



TREINAMENTO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PARA SUPERAR A RESISTÊNCIA BACTERIANA

Ana Beatriz Mendes de Oliveira

Colaboradores Layla Farage Martins; Guillermo Uceda;

Orientador(a) Regina Lúcia Baldini

Universidade de São Paulo

mendesscience@gmail.com

Objetivos

Expandir a abrangência de hospedeiros de bacteriófagos que infectam *P. aeruginosa*, através de um protocolo de evolução *in vitro*, analisar os genomas dos fagos evoluídos, seus fenótipos e avaliar a abrangência de hospedeiros.

Métodos e Procedimentos

Utilizamos o protocolo de evolução de fagos *in vitro* mais conhecido, o Protocolo de Appelmans [1]. Para isso, formamos um coquetel de fagos composto pelo sifovírus ZC01, o podovírus ZC03 [2] e o miovírus LAFX, que têm genomas e morfologias diferentes. Esse coquetel foi incubado com dez cepas de *P. aeruginosa*, sendo a PA14 a cepa de isolamento dos fagos ZC01 e ZC03, PASM a cepa de isolamento do LAFX, e oito isolados clínicos resistentes a todos os fagos (BC1136, BC1303, BC1410, BC1680, GES-1, IMP-16, OXA-18 e PAO1). Diluições seriadas (até 10^{-9} PFU/mL) do coquetel de fagos foram incubadas com culturas de cada cepa do estudo *overnight* em placa de 96 poços, a 37°C, sob agitação.

Após a incubação, as amostras com diminuição da turbidez, indicando uma infecção bem sucedida, foram reunidas num *pool* ao qual foi adicionado 10% de clorofórmio para a lise total das células. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante utilizado como fonte de fagos para o reinício de um novo *round* de exposição, até completar 30 *rounds*.

A infectividade do coquetel de fagos inicial foi verificada antes de iniciar os *rounds* com relação, utilizando o teste da gota contra as cepas hospedeiras (PA14 e PASM) e uma cepa conhecidamente resistente (PAO1). Para isso, 120 µL de cultura em fase exponencial de cada cepa de *P. aeruginosa* foram misturados com 3–5 mL de top-ágar (TSB com 0,7% de ágar) derretido. Em seguida, a mistura foi depositada em uma placa de Petri contendo TSB-ágar (1,5%). Após a solidificação do top-ágar, 5 µL de diluições seriadas de cada *pool* de fagos (6 diluições 1:10) foram delicadamente depositados sobre o top-ágar. As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 16°C e fotografadas. Este mesmo ensaio foi realizado com os coquetéis obtidos nos *rounds* 10, 20 e 30.

Ao final dos 30 *rounds*, algumas placas de lise individuais, correspondentes aos supostos fagos evoluídos e capazes de infectar todas as cepas do teste, foram isoladas e purificadas. Os fagos obtidos dessas placas tiveram sua

morfologia avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). O DNA, tanto dos fagos isolados do round 30 quanto dos sobrenadantes dos rounds 1, 2, 5, 10, 20 e 30, foi extraído e sequenciado na plataforma Miseq (Illumina). A análise dos genomas foi feita com um *pipeline* desenvolvido pelo grupo.

Resultados

Observamos o aumento do número de cepas sensíveis aos fagos do coquetel ao longo dos rounds. No início, apenas duas cepas eram sensíveis ao coquetel inicial, passando para cinco no round 10, nove no round 20 e todo o conjunto de cepas no round 30, sugerindo uma evolução dos fagos do coquetel.

Foram isolados fagos a partir de 4 placas de lise das cepas BC1680, IMP/16, BC1136 e BC1303, nomeados com o nome das cepas e adição de “E” para designar “Evoluído”. A análise da morfologia dos fagos isolados mostrou que os fagos 1680E, 1303E e D1136E, apresentam cauda longa característica de miovírus, diferente do fago IMP/16 que aparenta ser um podovírus (Figura 1).

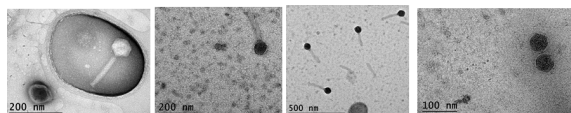


Figura 1: Os fagos 1680E, 1136E e 1303E e IMP/16, da esquerda para a direita, isolados a partir do round 30, visualizados por TEM.

As análises metagenômicas revelaram a diversidade e abundância viral. Dentre os fagos do coquetel inicial, apenas o ZC01 persistiu até o round 20, indicando estabilidade e possível infectividade prolongada. Já ZC03 e LAFX, foram detectados apenas nos dois primeiros rounds. Além disso, três sequências de fagos com tamanhos aproximados de 60.3, 35.5 e 66.3 kbp, nomeadas ph_1, ph_5 e IMP16E, foram detectadas ao longo de todos os rounds, conforme mostrado na Tabela 1. Entre os fagos selecionados ao término do experimento, IMP16e foi um dos recuperados, enquanto

1136e foi registrado apenas no round 30. A abundância e a persistência desses fagos, superiores às observadas nos fagos iniciais do coquetel, indicam um processo de seleção adaptativa durante as passagens, favorecendo variantes mais estáveis e potencialmente melhor adaptadas ao hospedeiro experimental.

Tabela 1: Abundância dos fagos representativos ao longo dos rounds, medida pela profundidade dos reads mapeados no sequenciamento.

	ROUND01	ROUND02	ROUND05	ROUND10	ROUND20	ROUND30
ph_1	1481,3	1397,7	415,1	208,5	4271,8	194,1
IMP16E	8,4	148,5	75,8	2,9	34,6	1,6
1136E						311,1
ZC01	49,4	35,2		3,1	13,694	
ph_5	430,3	129,7	8,9	90,8	54,4	43,4
LAFX	46,8	7,9				
ZC03	96,4	17,6				

Conclusões

A aplicação do protocolo de Appelmans foi bem-sucedida na evolução *in vitro* dos fagos. Observou-se um aumento na abrangência de hospedeiros do coquetel de fagos ZC01, ZC03 e LAFX, com cepas originalmente resistentes se tornando suscetíveis. O sequenciamento revelou a complexidade dos eventos biológicos, indicando não apenas a evolução dos fagos originais, mas também a excisão de profagos do genoma das hospedeiras, o que contribuiu para a diversidade da população. Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Em memória de Aline Maria da Silva, nosso profundo agradecimento.
Fomento FAPESP CEPID B3 projeto 2023/06729-4;

Referências

- [1] Burrowes BH, Molineux IJ, Fralick JA. Viruses. 2019;11(3)
- [2] Amgarten D, Martins LF, Lombardi KC, Antunes LP, de Souza APS, Nicastro GG, et al. BMC Genomics. 2017;18:ARTN 346.