

ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE VÍRUS BACTERIANOS COMO ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DE INFECÇÕES

Bruna C. A. Nogueira¹

Marta M. D. C. Vila²

Victor M. C. F. Balcão³

Resumo

A resistência bacteriana aos antibióticos é uma questão crescente de saúde pública, com previsões alarmantes de até 10 milhões de mortes anuais até 2050. Dentre os patógenos resistentes, o grupo ESKAPE se destaca pela dificuldade no tratamento. Assim, busca-se alternativas, como o uso de bacteriófagos, vírus que infectam especificamente bactérias, oferecendo uma abordagem promissora para o controle dessas infecções. O objetivo deste estudo foi isolar, preservar e catalogar bacteriófagos líticos a partir de amostras ambientais da região de Sorocaba, São Paulo, visando o desenvolvimento de uma biblioteca de fagos para futuras pesquisas. A metodologia seguiu o protocolo de isolamento de bacteriófagos a partir de amostras de solo e água, utilizando técnicas de enriquecimento e o teste de *spot-test* para detecção da presença de fagos. Após o isolamento, os bacteriófagos foram armazenados em tampão SM e glicerol a -80°C para garantir sua preservação. Foram

Palavras-chave: Bactérias multirresistentes; Biblioteca de fagos; Resistência bacteriana; Terapia fágica;

¹ Bruna C. A. Nogueira, aluna do Programa de Pós-Graduação no Programa de Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba – UNISO, brunanogueira90@hotmail.com

² Profa. Dra. Marta M. D. C. Vila, Universidade de Sorocaba, Vblab – Laboratório de Vírus Bacterianos, marta.vila@prof.uniso.br

³ Orientação: Prof. Dr. Victor M. Balcão, Universidade de Sorocaba, VBlab – Laboratório de Vírus Bacterianos, victor.balcao@prof.uniso.br

INTRODUÇÃO

O uso inadequado e excessivo de antibióticos tem causado a queda da eficácia de agentes antimicrobianos, de modo que, infecções causadas por bactérias têm se tornado cada vez mais difíceis de serem tratadas e controladas. A resistência de microrganismos patogênicos a antibióticos tem gerado altos custos de tratamento e importantes efeitos colaterais devido ao uso excessivo de antibióticos fortes. As bactérias do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) são os patógenos reconhecidos por sua resistência bacteriana, se tornando uma ameaça à saúde pública, afetando a saúde de seres humanos ao redor do mundo (Munita; Arias, 2016). Segundo pesquisas recentes, a resistência bacteriana a antibióticos pode causar até 10 milhões de mortes anuais até 2050, superando o número de mortes por câncer e outras doenças (Mello & Oliveira, 2021). Sendo assim, se faz necessária a pesquisa por métodos alternativos que visam o combate à resistência bacteriana (Balcão et al., 2022a,b; Harada et al., 2022; Viertel et al., 2014).

Os bacteriófagos, ou fagos, são definidos como vírus que infectam única e exclusivamente bactérias, desempenhando um papel crucial no controle biológico de microrganismos. Esses vírus possuem um genoma de ácido nucleico, que pode ser RNA ou DNA, encapsulado em uma estrutura proteica chamada capsídeo. Essa estrutura pode ser complementada por uma cauda, que pode ser contrátil ou não, e por apêndices que variam em complexidade. Os fagos são classificados em dois tipos principais, de acordo com o seu ciclo de replicação: fagos líticos (virulentos) e lisogênicos. No ciclo lítico, o fago injeta o seu genoma na célula bacteriana, o qual se multiplica rapidamente, produzindo novas partículas virais, e em seguida causa a lise (ruptura) da célula hospedeira, liberando seus descendentes para infectar novas bactérias. Esse ciclo é o mais interessante para o controle biológico de bactérias, já que resulta na destruição da célula bacteriana. Por outro lado, no ciclo lisogênico, o genoma do fago é integrado ao genoma da bactéria hospedeira formando um profago, onde pode permanecer inativo por um determinado período de tempo. Nesse estado latente, o profago é replicado junto com o DNA da bactéria durante a divisão celular, sem causar a destruição imediata da célula. Contudo, sob certas condições, o profago pode sofrer excisão e entrar em um ciclo lítico, reativando sua replicação e levando à lise da célula. Devido à sua especificidade, os fagos líticos oferecem uma alternativa promissora no combate a infecções bacterianas, especialmente no contexto

da resistência a antibióticos, já que podem ser usados para atacar diretamente bactérias específicas sem afetar a microbiota benéfica (Balcão et al., 2022c; Torres-Barceló, 2018).

Os bacteriófagos são amplamente distribuídos no planeta e podem ser encontrados em praticamente qualquer ambiente que contenha bactérias viáveis. Estima-se que existam aproximadamente 10^{32} partículas virais, o que os torna cerca de dez vezes mais abundantes na biosfera do que as próprias bactérias (Thung et al., 2018). No entanto, apesar dessa abundância, apenas uma pequena fração de fagos foi identificada e catalogada até ao momento (Akhwale et al., 2019). Nesse contexto, torna-se crucial o desenvolvimento de coleções ou bibliotecas de bacteriófagos, que possam ser disponibilizadas para a comunidade científica e utilizadas em pesquisas.

Este trabalho tem como objetivo o isolamento, preservação, catalogação e fornecimento de bacteriófagos e suas bactérias hospedeiras, visando apoiar pesquisas científicas e atender demandas regionais e nacionais, promovendo o desenvolvimento tecnológico e possibilitando aplicações práticas desses fagos em áreas como a biotecnologia e o controle de infecções bacterianas resistentes.

METODOLOGIA

O isolamento de bacteriófagos foi realizado a partir de amostras ambientais, como solo e água, coletadas na região de Sorocaba/SP. O protocolo seguiu as etapas descritas por Kutter & Sulakvelidze (2005) para a obtenção de fagos.

Na fase de enriquecimento, as amostras provenientes de fontes ambientais foram adicionadas a frascos contendo meio Tryptic Soy Broth (TSB) e uma cepa bacteriana hospedeira previamente selecionada. Os frascos foram incubados por 24 h, em temperatura ótima para o crescimento da cepa hospedeira de isolamento, permitindo a multiplicação de fagos presentes nas amostras. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 20 min em tubos Falcon de 15 mL e o sobrenadante foi coletado e filtrado utilizando filtros PES de 0,2 μm de tamanho de poro, visando reter e eliminar células bacterianas e restos celulares, mantendo apenas as partículas virais.

Para verificação da presença de bacteriófagos na amostra, o filtrado foi testado através do teste da gota (*spot-test*) em placas de Petri contendo tapete bacteriano da cepa hospedeira. As placas de Petri contendo o *spot-test* foram incubadas novamente à temperatura ótima para crescimento

bacteriano, onde após um período de 24 h, foram inspecionadas quanto à presença ou não de halos de lise translúcidos, indicativos da presença de bacteriófagos virulentos.

As placas de lise formadas pelos bacteriófagos encontrados foram então recortadas e armazenadas a -80 °C em criotubos enriquecidos com 1,5 mL de SM Buffer (tampão fágico), 1,5 mL de glicerol e 200µL de suspensão contendo a cepa hospedeira.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados até ao momento 16 bacteriófagos a partir de diferentes amostras ambientais. Os bacteriófagos podem ser facilmente obtidos de fontes como solo, água, esgoto e outros ambientes colonizados por bactérias (Marks & Sharp, 2000). O processo de enriquecimento das amostras visa aumentar a concentração de fagos presentes, facilitando sua detecção nas amostras coletadas do ambiente (Gill & Hyman, 2010). A técnica do *spot test* é uma abordagem simples e eficaz que permite avaliar a capacidade dos fagos de lisar bactérias hospedeiras (Hyman, 2019).

A ocorrência, viabilidade e longevidade dos bacteriófagos são influenciadas por diversos fatores, como temperatura, acidez, salinidade e a presença de íons. Esses fatores podem comprometer a integridade dos fagos, causando danos em suas estruturas, como cabeça, cauda e envelope, além de provocar a perda de lipídeos ou DNA e alterações estruturais (Ackermann et al., 2005).

O SM Buffer tem a função de proporcionar um ambiente estável para os bacteriófagos, preservando sua atividade biológica. O magnésio (Mg^{2+}) é fundamental para a estabilidade estrutural dos fagos, enquanto o Tris-HCl mantém o pH em níveis ideais (Carlson, 2005). A adição de glicerol ao meio de armazenamento é essencial para evitar danos decorrentes da formação de cristais de gelo durante os processos de congelamento e descongelamento, garantindo que a estrutura e viabilidade dos fagos permaneçam preservadas (Kropinski et al., 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa sobre bacteriófagos oferece uma alternativa promissora para o controle de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Até ao momento, a metodologia empregada mostrou-se eficaz no isolamento e preservação de fagos de amostras ambientais de Sorocaba/SP. A criação de uma biblioteca de bacteriófagos líticos contribuirá para o avanço da terapia fágica, proporcionando novos

recursos para a melhoria da saúde pública, sendo fundamental para o sucesso de futuras aplicações científicas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudos concedidas, no âmbito de projeto de pesquisa (Processos nº 301978/2022-0 (bolsa PQ-2), Victor M. Balcão e 130204/2024-2 (bolsa de Mestrado no âmbito do Projeto Observatório (ref. 440869/2022-6), Bruna Caroline Alves Nogueira). À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil), pelos Apoios à Pesquisa concedidos a Victor M. Balcão (FAPESP Refs. No. 2022/10775-9 (Project PsgPhageKill) e 2023/03797-9).

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, H.W. (2005). Bacteriophage classification. In: Kutter, E.; Sulakvelidze, A. (Eds.), *Bacteriophages: Biology and Applications* (pp. 67-90). Boca Raton, FL: CRC Press.
- AKHWALE, J.K.; ROHDE, M.; ROHDE, C.; BUNK, B.; SPRÖER, C.; BOGA, H.I.; KLENK, H.; WITTMANN, J. (2019). Isolation, characterization and analysis of bacteriophages from the haloalkaline lake Elmenteita, Kenya. *PLoS ONE*, 14(4), e0215734. doi:10.1371/journal.pone.0215734.
- BALCÃO, V. M.; ALMEIDA, P. F. F. B.; AMORIM, L. R. P.; BASU, A.; BELLINE, B. G.; CIEZA, B.; DA SILVA, A. M.; DA SILVA, A. M.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. M.; PEREIRA, C.; ROSSI, F. P. N.; SETUBAL, J. C.; SQUINA, F. M.; VILA, M. M. D. C. (2022a). Isolation and molecular characterization of two novel lytic bacteriophages for the biocontrol of *Escherichia coli* in uterine infections: In vitro and ex vivo preliminary studies in veterinary medicine. *Pharmaceutics*, 14(11), 2344. doi: 10.3390/pharmaceutics14112344.
- BALCÃO, V. M.; BASU, A.; CIEZA, B.; ROSSI, F. N.; PEREIRA, C.; VILA, M. M. D. C.; SETUBAL, J. C.; HA, T.; DA SILVA, A. M. (2022a). Pseudomonas-tailed lytic bphages: genome mechanical analysis and putative correlation with virion morphogenesis yield. *Future Microb.*, 17(13), 1009-1026. doi: 10.2217/fmb-2021-0293.
- BALCÃO, V. M.; BELLINE, B. G.; SILVA, E. C.; MARTINS, L. F.; MORELI, F. C.; PEREIRA, C.; ROSSI, F. P. N.; SILVA, E. C.; VILA, M. M. D. C.; DA SILVA, A. M. (2022c). Isolation and molecular characterization of a novel lytic bacteriophage that inactivates MDR *Klebsiella pneumoniae* strains. *Pharmaceutics*, 14(7), 1421. doi: 10.3390/pharmaceutics14071421.
- BRÜSSOW, H., KUTTER, E., & SULAKVELIDZE, A. (2005). Genomics and evolution of tailed phages. *Bacteriophages: Biology and application*, 91-128.



CARLSON, K. (2005). Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches. In: Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (Eds.), *Bacteriophages: Biology and Applications* (pp. 437-494). CRC Press.

GILL, J. J.; HYMAN, P. (2010). Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 11, 2-14.

HARADA, L. K.; SILVA, E. C.; ROSSI, F. P. N.; CIEZA, B.; OLIVEIRA, T. J.; PEREIRA, C.; TOMAZETTO, G.; SILVA, B. B.; SQUINA, F. M.; VILA, M. M. D. C.; SETUBAL, J. C.; HA, T.; DA SILVA, A. M.; BALCÃO, V. M. (2022). Characterization and in vitro testing of newly isolated lytic bacteriophages for biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol.*, 17(2), 111-141. doi: 10.2217/fmb-2021-0027.

HYMAN, P. (2019). Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1), 35. doi: 10.3390/ph12010035.

KROPINSKI, A. M.; MAZZOCCO, A.; WADDELL, T. E.; LINGOHR, E.; JOHNSON, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In: Clokie, M. R. J.; Kropinski, A. M. (Eds.), *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. 69-76). Humana Press.

MARKS, T.; SHARP, R. (2000). Bacteriophage and biotechnology: A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 75, 6-17.

MELLO, M. S.; OLIVEIRA, A. C. (2021). Overview of the actions to combat bacterial resistance in large hospitals. *Rev. Lat. Amer. Enferm.*, 29, e3407. doi: 10.1590/1518-8345.3952.3407.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.*, 4(2). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

THUNG, T. Y.; LEE, E.; PREMARATHNE, K.; MAZLAN, N.; KUAN, C. H.; ELEXSON, N.; TAN, C. W. (2018). Bacteriophages and their applications. *Food Res.*, 2(5), 404-414.

TORRES-BARCELÓ, C. (2018). The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerg. Microbes & Infec.*, 7(1), 1-12.

VIERTEL, T.M.; RITTER, K.; HORZ, H. (2014). Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.*, 69, 2326–2336