

**Desenvolvimento de formulações para estabilização de bacteriófagos visando aplicação em fagoterapia.**

**Lisa Miyuki Onuki**

**Colaboradora:** Dr. Layla Farage Martins

**Orientador(a):** Prof. Dr. Ronaldo Bento Quaggio

**Instituto de Química da Universidade de São Paulo**

lisamiyuki@usp.br

A resistência bacteriana a antibióticos representa uma ameaça grave à saúde global, conforme declarado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os bacteriófagos líticos surgiram como uma terapia alternativa potencial contra infecções causadas por bactérias resistentes, pois infectam e lisam especificamente as células bacterianas sem prejudicar o organismo hospedeiro humano (1). Infecções bacterianas geralmente envolvem múltiplas cepas e a combinação de diferentes fagos em um único coquetel é uma estratégia promissora para ampliar o alcance e a eficácia terapêutica (2).

**Objetivos**

Investigar a estabilidade de bacteriófagos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, avaliando a sua viabilidade em duas temperaturas e dois veículos distintos para determinar a melhor forma de armazenamento. Avaliar um coquetel formado com os fagos mais estáveis utilizando ambos veículos, com relação à estabilidade, interação dos fagos e efeito no crescimento bacteriano *in vitro*. O desenvolvimento deste coquetel visa potencializar a eficácia da fagoterapia contra infecções causadas por múltiplas cepas bacterianas.

**Métodos e Procedimentos**

Sete bacteriófagos, isolados e estudados por nosso grupo, foram testados, sendo um para *S. aureus* e seis para *P. aeruginosa*. Cada um foi suspenso em uma formulação de base spray ou em solução tampão de fosfato (PBS). Todas as suspensões foram ajustadas para o mesmo título inicial,  $\sim 10^8$  PFU/mL, e armazenadas a 4°C ou 25°C. A viabilidade dos fagos foi monitorada por quatro meses. Para isso, foram feitas diluições seriadas de cada amostra em tampão SM. Aliquotas de 5 µL de cada diluição foram gotejadas em placas de TSB previamente cobertas com uma camada de top-ágar contendo as bactérias hospedeiras. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C e as placas de lise foram contadas. Os fagos mais estáveis foram combinados em um coquetel na formulação de base spray ou em PBS, armazenado a 4°C e 25°C. A estabilidade foi avaliada mensalmente por *drop test*. O efeito do coquetel formulado em base spray ou PBS e armazenado a 4°C por 4 meses contendo os fagos ZC01, ZC03, MARIX, LAFX, MENDESX e GLTX foi avaliado pela curva de crescimento bacteriano realizada em placa de 96 poços na presença das bactérias hospedeiras de *P. aeruginosa* PA14 e FC79 e diferentes MOIs (proporção fago:bactéria, multiplicidade de infecção). As medidas de

turbidez do meio foram aferidas a 600nm ao longo do tempo por 16h no LogPhase (Agilent).

## Resultados

A maioria dos fagos individuais e o coquetel perdem estabilidade ao decorrer do tempo em ambas as temperaturas, mas principalmente a 25°C na base spray. O decaimento da atividade do coquetel com PA14 nos dois veículos a 25°C é coerente com o decaimento da atividade dos fagos individuais.

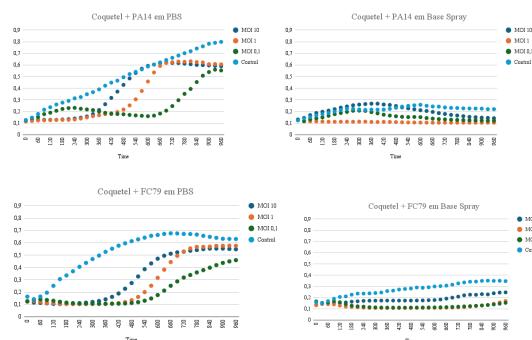
**Tabela 1: Estabilidade dos fagos em base spray ou PBS.** Os números se referem a contagem de fagos no *drop test*. A coloração da tabela está em escala de *heat map* que varia do vermelho/alaranjado, para valores menores a verde, para valores mais altos, sendo o valor máximo representado pela sigla “mpc” (muitos para contar) em verde escuro.

Fagos	Título de fagos em base spray a 10 <sup>7</sup> (PFU/ml.)							
	4°C				25°C			
	tempo 0	2° mês	3° mês	4° mês	tempo 0	2° mês	3° mês	4° mês
ZC01	7	15	0,05	0,58	6	0,88	0	0
ZC03	4,8	0,46	0	0,001	0,22	0,0082	0	0
Sa121X	0	2	0,63	0,51	0	0,49	0,013	0,0045
MARIX	1,2	0	2,4	0,7	1,2	0	0,75	0,7
LAFX	x	68	40	67	x	0,34	0,15	0,015
MENDESX	100	0,059	0,0017	120	100	0,0002	0	60
GLTX	16	24	1,7	15,6	2	29	39	20,6
COQ+PA14	160	4600	640	104	120	420	4,7	32
COQ+FC79	x	82	134	96	x	78	74	146
COQ+BC1680	30	0	mpc	43	4	0	11,5	4,8

Fagos	Título de fagos em PBS a 10 <sup>7</sup> (PFU/ml.)							
	4°C				25°C			
	tempo 0	2° mês	3° mês	4° mês	tempo 0	2° mês	3° mês	4° mês
ZC01	5,7	50	1,6	74	12	17,5	0,014	0,05
ZC03	0,38	28	12	0,62	3,6	1,1	0,15	0,02
Sa121X	0	2,55	2,2	22	0	mpc	3	1,9
MARIX	7,4	0	1,35	0,94	0,8	0	1,5	1
LAFX	x	196	129	430	x	103	168	68
MENDESX	60	0,006	0,007	0	112	0,000	0,008	0
GLTX	24	149	116	135	14	83	43	270
COQ+PA14	120	4600	386	17,5	8600	34000	30	7,7
COQ+FC79	x	260	121	180	x	174	131	210
COQ+BC1680	14	0	mpc	4,8	2,6	0	21,3	9

Quanto à inibição do crescimento das bactérias, o coquetel em base spray obteve melhores resultados comparado ao controle com P. aeruginosa, inibindo completamente o crescimento das culturas em valores de MOI 1 (figura 1). Surpreendentemente, o efeito de inibição das amostras em PBS foi maior nas MOIs menores.



**Figura 1. Inibição de crescimento das bactérias pelas diferentes preparações.** O coquetel foi adicionado às culturas bacterianas com  $D0600nm=0,1$  e o crescimento foi avaliado temporalmente pela medida da turbidez do meio a 600nm.

## Conclusões

A estabilidade dos fagos individuais e do coquetel de fagos, em geral, diminui em função do tempo e da maior temperatura testada (25°C). O coquetel formado por uma combinação de fagos contra *P. aeruginosa* em veículo de base spray e armazenado a 4°C tem um efeito inibitório do crescimento bacteriano e do surgimento de bactérias resistentes.

## Agradecimentos

Minha sincera gratidão à Profª. Aline Maria da Silva, pela confiança depositada, orientação e inspiração para a pesquisa. Estendo meus agradecimentos a todos os co-orientadores e colaboradores pelo auxílio técnico e contribuições essenciais.

## Referências

1. Murray CJ et al. *The Lancet*. 2022 Feb 12;399(10325):629–55.
2. Venturini C et al.. *EMBO Mol Med*. 2022 Jul 7;14(7).