

IDENTIFICAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS EM AMOSTRAS DE ESGOTO NA CIDADE DE SALVADOR

Nathália Alcoforado Pereira¹; Danielle Devequi Gomes Nunes²; Roberto José da Silva Badaró²

¹Bolsista; Iniciação Científica – Voluntária; med.nathaliapereira@gmail.com

²Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador - BA; badaro@fieb.org.br

RESUMO

Os bacteriófagos são vírus estudados como agentes terapêuticos para controlar infecções bacterianas. Este projeto visa identificar fagos em amostras de esgoto de Salvador. As amostras foram tratadas e os fagos identificados através de enriquecimento em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* para avaliar a atividade lítica. Os resultados revelam a identificação e isolamento de fagos em esgoto tratado, com potencial terapêutico para tratar infecções causadas por bactérias do grupo ESKAPE. Este estudo destaca a promissora aplicação dos bacteriófagos no combate à resistência antimicrobiana, um problema mundial. Nessa perspectiva, o projeto visa analisar a presença de bacteriófagos em amostras ambientais para posterior atuação contra organismos multirresistentes. Os resultados podem viabilizar a construção de uma alternativa rentável e efetiva contra o problema global de resistência antimicrobiana.

PALAVRAS-CHAVE: Bacteriófagos; Bactérias Multirresistentes; Terapia Fágica.

1. INTRODUÇÃO

Os bacteriófagos – também conhecidos como fagos - são vírus que infectam bactérias, mas não tem a capacidade de atingir células eucarióticas, como as células humanas, por exemplo.¹ Esses organismos foram utilizados inicialmente pelo estudioso franco-canadense Félix d'Herelle para tratar pacientes com desintéria, ainda no século XX.² A ideia de usar fagos como opção de tratamento foi esquecida pelo ocidente, mas volta a chamar atenção da comunidade científica na década de 1980. Com o fim da Guerra Fria, os Estados Unidos continuam a ideia da terapia fágica abandonada pelos soviéticos e iniciam em 2000 os testes clínicos com fagos.³

Na contemporaneidade, a busca por alternativas de tratamento se tornou algo urgente. A resistência bacteriana a antibióticos é um problema socioeconômico e de saúde pública em todas as nações do globo.⁴ Nessa perspectiva, o projeto apresenta como objetivo identificar potenciais bacteriófagos em amostras de esgoto da cidade de Salvador, realizar o isolamento desses organismos, avaliar a lise celular em cepas bacterianas ATCC e efetuar a caracterização dos bacteriófagos isolados. O processo de *hunting* foi feito em busca de fagos específicos para a bactéria do grupo ESKAPE - *Pseudomonas aeruginosa*. Dessa maneira, os fagos encontrados poderão ser futuramente testados contra bactérias clínicas, possibilitando analisar a viabilidade destes para tratamento de infecções multirresistentes.

2. METODOLOGIA

Preparação das amostras: As amostras de esgoto coletadas foram recebidas, identificadas e datadas de acordo com informações da coleta. Após o recebimento, houve filtração e centrifugação das amostras ambientais até a remoção de qualquer partícula orgânica.

Enriquecimento da amostra: Nessa etapa, o objetivo foi aumentar a concentração de fagos no meio avaliado. Para isso, adicionou-se meio LB (Luria Bertani) e a bactéria diluídas em densidade óptica (OD) de 0,2 à amostra ambiental. O processo de enriquecimento pode ser repetido várias vezes, porém é crucial realizar centrifugação e filtração das amostras entre as etapas de enriquecimento.

Spot Assay: Para realizar uma triagem inicial da atividade lítica dos fagos na amostra enriquecida foram preparadas placas de petri utilizando a técnica de sobreposição de ágar duplo (*Double Agar Overlay*), sendo a camada inferior composta por meio LB 1% ágar e a camada superior composta pela bactéria diluída em OD 0,2 e meio LB-ágar 0,5%. O enriquecimento é então adicionado a placa, inoculado com a bactéria alvo, e

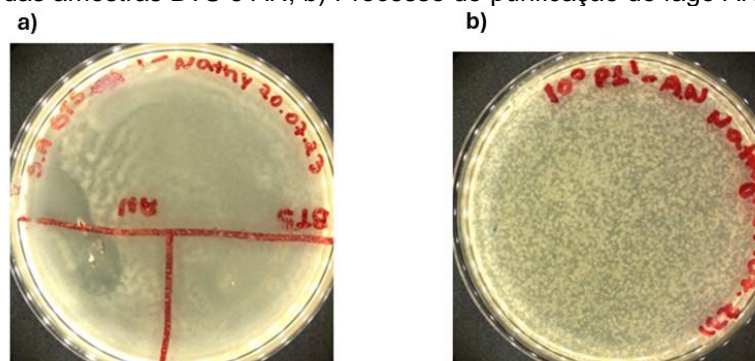
levada a incubação. Quando há presença de fagos para a bactéria testada, forma-se um halo no local o que indica que houve lise bacteriana.

Purificação: Essa etapa é feita após a confirmação da presença de fagos. O halo formado deve ser coletado utilizando uma ponteira e armazenados em solução tampão de SM Buffer. Esse hiperconcentrado de fagos sofre diluições seriadas. Após isso, placas de sobreposição dupla de LB-ágar são feitas com a bactéria e o seu fago em diferentes diluições. O fago é então testado em concentrações distintas a fim de encontrarmos a concentração ideal dos fagos isolados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

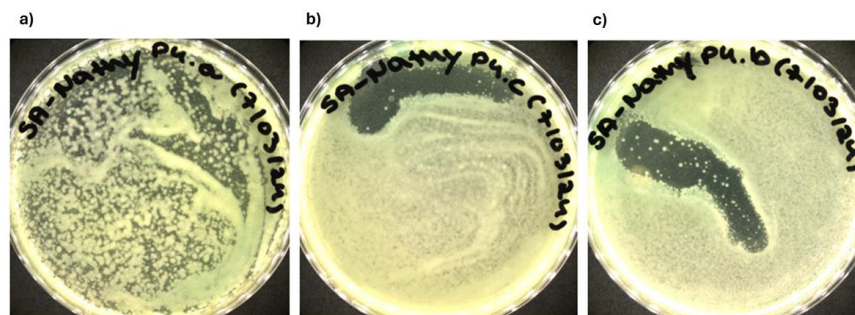
Inicialmente foram testadas cinco amostras ambientais oriundas de pontos estratégicos da cidade de Salvador. As amostras foram identificadas como AN (Acesso Norte), BTS (Baia de Todos os Santos), P4 (amostra fornecida pela Fiocruz). É importante ressaltar que foi feita uma amostragem para a amostras P4, e a esta foi dividida em A, B e C. Foi detectada a presença de bacteriófagos contra a cepa bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras AN e P4 (A, B e C). Apesar da presença de fagos nas amostras utilizadas, notou-se uma perda progressiva da capacidade lítica desses microrganismos possivelmente relacionado à resistência induzida pela exposição prologada ao seu hospedeiro. Além disso, para algumas amostras a realização de várias rodadas de enriquecimento (média de 4) foram necessárias até uma atividade visivelmente expressiva dos fagos, prologando o tempo de execução do protocolo. Na figura 1a é possível observar que a amostra BTS não apresentou halo de lise, indicando que não possui bacteriófagos para *Pseudomonas aeruginosa*, diferente do observado para amostra AN. No entanto, como observado na figura 1b, durante o processo de purificação do potencial fago presente na amostra AN, não foi possível observar atividade lítica satisfatória da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Sendo assim, não foi possível prosseguir com o isolamento e armazenamento desses fagos.

Figura 1. Ensaios de Placas realizados com as amostras identificadas como AN e BTS; a) Triagem inicial das amostras BTS e AN; b) Processo de purificação do fago AN.



Na figura 2, é possível observar os ensaios de placa (*spot assay*) das amostras identificadas como P4. Nessas amostras foram identificadas atividade lítica de potenciais bacteriófagos. Para isso, foram realizados os processos iniciais de enriquecimento e ainda é necessário seguir com o protocolo de purificação para de fato atestar a capacidade lítica destes potenciais fagos frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 2. Ensaios de Placas realizados com as amostras P4. A) Amostra P4.a; b) Amostra P4.c; c) Amostra P4.b.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os bacteriófagos são considerados organismos onipresentes, encontrados especialmente em locais onde a vida bacteriana é abundante. Assim, fagos encontrados em águas residuais têm demonstrado grande potencial para o tratamento de bactérias do grupo ESKAPE. O uso de fagos pode ser uma alternativa eficaz aos antibióticos tradicionais, uma vez que os bacteriófagos podem infectar e destruir bactérias específicas sem prejudicar outras espécies benéficas ao organismo. Os resultados demonstram a existência de fagos para *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras estudadas, no entanto, ainda se mostra como um desafio aumentar a viabilidade da capacidade lítica desses microrganismos.

Apesar disso, bacteriófagos seguem como um potencial e promissora aposta para a crise de Resistência Antimicrobiana no planeta. É fundamental continuar investindo em pesquisas para aprimorar a seleção e aplicação de fagos na terapia bacteriana, bem como para entender melhor a interação entre fagos e bactérias multirresistentes.

Agradecimentos

Agradeço ao SENAI-CIMATEC pela oportunidade de vivenciar minha iniciação científica na instituição. Agradeço também a minha orientadora que foi fundamental durante todo o processo e aos meus colegas sempre companheiros e cordiais.

5. REFERÊNCIAS

¹HITCHCOCK, Nicole Marie e colab. **Current Clinical Landscape and Global Potential of Bacteriophage Therapy**. *Viruses*, v. 15, n. 4, 1 Abr 2023. Disponível em: </pmc/articles/PMC10146840/>. Acesso em: 2 jan 2024.

²SUMMERS, William C. **The strange history of phage therapy**. *Bacteriophage*, v. 2, n. 2, p. 130–133, Abr 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kbac20>. Acesso em: 2 jan 2024.

³WITTEBOLE, Xavier e DE ROOCK, Sophie e 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, 1 Jan 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC3916379/>. Acesso em: 2 jan 2024.

⁴WHO. **Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022**. World Health Organization News. Geneva, Switzerland: [s.n.], 2022.