

Caracterização de bacteriófagos contra *Klebsiella pneumoniae* e investigação dos mecanismos envolvidos na exposição da bactéria aos fagos em associação com N-acetilcisteína.

Felipe Del Bianco Soares, Dra. Layla Farage Martins, Prof Dr Ronaldo Quaggio

Instituto de Química, Universidade de São Paulo

fdelbiancosoares@usp.br

A disseminação de bactérias e outros microrganismos resistentes a quase todos os antimicrobianos disponíveis é uma ameaça mundial. Entre esses patógenos está a *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). Com isso, surge a necessidade de desenvolvimento de novas opções terapêuticas, como a fagoterapia e possível sinergismo com outros compostos antimicrobianos, como a N-acetilcisteína (NAC), no combate ao crescimento bacteriano e formação de biofilme.

Objetivos

Aprofundar os estudos com o NAC como adjuvante na fagoterapia através de análises *in vitro* e *in vivo* conforme estudo já iniciado. Reavaliar as curvas de crescimento da *K. pneumoniae* K81 na presença de NAC preparado fresco e dos fagos MJ e FDB; avaliar a abrangência de hospedeiros destes fagos em outras cepas clínicas de *K. pneumoniae*, testar *in vivo* o efeito de NAC com os fagos no modelo animal de *Galleria mellonella* infectada com K81. Estes objetivos visam explorar o potencial e sinergia dos fagos e de NAC como candidatos a fagoterapia.

Métodos e Procedimentos

A curva de crescimento bacteriano foi feita em meio líquido em placa de 96 poços com adição da K81 (DO_{600nm}=0,1) e adição de fagos e/ou NAC. As medidas de turbidez do meio foram

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

A avaliação da infecção causada por K81 em modelo animal de larvas de *G. mellonella*, e o efeito de NAC e os fagos para o tratamento, foi feita injetando 10ul de K81 e os fagos/NAC 1h após a infecção. As larvas foram acompanhadas por até 5 dias.

O teste de sensibilidade de diferentes isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes da Inglaterra aos fagos FDB e MJ foi feito por *drop test*, em que diferentes concentrações de cada fago são gotejadas sob o tapete bacteriano em meio top ágar TSB 0,7%. As placas são incubadas a 37°C por uma noite e fotografadas.

Resultados

Com relação ao efeito de NAC e dos fagos no crescimento de *K. pneumoniae* K81, notamos um efeito sinérgico ao combinar diferentes concentrações do NAC com os fagos testados em uma única concentração, relativa à MOI de 1 (*Multiplicity Of Infection* com a proporção de fago:bactéria=1) (Figura 1a e 1b).

No teste *in vivo* observamos que o tratamento com o fago foi mais eficaz no grupo com a menor concentração de bactéria (10⁶ CFU/ml) do que com a maior concentração de bactéria (10⁷ CFU/ml), apresentando uma porcentagem de sobrevivência de 90% (Figura 2b) e 30% (Figura 2a), respectivamente. O tratamento com o fago manteve 70% das larvas vivas com ou sem NAC (Figura 3).

Os fagos FDB ou MJ são capazes de infectar as bactérias isoladas de um hospital da Inglaterra (Figura 4). Além disso, é interessante notar que apesar destes fagos terem uma identidade de sequência genômica de 99%, eles diferem com relação à eficiência de infecção nestes 3 isolados.

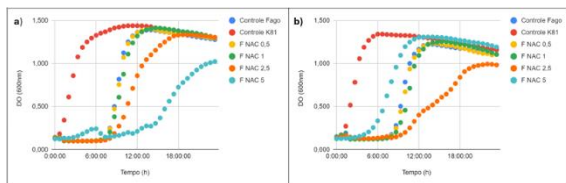


Figura 1: Curva de crescimento da bactéria de isolamento K81 com NAC, MJ (a) e FDB (b).

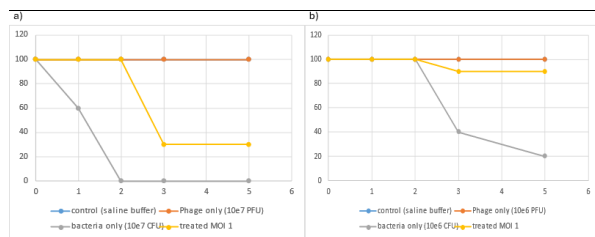


Figura 2: Sobrevivência das larvas *Galleria mellonella* infectadas com K81 e tratadas com o fago FDB. a) Bactéria 10e7 CFU/ml e FDB 10e7 PFU/ml. b) Bactéria 10e6 CFU/ml e FDB 10e6 PFU/ml. Eixo y: Sobrevivência; Eixo x: tempo.

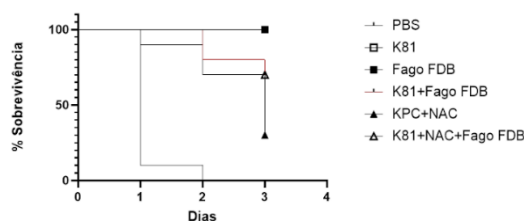


Figura 3: Sobrevivência das larvas *Galleria mellonella* infectadas com K81 e tratadas com o fago FDB e NAC.

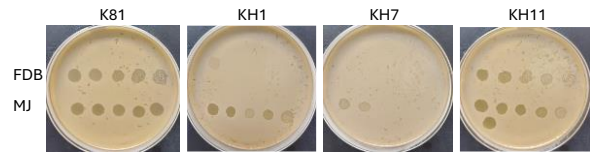


Figura 4: Placas de lise do fago FDB e MJ em diferentes cepas de *K. pneumoniae*.

Conclusões

O NAC a 2,5 mg/ml apresenta um efeito sinérgico na presença dos fagos. Em relação aos testes *in vivo*, NAC não apresentou um efeito sinérgico com o fago em salvar as larvas comparado ao efeito apenas do fago. Interessantemente, os fagos foram capazes de infectar isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de outro país, com diferentes eficiências de infecção apesar da alta identidade genética entre eles.

Agradecimentos

Em memória à Prof^a. Aline Maria da Silva, pela orientação e inspiração para a pesquisa. A todos os co-orientadores e colaboradores pelo auxílio técnico e contribuições essenciais. Ao IQUSP, CNPq e FAPESP.

Referências

Murray, C. J. et al. 2022. Lancet 399:629-655.

Valzano, F. et al. 2022. Spectrum Microbiology.

Azeredo, J. & Sillankorva, S. 2018. Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice. Humana Press, New York, NY.