

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS CONTRA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E ASSOCIAÇÃO DE N-ACETILCISTEÍNA NO POTENCIAL TERAPÊUTICO

Felipe Del Bianco Soares, Dra. Layla Farage Martins, Profa. Dra. Aline Maria da Silva

Instituto de Química, Universidade de São Paulo; CEPID B3 – Centro de Pesquisa em Biologia de Bactérias e Bacteriófagos
fdelbiancosoares@usp.br ✉

Objetivos

O objetivo deste projeto de Iniciação Científica é isolar fagos contra *Klebsiella pneumoniae* cepa K81 como hospedeira, realizar a caracterização microbiológica inicial de ao menos um fago lítico e realizar ensaios *in vitro* do fago isolado em associação com N-acetilcisteína (NAC) em culturas planctônicas (em suspensão) e no biofilme da bactéria. Este objetivo visa explorar o potencial dos fagos e de NAC como candidatos a fagoterapia.

Métodos e Procedimentos

1. Isolamento de fago(s) em meio sólido a partir de amostra líquida ambiental coletada nas imediações da USP, após filtragem da amostra com filtro 0,22 μ m. A bactéria hospedeira utilizada é a *K. pneumoniae* K81, um isolado clínico MDR (multidroga resistente) resistente a carbapenêmicos (KPC), isolada de paciente do Hospital das Clínicas de São Paulo e gentilmente cedida pelo grupo do Prof. Dr Edson Abdala (Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias Faculdade de Medicina da USP). Para cada fago, uma única placa de lise foi selecionada e passada por 3 rodadas de seleção em crescimento com a K81.

2. Dois fagos foram selecionados para caracterização de aspectos biológicos, o que inclui, estudo da morfologia através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e sequenciamento do genoma total utilizando a plataforma Illumina.

3. Análise da interação de NAC com o fago isolado e com a bactéria hospedeira em meio líquido utilizando uma concentração do fago e diferentes concentrações da NAC, que variam de 1 a 20 mg/mL. A curva de morte da bactéria foi aferida por medição da turbidez do meio por 16 h.

4. Avaliação do efeito da suspensão de fagos em associação com NAC em degradar biofilme, utilizando diferentes concentrações de NAC e incubando por 24h o biofilme de K81 pré-formado em placa de 96 poços por 24 h. Após tratamento, o biofilme remanescente foi corado com cristal violeta, solubilizado e medido a 595 nm.

Resultados

Os fagos correspondentes a duas placas de lise foram nomeados como vB_KPC_MJ e vB_KPC_FDB. A morfologia dos fagos foi verificada por MET, apresentando uma morfologia compatível com um Miovírus, de cápsula alongada e cauda longa contrátil (Figura 1), confirmada pelo sequenciamento dos genomas. A atividade de NAC foi verificada no crescimento da cepa K81 e em combinação com cada fago. O teste apenas com o NAC serviu para verificar a sensibilidade da bactéria ao composto. Em todas as concentrações de NAC utilizadas não foi verificado comprometimento significativo no crescimento de K81 (Figura 2). Não observamos efeito sinérgico ao combinar 5 mg/mL NAC com nenhum dos fagos em uma única concentração (Figura 3). No biofilme pré-

formado por 24h, NAC não degrada significativamente o biofilme nas duas concentrações usadas (5 e 10 mg/ml), comparado ao controle. Há diminuição do biofilme entre 20-40% na presença de fagos a 10^7 PFU/ml (Figura 4). Na presença de NAC a 5 mg/mL com fago a 10^6 PFU/mL se observa uma redução de ~40% do biofilme comparado ao controle. Nas outras combinações, esse padrão se mantém.

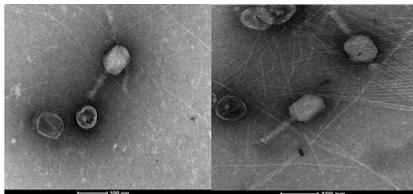


Figura 1: Morfologia de Miovírus obtida por MET.

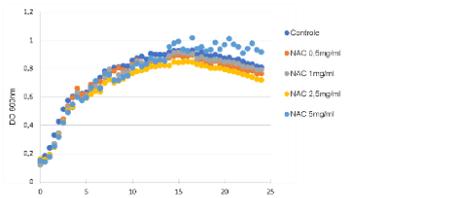


Figura 2: Curva de crescimento de K81 com NAC em diferentes concentrações.

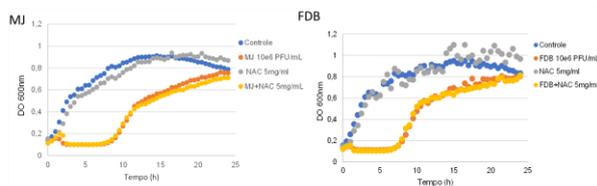


Figura 3: Curva de morte de K81 com os fagos MJ e FDB em associação com NAC, 5 mg/ml.

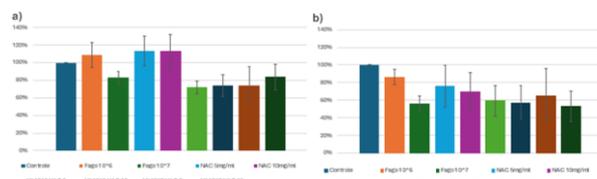


Figura 4: Efeito do fago MJ (a) e FDB (b) e de NAC no biofilme.

Conclusões

Os fagos líticos, MJ e FDB, isolados contra *K. pneumoniae* (KPC) apresentam morfologia e genoma de Miovírus. A adição de NAC não incrementa o efeito já observado pelo fago no crescimento da bactéria. No biofilme pré-formado por 24h há um sinergismo entre NAC e os fagos nas menores concentrações testadas. O sinergismo pelo aumento de NAC e/ou fagos não significou aumento proporcional (dose dependente) da destruição do biofilme. Os dados sugerem que NAC e fagos podem ser usados em baixa concentração com eficiência.

Agradecimentos

IQUSP, CNPq e FAPESP.

Referências

Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F. S., L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G. *et al.* 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399:629-655.

Valzano, F., Boncompagni, S. R., Micieli, M., Di Maggio, T., Di Pilato, V., Colombini, L., Santoro, F., Pozzi, G., Rossolini, G. M., Pallechi, L. 2022. Activity of N-Acetylcysteine Alone and in Combination with Colistin against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Transcriptomic Response to N-Acetylcysteine Exposure. *Spectrum Microbiology*.

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