

IDENTIFICAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Endew Santos Ribeiro¹; Nicole Marie Hitchcock²; Danielle Devequi Gomes Nunes²; Leticia de Alencar Pereira Rodrigues²

¹ Engenharia Química; Iniciação científica – CNPq; endewr@gmail.com

² Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; leticiap@fiieb.org.br

RESUMO

Este estudo tem como objetivo identificar e avaliar fagos como uma potencial alternativa para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, como a *Klebsiella Pneumoniae*. Para isso, amostras de água residuais foram coletadas em três diferentes localidades da cidade de Salvador, Bahia, e processadas para isolar e concentrar os fagos ativos contra essa cepa bacteriana. A metodologia incluiu a preparação das amostras, ativação e repique das cepas, cálculo e preparo da OD 0.2, enriquecimento, amplificação dos fagos, identificação e caracterização dos fagos, e avaliação da atividade antimicrobiana destes fagos. Os resultados obtidos indicaram a presença de fagos ativos contra a *K. Pneumoniae* nas amostras de água coletadas, demonstrando o potencial dos fagos como uma alternativa promissora para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Portanto, este estudo contribui para a identificação de potenciais novas soluções terapêuticas para combater a resistência antimicrobiana e reduzir o impacto negativo dessas infecções na saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE: Bacteriófagos; resistência antimicrobiana; *Klebsiella Pneumoniae*

1. INTRODUÇÃO

Bactérias multirresistentes representam um perigo iminente para a saúde pública, uma vez que a resistência a múltiplos antibióticos torna o tratamento dessas infecções cada vez mais difícil e, em alguns casos, impossível. A crescente prevalência dessas bactérias é um desafio para a medicina moderna e exige a busca de novas soluções para combater essas infecções.¹

Bacteriófagos, vírus que infectam e se reproduzem dentro de bactérias, têm sido explorados como uma alternativa potencialmente promissora para o tratamento de infecções bacterianas. O uso de bacteriófagos para o controle de infecções é uma prática antiga, que tem sido bem sucedida em muitas partes do mundo. Com o avanço da tecnologia, os bacteriófagos podem ser isolados, modificados e ampliados em grande escala para uso clínico.²

A possibilidade de usar bacteriófagos como uma arma eficaz contra bactérias multirresistentes é uma área de pesquisa em expansão. As propriedades exclusivas dos bacteriófagos, como sua especificidade para hospedeiros bacterianos, baixa toxicidade e capacidade de replicação rápida, os tornam uma alternativa atraente frente aos antibióticos. No entanto, são necessárias mais pesquisas para entender completamente o potencial dos bacteriófagos para combater as infecções bacterianas.^{1,2,3}

Neste estudo, foram coletadas amostras residuais de água de diversas localidades da cidade de Salvador, na Bahia, a fim de encontrar fagos capazes de combater a cepa laboratorial de *Klebsiella Pneumoniae*, uma bactéria gram- negativa responsável por muitas infecções hospitalares. As amostras foram processadas para isolar e concentrar os fagos ativos contra esta cepa de *K. Pneumoniae*. Dessa forma, contribuir para a identificação de potenciais novas soluções para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

1. METODOLOGIA

1.1 Preparação das amostras

As amostras de água foram coletadas de 3 locais diferentes da cidade de Salvador, sendo elas: Boca do Rio, Dique do Tororó e Canal da Praia. Dessa forma, sendo abreviado como: BR, DT1A e CP, respectivamente. Após isso, elas foram centrifugadas a 4000 RPM por 10 minutos, e em seguida foram filtradas utilizando de filtros 0,22µm e guardadas a 4°C em um refrigerador.

1.2 Ativação e repique das cepas

A cepa foi retirada da criogenia e com auxílio de uma alça, coletou-se 10 µL e incubado em 5 mL de LB 1%, a 37°C por 24 horas. Após esse período, com outra alça de 10 µL estriou-se a cultura incubada em uma placa de ágar LB, sendo essa a placa mãe a ser utilizada nos futuros repiques.

Foi utilizada nas demais etapas do projeto o inóculo da cepa bacteriana laboratorial *K. Pneumoniae* em 10 mL de LB em tubos de cultura estéreis. Foi coletada uma colônia de um estoque congelado de placas estriadas com uma alça estéril e cultivada durante a noite por 37 °C. Sendo necessário realizar esse repique previamente para as etapas 2.4 até a etapa 2.7.

1.1 Cálculo e preparo da OD.02

Separou-se duas cubetas, uma contendo 3 mL de LB 1% (para calibração do equipamento) e outra com 3 mL do repique. Após aferir a OD do repique, calcula-se a quantidade de meio necessária para diluir a cultura para OD 0,2 da forma abaixo:

$$M1 \times V1 = 0,2 \times V2$$

Dessa forma, M1 representa a OD aferida pelo espectrofotômetro, V1 é o volume necessário do repique para preparar a diluição desejada e V2 representa o volume desejado da diluição. Essa deve ser realizada nas etapas 2.4 até a 2.6.

1.2 Enriquecimento

Essa etapa é realizada em dias consecutivos, sendo realizado o enriquecimento em duas formas diferentes. Para o dia 1 de enriquecimento utilizou-se de LB 10X (dez vezes a concentração padrão para preparo). Dessa forma, em um tubo, foram adicionados 100µL diluição OD preparado no dia, 100 mL de LB 10X e 8,9 mL da amostra ambiental de água, sendo incubados a 37°C por 24 horas. Esse processo é repetido para cada amostra.

Para o dia 2 de enriquecimento, iniciou-se centrifugando os tubos de enriquecimento a 4000 RPM por 10 minutos, para separar as bactérias dos fagos. Nessa parte também foi utilizado o LB em sua concentração padrão. Assim, em um tubo, foram adicionados 1mL da diluição da OD preparado no dia, 8 mL de LB e 1 mL do sobrenadante centrifugado do enriquecimento do dia 1. Os tubos do dia 2 de enriquecimento foram incubados a 37°C por 24 horas. Esse processo é repetido para cada amostra.

1.3 Ensaio Spot

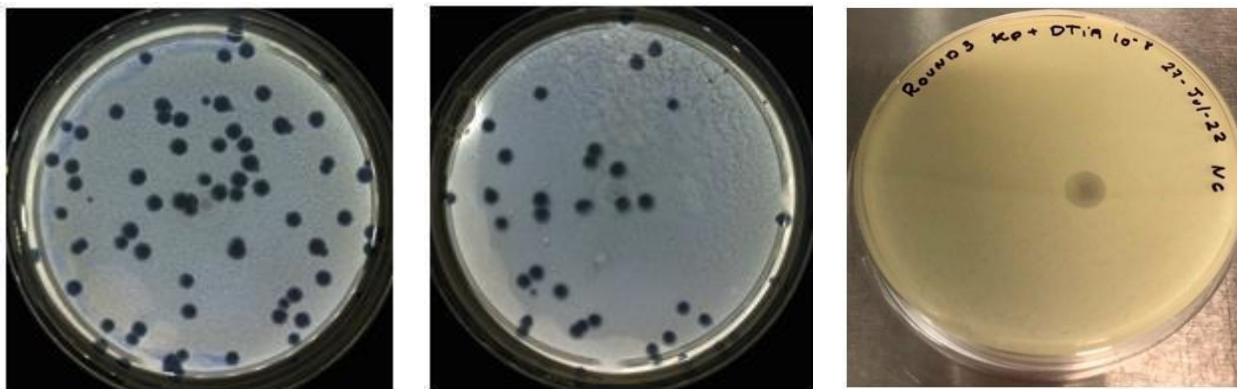
No terceiro dia é realizado o ensaio *spot*, onde é utilizado 3 mL de LB com 0,3% de ágar que é aquecido e mistura-se com 100µL da OD preparada no dia, sendo despejado em uma placa de petri com ágar LB até aguardar solidificar. Após isso, será adicionado 4µL do sobrenadante na placa e levada para a incubação a 37°C por 24 horas.

1.4 Purificação

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão representados na Figura 1, onde é possível observar a inibição do crescimento bacteriano após a inoculação dos bacteriófagos.

Figura 1. Purificação das amostras BR, CP e DT1A na concentração de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-8}



Fonte: elaborado pelo autor

Durante o estudo, foi possível encontrar fagos capazes de lisar as bactérias *Klebsiella*, sendo esse resultado extremamente positivo, pois esta cepa bacteriana está presente em recorrentes infecções hospitalares multirresistentes. Assim, obter-se fagos capazes de combater o crescimento dessas bactérias pode ser um instrumento muito importante no combate a resistência aos medicamentos utilizados no mercado. O resultado também se torna interessante pois a ação do bacteriófago é voltada para o seu hospedeiro específico, devido aos receptores serem compatíveis com as proteínas virais fágicas, dessa forma, permitindo a identificação de um fago específico para cada cepa bacteriana e neste trabalho foi possível identificar um fago específico para a cepa laboratorial de *K. Pneumoniae*. Além disso, estes resultados corroboram com dados encontrados na literatura, sendo possível encontrar os bacteriófagos em efluentes na natureza.^{2,4,5}

Com isso, os fagos já isolados foram separados para futuramente serem submetidos ao sequenciamento de DNA, fazendo com que seja possível identificar se foram encontrados fagos já catalogados ou uma nova variedade.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, os resultados dos testes demonstraram a presença de fagos capazes de lisar a cepa bacteriana da *Klebsiella pneumoniae*, o que é extremamente relevante para o avanço nas pesquisas com bacteriófagos e para a identificação de potenciais novas terapias para o combate a infecções hospitalares multirresistentes. A especificidade do fago para hospedeiros compatíveis com as proteínas virais fágicas é um fator que pode tornar a terapia fágica mais eficaz do que os antibióticos convencionais. Além disso, a presença dos bacteriófagos em efluentes na natureza torna o procedimento de identificação e isolamento mais fácil e escalonável, a próxima etapa deste trabalho é a realização do sequenciamento genético dos fagos isolados para determinar se eles são uma nova variedade ou fagos já catalogados. Assim, ainda não necessários novas pesquisas afim de melhor compreender a ação destes fagos e como eles podem ser utilizados em ambiente clínico para o

tratamento de infecções multiresistentes sendo ainda um longo caminho a ser percorrido mas que mostra um grande potencial para a saúde.

4. REFERÊNCIAS

¹CARVALHO, J. J. V. DE et al. **Bactérias multiresistentes e seus impactos na saúde pública: Uma responsabilidade social.** Research, Society and Development, v. 10, n. 6, p. e58810616303, 10 jun. 2021.

²ROHNELT, N. M. S. **ISOLAMENTO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS AMBIENTAIS E SUA ATIVIDADE CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA.** p. 72–72, 2020.

³SILVA, L. O. P. DA; NOGUEIRA, J. M. DA R. **Uso de bacteriófagos como alternativa no controle de infecções bacterianas.** Research, Society and Development, v. 11, n. 11, p. e200111133619, 20 ago. 2022

⁴PERNA, T. D. G. DA S. et al. **Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero klebsiella em uma Unidade de Terapia Intensiva** | Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica. Disponível em: <<http://www.sbcm.org.br/ojs3/index.php/rsbcm/article/view/141>>. Acesso em: 12 abr. 2023.

⁵ROSSI, L. P. R.; ALMEIDA, R. C. DE C. **Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 69, n. 2, p. 151–156, 1 fev. 2010.