

ISOLAMENTO DE BACTERIÓFAGOS LÍTICOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DE DIVERSOS AMBIENTES NATURAIS

Giullia Luiza Takahashi Rodrigues

Ariosvaldo Pereira dos Santos Junior, Layla Farage Martins, Fernando Pacheco Nobre Rossi

Regina Lúcia Baldini

Instituto de Química/Universidade de São Paulo

giu.takahashi@usp.br

Objetivos

O objetivo deste projeto é isolar e caracterizar dez bacteriófagos líticos contra isolados clínicos distintos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria que causa infecções oportunistas de difícil tratamento. A caracterização engloba aspectos da infecção, aspectos morfológicos e sequenciamento genômico.

Métodos e Procedimentos

Os protocolos de isolamento, propagação e purificação dos fagos foram baseados em metodologias descritas (AZEREDO, 2018). Amostras de córrego Pirajussara foram utilizadas para o isolamento dos fagos, por enriquecimento nas cepas PA14Δ*pil*, BC1136, BC1410, BC1680 e BC1303 de *P. aeruginosa*, sendo que a primeira já havia no laboratório e as demais foram fornecidas pela Dra. Silvia Costa, do Hospital das Clínicas.

Para o teste da gota e ensaio de abrangência de hospedeiro, 5 µL das diferentes diluições dos fagos purificados (10^{-1} a 10^{-10}) foram aplicados sobre um tapete bacteriano em top ágar, com a cultura da cepa de interesse e

foram observadas as placas de lise.

Para a curva de morte, foi utilizada uma cultura bacteriana em fase estacionária em $DO_{600\text{nm}} = 0,1$, em placas de 96 poços, nos quais foram adicionadas preparações do fago, em proporções fago:bactéria de 100 a 0,1. A placa foi incubada a 37°C e a turbidez das culturas foi medida, no Spectramax Paradigm. A morfologia foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão.

O DNA dos fagos foram extraídos com fenol:clorofórmio, sequenciados na plataforma Miseq (Illumina), montados e anotados com a ferramenta Pharokka.

Resultados

Foram isolados dez fagos, sendo um contra a cepa PA14Δ*pilA* e nove contra as cepas clínicas e todos eles apresentam morfotipo de Myovirus, com cauda longa e retrátil (Figura 1).

De acordo com o padrão geral obtido nas curvas de morte, é possível perceber que com a multiplicidade de infecção (MOI) de 100:1, há uma alta ação bactericida dos fagos desde o início do experimento. No caso de MOIs menores, o efeito lítico é mais demorado, em comparação com a MOI de 100, como

esperado.

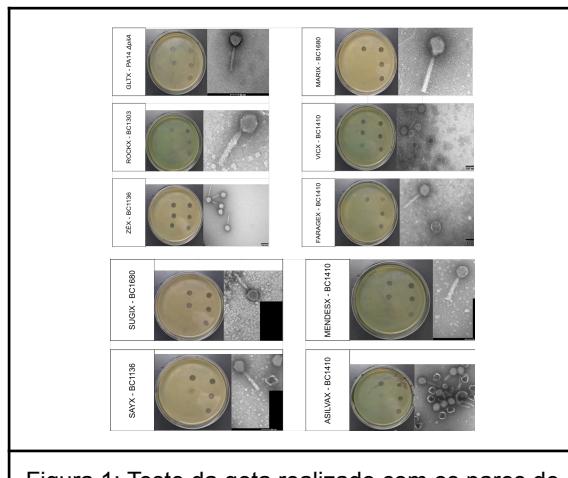


Figura 1: Teste da gota realizado com os pares de fagos e bactérias indicados. À esquerda, as placas de lise; à direita, imagens obtidas por microscopia.

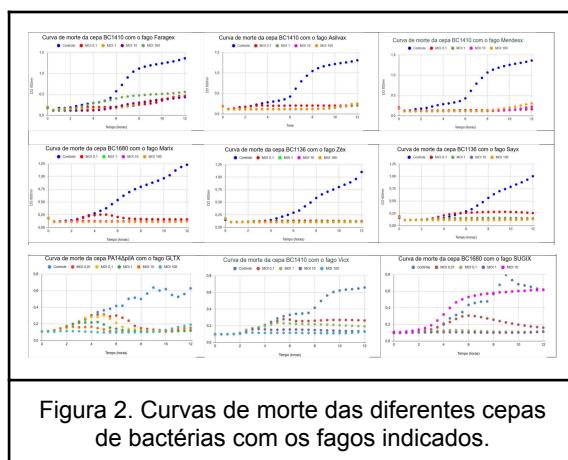


Figura 2. Curvas de morte das diferentes cepas de bactérias com os fagos indicados.

O cálculo da eficiência de plaqueamento (EOP) mostrou que nove deles têm alta abrangência de hospedeiro, infectando seis ou mais cepas (Tabela 1).

A análise dos genomas dos fagos indica que eles são estritamente líticos, ou seja, não apresentam genes relacionados com lisogenia. A análise comparativa com a base de dados

NCBI indica que todos os nove fagos pertencem ao gênero *Pbunavirus*, que inclui pelo menos outros 100 fagos contra *P. aeruginosa*, corroborando com os resultados relativos à morfologia.

Tabela 1. Eficiência de plaqueamento (EOP) para os fagos GLTX, SUGIX, ROCKX, MARIX, ZEX, SAYX, MENDESX, FARAGEX, ASILVAX e VICX nas doze cepas de *P. aeruginosa*.

Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Eficiência de plaqueamento (EOP) do fago (%)							
	GLTX	SUGIX	ROCKX	MARIX	ZEX	SAYX	MENDESX	ASILVAX
Legenda								
Cepa contra a qual o fago foi isolado								
Valor de EOP >100	60	130	120	110	100	100	100	110
Não houve infecção pelo fago	100	100	90	60	70	60	40	50
Valor de EOP >0 e <100	100	0	0	0	0	0	0	0
PA01	100	100	90	60	70	60	40	50
PA14	100	100	90	60	70	60	40	50
PA14 Ap1A	100	0	0	0	0	0	0	0
PA14 Ap0800	100	140	120	70	100	100	100	110
PASM2	50	0	0	0	60	0	70	50
IMP-16	0	90	120	100	80	100	100	50
OXA-18	0	0	0	60	0	40	0	0
GES-1	0	90	0	80	100	100	100	0
BC1410	0	100	120	90	100	100	100	100
BC1136	0	130	120	100	100	100	100	100
BC1303	0	130	100	100	100	100	90	100
BC1680	0	100	110	100	100	110	90	100
VICX	100	100	100	100	100	100	100	100

Conclusões

A obtenção de preparações puras, de alta concentração de fagos e com diferentes abrangências de hospedeiros foi atingida com sucesso. Além disso, realizamos a caracterização clássica: morfológica, genômica e de atividade lítica desses fagos.

Agradecimentos

Agradeço à minha falecida orientadora Aline Maria da Silva, por sempre ter me incentivado em minha trajetória científica. Agradeço ao Ariosvaldo Pereira dos Santos Junior e à minha supervisora Layla Farage Martins por terem me apresentado o mundo dos fagos. Por fim, agradeço à FAPESP pelo financiamento e por possibilitar este trabalho (2023/06724-2).

Referências

Azeredo J, Sillankorva S. Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice. Azeredo J, Sillankorva S, editors. New York, NY: Humana Press; 2018. 303 p.