção e aplicação terapêutica. A integração de técnicas clássicas da microbiologia, com abordagens moleculares e computacionais modernas demonstra-se uma estratégia sólida no enfrentamento da resistência antimicrobiana. Embora promissores, os resultados obtidos reforçam a necessidade de estudos adicionais para validação em modelos clínicos e ambientais, visando à futura implementação da terapia bacteriófágica em larga escala.

7 CONCLUSÃO

Em síntese, este estudo representa um avanço relevante no enfrentamento da resistência antimicrobiana, ao demonstrar que os bacteriófagos podem desempenhar um significativo no tratamento de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes. A caracterização do isolado BIPV evidenciou a formação de halos bem definidos nos ensaios de sensibilidade, elevada contagem de unidades formadoras de placa (PFU) e atividade lítica específica, reforçando o potencial terapêutico desse bacteriófago.

Os resultados obtidos corroboram a literatura recente, que aponta os bacteriófagos como alternativas promissoras diante do progressivo esgotamento da eficácia dos antibióticos convencionais. Embora ainda exista limitações metodológicas e experimentais ainda existam como a necessidade de ampliar os ensaios *in vivo* e de investigar de forma mais aprofundada a estabilidade, o espectro de ação e a dinâmica fago-hospedeiro, os achados aqui apresentados fornecem uma base científica consistente para o desenvolvimento de estudos subsequentes.

Além disso, este trabalho contribui para a consolidação da fagoterapia como uma estratégia complementar no combate às infecções hospitalares e comunitárias causadas por patógenos multirresistentes, com destaque para *K. pneumoniae*. A continuidade das pesquisas poderá abranger avaliações de segurança e eficácia em modelos animais, análise genómicas detalhadas para exclusão de genes associados à virulência ou resistência antimicrobiana, bem como estudos aplicados voltados a viabilidade de formulações terapêuticas baseadas em bacteriófagos.

Portanto, os dados apresentados não apenas reforçam a relevância dos bacteriófagos como agentes antimicrobianos naturais, mas também abrem perspectivas para o desenvolvimento de abordagens inovadoras, seguras e sustentáveis no enfrentamento da crise global da resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ABEDON, S. T. (2012). Phage therapy pharmacology: calculating phage dosing. **Advances in Applied Microbiology**, 78, 1-40.
- ACKERMANN, H. W. 5500 **Phages examined in the electron microscope**. Archives of **Virology**, v. 152, n. 2, p. 227–243, 2007.
- ACKERMANN, H. W. **Bacteriophage observations and evolution**. Research in **Microbiology**, v. 154, n. 4, p. 245–251, 2003.
- ADAMS, M. H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Avaliação nacional das ações de prevenção e controle das infecções e gerenciamento de antimicrobianos na Atenção Primária à Saúde – 2024. Publicado em 26 nov. 2024.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Alerta sobre bactérias produtoras de KPC e NDM no Paraná e Santa Catarina. Brasília: ANVISA, 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa>. Acesso em: 05 nov. 2025.
- ALMEIDA, Vivieni Vieira Prado et al. Infecções por *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos em hospital de nível terciário: **epidemiologia e caracterização**. 2013.
- A ALSUBHI, Ghadah. Bacteriophages as affordable solution for treatment of multidrug resistant bacteria, and their recent potential applications. **Novel Research in Microbiology Journal**, v. 5, n. 6, p. 1405-1414, 2021.
- ALMEIDA, Zonaite; FARIAS, Luciana. Investigação epidemiológica das principais infecções nosocomiais no Brasil e identificação dos patógenos responsáveis: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 1, n. 2, p. 49-53, 2015.
- AMARAL, S.M.; CORTÊS, A.Q.; PIRES, F.R. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **J Bras Pneumol**. 2009.
- ARTHUR TIMERMAN. Resistência bacteriana aos antibióticos: o panorama atual. 2017.
- AZEREDO J., & Sutherland, I. W. (2008). The use of phages for the removal of infectious biofilms. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 9(4), 261-266.
- BASTOS, Iago de Oliveira et al. O papel do farmacêutico no combate à resistência bacteriana: uma revisão integrativa. **Revista Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, p. e123111025959, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i10.25959.
- BIBERG, C.A.; RODRIGUES, A.C.S.; CARMO S.F.; et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwest region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 501–504, 2015.
- BORGES, Felipe Valadão et al. Infecção por superbactérias no centro cirúrgico e na Unidade de Terapia Intensiva: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 1, p. e4212139453-e4212139453, 2023. Disponível em:

<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/39453>. Acesso em: 28/out/24.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998. Diretrizes e normas para prevenção e controle de infecções hospitalares. **Diário Oficial da União, Brasília, 1998**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resistência microbiana: saiba o que é e como evitar: Bactérias resistentes causam atualmente 700 mil mortes por ano em todo o mundo. Em 2050, o número de vidas perdidas anualmente pode chegar a 10 milhões. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticiasanvisa/2020/resistencia-microbiana-saiba-o-que-e-e-como-evitar>. Acesso em: 02/out/24

BRASIL. Ministério da Saúde. *Webinar: Eu também contribuo para a prevenção e o controle das infecções! Brasília: Ministério da Saúde, 2022.* Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2024/webinar-eu-tambem-contribuo-para-a-prevencao-e-o-controle-das-infeccoes>. Acesso em: 05 nov. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Prevenção e controle Webinar:** Eu também contribuo para a prevenção e o controle das infecções! Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2024/webinar-eu-tambem-contribuo-para-a-prevencao-e-o-controle-das-infeccoes>. Acesso em: 14 maio 2024.

BRISSE, S.; GRIMONT, P. A. D. The genus *Klebsiella*. In: ROSENBERG, E. et al. (eds.). The Prokaryotes: Gammaproteobacteria. 4. ed. Berlin: Springer, 2021. p. 159–196.

BRÜSSOW, Harald; HENDRIX, Roger W. **Phage genomics: small is beautiful.** *Cell*, v. 108, n. 1, p. 13-16, 2002.

BRÜSSOW, Harald. Phage therapy for the treatment of human intestinal bacterial infections: soon to be a reality. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, v. 11, n. 9, p. 785-788, 2017.

CASJENS, S. R. Comparative genomics and evolution of the tailed bacteriophages. *CurrOpinMicrobiol*, v. 8, p. 451-8. 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). National Healthcare Safety Network (NHSN): surveillance and reporting guidelines. **Atlanta, 2020.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/nhsn/>. Acesso em: 05 nov. 2025.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Healthcare-associated infections: organisms and transmission. **Atlanta, 2019.** Disponível em: <https://www.cdc.gov>. Acesso em: 05 nov. 2025.

CISLO, M., et al. (1987). Bacteriophage treatment of suppurative 'kin infections. **Archivum immunologiae et therapia experimentalis**, 35 (2), 175-183.

CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. (Org.). *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. New York: Humana Press, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2023.

CRISCUOLO, Elena et al. *Bacteriophages and their immunological applications against infectious threats*. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, n. 1, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1155/2017/3780697.

D'ANDREA, M. M.; ARENA, F.; PANTOSTI, A.; VARI, A.; CONTI, G.; ROSSOLINI, G. M. The ESKAPE group: History and challenges. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 8, p. 538–540, 2017. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.04.008.

DA CUNHA, Izabelly Souza et al. *Os efeitos do uso de antibióticos na microbiota intestinal*. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 12, p. e125121244044, 2023. DOI: 10.33448/rsd-v12i12.44044.

DANIS-Wlodarczyk, K., et al. (2016). A proposed integrated approach for the preclinical evaluation of phage therapy in *Pseudomonas* infections. **Scientific Reports**, 6, 28115.

DA SILVA JL, Hirata RDC, Hirata MH. Bacteriophage: laboratorial diagnosis and phage therapy. **Braz J Microbiol**. 2009 Sep;40(3):547-549.

DA SILVA JÚNIOR, Raimundo Orlando et al. O Uso da Biotecnologia na Produção de Antibióticos:Uma Revisão Integrativa. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9,n. 6, p. 3114-3125, 2023. <https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/10556/4365>.

DA SILVA, Eleen Márcia Martins. Aplicações da terapia com bacteriófagos como controle microbiológico. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso — **Universidade Estadual Paulista**, 2011.

DA SILVA, Líllian Oliveira Pereira; DA ROCHA NOGUEIRA, Joseli Maria. Uso de bacteriófagos como alternativa no controle de infecções bacterianas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e200111133619, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i11.33619. Disponível em: <https://rsdjurnal.org/index.php/rsd/article/view/33619>. Acesso em: 05 nov. 2025.

DA SILVA, Aridson Erick Ferreira; JUNIOR, Omero Martins Rodrigues. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado dos carbapenêmicos meropenem e imipenem: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e44711730195-e44711730195, 2022.

DE ANDRADE, Leonardo Neves; DARINI, Ana Lúcia Costa. Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. Revista da ABM – **Academia Brasileira de Microbiologia**, v. 2, n. 1, p. 45–58, 2020. Disponível em: <https://abm.org.br>. Acesso em: 05 nov. 2025.

DE ARRUDA, C. et al. Revisão bibliográfica de antibióticos beta-lactâmicos. **Revista Saúde em Foco**, v. 11, p. 982–995, 2019.

DE CARVALHO, Mariana Lustosa et al. Infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva neonatal. **Revista interdisciplinar**, v. 7, n. 4, p. 189-198, 2015.

DE OLIVEIRA AZEVEDO, Brenda; PACHECO, Laura Júlia Santos; MACHADO, Juliana Martins. *Resistência Bacteriana Associada Aos Efeitos Da Automedicação*. 2023.

Deresinski Stan. Bacteriophage Therapy: Exploiting Smaller Fleas. Clinical Infectious Diseases; 48: 1096-1101, 2009.

DOMINGO-CALAP, Pilar; DELGADO-MARTÍNEZ, Jennifer. **Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era.** Antibiotics, v. 7, n. 3, p. 66, 2018.

FATHIMA, Bibi; ARCHER, Ann Catherine. Bacteriophage therapy: recent developments and applications of a renaissant weapon. Research in microbiology, v. 172, n. 6, p. 103863, 2021.

FAPESP. *Klebsiella pneumoniae é a bactéria que mais causa infecções hospitalares no Brasil, aponta estudo.* Agência FAPESP, 2019. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br>. Acesso em: 05 nov. 2025.

FERREIRA, Bárbara Sofia Bucha. O potencial terapêutico dos bacteriófagos e as infecções nosocomiais. 2022. Tese de Doutorado.

FERREIRA, Joana Margarida Costa. *Klebsiella pneumoniae e a ameaça da resistência aos antibióticos.* 2022. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) — Universidade de Lisboa, Lisboa, 2022.

FRUCIANO, D. E.; BOURNE, S. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. Can J Infect Dis Med Microbiol, v. 18, p. 19-26. 2007.

FUENTES CASTILLO, C. Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, v. 1, n. 2, p. 262–266, 2007.

Fundação Oswaldo Cruz, <https://portal.fiocruz.br/noticia/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia>, 2021.

GALLEGO, G. M. et al. Resistência bacteriana a múltiplas drogas: desafio terapêutico no transplante de rim. Revista Universidad y Salud, v. 21, n. 1, p. 72–87, 2018.

Gill, J. J., & Hyman, P. (2010). Phage choice, isolation, and preparation for phagotherapy. Current pharmaceutical biotechnology, 11 (1), 2-14.

GROTH, A. C.; CALOS, M. P. **Phage Integrases: Biology and Applications.**

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Química Nova, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000300035.

GUPTA, K.; NAGARAJ, G.; DOUGLAS, S. β -Lactam Antibiotics. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/> Acesso em: 05 nov. 2024.

HAQ, I. et al (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. Virology Journal, 9:9., disponível em <http://www.virologyj.com/content/9/1/9>

HARADA, L. K. et al. **Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art** Microbiological Research, v. 212–213, n. February, p. 38–58, 2018.

HEILBERG, Ita Pfeferman; SCHOR, Nestor. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário: ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, p. 109-116, 2003.

HYMAN, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. **Advances in Applied Microbiology**, 70, 217–248.

HILAL-DANDAN, R.; BRUTON, L. L. Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics. New York: McGraw-Hill, 2014.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). *Virus taxonomy: 2024 release*. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 05 nov. 2025.

JUNIOR, Aluisio Martins et al. Infecções por bactérias do grupo “ESKAPE” em pacientes internados em unidade de terapia intensiva por COVID-19. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 103373, 2023.

KROPINSKI, A. M.; Mazzocco, A.; Waddell, T. E.; Lingohr, E.; Johnson, R. P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 501, p. 69–76, 2009.

KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. (Org.). Bacteriophages: Biology and Applications. 2005.

KLUMPP, J. et al. Bacteriophage functional genomics and its role in bacterial pathogen detection. **Brief Funct Genomics**, 12(4):354-65. Jul. 2013.

LABRIE, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, 8(5), 317-327.

LI, Na et al. Isolation and characterization of novel phages targeting pathogenic *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 792305, 2021.

LI, Yanping et al. ***Klebsiella pneumonia* and its antibiotic resistance: a bibliometric analysis**. Bio Medresearchinternational, v. 2022, n. 1, p. 1668789, 2022. UNEP. O que é resistência antimicrobiana e por que ela é uma ameaça crescente? 2023. Disponível em: <https://www.unep.org/pt-br/noticias-e-reportagens/reportagem/o-que-e-resistencia-antimicrobiana-e-por-que-ela-e-uma-ameaca>. Acesso em: 17ago. 2023.

LIMA, Mariana Alves et al. Infecções hospitalares associadas a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (kpc): uma revisão. **BrazilianJournalof Health Review**, v. 7, n. 1, p. 3268-3280, 2024.

LOBA, Andreia Filipa Franco Rei et al. **Fagoterapia como alternativa ao uso dos antibióticos convencionais**. 2014. Dissertação de Mestrado.

MADIGAN, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P.V.; and Clark, D. P. (2008). **Microbiologia de Brock**, 10a edição. Artmed Editora S/A. Porto Alegre, RS.

MADIGAN, M. T., et al. (2018). **Brock Biology of Microorganisms**. 15th ed. Pearson.

MARCHIOTTI, MATHEUS CORDEIRO *et al.* Fagoterapia: Uma alternativa a simples e barata para o tratamento de infecções bacterianas resistentes à antibioticoterapia. Uningá Review, v. 26, n. 2, 2016.

MEADEN, S.; KOSKELLA, B. Exploring the risks of phage application in the environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 358, 2013.

MITIGATING BACTERIAL RESISTANCE IN A TERTIARY CARE Setting During COVID-19. **Infection and Drug Resistance**, p. 1647-1656, 2025.

MOURA, M.E.B.; CAMPELO, S.M.A.; BRITO, F.C.P.; BATISTA, O.M.A.; ARAÚJO, T.M.A.; OLIVEIRA, A.D.S. **Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino.** Rev. Bras. Enferm. Brasília v.60, n.4, p.416-21, 2007.

MURAI, Amanda Yuki et al. Tratamento de infecções hospitalares causadas pela *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) com antibióticos da classe das cefalosporinas. **Revista Brasileira de Ciências Biomédicas**, v. 3, n. 1, p. E0652022-12, 2022.

OLIVEIRA, C. F.; MOREY, A. T.; BIASI-GARBIN, R. P. et al. *Emergência de Staphylococcus aureus resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo.* **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 2, p. 243–249, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022.* Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/item/9789240062702>. Acesso em: 05 nov. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Antimicrobial resistance.* Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2024.* Geneva: World Health Organization, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2021.* Geneva: World Health Organization, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/item/9789240062702>. Acesso em: 05 nov. 2025.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Infecções relacionadas à assistência à saúde: epidemiologia, controle e prevenção. São Paulo: Atheneu, 2014.

PARK, M., *et al.* (2012). Characterization and comparative genomic analysis of a novel bacteriophage, SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7. **Applied and environmental microbiology**, 78 (1), 58-69.

PUCCINI, P.T. Perspectivas do controle da infecção hospitalar e as novas forças sociais em

defesa da saúde. **Rev. Ciência & Saúde Coletiva**, 16(7):3043-3049,2011.

PUJATO, S.A.; QUIBERONI, A.; MERCANTI, D.J. Bacteriophages on dairy foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, p. 14-30, 2018.

ROCHA, D. P. Coordenação de metais a antibióticos como estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, p. 111–118, 2021.

SABA, Neelam; BALWAN, Wahied Khawar. *Study of frequency, epidemiology of nosocomial infections in healthcare centres*. **Saudi Journal of Pathology and Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 160–166, 2023.

SCHENKEL, TIAGO SFREDO. Isolamento de bacteriófagos líticos em efluentes hospitalares e sua atividade contra *pseudomonas aeruginosa* e *acinetobacter baumannii* multirresistentes. 2021.

SANTOS, Sílvio B. et al. Population dynamics of a *Salmonella* lytic phage and its host: implications of the host bacterial growth rate in modelling. **PloS one**, v. 9, n. 7, pe102507, 2014.

SCHERER, Carolina Boesel; BOTONI, Larissa Silveira; COSTA-VAL, Adriane Pimenta. Mecanismos de ação de antimicrobianos e resistência bacteriana. **Veterinária**, v. 4, n. 13, p. 12–20, 2016.

SILVA, J. A.; SOUZA, M. F.; OLIVEIRA, R. T. *Klebsiella pneumoniae*: um patógeno emergente na resistência antimicrobiana. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 52, n. 3, p. 210-225, 2023.

SILVA, Valdira Salgueiro da et al. Multirresistência de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*s e *Staphylococcus aureus* em hemoculturas em UTIs: uma revisão de literatura. 2022.

SILLANKORVA, Sanna. Isolation of bacteriophages for clinically relevant bacteria. **Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice**, p. 23-30, 2018.

SOUSA, Antonio Manuel. **Bacteriófagos: características gerais, utilidades e aplicações biotecnológicas**. 2012.

TADEUCCI, Por. **ANVISA lança diretrizes para programa de gerenciamento do uso de antimicrobianos**. Disponível em: <https://www.ccih.med.br/anvisa-lanca-diretrizes-para-programa-de-gerenciamento-do-uso-de-antimicrobianos/>. Acesso em: 03 jan. 2018.

TEIXEIRA, Alysson Ribeiro et al. **Resistência bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos**. 2019.

TORTORA, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2012) **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed 10^a Ed, P53.

TOWNSEND, Eleanor M. et al. Isolation and characterization of *Klebsiella* phages for phage therapy. **Therapy, Applications, and Research**, v. 2, n. 1, p. 26-42, 2021.

TURNER, M. Phage on the rampage. **Nature international weekly jornal science.** v.360. Jun. 2011.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). O que é resistência antimicrobiana e por que ela é uma ameaça crescente? 2023. Disponível em: <https://www.unep.org/pt-br/noticias-e-reportagens/reportagem/o-que-e-resistencia-antimicrobiana-e-por-que-ela-e-uma-ameaca> Acesso em: 05 nov. 2025.

VAZ, Clarissa Silveira Luiz et al. **Quantificação de bacteriófagos em amostras biológicas: comparação de métodos com plaqueamento em ágar.** 2024.

VIEIRA *et al.*, 2021. Eficácia da fagoterapia para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes e suas aplicações. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 10728-10744, 2021.

VIERTEL, T. M. et al. Viruses versus bacteria - novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. **J Antimicrob Chemother.** 69(9):2326-2336. 2014.

WITTEBOLE, Xavier; DE ROOCK, Sophie; OPAL, Steven 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.

ZHANG, Xueyan et al. Role of Antimicrobial Stewardship in Modulating Antibiotic Use and Mitigating Bacterial Resistance in a Tertiary Care Setting During COVID-19. **Infection and Drug Resistance**, p. 1647-1656, 2025.