



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

GABRIEL HENRIQUE MAXIMINO SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

DESENVOLVIMENTO DE UM COQUETEL DE
BACTERIÓFAGOS CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS
MULTIRESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii*:
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME E
ASSOCIAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS

GABRIEL HENRIQUE MAXIMINO SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM COQUETEL DE
BACTERIÓFAGOS CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS
MULTIRESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii*:
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME E
ASSOCIAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS**

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Estadual de Londrina - UEL, como
requisito para a obtenção do título de Mestre em
Microbiologia.

Orientador: Prof^a Renata Katsuko Takayama
Kobayashi.

Coorientador: Dr. Jhonatan Macedo Ribeiro

Londrina
2026

GABRIEL HENRIQUE MAXIMINO SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM COQUETEL DE
BACTERÍÓFAGOS CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS
MULTIRESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii*:
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME E
ASSOCIAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de Dissertação de Mestrado
apresentado à Universidade Estadual de
Londrina - UEL, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em
Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Renata Katsuko Takayama Kobayashi

Prof.^a Orientadora
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Jhonatan Macedo Ribeiro

Dr. Coorientador
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Giovana Nicolete Pereira

Dr.^a Membro 3
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Sara Scandorieiro

Dr.^a Membro 4
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S237d Santos, Gabriel Henrique Maximino.

Desenvolvimento de um coquetel de bacteriófagos contra isolados clínicos multiresistentes de *Acinetobacter baumannii* : Avaliação da atividade antibiofilme e associação com antimicrobianos / Gabriel Henrique Maximino Santos. - Londrina, 2026.
131 f. : il.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Coorientador: Jhonatan Macedo Ribeiro.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2026.

Inclui bibliografia.

1. Fagoterapia - Tese. 2. Bacteriófagos - Tese. 3. Antimicrobianos - Tese. 4. Associação - Tese. I. Kobayashi, Renata Katsuko Takayama. II. Ribeiro, Jhonatan Macedo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579

SANTOS, Gabriel Henrique Maximino. **DESENVOLVIMENTO DE UM COQUETEL DE BACTERIÓFAGOS CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS MULTIRRESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii*: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME E ASSOCIAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS**. 2026. 127 p. Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

RESUMO

Em decorrência do aumento global de infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* multirresistente aos antimicrobianos, especialmente em ambiente hospitalar e em unidades de terapia intensiva, torna-se urgente a busca por alternativas terapêuticas capazes de contornar a resistência e a formação de biofilmes por esse patógeno. Nesse contexto, a fagoterapia surge como opção promissora, utilizando bacteriófagos, vírus que infectam especificamente bactérias, seja de forma isolada, em coquetéis ou em associação a antibióticos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de um coquetel de bacteriófagos contra isolados clínicos multirresistentes de *A. baumannii*, bem como investigar seu potencial em combinação com diferentes classes de antimicrobianos. Para isso, foram isolados fagos a partir de amostras de efluentes hospitalares, selecionados de acordo com seu espectro de ação e desempenho em ensaios *in vitro*, incluindo *Spot Test*, Eficiência de Plaqueamento, Índice de Virulência e Multiplicidade de Infecção, culminando na escolha de quatro fagos para composição de um coquetel. Foram conduzidos ensaios de virulência *in vitro* frente a diversos isolados clínicos, testes de sobrevivência em larvas de *Galleria mellonella* para avaliar taxas de sobrevivência e a relação entre virulência e eficácia terapêutica dos fagos, além de ensaios de *checkerboard* para análise da interação entre o coquetel e antibióticos como levofloxacina, meropenem, piperacilina-tazobactam e colistina, bem como testes de atividade antibiofilme dessas combinações. Os resultados demonstraram que o coquetel apresentou amplo espectro de ação (93,6%, ou seja, 59 dos 63 isolados), com altos índices de virulência (média de 0,73) e capacidade de reduzir significativamente a carga bacteriana, refletindo em maior sobrevivência das larvas tratadas (66,4% de sobrevivência) em comparação aos controles infectados sem fagos (7,6%). Adicionalmente, as combinações com antibióticos permitiram a redução das concentrações de diferentes fármacos, inclusive daqueles com eficácia previamente comprometida, e mostraram que sozinho o coquetel já é capaz de reduzir de maneira significativa biofilmes formados de *A. baumannii*. Diante disso, conclui-se que o coquetel de bacteriófagos estudado apresenta potencial terapêutico no manejo de infecções causadas por *A. baumannii* multirresistente, contribuindo para a otimização do uso de antibióticos e apontando a necessidade de estudos adicionais em modelos vertebrados e eventualmente em cenários clínicos para garantir sua aplicação.

Palavras-chave: bacteriófagos; fagoterapia; antibacterianos; resistência; associação.

SANTOS, Gabriel Henrique Maximino. **DEVELOPMENT OF A BACTERIOPHAGE COCKTAIL AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT CLINICAL ISOLATES OF *Acinetobacter baumannii*: EVALUATION OF ANTIBIOFILM ACTIVITY AND ASSOCIATION WITH ANTIMICROBIALS**. 2026. 127 p. Master's Dissertation in Microbiology – Department of Microbiology, Center for Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, 2026.

ABSTRACT

Due to the global increase in infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, particularly in hospital settings and intensive care units, there is an urgent need for alternative therapeutic strategies capable of overcoming resistance and biofilm formation by this pathogen. In this context, phage therapy emerges as a promising option, employing bacteriophages—viruses that specifically infect bacteria—either individually, in cocktails, or in combination with antibiotics. Thus, the present study aimed to evaluate the antibacterial activity of a bacteriophage cocktail against multidrug-resistant clinical isolates of *A. baumannii*, as well as to investigate its potential when combined with different classes of antimicrobials. For this purpose, phages were isolated from hospital effluent samples and selected according to their host range and performance *in vitro* assays, including Spot Test, Efficiency of Plating, Virulence Index, and Multiplicity of Infection, ultimately leading to the selection of four phages for cocktail formulation. *In vitro* virulence assays were performed against several clinical isolates, along with survival tests in *Galleria mellonella* larvae to assess survival rates and the relationship between virulence and therapeutic efficacy of the phages. Checkerboard assays were also carried out to analyze the interaction between the cocktail and antibiotics such as levofloxacin, meropenem, piperacillin-tazobactam, and colistin, as well as to evaluate the antibiofilm activity of these combinations. The results demonstrated that the cocktail exhibited a broad spectrum of activity (93.6%, i.e., 59 of 63 isolates), high virulence indices (mean of 0.73), and the ability to significantly reduce bacterial load, resulting in higher survival rates of treated larvae (66.4%) compared to infected controls without phages (7.6%). Additionally, the combinations with antibiotics allowed for a reduction in the concentrations of various drugs, including those with previously compromised efficacy, and showed that the cocktail alone was already capable of significantly reducing preformed *A. baumannii* biofilms. Therefore, it can be concluded that the bacteriophage cocktail studied presents therapeutic potential for managing infections caused by multidrug-resistant *A. baumannii*, contributing to the optimization of antibiotic use and highlighting the need for further studies in vertebrate models and, ultimately, in clinical scenarios to ensure its application.

Keywords: bacteriophages; phage therapy; antibacterials; resistance; combination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cronologia da descoberta, primeiro uso clínico e primeiro relato de resistência clínica das 38 classes de antibióticos.....	16
Figura 2 – Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos	20
Figura 3 – Representação da morfologia viral de bacteriófagos. A: Morfologia de um fago observado por Micrografia Eletrônica de Transmissão, com ampliação de 150.000×. B: Esquema das estruturas que compõem um bacteriófago.....	25
Figura 4 – Características morfológicas e genéticas das famílias dos bacteriófagos.....	27
Figura 5 – Eventuais ciclos de replicação dos bacteriófagos	29
Figura 6 – <i>Layout</i> utilizado nas microplacas empregadas no ensaio de <i>checkerboard</i> entre o coquetel e antibióticos	42
Figura 7 – Imagem dos plaques de cada um dos fagos que compõem o coquetel	49
Figura 8 – Gráficos demonstrando a diferença entre a utilização de um fago isolado e o coquetel frente a curva de crescimento bacteriano. Em A: Curva de Virulência do fago phAb586 frente ao isolado Ab554 e em B: Curva de Virulência do Coquetel frente ao isolado Ab554.....	60
Figura 9 – Painel contendo os gráficos de multiplicidade de infecção de cada um dos bacteriófagos que compõem o Coquetel.	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – <i>Host Range</i> dos bacteriófagos que compõem o coquetel segundo a técnica de <i>Spot Test</i>	51
Gráfico 2 – <i>Host Range</i> dos bacteriófagos que compõem o coquetel segundo a técnica de Eficiência de Plaqueamento Relativa.....	56
Gráfico 3 – <i>Host Range</i> dos bacteriófagos isolados e do coquetel segundo a técnica de Índice de Virulência.....	59
Gráfico 4 – Curva de Virulência do Coquetel frente ao isolado Ab846.....	62
Gráfico 5 – Curva de Virulência do Coquetel frente ao isolado Ab576.....	63
Gráfico 6 – Curva de Virulência do Coquetel frente ao isolado Ab615.....	64
Gráfico 7 – Curva de Virulência do phAb598 frente ao isolado Ab624.....	68
Gráfico 8 – Média de sobrevivência, com desvio padrão, de larvas de <i>Galleria mellonella</i> frente aos 63 isolados de <i>A. baumannii</i> testados.....	71
Gráfico 9 – Correlação entre virulência <i>in vitro</i> e sobrevivência de larvas de <i>Galleria mellonella</i>	73
Gráfico 10 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Levofloxacina e o Coquetel frente o isolado Ab576	83
Gráfico 11 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Meropenem e o Coquetel frente o isolado Ab576	86
Gráfico 12 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Piperacilina-Tazobactam e o Coquetel frente o isolado Ab576	89
Gráfico 13 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Colistina e o Coquetel frente o isolado Ab576	92
Gráfico 14 – Atividade antibiofilme da combinação entre o Coquetel de bacteriófagos e Levofloxacina.....	97
Gráfico 15 – Atividade antibiofilme da combinação entre o Coquetel de bacteriófagos e Meropenem.....	99
Gráfico 16 – Atividade antibiofilme da combinação entre o Coquetel de bacteriófagos e Piperacilina-Tazobactam	101
Gráfico 17 – Atividade antibiofilme da combinação entre o Coquetel de bacteriófagos e Colistina.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Antibióticos utilizados para avaliação do perfil de Resistência dos 63 isolados de <i>A. baumannii</i>	40
Tabela 2 – Resultados do perfil de resistência dos 63 isolados de <i>A. baumannii</i> frente aos antibióticos testados.....	76
Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados selecionados de <i>A. baumannii</i> utilizados nos testes de associação Coquetel- Antibiótico.....	79
Tabela 4 – Resumo dos resultados obtidos no teste Coquetel-Antibiótico para os três isolados de <i>A. baumannii</i> testados, onde observa-se o número de ocorrência dos efeitos biológicos da combinação, assim como a redução na concentração de antibiótico decorrentes da associação	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB	<i>Acinetobacter calcoaceticus–baumannii</i>
BAVS	<i>Bacterial and Archaea Viruses Subcommittee</i>
CDC	<i>Center of Disease Control</i>
CK	<i>Cocktail</i> ou Coquetel (Bacteriófagos)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COL	Colistina
CRAB	<i>Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EOP	<i>Efficiency of Platting</i> ou Eficiência de Plaqueamento
GC	<i>Global clones</i>
HU-UEL	Hospital Universitário de Londrina
ICTV	<i>International Committee on the Taxonomy of Viruses</i>
LB	Lysogeny-Broth
LBA	Lysogeny-Broth Agar
LBBA	Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada
LBSA	Lysogeny-Beoth Soft Agar
LPS	Lipopolissacarídeo
LVX	Levofloxacina
MDR	<i>Multidrug resistant</i>
MER	Meropenem
MHA	<i>Muller Hinton Ágar</i>
MHB	<i>Muller Hinton Broth</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> ou Multiplicidade de Infecção
NIP-3	Núcleo Integrado em Pesquisa 3

OD	<i>Optical Density</i> ou Desidade Óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PFU	<i>Plaque-Forming Unit</i>
PPT	Piperacilina-Tazobactam
RAM	Resistência aos Antimicrobianos
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SFA	Sinergia fago-antibiótico
SST	<i>Streak Spot Test</i>
ST	<i>Spot Test</i>
Tampão SM	Tampão <i>Saline-Magnesium</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
URSS	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
VI	<i>Virulence Index</i> ou Índice de Virulência
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	A HISTÓRIA DOS ANTIMICROBIANOS	15
2.2	O SURGIMENTO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	17
2.3	O GRUPO <i>ESKAPE</i>	18
2.4	<i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	20
2.5	BACTERÍOFAGOS	24
2.6	ASSOCIAÇÃO ENTRE BACTERÍOFAGOS E ANTIMICROBIANOS.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	MEIOS DE CULTURA E REAGENTES.....	32
4.2	ISOLADOS BACTERIANOS	32
4.3	ISOLAMENTO E PROPAGAÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS	33
4.4	SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS.....	33
4.5	DETERMINAÇÃO DO <i>HOST RANGE</i>	35
4.5.1	<i>Spot Test</i>	35
4.5.2	Eficiência de Plaqueamento Relativa	35
4.5.3	Índice de Virulência	36
4.6	MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO	37
4.7	ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA EM LARVAS DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	38
4.8	PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>A. BAUMANNII</i>	39
4.8.1	Antibiograma	39
4.8.2	Definição da Concentração Inibitória Mínima	40
4.9	AValiação DO EFEITO COMBINADO DO COQUETEL E ANTIMICROBIANOS POR	

	MICRODILUIÇÃO EM <i>CHECKERBOARD</i>	41
4.9.1	Comparação entre o Efeito inibitório da Combinação e dos Tratamentos isolados	43
4.9.1.1	Processamento de dados	43
4.9.1.2	Separação do ruído experimental e da diferença real de inibição	44
4.9.1.3	Indicativos quantitativos de efeito biológico e integração com critérios experimentais	45
4.10	AVALIAÇÃO ANTIBIOFILME DOS BACTERÍOFAGOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIMICROBIANOS	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	ISOLAMENTO DOS BACTERÍOFAGOS E ANÁLISE DO <i>HOST RANGE</i>	48
5.1.2	Isolamento Propagação e Detecção dos Bacteriófagos	48
5.1.2	<i>Spot Test</i>	50
5.1.3	Eficiência de Plaqueamento	53
5.1.4	Índice de Virulência	57
5.2	MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO	65
5.3	TESTE DE SOBREVIVÊNCIA <i>IN VIVO</i> COM LARVAS DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	69
5.3.1	Correlação entre Índice de Virulência e sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i>	73
5.4	PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>A. BAUMANNII</i>	74
5.5	ASSOCIAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS E ANTIMICROBIANOS	80
5.5.1	Levofloxacina	82
5.5.2	Meropenem	85
5.5.3	Piperacilina-Tazobactam	88
5.5.4	Colistina.....	91
5.6	ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS BACTERÍOFAGOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIMICROBIANOS	95
6	CONCLUSÃO	105
7	REFERÊNCIAS.....	106

ANEXO 1 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Levofloxacina e o Coquetel frente o isolado Ab615	121
ANEXO 2 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Meropenem e o Coquetel frente o isolado Ab615	122
ANEXO 3 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Piperacilina-Tazobactam e o Coquetel frente o isolado Ab615	123
ANEXO 4 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Colistina e o Coquetel frente o isolado Ab615.....	124
ANEXO 5 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Levofloxacina e o Coquetel frente o isolado Ab846	125
ANEXO 6 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Meropenem e o Coquetel frente o isolado Ab846	126
ANEXO 7 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Piperacilina-Tazobactam e o Coquetel frente o isolado Ab846	127
ANEXO 8 – <i>Checkerboard</i> da associação entre Colistina e o Coquetel frente o isolado Ab846.....	128

1 INTRODUÇÃO

Descritos inicialmente por Frederick Twort em 1915 (DIALLO; DUBLANCHET, 2023; HATFULL; DEDRICK; SCHOOLEY, 2022) e aplicados clinicamente por Felix d'Herelle em 1919 no tratamento de crianças com disenteria bacteriana (SORESSA BAKALA; MOTUMA, 2022; STRATHDEE et al., 2023), os bacteriófagos (fagos) são vírus que infectam especificamente bactérias sem exercer efeito tóxico nas células humanas (SORESSA BAKALA; MOTUMA, 2022). Apesar de sua utilização terapêutica anteceder a popularização dos antibióticos, fatores políticos, limitações metodológicas iniciais e, sobretudo, o impacto da descoberta e ampla difusão da penicilina e seus sucessores favoreceram o abandono progressivo da fagoterapia em grande parte do mundo ocidental (DIALLO; DUBLANCHET, 2023; SALMOND; FINERAN, 2015). Na atualidade, diante do surgimento e disseminação global de bactérias multirresistentes, a necessidade urgente de alternativas aos antimicrobianos convencionais, reforçada por órgãos como o *Centers for Disease Control* (CDC) e a *World Health Organization* (WHO), tem impulsionado a redescoberta e o avanço da fagoterapia como opção terapêutica complementar (CDC, 2019; WHO, 2022).

Nesse cenário de multirresistência no ambiente hospitalar, um conjunto de patógenos ganhou destaque pela elevada capacidade de escapar à ação de múltiplas classes de antibióticos, sendo reunidos sob o acrônimo ESKAPEE (LAWS; SHAABAN; RAHMAN, 2019), entre esses, em especial *Acinetobacter baumannii*, destaca-se como um importante patógeno de infecções relacionadas à assistência à saúde, principalmente em unidades de terapia intensiva, associado a pneumonias relacionadas à ventilação mecânica, bacteremias e infecções de feridas, frequentemente em pacientes debilitados ou imunocomprometidos. Trata-se de um bacilo Gram-negativo não fermentador, com alta capacidade de adquirir e acumular mecanismos de resistência, incluindo produção de β -lactamases de amplo espectro, carbapenemases, modificações de alvos, bombas de efluxo e alterações de permeabilidade, além de formar biofilmes persistentes em superfícies bióticas e dispositivos médicos, o que dificulta sua erradicação por antibióticos convencionais.

Nesse contexto, a exploração da fagoterapia como método alternativo e complementar contra *A. baumannii*, isoladamente ou em combinação com antimicrobianos, surge como uma estratégia promissora para enfrentar infecções causadas por cepas MDR e XDR desse formidável patógeno.

2 REVISÃO DE LITERATURA

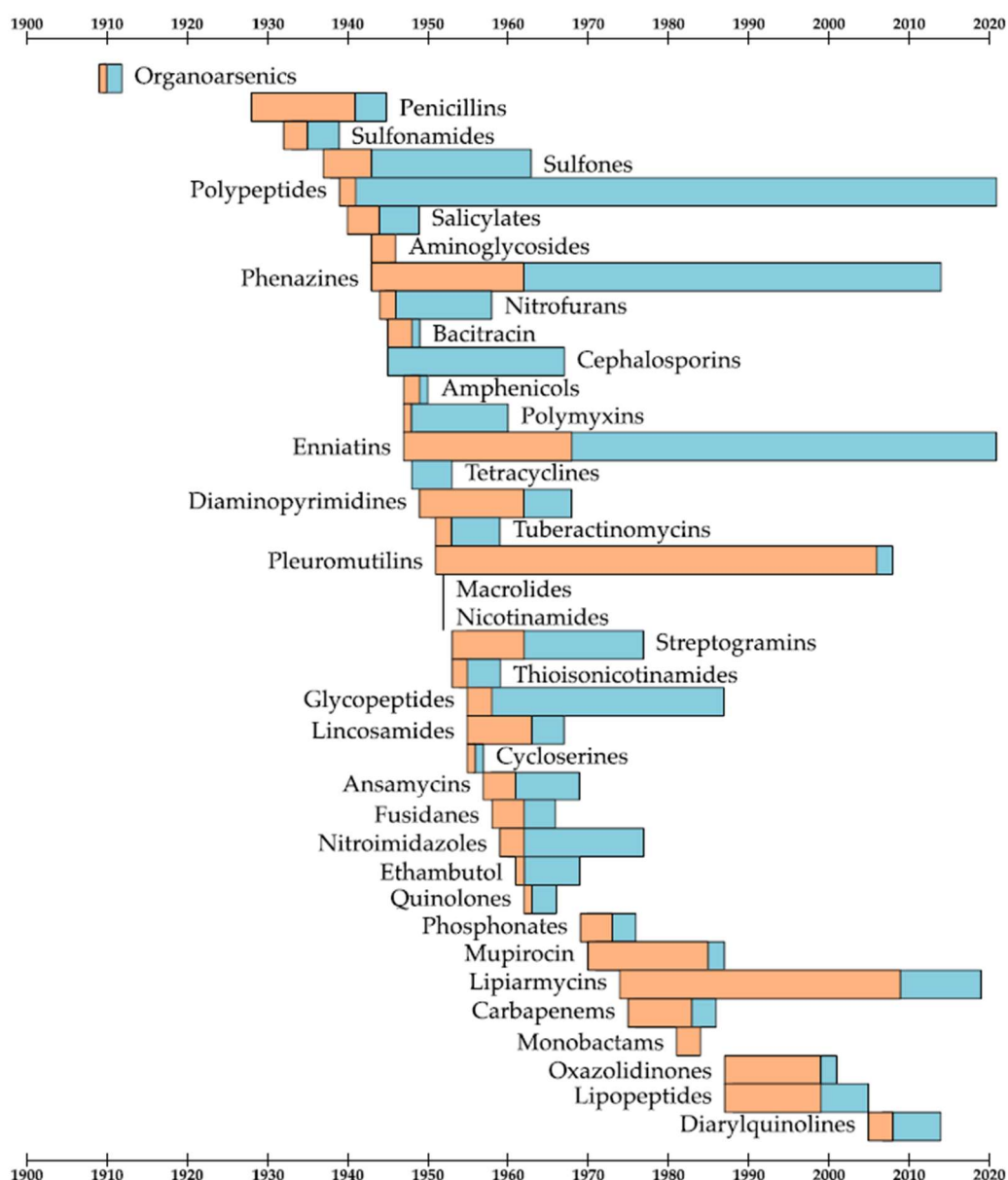
2.1 A HISTÓRIA DOS ANTIMICROBIANOS

A introdução da arsefenamina (Salvarsan) em 1910, pelo médico e cientista alemão Paul Ehrlich, é considerada um marco inicial da terapia antibacteriana moderna, por se tratar do primeiro composto sintético empregado no tratamento de infecções bacterianas, especificamente a sífilis causada por *Treponema pallidum* (CHRISTENSEN, 2021; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Partindo da hipótese de que determinados corantes poderiam se ligar seletivamente a tecidos e microrganismos, Erlich propôs o conceito de uma “bala mágica”, capaz de atingir apenas o agente etiológico da doença sem causar danos significativos ao hospedeiro (CHRISTENSEN, 2021; GELPI; GILBERTSON; TUCKER, 2015). Com esse objetivo, ele infectou camundongos com *T. pallidum* e avaliou sucessivamente cerca de 606 compostos, até identificar um que tivesse atividade eficaz contra o patógeno, sem provocar a morte dos animais tratados (CHRISTENSEN, 2021; GELPI; GILBERTSON; TUCKER, 2015; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; SPAGNOLO; TRUJILLO; DENNEHY, 2021). Essa descoberta inaugurou uma potencial estratégia para combater tais infecções e da mesma forma deu início a uma busca por agentes antibacterianos, abrindo caminho para o desenvolvimento de novos compostos.

Na década de 1930, mantendo o raciocínio de empregar corantes como agentes com potencial antibacteriano e inspirado por Erlich, Gerhard Domagk iniciou os estudos com sulfonamidas (Prontosil) para o tratamento de infecções causadas por *Streptococcus* (CHRISTENSEN, 2021; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; MOHR, 2016; OTTEN, 1986; SPAGNOLO; TRUJILLO; DENNEHY, 2021). Ensaios pré-clínicos conduzidos em camundongos e coelhos evidenciaram a eficácia do composto, permitindo a progressão para estudos clínicos e posterior introdução na prática terapêutica. Embora posteriores à arsefenamina, as sulfonamidas representaram os primeiros antimicrobianos sintéticos efetivos, caracterizando-se por um amplo espectro de ação e permanecendo em utilização até a atualidade (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Tanto o Salvarsan quanto o Prontosil, por apresentarem propriedades antibacterianas e origem sintética, foram classificados como quimioterápicos (antimicrobianos sintéticos), enquanto os antibióticos

propriamente ditos, que são biomoléculas produzidas por organismos para inibir ou matar outros microrganismos, só viriam a ser descobertos e isolados nas décadas de 1930 e 1940.

Figura 1 - Cronologia da descoberta, primeiro uso clínico e primeiro relato de resistência clínica das 38 classes de antibióticos.



Fonte: Stennett (2022). Para cada classe de antibiótico, as barras laranjas representam as “janelas de desenvolvimento” (quanto tempo após sua descoberta o antibiótico foi usado pela primeira vez na clínica), e as barras azuis representam as “janelas de resistência” (quanto tempo após seu primeiro uso foi relatado resistência clínica).

Já em 1928, Alexander Fleming realizou a descoberta revolucionária que inaugurou a chamada "Era de Ouro dos Antibióticos" (MOHR, 2016). Ao investigar *Staphylococcus aureus*, ele notou que uma contaminação por um fungo do gênero *Penicillium* impedia o crescimento bacteriano (FLEMING, 1929). Essa inibição foi posteriormente atribuída a um composto antibacteriano batizado de Penicilina, embora sua purificação só tenha ocorrido em 1940, pelas mãos de Ernst Chain, Howard Florey e Norman Heatley (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; MOHR, 2016). A partir daí, surgiram derivados semissintéticos como a ampicilina, descrita inicialmente por Brewer e Jonson em 1953 (BREWER; JOHNSON, 1953), e a metecilina, desenvolvida pela empresa inglesa Beecham em 1959. O fato é que a Penicilina marcou um avanço e estímulo histórico ao revelar compostos naturais com ação antibacteriana.

O êxito na prática clínica, somado à urgência em conter doenças infecciosas e surtos epidêmicos associados à Segunda Guerra Mundial, impulsionou, entre a década de 1940 e meados da década de 1970, uma intensa busca por novos agentes antimicrobianos (**Figura 1**). As descobertas conduzidas por Waksman e colaboradores demonstraram que bactérias do gênero *Streptomyces* eram fontes particularmente promissoras de antibióticos (WAKSMAN; SCHATZ; REYNOLDS, 2010). A partir dessas investigações, diversas classes de moléculas foram descritas, incluindo as tetraciclina, como a aureomicina identificada por Duggar (DUGGAR, 1948), os aminoglicosídeos, como a estreptomicina descrita por Schatz (SCHATZ; BUGIE; WAKSMAN, 2005), e o cloranfenicol, relatado por John Ehrlich (EHRlich et al., 1947), entre muitas outras classes. Estima-se que cerca de dois terços dos antibióticos conhecidos atualmente sejam derivados de espécies de *Streptomyces* (QUINN et al., 2020; XIA et al., 2020). Ao longo do tempo, também foram caracterizados antibióticos produzidos por bactérias de outros gêneros e por fungos, além do desenvolvimento contínuo de novos antimicrobianos sintéticos (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

2.2 O SURGIMENTO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

O entusiasmo gerado pela sucessiva descoberta de novos antimicrobianos levou, nas décadas iniciais de uso desses fármacos, um forte otimismo entre médicos e pesquisadores. Esse cenário, porém, mostrou-se passageiro, pois cepas

bacterianas resistentes aos antimicrobianos já vinham sendo descritas e continuaram a emergir de forma expressiva nas décadas seguintes (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013).

Apesar da natureza revolucionária da descoberta da penicilina por Fleming, a primeira cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a esse antibiótico foi relatada já em 1940 (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Para tentar contornar essa limitação, a meticilina foi introduzida clinicamente em 1959, porém, em apenas um ano também surgiram relatos de cepas resistentes a esse fármaco (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013). A trajetória da antibioticoterapia passou então a seguir um padrão recorrente, com a descoberta de um novo agente, sua incorporação na prática clínica, surgimento da resistência aos antimicrobianos e posterior substituição ou complementação por outro fármaco (**Figura 1**).

Atualmente, o fenômeno da resistência aos antimicrobianos é um problema global que gera grandes impactos para a economia e saúde mundial (WHO, 2022). Um estudo amplamente mencionado quando se aborda esse tema (NAGHAVI et al., 2024), estima que o número de mortes relacionadas de alguma forma a RAM até 2050 pode chegar a 8,22 milhões, e 1,91 milhões poderão ser diretamente atribuídas a esse problema.

Apesar da resistência bacteriana ser enfrentado pela humanidade desde o início do século XX, tal fenômeno é muito mais remoto na história do planeta (SPAGNOLO; TRUJILLO; DENNEHY, 2021). As moléculas produzidas pelos microrganismos que são de interesse clínico também expressam significativa importância na natureza, desempenhando papéis diretamente relacionados a competição entre microrganismos, sinalização química, relação parasita-hospedeiro, e sua evolução e adaptação aos ambientes. (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013). Dessa forma, considerando que os microrganismos habitam o planeta há bilhões de anos, os mecanismos de resistência datam de épocas muito mais antigas do que imaginamos.

2.3 O GRUPO *ESKAPE*

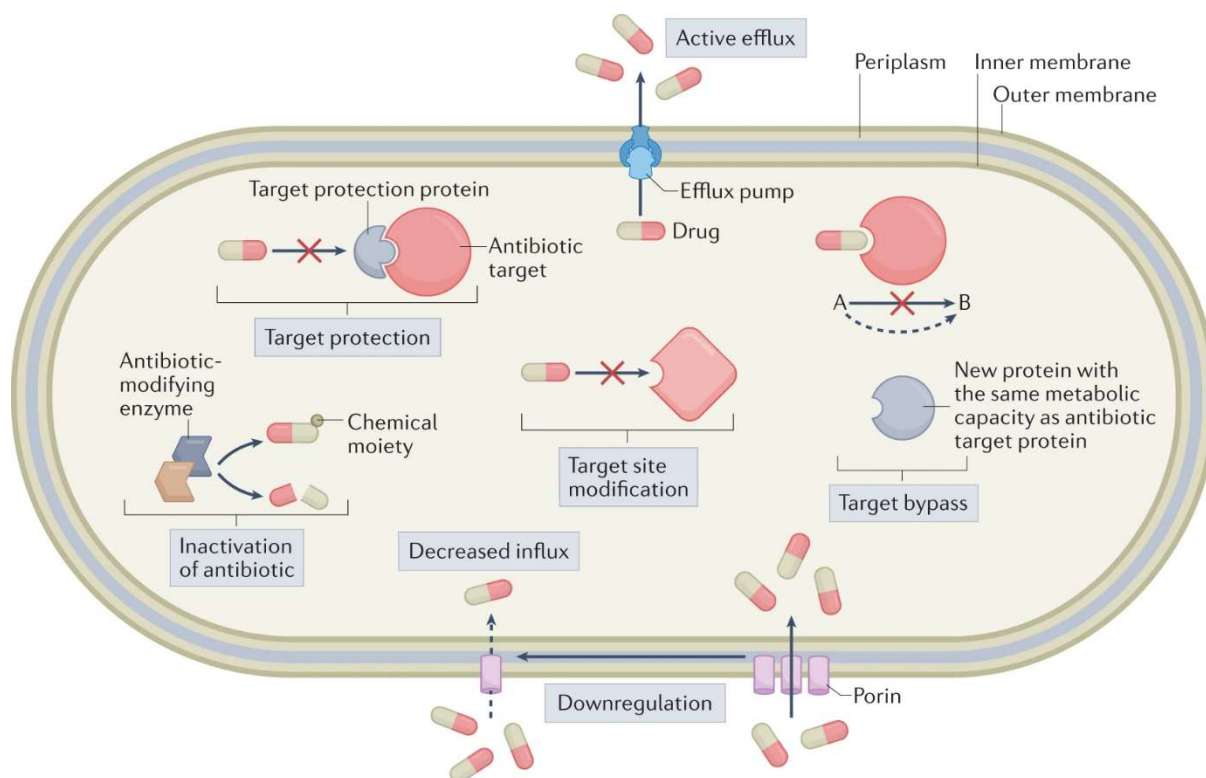
Entre os principais patógenos associados à RAM, alguns se destacam como centrais no cenário clínico atual. A OMS organiza esses microrganismos em patógenos de prioridade crítica, como o caso de *Acinetobacter baumannii*, foco deste

estudo, mas também Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos, Enterobacterales resistentes a cefalosporinas de terceira geração e *Mycobacterium tuberculosis* resistente à rifampicina. Como prioridade alta, destacam-se *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Salmonella Typhi* resistente a Fluoroquinolonas. Já como prioridade média, temos estreptococos do grupo A resistentes a macrolídeos e estreptococos do grupo B resistentes à penicilina (WHO, 2024).

Em paralelo a essa classificação, difundiu-se na literatura o acrônimo ESKAPE, que reúne *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.*, por vezes expandido para incluir *Escherichia coli* (RUEKIT et al., 2022). Dentro desse grupo, ganham destaque clínico cepas como *E. faecium* resistente à vancomicina (VREfm), *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (CRKP), *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAB) e *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos (CRPA) (MILLER; ARIAS, 2024).

A inclusão desses microrganismos em um mesmo grupo decorre não apenas de sua relevância em ambiente hospitalar, mas também de características compartilhadas de resistência intrínseca e adquirida (DE OLIVEIRA et al., 2020; MILLER; ARIAS, 2024). Evidências indicam que, por mutações e pela aquisição de elementos genéticos móveis, bactérias ESKAPE desenvolveram resistência frente a oxazolidinonas, lipopeptídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina, β -lactâmicos, combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamase e antibióticos de última escolha, como carbapenêmicos, glicopeptídeos e algumas polimixinas (DE OLIVEIRA et al., 2020; NAYLOR et al., 2018; ZAMAN et al., 2017). De forma geral, seus mecanismos podem ser agrupados em: inativação ou modificação do antimicrobiano, alteração do sítio-alvo, redução da penetração e acúmulo do fármaco, entre outros (**Figura 2**) (DE OLIVEIRA et al., 2020).

A crescente preocupação global com a RAM, reforçada por instituições como CDC (*Centers for Disease Control*) e OMS, tem direcionado esforços científicos e recursos econômicos não apenas para o entendimento desses patógenos multirresistentes, mas também para a busca de novas estratégias terapêuticas, impulsionando o desenvolvimento de alternativas aos antimicrobianos convencionais (WHO, 2022).

Figura 2 – Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Fonte: Darby (2023).

2.4 ACINETOBACTER BAUMANNII

Os primeiros estudos envolvendo o gênero *Acinetobacter* começaram em 1911 com a descoberta da espécie *Micrococcus calcoaceticus* por Martinus Beijerinck (BEIJERINCK, 1911). Posteriormente, ela foi renomeada como *Bacterium antitratum* (SCHAUB; HAUBER, 1948), *Diplococcus mucosus* (LINZENMEIER, 1955), *Moraxella lwoffii* (PIECHAUD, 1951), *M. glucidolytica* (PIECHAUD, 1956) e *Neisseria winogradskyi* (LEMOIGNE; GIRARD, 1952). O gênero e a nomenclatura atuais só surgiram após o estabelecimento do gênero *Acinetobacter* em 1957 e das análises moleculares conduzidas por Bouvet & Grimont (BOUVET; GRIMONT, 1986). O nome da espécie "*baumannii*" homenageia os bacteriologistas americanos Paul e Linda Baumann.

As espécies do gênero *Acinetobacter* são caracterizadas como cocobacilos medindo 0,9–1,6 µm de diâmetro e 1,5–2,5 µm de comprimento, mantendo sua morfologia cocobacilar durante a fase estacionária (BAUMANN; DOUDOROFF; STANIER, 1968), embora cepas de *A. baumannii* sensíveis à polimixina possam

apresentar morfologia em bastonete durante a fase logarítmica, alongando-se na fase estacionária (SOON, 2009), ou até mesmo assumindo uma forma mais cocóide e reduzida, com alterações topográficas em resposta à dessecação e à privação de oxigênio (BASHIRI et al, 2021).

A. baumannii é, portanto, uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Moraxellaceae* (PARTE et al, 2020), descrita em 1986 por Bouvet e Grimont, que definiram sua cepa-tipo (ATCC 19606) originalmente isolada de uma amostra de urina, formando colônias circulares, convexas, lisas e ligeiramente opacas, capazes de crescer entre 15–44 °C (BOUVET; GRIMONT, 1986). *A. baumannii* ganhou significativa relevância clínica principalmente devido ao seu envolvimento em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Sua capacidade de tolerar dessecação, variações de temperatura e pH, e condições pobres em nutrientes, bem como sua alta capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, combinada ao rápido surgimento como patógeno global devido às altas taxas de resistência antimicrobiana, torna-o uma ameaça crítica à saúde pública mundial, principalmente devido à sua propensão a adquirir de forma facilitada múltiplos fenótipos de resistência a fármacos (BASHIRI et al, 2021, WHO, 2024).

Em 2021, *A. baumannii* foi a segunda principal causa bacteriana de mortes no mundo, ficando atrás apenas de *Staphylococcus aureus*. O fenótipo CRAB (*Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii*) representou a combinação patógeno-antibiótico com aumento de mais de 25.000 mortes anuais atribuíveis entre 1990 e 2021, totalizando 78.100 mortes em todo o mundo (NAGHAVI et al, 2024). A OMS classificou CRAB como um patógeno crítico para pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias de controle, devido à sua alta mortalidade, baixa tratabilidade e à escassez de novas drogas em desenvolvimento (WHO, 2024).

Trata-se de um patógeno capaz de causar uma série de infecções nosocomiais em vários locais anatômicos, geralmente de caráter oportunista e implicando em diversas infecções que afetam principalmente pacientes críticos em UTIs (ZHANG et al., 2025; CAVALLO et al., 2023; MUKHOPADHYAY; BAIRAGI, 2024). As infecções por *A. baumannii* adquiridas em ambiente hospitalar incluem: pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções de pele e tecidos moles, infecções de feridas, infecções do trato urinário, meningite secundária, e infecções da corrente sanguínea (ZHANG et al., 2025; CAVALLO et al., 2023; PHILLIPS et al., 2025). As manifestações clínicas mais frequentes são pneumonia associada à ventilação mecânica e infecção

da corrente sanguínea (CAVALLO et al., 2023), ambas associadas a morbidade e mortalidade consideráveis, que podem chegar a 52% (INCHAI et al., 2015; CAVALLO et al., 2023; ZHANG et al., 2025).

Além disso, as infecções causadas por *A. baumannii* representam cerca de 2% de todas as IRAS nos Estados Unidos e na Europa (MAGILL et al., 2014; LOB et al., 2016); no entanto, essas taxas são duas vezes maiores na Ásia e no Oriente Médio. Embora as taxas de infecção sejam menores do que as causadas por outros patógenos Gram-negativos, globalmente, cerca de 45% de todos os isolados são considerados multirresistentes (MDR), com taxas que chegam a 70% na América Latina e no Oriente Médio (GIAMMANCO et al., 2017).

Na atualidade, o tratamento disponível para cepas CRAB inclui polimixinas, como colistina e polimixina B, ambas amplamente utilizadas globalmente, apesar de sua nefrotoxicidade, bem como tetraciclina e β -lactâmicos em combinação com inibidores de β -lactamase, como sulbactam, durlobactam e cefiderocol (IOVLEVA; FOWLER; DOI, 2024).

Atualmente, há mais de 50 espécies designadas de *Acinetobacter*, das quais a esmagadora maioria é considerada não patogênica, somente algumas espécies selecionadas são patógenos humanos oportunistas. Os membros clinicamente mais relevantes do gênero *Acinetobacter* se agrupam filogeneticamente no complexo *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* (ACB). O complexo ACB consiste em cinco espécies patogênicas: *A. baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter seifertii* e *Acinetobacter dijkshoorniae*, bem como uma espécie não patogênica, *Acinetobacter calcoaceticus* (MULESHKOVA et al., 2025; WONG et al., 2017).

A relação genética entre os membros do complexo ACB e suas semelhanças fenotípicas podem indicar que compartilham fatores de virulência comuns, tornando os estudos em *A. baumannii* potencialmente aplicáveis a outras espécies patogênicas de *Acinetobacter* (DJAHANSCHIRI et al., 2020). Nesse contexto, a disseminação global de *A. baumannii* está intimamente ligada ao surgimento de linhagens clonais de alto risco, particularmente os chamados *global clones* 1 (GC1) e 2 (GC2), que concentram a maior parte dos isolados multirresistentes e CRAB envolvidos em surtos hospitalares em todo o mundo (SHELENKOV; AKIMKIN; MIKHAYLOVA, 2023; BOUTZOUKAS; DOI, 2025; HOLT et al., 2016). Esses clones carregam ilhas de resistência complexas, compostas por transposons, integrons e diversos genes de

resistência a β -lactâmicos, aminoglicosídeos e demais classes farmacológicas, o que favorece a persistência de fenótipos MDR e XDR em UTIs. A caracterização dessas linhagens por tipagem molecular (como MLST, PFGE e, mais recentemente, sequenciamento genômico completo), tornou-se ferramenta essencial para vigilância epidemiológica, rastreamento de surtos e compreensão da dinâmica de transmissão intra-hospitalar (SHELENKOV; AKIMKIN; MIKHAYLOVA, 2023; HIGGINS et al., 2017; BOUTZOUKAS; DOI, 2025).

Do ponto de vista molecular, a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* é principalmente mediada pela produção de β -lactamases do tipo OXA (particularmente OXA-23, OXA-24/40 e OXA-58), frequentemente associadas a elementos de inserção como ISAb₁, que atuam como promotores fortes e aumentam a expressão gênica (WONG et al., 2019). Metallo- β -lactamases de classe B, como NDM, VIM e IMP, também têm sido descritas, embora com menor prevalência, contribuindo adicionalmente para o fenótipo CRAB em determinados contextos geográficos. Outros mecanismos incluem perda ou modificação de porinas da membrana externa, hiperexpressão de bombas de efluxo e alterações nos alvos dos antimicrobianos, resultando em redução da permeabilidade e aumento da inativação de drogas. A resistência à colistina, muitas vezes utilizada como última linha terapêutica, está associada principalmente a modificações do lipopolissacarídeo (LPS) ou até à perda do LPS, reduzindo a afinidade do fármaco pela membrana externa.

Além do robusto arsenal de resistência, *A. baumannii* exibe um repertório amplo de fatores de virulência que contribuem para colonização, evasão imune e sobrevivência em ambientes hostis. Entre eles, destacam-se a cápsula polissacarídica, cuja espessura e composição está relacionada com maior virulência, tolerância à dessecação, resistência a desinfetantes e proteção contra fagocitose (SINGH; ADAMS; BROWN, 2019; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). A formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas é outro determinante central, sustentada pela expressão de *pilis* do tipo *Csu*, proteínas de adesão como *Bap* e por sistemas de *quorum sensing* que modulam a transição entre crescimento planctônico e sésil (AHMAD et al., 2023; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). Sistemas de captação de ferro, como a produção do sideróforo acinetobactina, proteínas de membrana externa, fosfolipases, proteases e sistemas de secreção também desempenham papel crítico na adaptação ao hospedeiro e na patogênese (HARDING;

HENNON; FELDMAN, 2018).

Ecologicamente, *A. baumannii* destaca-se pela notável capacidade de sobreviver por semanas ou meses em superfícies secas, incluindo leitos, grades, bombas de infusão, ventiladores mecânicos, maçanetas e outras superfícies hospitalares (WENDT et al., 1997; ZEIDLER; MÜLLER, 2019), o que favorece a transmissão cruzada entre pacientes por meio das mãos de profissionais de saúde e de equipamentos contaminados. Isolados também têm sido recuperados de água, solo e ambientes externos, sugerindo um reservatório ambiental mais amplo que pode atuar como fonte para a introdução do patógeno em unidades de saúde (AHUATZIN-FLORES; TORRES; CHÁVEZ-BRAVO, 2024). Essa combinação de tolerância ambiental, formação de biofilme e resistência antimicrobiana sustenta a permanência prolongada de clones de alto risco em hospitais, mesmo diante de medidas de controle.

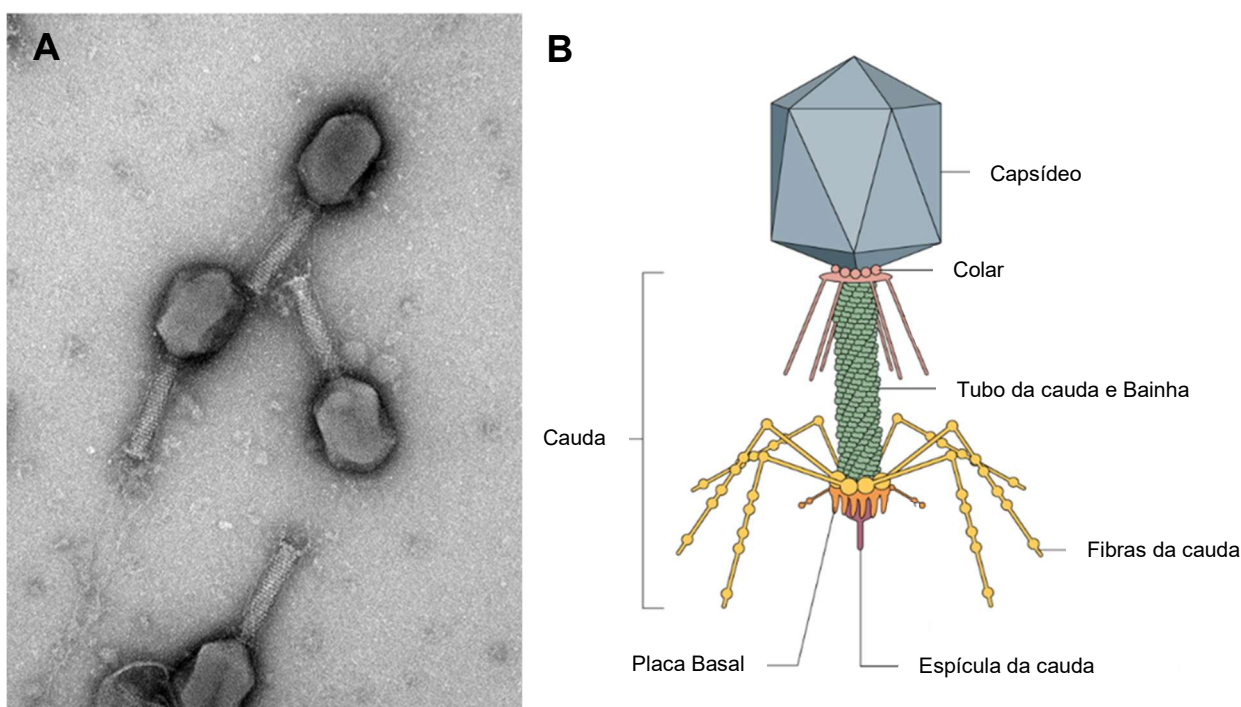
Frente à expansão global de CRAB e às opções terapêuticas limitadas, diversas estratégias alternativas vêm sendo exploradas. Novos esquemas baseados em sulbactam, particularmente em combinações com inibidores de β -lactamase de última geração, e o uso de cefiderocol e eravaciclina têm apresentado atividade promissora contra isolados MDR e XDR em estudos clínicos e pré-clínicos (KARRULI et al., 2023). Além disso, abordagens não convencionais, como nesse caso a terapia com bacteriófagos, vêm sendo investigadas como aliados ou alternativas à antibioticoterapia tradicional para o manejo de infecções graves por *A. baumannii*.

2.5 BACTERIÓFAGOS

Bacteriófagos, ou fagos, são vírus encontrados em praticamente todos os tipos de ambiente, aquáticos e terrestres, e infectam de forma específica células bacterianas. Estimam-se cerca de 10^{31} partículas fágicas na biosfera, o que os torna as entidades biológicas mais abundantes conhecidas. Apesar de atualmente ganhar destaque como estratégia terapêutica alternativa, a descoberta dos bacteriófagos e seu uso na chamada Fagoterapia remontam ao início do século XX (SALMOND; FINERAN, 2015). Os fagos foram identificados por Frederick Twort, em 1915, na Inglaterra, durante tentativas de desenvolver uma vacina em meio artificial sem necessidade de célula hospedeira (TWORT; LOND, 1915), e por Felix d'Herelle, em 1917, em Paris, ao investigar um surto de disenteria em soldados da Primeira Guerra

Mundial, sendo este o primeiro a propor o termo “bacteriófago”. Em 1919, d’Herelle realizou um dos primeiros usos terapêuticos documentados, tratando um menino de 12 anos com disenteria no *Hôpital des Enfants-Malades*, em Paris, com recuperação completa do paciente e de outros três tratados com a mesma suspensão fágica.

Figura 3 – Representação da morfologia viral de bacteriófagos. **A:** Morfologia de um fago observado por Micrografia Eletrônica de Transmissão, com ampliação de 150.000×. **B:** Esquema das estruturas que compõem um bacteriófago.



Fonte: **A:** ZHAO (2019). **B:** o próprio autor (2026)

Esse sucesso inicial despertou grande entusiasmo na comunidade científica, levando à aplicação clínica da fagoterapia em diferentes tipos de infecção e ao início da comercialização de preparações fágicas direcionadas a variados patógenos bacterianos (SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001). Nesse contexto, em 1923 foi fundado o Instituto Eliava, em Tbilisi, por George Eliava em colaboração com d’Herelle, que se consolidou como centro de referência em fagoterapia e permanece em atividade na Geórgia até hoje.

Contudo, o entusiasmo em torno da fagoterapia diminuiu progressivamente. No final da década de 1930, o *Council on Pharmacy and Chemistry* da *American Medical Association* considerou a eficácia da fagoterapia como incerta e reforçou a

necessidade de pesquisas mais aprofundadas para estabelecer sua viabilidade (SALMOND; FINERAN, 2015; SUMMERS, 2001).

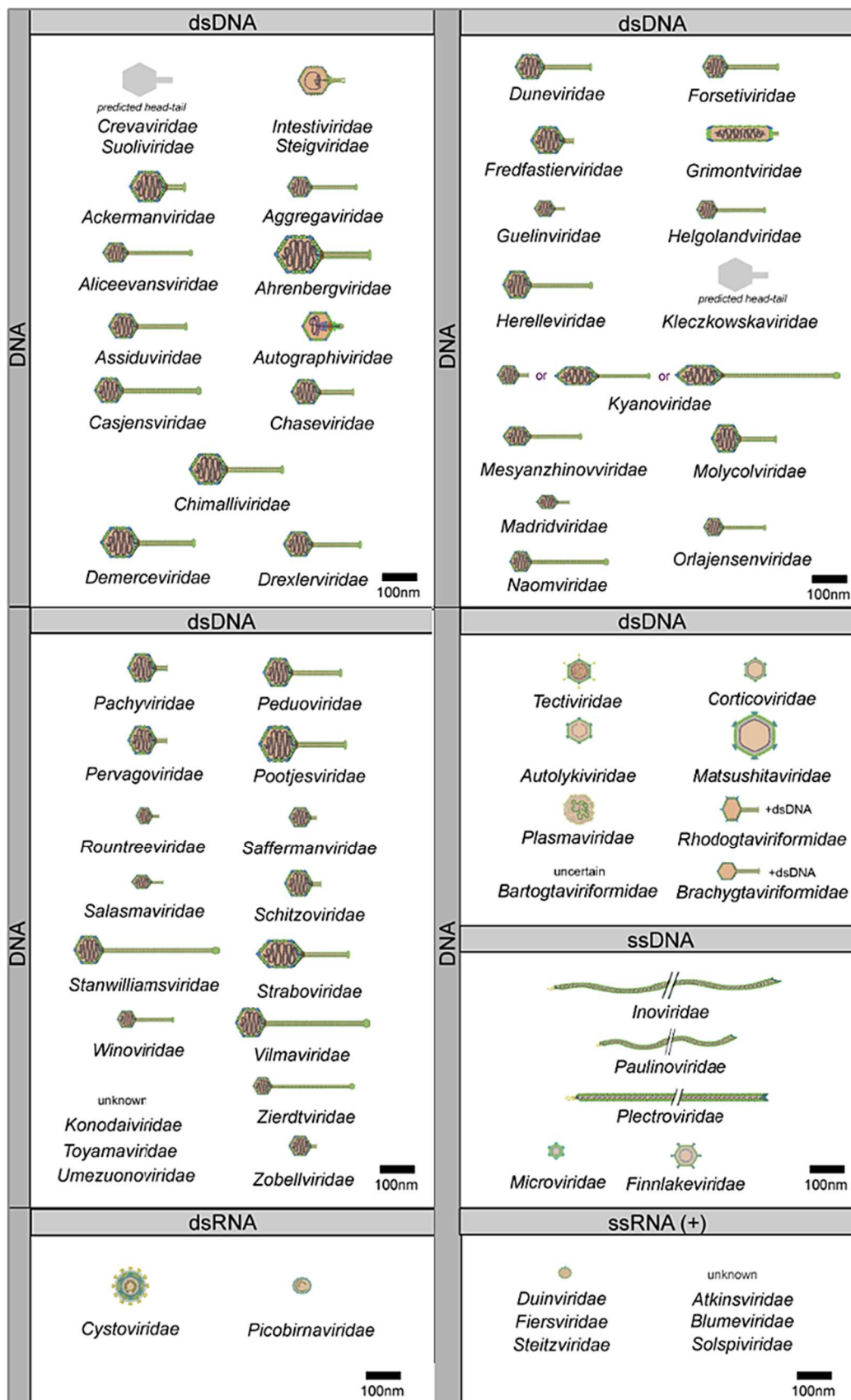
Ao mesmo tempo, os primeiros antibacterianos sintéticos e naturais começaram a ser introduzidos e amplamente utilizados, especialmente durante a Segunda Guerra Mundial, o que contribuiu para o declínio da fagoterapia em grande parte do mundo, com exceção da então URSS e de alguns países do Leste Europeu, onde a pesquisa e o uso clínico de fagos continuaram por décadas (ABEDON et al., 2011; SALMOND; FINERAN, 2015). Fora desses locais, principalmente no lado ocidental, o interesse pela fagoterapia retornou apenas na década de 1980, com os trabalhos de Smith e Huggins (SMITH; HUGGINS, 1982, 1983; SMITH; HUGGINS; SHAW, 1987a, 1987b).

Atualmente, a fagoterapia é vista como uma ferramenta promissora e alternativa diante da crescente resistência antimicrobiana, especialmente frente a bactérias multirresistentes (MDR), capazes de causar infecções graves e fatais. Diversos relatos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado a eficácia e segurança do uso de bacteriófagos no tratamento de infecções por bactérias MDR, assim como no caso de *A. baumannii*, reforçando seu potencial como alternativa ou complemento aos antimicrobianos convencionais (GORDILLO ALTAMIRANO; BARR, 2019).

Assim como outros vírus, os fagos atuam como parasitas intracelulares obrigatórios, dependentes da célula hospedeira para sua replicação (CLOKIE et al., 2011; GORDILLO ALTAMIRANO; BARR, 2019; SALMOND; FINERAN, 2015). A morfologia dos fagos é bastante diversa e se adapta às condições do ambiente e ao tipo de hospedeiro, sempre focando no objetivo principal de assumir controle da maquinaria metabólica bacteriana para produção de novas partículas virais. Sua organização estrutural é relativamente simples, pois o genoma pode ser constituído por ácido ribonucleico (RNA) ou ácido desoxirribonucleico (DNA), em fita simples ou dupla, e o capsídeo pode apresentar formas poliédricas, caudadas, filamentosas ou pleomórficas, com ou sem envelope (**Figura 3**) (NAUREEN et al., 2020).

Quanto a sua taxonomia, os bacteriófagos são classificados pelo *Bacterial and Archaea Viruses Subcommittee* (BAVS) do International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV). Anteriormente, essa classificação baseava-se principalmente em características morfológicas, agrupando assim os fagos em famílias como Myoviridae,

Figura 4 – Características morfológicas e genéticas das famílias dos bacteriófagos



Fonte: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2024).

Siphoviridae, Podoviridae, Inoviridae, Microviridae, Ackermannviridae e Herelleviridae, das quais a maior parte pertencia à ordem Caudovirales (ADRIAENSSENS et al., 2018; SIMMONDS et al., 2017; WALKER et al., 2019).

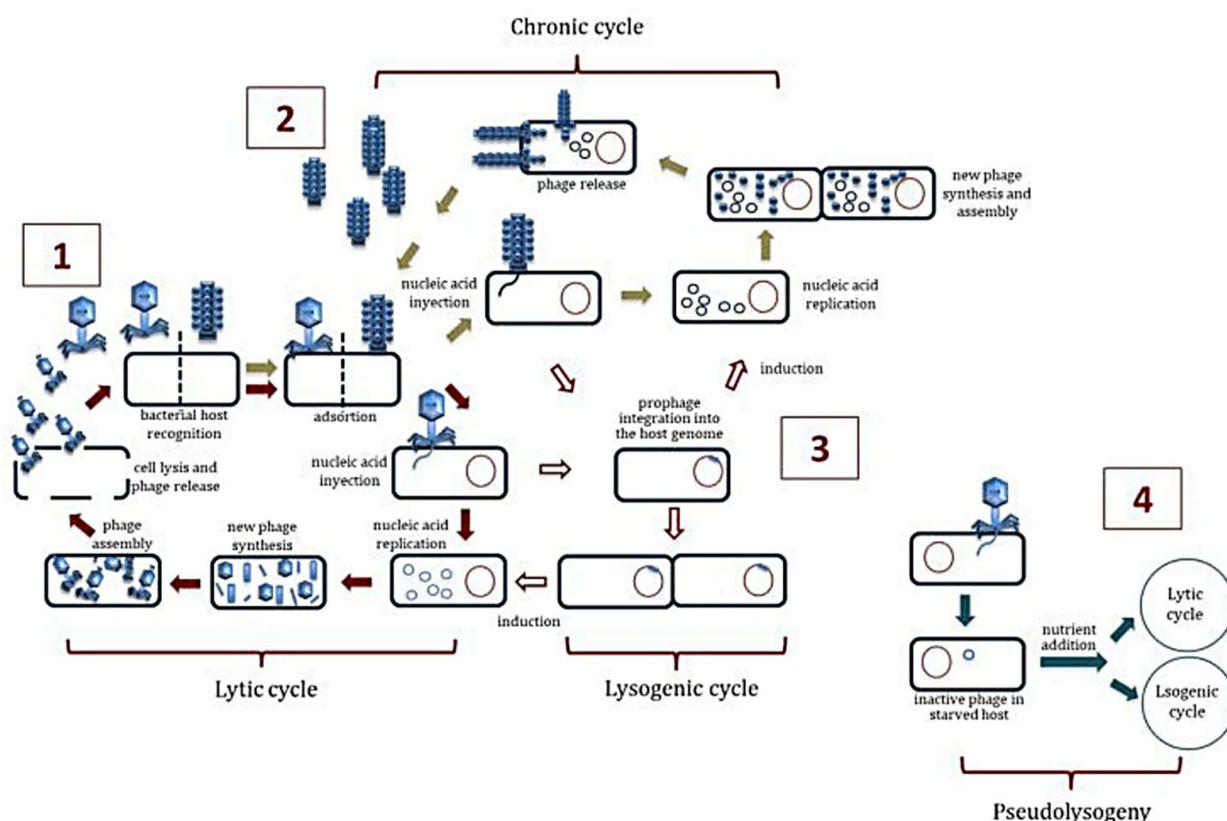
Com as revisões recentes, o componente essencial para caracterização moderna de fagos tornou-se a análise genômica, que atualmente serve como base para a classificação viral de acordo com o ICTV, que a partir de 2022 definiu a análise genômica comparativa como fundamento para sua identificação. Dessa forma, a ordem Caudovirales foi extinta e seus membros passaram a integrar a classe Caudoviricetes, além disso, as famílias Myoviridae, Podoviridae e Siphoviridae foram descontinuadas, com suas antigas subfamílias sendo elevadas ao nível de família. Atualmente, o agrupamento dos fagos considera não apenas a morfologia, mas, sobretudo, à similaridade genética entre os membros de um mesmo grupo (TURNER; KROPINSKI; ADRIAENSSENS, 2021).

Do ponto de vista funcional, os fagos se propagam em suas interações parasita-hospedeiro com base em diferentes ciclos de replicação, que podem ser classificados em quatro tipos principais: (1) lítico, (2) crônico e (3) lisogênico (**Figura 4**) (CLOKIE et al., 2011; NAUREEN et al., 2020; SIEIRO et al., 2020).

No ciclo lítico (1), o fago adere a receptores específicos na célula bacteriana, injeta seu genoma e passa a explorar a maquinaria metabólica da hospedeira para produzir novas partículas virais, que são liberadas pela lise da parede celular, resultando na morte da bactéria e na disseminação de vírions para novas infecções. No ciclo de infecção crônica (2), o processo inicial é semelhante, mas os vírions recém-formados são liberados sem lise, permitindo que a célula hospedeira permaneça viável enquanto continua a produzir partículas fágicas.

No ciclo lisogênico (3), após a adsorção e injeção do material genético, o genoma fágico integra-se ao cromossomo bacteriano, passando a ser denominado prófago e sendo replicado e herdado pelas células descendentes até que um estímulo desencadeie sua indução para o ciclo lítico. Já no ciclo pseudo-lisogênico (4), uma variante do lisogênico, o genoma do fago permanece na célula hospedeira em estado não replicativo e inativo, condição que provavelmente ocorre em situações de limitação nutricional, nas quais não há energia suficiente para a expressão gênica viral, porém com o restabelecimento das condições nutricionais, o fago pode então seguir para o ciclo lítico ou lisogênico a depender de suas características (CENENS et al., 2013; SIEIRO et al., 2020).

Figura 5 – Eventuais ciclos de replicação dos Bacteriófagos



Fonte: Sieiro (2020).

2.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE BACTERIÓFAGOS E ANTIMICROBIANOS

A associação entre bacteriófagos e antimicrobianos tem emergido como uma estratégia promissora para enfrentar a crescente prevalência de cepas MDR, especialmente entre patógenos do grupo ESKAPE, como *A. baumannii*. Nessa abordagem, os fagos podem atuar de forma complementar ou sinérgica aos antimicrobianos convencionais, explorando mecanismos de ação distintos. A sinergia terapêutica ocorre quando o efeito combinado de dois agentes é maior do que a soma de seus efeitos individuais (DOERN, 2014). Nesses casos, enquanto os antibióticos interferem em alvos específicos da célula bacteriana (síntese de parede, replicação de DNA, síntese proteica, entre outros), os fagos promovem lise bacteriana por infecção viral produtiva, podendo ainda remodelar a estrutura da população bacteriana por meio de pressão seletiva (GORDILLO ALTAMIRANO et al., 2022; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). Esse duplo ataque reduz a probabilidade de sobrevivência e pode retardar o surgimento de resistência adicional.

Do ponto de vista microbiológico, diferentes perfis de interação têm sido descritos entre fagos e antibióticos, variando de sinergismo a antagonismo, passando até por efeitos aditivos. Em cenários sinérgicos, a atividade fágica pode favorecer a penetração do antibiótico, por exemplo, por degradação da matriz de biofilme ou por seleção de mutantes com alterações de superfície que, embora reduzam a susceptibilidade ao fago, aumentam a sensibilidade ao antibiótico (AKTURK et al., 2019; GORDILLO ALTAMIRANO et al., 2022). Em paralelo, subinibições de antibióticos podem modular a fisiologia bacteriana (como a taxa de crescimento, expressão de receptores de fagos ou de sistemas de defesa) de forma a facilitar a infecção fágica (GORDILLO ALTAMIRANO; BARR, 2019). Por outro lado, combinações inadequadas podem resultar em antagonismo, como situações em que antibióticos bacteriostáticos reduzem a taxa de replicação bacteriana a ponto de limitar a produção de novas partículas virais, comprometendo a eficácia da terapia fágica.

A sinergia fago-antibiótico (SFA) foi detectada pela primeira vez *in vivo* contra a colibacilose em frangos de corte (HUFF et al., 1944), mas o próprio termo foi cunhado três anos depois, ao observar como doses subinibitórias de antibióticos podiam aumentar o tamanho do *burst size* de fagos líticos *in vitro* (COMEAU et al., 2007). O conceito se expandiu com a descoberta de mais mecanismos pelos quais antibióticos e fagos potencializam os efeitos antibacterianos uns dos outros (GORDILLO ALTAMIRANO; BARR, 2019).

Do ponto de vista evolutivo, essa terapia combinada representa uma forma de induzir os chamados *trade-offs* adaptativos nas populações bacterianas (MANGALEA; DUERKOP, 2020; ZHANG; AHN et al., 2025). A pressão seletiva exercida por fagos frequentemente direciona mutações em receptores de superfície, sistemas de exopolissacarídeos ou estruturas capsulares, que podem acarretar, em alguns casos, na ressensibilização a determinadas classes de antibióticos (MANGALEA; DUERKOP, 2020). Esse fenômeno é particularmente relevante em *A. baumannii*, cuja cápsula e outros determinantes de superfície estão diretamente relacionados à virulência, à formação de biofilme e à resistência a antimicrobianos (SINGH; ADAMS; BROWN, 2019; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).. A exploração estratégica desses *trade-offs*, por meio da seleção de fagos com perfis específicos de receptor e de combinações apropriadas com controle da melhor dose, pode abrir caminho para formas de tratamento alternativas, porém eficientes contra cepas MDR e XDR.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver um coquetel de bacteriófagos com ação contra isolados clínicos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* obtidos de ambiente hospitalar, realizar as caracterizações *in vitro* dos fagos que compõem o coquetel e avaliar sua associação com antimicrobianos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bacteriófagos contra isolados clínicos multirresistentes de *A. baumannii* provenientes do ambiente hospitalar;
- Selecionar os melhores bacteriófagos isolados a fim de formular um coquetel;
- Realizar a análise *in vitro* dos bacteriófagos e definir seu *host range* frente ao banco de isolados hospitalares de *A. baumannii*;
- Analisar o índice de virulência de cada fago que compõe o coquetel frente os isolados de *A. baumannii*;
- Definir as melhores multiplicidades de infecção dos fagos que compõem o coquetel;
- Avaliar a atividade do coquetel formulado em testes *in vivo* utilizando larvas de *Galleria mellonella*;
- Avaliar o desempenho *in vitro* do coquetel em combinação com antibióticos no combate aos isolados de *A. baumannii*;
- Avaliar a atividade antibiofilme do coquetel em associação a antibióticos contra biofilmes de *A. baumannii*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

As bactérias foram cultivadas em meio *Lysogeny-Broth* (LB) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl) ou em placas de LB Ágar (LBA) (1,5% de ágar). Os experimentos de dupla camada de ágar foram realizados utilizando ágar LB semi-solidificado (LBSA) (0,7% de ágar), suplementado com 10 mM de CaCl₂. Placas de LBA suplementadas com 10 mM de CaCl₂ foram usadas para os ensaios de *Streak Spot Test*. O meio *Mueller Hinton* (MH) (17g/L de hidrolisado ácido de caseína, 2,0g/L de extrato de carne e 1,5g/L de amido de milho) foi utilizado para os experimentos de *Checkerboard* e CIM (Concentração Inibitória Mínima). Para a realização dos antibiogramas e dos testes mencionados acima, as bactérias foram cultivadas em MH Ágar (MHA) (1,5% de ágar). O tampão Saline-Magnesium (SM) (50 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, 8 mM de MgSO₄) foi utilizado para a diluição dos bacteriófagos.

4.2 ISOLADOS BACTERIANOS

Para a realização desse estudo, foram utilizados 63 isolados bacterianos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, selecionados por representarem amplo espectro de resistência sendo classificados como CRAB e provenientes de amostras hospitalares de sangue, secreção traqueal, feridas e partes moles que foram isolados entre 2023 e 2024. Essas bactérias foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Eliana Carolina Vespero, docente associada ao Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de Londrina (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina).

As bactérias foram armazenadas em meio BHI (Difco™ BHI) suplementado com 40% (v/v) de glicerol a -20°C ou em ágar estoque (4 g/L neopeptona, 2 g/L extrato de carne, 1 g/L NaCl, 12 g/L ágar) a temperatura ambiente, compondo a coleção de microrganismos do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada (LBBA-NIP3) do Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

4.3 ISOLAMENTO E PROPAGAÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS

O isolamento dos bacteriófagos foi realizado a partir de efluentes do Hospital Universitário de Londrina, conforme adaptações do protocolo descrito por Van Twest & Kropinski (2009). Para o processamento das amostras, alíquotas de 10 mL foram adicionadas em tubos cônicos estéreis de 15 mL, no qual foram adicionados 5% (v/v) de clorofórmio seguido de mistura por inversão cuidadosa durante 5 minutos e centrifugação a $5.000 \times g$ por 5 minutos. Realizou-se a coleta do sobrenadante, que foi então armazenado a 4°C até o uso.

Para o enriquecimento de bacteriófagos, em tubos cônicos estéreis de 50mL foram misturados 10 mL dos sobrenadantes processados, 15 mL de caldo LB 2x concentrado, suplementado com 10 mM de CaCl_2 , e 100 μL de cada cultura bacteriana em fase exponencial. Os tubos foram então incubados a 37 °C, sob agitação constante de 120 rpm, *overnight* (período de 18 a 24 horas). Após a incubação, retirou-se uma alíquota do cultivo, em que foi realizado novamente o tratamento com 5% (v/v) de clorofórmio e centrifugação, conforme as condições descritas anteriormente. Ao final do processo, o sobrenadante enriquecido foi coletado e armazenado a 4 °C para os testes posteriores.

A possível presença de bacteriófagos nos sobrenadantes enriquecidos foi observada através do método de triagem de *Streak Spot Test* (SST). Para o teste, com auxílio de uma alça de platina, foram feitas estrias com os isolados de *A. baumannii*; previamente cultivadas *overnight* em caldo LB; em placas LBA suplementadas com 10 mM de CaCl_2 . Em seguida, alíquotas de 5 μL de cada sobrenadante enriquecido foram aplicadas sobre as estrias e posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para posterior leitura de eventuais zonas de inibição ou descontinuidade do crescimento bacteriano.

4.4 SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS

Foram considerados positivos os resultados das amostras que apresentaram zonas de descontinuidade e/ou inibição do crescimento bacteriano no SST. Esses isolados foram submetidos ao experimento de dupla camada de ágar para a seleção e propagação dos bacteriófagos, conforme descrito por Van Twest e Kropinski (2009) e Stachurska et al. (2021).

Para isso, em tubos cônicos estéreis contendo 5 mL de LBSA suplementado, previamente aclimatados a 50°C, foram adicionados 100 µL da cultura bacteriana suscetível (identificada no SST) e 100 µL da diluição do lisado de interesse. O conteúdo foi homogeneizado cuidadosamente, vertido sobre placas de LBA e, após a solidificação, incubado *overnight* a 37°C.

A presença de bacteriófagos foi confirmada pelo aparecimento de placas de lise (plaques). Para a seleção, foram utilizadas características morfológicas como turbidez e diâmetro para a identificação de fagos distintos.

Os plaques selecionados foram coletados com auxílio de pipetas Pasteur e transferidos para tubos contendo a bactéria hospedeira, em fase exponencial, cultivada em caldo LB suplementado. Esse inóculo foi incubado *overnight* a 37 °C. Após esse período, realizou-se a extração dos bacteriófagos utilizando a metodologia de clorofórmio e centrifugação previamente descrita. Os sobrenadantes foram diluídos (1:10) e submetidos a uma nova etapa de seleção em placa. Esse procedimento foi repetido três vezes ou até que fosse obtida uma morfologia uniforme de plaques.

A quantificação da concentração dos bacteriófagos isolados foi realizada também utilizando o método de dupla camada de ágar previamente descrito (GLONTI, PIRNAY, 2022; RIBEIRO ET AL., 2023). Em tubos cônicos estéreis contendo 5 mL de LBSA suplementado, previamente aclimatados a 50°C, foram adicionados 100 µL do inóculo da bactéria hospedeira específica (mesmo isolado utilizado para o isolamento do fago). O conteúdo foi homogeneizado cuidadosamente, vertido sobre placas de LBA para solidificação. Alíquotas de 10 µL de diluições seriadas dos bacteriófagos (1:10) foram adicionadas sobre a superfície do ágar e, posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C *overnight*. O título viral foi determinado pela contagem das Unidades Formadoras de Placa (UFP) e expresso em UFP/mL.

Após as etapas iniciais previamente descritas, os quatro bacteriófagos que apresentaram maior abrangência contra os isolados de *A. baumannii* foram selecionados para os experimentos subsequentes de caracterização do espectro de hospedeiros (*host range*). Os fagos selecionados phAb568, phAb570, phAb586 e phAb598, foram nomeados utilizando o prefixo 'ph' (bacteriófago), seguido pela sigla da espécie bacteriana e pela identificação da cepa hospedeira na qual foram isolados. Tais fagos foram selecionados principalmente considerando os resultados de seus espectros de hospedeiros frente ao ensaio de *Spot test* realizado posteriormente a essas etapas iniciais.

4.5 DETERMINAÇÃO DO *HOST RANGE*

O espectro de hospedeiros (*host range*) dos bacteriófagos isolados foi determinado em relação aos 63 isolados bacterianos de *A. baumannii* pelos métodos de *Spot Test* (VAN TWEST; KROPINSKI, 2009; GLONTI; PIRNAY, 2022), Eficiência de Plaqueamento (EOP) e Índice de Virulência (Vi).

4.5.1 *Spot test*

Esse experimento foi realizado seguindo a metodologia de dupla camada de ágar previamente descrita. Alíquotas de 10 µL dos fagos em concentração estoque foram aplicadas sobre as placas com a camada de LBSA suplementado e incubadas *overnight* a 37 °C. Após o período de incubação, a atividade lítica foi avaliada qualitativamente, sendo categorizada em: três cruces (+++) para zonas de lise totalmente límpidas; duas cruces (++) para zonas de lise parcialmente límpidas ou com colônias resistentes visíveis; uma cruz (+) para zonas de lise opacas; e zero (0) quando não houve a formação de zonas de lise.

Os resultados do ST foram compilados e visualizados por meio de heatmaps, gerados no *software* R (versão 4.3.1). As categorias visuais foram convertidas em números equivalentes as cruces (0,1,2 e 3).

4.5.2 Eficiência de Plaqueamento Relativa (EOP)

As cepas que apresentaram sensibilidade aos bacteriófagos em zonas de inibição pelo ensaio de ST foram selecionadas para o ensaio de EOP (MIRZAEI; NILSSON, 2015; RIBEIRO et al, 2023), realizando a mesma metodologia de dupla camada de ágar utilizada para a quantificação dos bacteriófagos.

A EOP foi calculada para cada fago com base na razão entre o isolado bacteriano em que foram obtidas a maior contagem de placas de lise (chamado aqui de hospedeiro) e os outros isolados testados (teste), de forma que:

$$EOP = \frac{(UFP.mL - 1 \text{ teste})}{(UFP.mL - 1 \text{ hospedeiro})}$$

A EOP para a combinação fago-bactéria foi realizada conforme os critérios: "Alto" para razões $\geq 0,5$; "Intermediário" para razões entre $\geq 0,1$ e $< 0,5$; "Baixo" para razões $> 0,001$ e $< 0,1$; e "Ineficiente" para razões $\leq 0,001$ (MIRZAEI; NILSSON, 2015). Os valores de EOP foram compilados e a análise dos resultados foi realizada através da construção de *heatmaps*, gerados no *software* R (versão 4.3.1).

4.5.3 Índice de Virulência (VI)

A atividade lítica em meio líquido foi avaliada para todos os isolados que apresentaram algum valor de EOP. O procedimento foi realizado com adaptações dos protocolos descritos por Storms et al. (2020), Haines et al. (2021) e Ribeiro et al. (2023).

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, aos quais foram adicionados inicialmente 100 μL de meio LB 2x concentrado e suplementado. Em seguida, acrescentaram-se 50 μL das diluições seriadas do bacteriófago, distribuídas de modo a testar, individualmente, MOIs teóricas variando de 1 a 10^{-7} contra o inóculo bacteriano. Nos controles de crescimento e de esterilidade, adicionaram-se 50 μL de tampão SM. Paralelamente, o isolado de *A. baumannii*, cultivado em LBA, foi ajustado em escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em solução salina (0,85% NaCl). Alíquotas de 50 μL desse inóculo foram adicionadas aos poços de tratamento e ao controle positivo. A placa teve a tampa removida e foi selada com filme de PVC plastificado permeável a gases previamente esterilizado.

A incubação foi realizada a 37°C em leitor de microplacas (LMR-96I, Loccus®), com leituras de densidade óptica a 600nm (DO600) realizadas a cada 15 minutos, precedidas de agitação, durante 18 horas.

Os dados de absorbância obtidos para cada multiplicidade testada foram processados no *software Microsoft Office Excel* v.16.0, gerando curvas de crescimento baseadas na média dos valores.

Inicialmente calculou-se o valor da virulência local para cada grupo tratamento a partir da divisão da área sob a curva do grupo tratamento (A_i) pela área sob a curva do controle positivo de bactéria (A_0). O valor da área sob a curva foi calculado a partir da regra do trapézio para cada teste para os tempos de 0 a 18 horas. Os resultados foram então normalizados como valores teóricos mínimos e máximos de 0 e 1, respectivamente, conforme a fórmula:

$$v_i = 1 - \frac{A_i}{A_0}$$

O valor de v_1 para cada MOI foi colocado em uma nova curva (MOI x v_1) e a área dessa nova curva (A_P) foi calculada pela regra do trapézio. A área teórica máxima ($A_{máx}$) dessa curva também foi calculada pela regra do trapézio. Por fim, o valor de VI foi determinado para cada grupo tratamento pela divisão de A_P por $A_{máx}$, conforme a fórmula:

$$VI = \frac{A_p}{A_{máx}}$$

Os valores foram normalizados em uma escala de 0 a 1, em que um VI próximo a 1 reflete alta atividade lítica (elevada inibição do crescimento bacteriano), enquanto valores próximos a 0 indicam baixa virulência. O experimento de VI foi realizado para os fagos isolados e para o coquetel, composto pela associação dos quatro fagos em proporções iguais (1:1:1:1).

Para a análise comparativa, os resultados de VI foram agrupados em *heatmaps* gerados no *software* R (versão 4.3.1).

4.6 MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO

Para esse experimento, assumiu-se que os fagos foram totalmente absorvidos pela bactéria hospedeira, conforme metodologia descrita na literatura (ABEDON, 2018; KATSAOUNIS, 2018). Inicialmente, foram realizadas diluições seriadas (1:10) dos estoques de bacteriófagos em tampão SM para a obtenção de diferentes Multiplicidades de Infecção (MOI). As concentrações variaram de $1,5 \times 10^9$ UFP/mL (correspondente à MOI 10) até 15 UFP/mL (correspondente à MOI 10^{-7}). Alíquotas dessas diluições foram combinadas com igual volume de inóculo bacteriano ajustado na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em solução salina e inoculadas em caldo LB suplementado, mantendo-se a proporção volumétrica de 1:1:10. Os cultivos foram incubados a 37°C, sob agitação constante de 120 rpm, *overnight*. Após esse período, foram realizadas a extração e quantificação dos fagos, conforme metodologia descrita anteriormente. Os testes foram executados em triplicata para cada MOI.

Os resultados obtidos foram analisados e apresentados em forma de gráfico de barras criados pelo *software GraphPad Prism v.9.11*.

4.7 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA EM LARVAS DE *GALLERIA MELLONELLA*

Foi realizado o ensaio de sobrevivência *in vivo* em modelo alternativo de *Galleria mellonella*, seguindo protocolos previamente estabelecidos (NALE et al, 2021). Durante o preparo do experimento, as larvas de *G. mellonella* foram selecionadas pelo seu tamanho (200-250 mg) e coloração (creme). Antes de cada uma das injeções, as larvas foram submetidas à antissepsia com etanol a 70% (v/v), aplicado com o auxílio de um swab estéril.

Previamente aos experimentos de sobrevivência, realizou-se o ensaio de Dose Letal 90% (DL90) para determinar a concentração bacteriana capaz de levar 90% do grupo experimental ao óbito em 48h de análise. Para isso, culturas de *A. baumannii* em placas de LBA foram suspensas em solução salina (0,85% NaCl). A partir dessa suspensão, realizaram-se diluições seriadas (1:10) para obter cinco concentrações de teste, variando de 10^9 a 10^6 UFC/mL. Cada uma das concentrações bacterianas foram inoculadas em grupos experimentais de n=10 larvas, concomitantes a um controle negativo (injeção de PBS) para avaliar possível mortalidade por trauma físico. A concentração de 10^9 UFC/mL foi definida como DL90 e escolhida para os testes de sobrevivência, valor confirmado por leitura de densidade óptica (OD_{600nm}) de aproximadamente 1,6.

Para os testes de sobrevivência, as larvas foram distribuídas em quatro grupos experimentais (n=10 larvas/grupo): Grupo Controle Negativo; Grupo Controle Positivo (inoculado com a suspensão bacteriana); Grupo Controle de Fago (injeção do coquetel de bacteriófagos para verificar a ausência de toxicidade) e um Grupo Tratamento. As injeções foram realizadas com o auxílio de uma microseringa de precisão (*Hamilton Company*).

Em um primeiro momento, as larvas dos grupos Tratamento e Controle Positivo foram inoculadas com 10 μ L da suspensão bacteriana em concentração correspondente a da DL90 ($1,5 \times 10^9$) na última *proleg* esquerda, enquanto os grupos Controle Negativo e Controle do Fago receberam PBS estéril no mesmo local. Após um intervalo de duas horas, foi realizada uma segunda inoculação na última *proleg* direita, onde os grupos Tratamento e Controle do Fago receberam 10 μ L do coquetel

de bacteriófagos (previamente formulado em MOI teórica de 10^{-1} , correspondente a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFP/mL, enquanto os grupos Controle Negativo e Controle Positivo receberam uma segunda injeção de PBS estéril.

Após os procedimentos, todos os grupos foram acondicionados em placas de Petri estéreis e mantidos a 37°C. Analisou-se os resultados de sobrevivência diariamente (*time-points* de 24 e 48 horas após o tratamento), sendo consideradas mortas as larvas que não apresentaram resposta a estímulos táteis e/ou exibiram completa melanização.

4.8 PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE *A. BAUMANNII*

4.8.1 Antibiograma

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo método de disco-difusão, conforme as diretrizes estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023). Para o teste, foram selecionados 18 antibióticos com base na sua relevância e uso em ambiente hospitalar.

Para o preparo do inóculo, colônias de *A. baumannii*, previamente semeada em placas de MHA, foram ajustadas em escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Com o auxílio de um *swab* estéril, a suspensão foi semeada uniformemente sobre a superfície de placas contendo Ágar *Mueller-Hinton* (MHA) com espessura padronizada de 4 mm. Posteriormente, os discos impregnados com os antimicrobianos foram aplicados sobre a superfície do meio. As placas foram incubadas em estufa a 37°C *overnight*. Após esse período, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição com o auxílio de um paquímetro. Os valores obtidos para as bactérias testadas foram comparados com o valor de referência (*breakpoints*) estabelecido pelo CLSI para cada antibiótico, classificando os isolados nas categorias: Sensível (S), Intermediário (I) ou Resistente (R).

Os testes de disco-difusão foram realizados para todos os antibióticos, com exceção daqueles pertencentes à classe dos peptídicos (COL e PMB). Para eles, a resistência foi avaliada por ensaio de microdiluição em caldo (CIM), utilizando os valores de referência estabelecidos para sua classificação.

Tabela 1 – Antibióticos utilizados para avaliação do perfil de Resistência dos 63 isolados de *A. baumannii*

Classe do Antibiótico	Nome do Antibiótico	Sigla
Penicilinas + Inibidores de betalactamases	Ampicilina + Sulbactam	SBA
	Piperacilina + Tazobactam	PPT
Cefalosporinas	Ceftazidima	CAZ
	Cefepime	COM
	Cefotaxima	CTX
	Ceftriaxona	CRO
Carbapenêmicos	Imipenem	IPM
	Meropenem	MER
Aminoglicosídeos	Amicacina	AMI
	Gentamicina	GEN
	Tobramicina	TOB
Tetraciclinas	Doxiciclina	DOX
	Tetraciclina	TET
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	CIP
	Levofloxacina	LVX
Sulfonamidas	Sulfametoxazol + Trimetropima	SUT
Polimixinas	Polimixina B	PMB
	Colistina	COL

Fonte: o próprio autor (2026)

4.8.2 Definição da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Com base nos testes de sensibilidade, relevância clínica e classe farmacológica, foram selecionados quatro antibióticos e três isolados bacterianos para os ensaios de determinação da CIM. Entre os antibióticos estão a Piperacilina-

Tazobactam (PPT), o Meropenem (MER) e a Levofloxacin (LVX). Os isolados bacterianos foram (I) Ab576, clone XDR mundial; (II) Ab615, XDR resistente a colistina e (III) Ab846, pan-resistente.

Os antibióticos foram diluídos em caldo MH em placas de 96 poços, sendo realizadas diluições seriadas (fator de diluição 1:2) para cobrir as faixas de concentração terapêutica e os valores de referência estabelecidos para cada classe de antibióticos. O inóculo bacteriano foi preparado por meio de culturas de *A. baumannii* em placas de LBA, em que as colônias foram suspensas em solução salina e ajustadas à escala 0,5 de McFarland. Posteriormente, a suspensão foi diluída em MH para atingir uma concentração final de $5,0 \times 10^5$ UFC/poço. O experimento foi realizado com controles de esterilidade do meio e de crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 37°C *overnight*, a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano visível.

Conforme mencionado anteriormente, a CIM para Polimixina B (PMB) e Colistina (COL) foi determinada para todos os 63 isolados para caracterizar seu perfil de sensibilidade devido a exigências metodológicas (RELLER et al, 2009; CLSI, 2026). Entretanto, apenas os dados referentes a COL e aos três isolados selecionados foram considerados para a realização dos experimentos de biofilme e *checkerboard*.

4.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO COMBINADO DO COQUETEL DE BACTERÍOFAGOS COM ANTIMICROBIANOS POR MICRODILUIÇÃO EM *CHECKERBOARD*

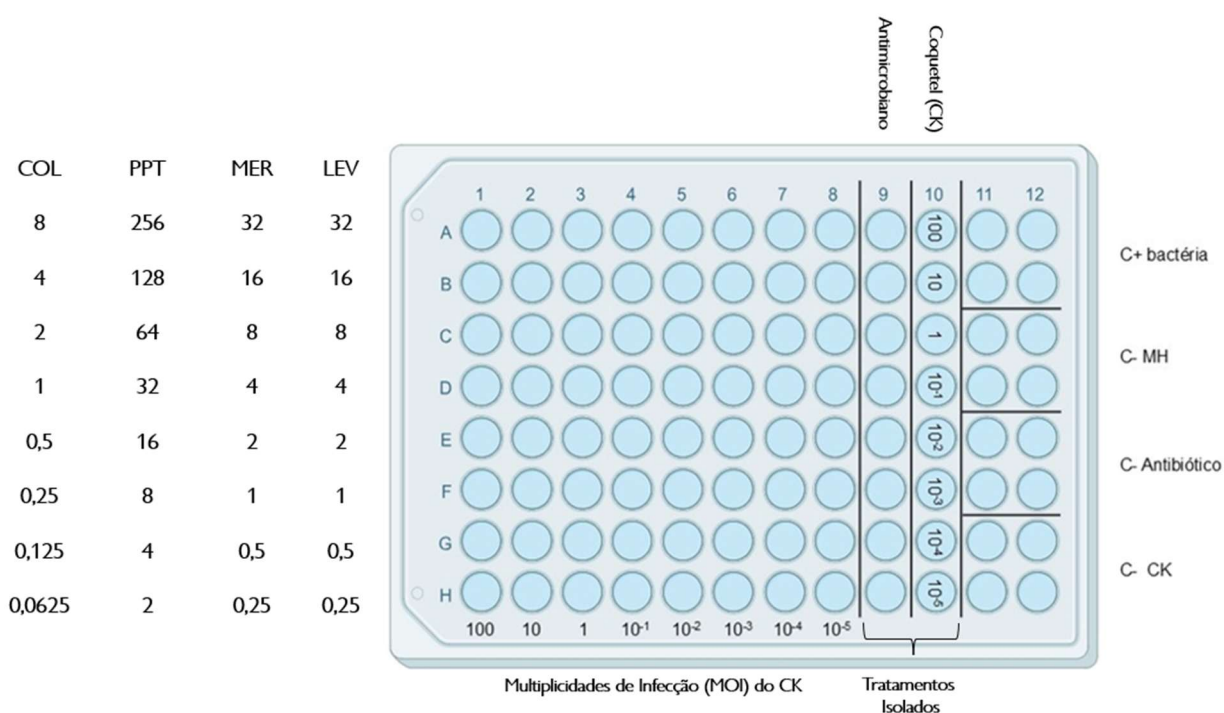
Para avaliar o efeito de combinações de bacteriófagos e antibióticos em *A. baumannii*, foram realizados ensaios de microdiluição em placas de 96 poços, utilizando o método colorimétrico de MTT, que estima a atividade metabólica bacteriana como indicativo indireto de viabilidade, com base na redução do sal de tetrazólio a formazan por células bacterianas metabolicamente ativas (Referência metodológica).

O delineamento experimental seguiu o formato de *checkerboard*, permitindo a avaliação simultânea de múltiplas combinações de antibióticos e bacteriófagos em uma única placa. As concentrações dos antibióticos foram distribuídas nas linhas da placa, enquanto os valores de Multiplicidade de Infecção (MOI) do coquetel fágico foram distribuídos nas colunas, resultando em 64 condições de associação (8 concentrações de antibiótico $\times$ 8 valores de MOI) por ensaio. Além das combinações,

cada antibiótico e o coquetel fágico foram testados individualmente nas mesmas condições experimentais (**Figura 1**).

As concentrações dos antibióticos foram definidas com base nos pontos de corte (*breakpoints*) estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023). As faixas de concentração utilizadas foram: Levofloxacina (LEV) e Meropenem (MER) de 0,25 a 32 µg/mL; Colistina (COL) de 0,0625 a 8 µg/mL; e Piperacilina-Tazobactam (PPT) de 2 a 256 µg/mL. As MOIs testadas variaram de 100 a 10^{-5} .

Figura 6 – *Layout* utilizado nas microplacas empregadas no ensaio de *checkerboard* entre o coquetel e antibióticos



Para a montagem do ensaio, foram adicionados a cada poço: 50 µL de meio MH com antibiótico na concentração de teste, 50 µL da suspensão do coquetel de fagos (nas respectivas MOIs) e 50 µL do inóculo bacteriano. O inóculo foi preparado a partir de culturas de *A. baumannii* em ágar MHA, suspensas em solução salina e ajustadas para 0,5 na escala de McFarland, sendo posteriormente diluídas em MH para atingir a concentração final de $5,0 \times 10^5$ UFC/poço. As placas foram incubadas estaticamente a 37 °C *overnight*. Após esse período, foram adicionados 20 µL de solução de MTT (0,25 mg/mL) a cada poço. As placas foram incubadas novamente por 2 horas a 37°C ao abrigo da luz, permitindo a conversão do sal em formazan

vermelho pelas desidrogenases das bactérias viáveis, com posterior leitura a 570 nm. O experimento foi repetido em três ensaios independentes, realizados em dias diferentes, totalizando três repetições biológicas. Em todos os ensaios foram incluídos controles de esterilidade do meio, dos antibióticos e dos bacteriófagos, bem como controle positivo de crescimento bacteriano sem tratamento.

Os valores de absorbância (Abs) obtidos foram utilizados para o cálculo da porcentagem de inibição da atividade metabólica dos tratamentos (individualmente e em associação) em relação ao controle bacteriano não tratado, considerado como 100% de atividade metabólica, conforme a equação:

$$\% \text{ de inibição da combinação} = 100 - \left(\frac{\text{Abs Combinação}}{\text{Abs Controle}} \times 100 \right)$$

Após o cálculo da porcentagem de inibição da atividade metabólica para as combinações e para os tratamentos isolados, foi avaliado se o efeito inibitório observado nas combinações foi superior ao efeito obtido com os agentes isolados, considerando a variabilidade experimental entre ensaios independentes (Seção 4.9.1.2). Além disso, também foi calculado se o efeito antibacteriano da associação entre fago e antibiótico é além do efeito independente dos tratamentos isolados, ou seja, avaliou-se se existe interação antibacteriana entre ambos (Seção 4.9.2.3).

4.9.1 Comparação entre o efeito inibitório da combinação e dos tratamentos isolados

4.9.1.1 Processamento de dados

Para o processamento dos dados, cada condição experimental (tratamentos isolados e combinações), os resultados foram expressos como média e desvio-padrão (DP) a partir de ensaios independentes realizados em dias distintos. Os dados de porcentagem de inibição foram organizados em matrizes correspondentes ao delineamento do *checkerboard* e visualizados por meio de mapas de calor (*heatmaps*), gerados no *software* R (versão 4.3.1), permitindo a inspeção global dos padrões de resposta ao longo das concentrações de antibiótico e valores de MOI do coquetel fágico.

4.9.1.2 Separação do ruído experimental e da diferença real de inibição

A interpretação dos dados considerou a variabilidade metodológica inerente ao ensaio colorimétrico de MTT, bem como as flutuações biológicas associadas ao metabolismo bacteriano. Ensaio baseado em atividade metabólica apresentam variações intrínsecas mesmo na ausência de tratamento, decorrentes de diferenças no estado fisiológico das células, taxa metabólica e eficiência de redução do MTT, resultando em oscilações nos valores de inibição entre ensaios independentes. Dessa forma, adotou-se um critério estatístico baseado em dois desvios-padrão (2 DP) dos tratamentos isolados, uma vez que, em distribuições aproximadamente normais, esse intervalo abrange cerca de 95% dos valores esperados e é amplamente utilizado para definir limites de variabilidade aceitável em dados experimentais. Esse critério é particularmente adequado para ensaios biológicos e metabólicos, como o MTT, nos quais variações moderadas são esperadas mesmo em condições controladas, permitindo uma distinção conservadora entre flutuações experimentais e diferenças potencialmente relevantes do ponto de vista biológico (BLAND; ALTMAN, 1996; MOTULSKY, 2014; RISS et al, 2016; GHASEMI et al, 2021).

Assim, para cada concentração de antibiótico testada isoladamente, foi definido um valor de referência da seguinte forma:

$$\textit{Controle d antibiótico isolado} = \% \textit{ de inibição do antibiótico} + 2 \textit{ DP}$$

De modo análogo, para cada MOI do coquetel fágico testado isoladamente, foi definido:

$$\textit{Controle do coquetel isolado} = \% \textit{ de inibição do coquetel} + 2 \textit{ DP}$$

Esses valores representam o limite superior esperado da inibição atribuível ao tratamento isolado, considerando apenas a variabilidade experimental. A utilização do tratamento isolado como referência fixa é justificada por ele constituir o padrão biológico real disponível para comparação, evitando que flutuações da combinação influenciem artificialmente o limiar de decisão. Para cada condição de combinação fago + antibiótico, a porcentagem de inibição observada foi então comparada ao controle isolado mais efetivo, definido como o maior valor de inibição entre o antibiótico

isolado e o coquetel fágico isolado (já acrescido de 2 DP).

A diferença de inibição, portanto, foi calculada conforme a expressão:

$$\text{Diferença} = \% \text{ de inibição da combinação} - \text{Maior \% de inibição entre os controles}$$

Dessa maneira, diferenças próximas ou inferiores ao limite de ruído experimental foram interpretadas como variações compatíveis com a variabilidade normal do ensaio, não sendo consideradas indicativas de efeito biológico adicional.

4.9.1.3 Indicativos quantitativos de efeito biológico e integração com critérios experimentais

Após a separação do ruído experimental, as diferenças de inibição observadas foram utilizadas como indicadores quantitativos graduais de efeito biológico, com o objetivo de auxiliar a análise e interpretação dos resultados, e não como critérios absolutos ou isolados. As combinações foram classificadas de acordo com a magnitude da diferença em relação ao controle isolado mais efetivo:

- $\leq 10\%$ de diferença: ausência de indicativo quantitativo de efeito biológico relevante
- $> 10\%$ e $\leq 20\%$ de diferença: zona intermediária (possível indicativo de efeito biológico)
- $> 20\%$ de diferença: indicativo quantitativo de provável efeito biológico
- $\geq 30\%$ de diferença: indicativo quantitativo de forte efeito biológico

As combinações classificadas como sem efeito não foram destacadas nos *heatmaps*, enquanto aquelas que indicam provável ou forte efeito biológico foram destacadas visualmente por diferentes intensidades de marcação, facilitando a interpretação integrada dos resultados.

4.10 AVALIAÇÃO ANTIBIOFILME DO COQUETEL EM ASSOCIAÇÃO A ANTIMICROBIANOS

A eficácia do coquetel de bacteriófagos, isolado e em combinação com

antimicrobianos, foi avaliada na redução de biofilmes pré-formados (24h) dos três isolados de *A. baumannii*. Os antibióticos foram testados em concentrações sub-inibitórias, baseando-se nos resultados observados no teste de *checkerboard*: Levofloxacina (LEV) e Meropenem (MER) a 8 µg/mL; Colistina (COL) a 2 µg/mL; e Piperacilina-Tazobactam (PPT) a 64 µg/mL.

Os cultivos bacterianos de *A. baumannii* foram realizados em placas de LBA a 37°C por 24 h. A partir do crescimento foram preparadas suspensões bacterianas na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$), para posteriormente serem diluídas (1:100) em meio LB e 200 µL dessa diluição ser adicionada nos respectivos poços de uma placa de 96 poços. O experimento foi realizado em quadruplicada para os poços de todas as condições, além de ser feito em três dias diferentes. As placas foram incubadas estaticamente a 37°C por 24h para a adesão e formação do biofilme.

Após esse período, o meio contendo células planctônicas foi removido e os poços lavados duas vezes com 200 µL de PBS (137 mM NaCl; 2,7mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄) estéril pré-aquecido (37°C). Para os grupos de tratamento combinado, adicionou-se a cada poço 100 µL do coquetel de fagos (título individual de cada um dos quatro fagos sendo $5,0 \times 10^7$ UFP/mL, totalizando $2,0 \times 10^8$ UFP/mL em concentração de bacteriófagos totais quando consideramos o coquetel formulado) e 100µL de meio LB 2x concentrado suplementado com o antibiótico (ajustado para a concentração final mencionada após adição nos poços). Nos grupos de tratamento isolado, o volume do agente ausente foi substituído por tampão SM e PBS, para os controles de antibiótico e coquetel respectivamente, mantendo o volume final constante. Nos poços controle de 48h, realizou-se a lavagem com PBS e a adição de 200 µL de meio LB.

A formação de biofilme foi avaliada inicialmente no tempo de 24h (controle basal). O protocolo consistiu na lavagem dos poços com PBS, seguida da adição de 200 µL de meio LB contendo MTT (0,25 mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 2h ao abrigo da luz. Posteriormente, a solução foi removida e adicionou-se 200 µL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. Após 15 min de homogeneização, a densidade óptica (DO) foi medida a 570nm em leitor de microplacas (LMR-96I, Loccus®).

Para a avaliação da eficácia terapêutica, os biofilmes pré-estabelecido em 24h e com adição dos respectivos tratamentos, foram novamente incubados a 37°C por 24h. Após o tempo total de 48h, repetiu-se o mesmo protocolo de lavagem e revelação

com MTT/DMSO descrito anteriormente.

A formação de biofilme e a atividade de redução da biomassa foram avaliadas com base na DO obtida no ensaio colorimétrico. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) para comparar as médias e desvios-padrão (calculados a partir das três repetições realizadas), considerando estatisticamente significativos. Os gráficos foram gerados pelo software GraphPad Prism v.9.11.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DOS BACTERÍOFAGOS E ANÁLISE DO *HOST RANGE*

5.1.1 Isolamento, Propagação e Detecção dos Bacteriófagos

O isolamento de bacteriófagos a partir de efluentes hospitalares tem se consolidado como uma estratégia eficaz para a obtenção de fagos contra patógenos bacterianos multirresistentes. Neste estudo, utilizando resíduos líquidos coletados de efluentes do HU-UEL, foi possível isolar quatro bacteriófagos denominados phAb568, phAb570, phAb586 e phAb598, que compõem o coquetel desenvolvido contra 63 isolados clínicos de *A. baumannii* provenientes da mesma instituição de saúde. A escolha de efluentes hospitalares como fonte de isolamento se baseia em evidências amplamente descritas na literatura, que demonstram que águas residuais hospitalares constituem reservatórios de fagos adaptados às cepas bacterianas circulantes nesses ambientes clínicos, com fagos isolados desses ambientes exibindo maior eficiência de lise quando comparados com aqueles obtidos de fontes ambientais não relacionadas a saúde (AGHAEE et al, 2021; LIN et al, 2025; ALHARBI; ZIADI, 2021).

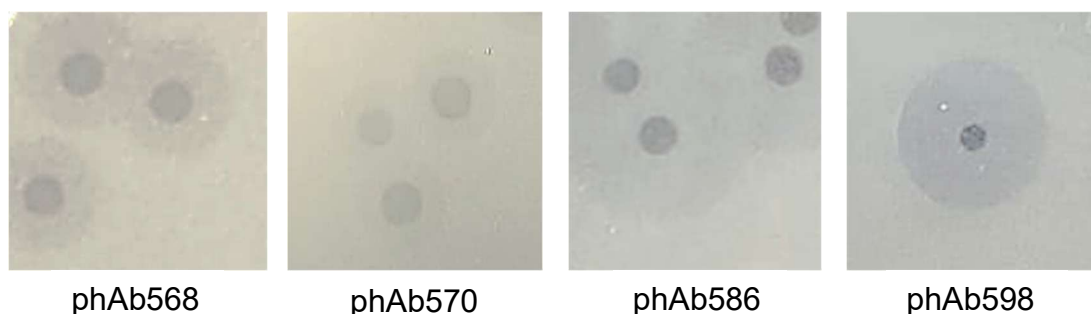
O protocolo de isolamento empregado seguiu a metodologia clássica adaptada e descrita inicialmente por Van Twest & Kropinski (2009), com o processamento dos resíduos partindo de uma extração com clorofórmio, etapa essencial para a purificação viral e remoção de contaminantes bacterianos. A extração com clorofórmio promove a lise das células presentes e facilita o isolamento de partículas virais no sobrenadante, permitindo a obtenção eficiente dos resíduos tratados (VAN TWEST; KROPINSKI, 2009).

A partir dos efluentes hospitalares previamente processados (resíduos tratados), o primeiro passo consistiu na propagação dos eventuais fagos existentes utilizando o painel de 63 isolados multirresistentes de *A. baumannii* como hospedeiros de enriquecimento. A detecção inicial foi realizada com base nos lisados brutos por meio do ensaio de *Streak Spot Test* (SST), no qual a formação de zonas de inibição sobre as estrias de crescimento bacteriano sugeriu a presença de partículas virais viáveis capazes de causar inibição de crescimento e reduzir localmente a densidade

celular, demonstrando que nos efluentes hospitalares utilizados poderia existir fagos para os isolados de interesse.

Em seguida, esses sobrenadantes foram submetidos a plaqueamentos de seleção em dupla camada de ágar, permitindo a visualização de placas de lise bem delimitadas conforme demonstradas na **Figura 6**. Tais zonas de inibição são uma característica comum dos bacteriófagos e considerado o padrão fenotípico para confirmar sua presença devido a possível ocorrência de seus ciclos líticos.

Figura 7 – Morfologia dos plaques de cada um dos fagos que compõem o coquetel utilizado nesse estudo



A análise morfológica dos plaques pode por vezes sugerir a existência de diferentes perfis no mesmo resíduo, com variação em diâmetro, contorno, grau de limpidez e presença de halos ao redor da zona central de lise (BAGIŃSKA et al., 2023; HERNANDEZ-MORALES et al., 2018; VUKOTIC et al., 2020). A observação de halos periféricos nos plaques é particularmente relevante no contexto de *A. baumannii*, pois sugere a atividade de depolimerases capsulares associadas às estruturas de cauda dos fagos, enzimas capazes de degradar o polissacarídeo capsular e, assim, facilitar o acesso ao receptor bacteriano (HERNANDEZ-MORALES et al., 2018; VUKOTIC et al., 2020), um fenômeno amplamente descrito para fagos anti-*A. baumannii* e diretamente ligado à capacidade de clivar cápsulas específicas (VUKOTIC et al., 2020). Essas características morfológicas, contudo, devem ser interpretadas de forma preliminar e sem conclusões diretas, já que diferenças no aspecto dos plaques podem refletir demais particularidades frente a bactéria hospedeira não diretamente associadas a suas reais propriedades (BAGIŃSKA et al., 2023).

Por esse motivo, nesta fase inicial, a distinção entre fagos é apenas sugerida. Para considerarmos a existência de fagos diferentes devemos analisar um conjunto de resultados relacionados ao seu espectro de hospedeiros (*host range*), através de

Spot Test, Eficiência de Plaqueamento e Índice de Virulência, que avaliam demais aspectos que serão abordados mais adiante nesse estudo.

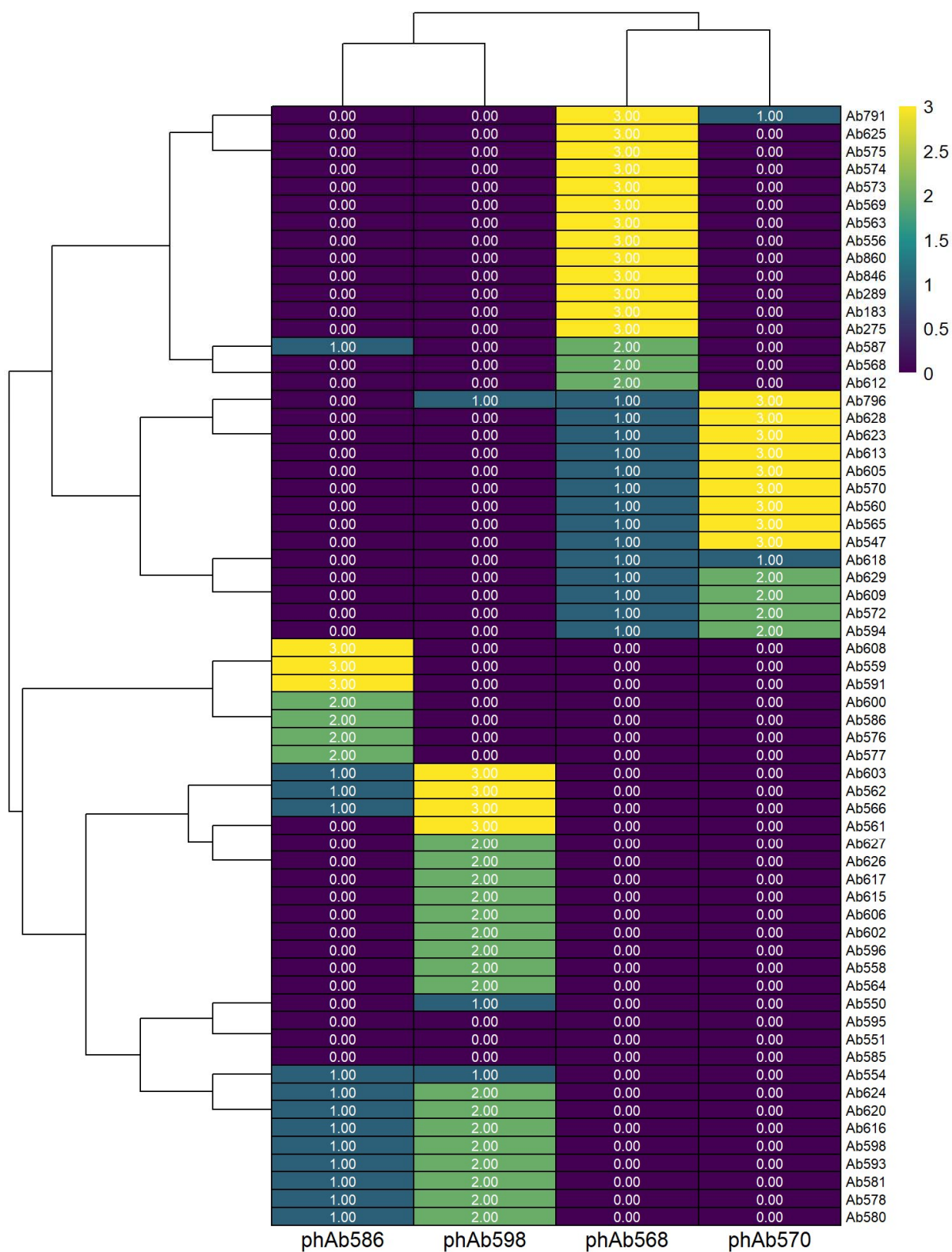
Mesmo assim, a confirmação inequívoca e precisa da identidade e da diversidade dos fagos isolados somente é alcançada com a caracterização genômica (TURNER, et al; 2022). O sequenciamento completo permite determinar o tamanho e a organização do genoma, identificar genes associados a lisogenia, resistência a antibióticos ou fatores de virulência, que são critérios essenciais para a seleção de candidatos seguros para uso terapêutico. Além disso, análises comparativas e filogenéticas permitem agrupar os fagos em famílias e gêneros, verificar o grau de parentesco entre isolados com morfologia de plaque similar e confirmar se perfis de *host range* distintos refletem linhagens virais diferentes ou apenas variações fenotípicas de um mesmo fago.

5.1.2 *Spot Test*

O ensaio de *Spot test* (ST) foi utilizado como método de triagem adicional para avaliação preliminar do espectro de hospedeiros (*host range*) dos fagos, técnica que permite a visualização da atividade lítica através da formação de zonas de clareamento ou redução de turbidez frente ao crescimento bacteriano. A análise do espectro de hospedeiros também foi conduzida com os 63 isolados de *A. baumannii*. O *heatmap* gerado a partir dos resultados do ST (**Gráfico 1**), revela determinados padrões de susceptibilidade frente aos isolados bacterianos.

Observa-se no **Gráfico 1**, que nenhum dos quatro fagos individualmente demonstrou capacidade de causar inibição visível em todos os isolados testados, fenômeno esperado e amplamente documentado na literatura e atribuído à natureza específica das interações fago-bactéria, mediadas pelo reconhecimento de receptores de superfície pelas proteínas de ligação ao receptor (RBPs), presentes nas estruturas da cauda dos bacteriófagos. Em *A. baumannii*, o polissacarídeo capsular (CPS) constitui o receptor primário para a maioria dos fagos caracterizados, e a diversidade de tipos capsulares pode por vezes explicar a variabilidade e especificidade observada no espectro de atividade (KNIREL et al, 2020; DICKS et al, 2024; TASLEM MOUROS et al, 2022).

Gráfico 1 – Host Range dos bacteriófagos que compõem o coquetel segundo a técnica de *Spot Test*



A classificação numérica presente no *heatmap* foi definida de acordo com as zonas de inibição observadas no *Spot test*, sendo categorizadas em 3: Inibição límpida, 2: Inibição límpida com presença de colônias resistentes, 1: Pouca inibição com presença de turbidez, 0: ausência de inibição.

Ainda assim, a abrangência do coquetel a nível de ST associando os quatro fagos alcançou 95,23%, ou seja, 60 dos 63 isolados testados demonstraram susceptibilidade a pelo menos um dos fagos, demonstrando a complementariedade significativa do coquetel, que foi fundamental para seleção e determinação de tais fagos por representar um excelente espectro de atividade quando consideramos sua aplicação em conjunto.

Analisando individualmente, o phAb586 apresentou uma capacidade lítica relativamente menor quando comparado aos demais, com um maior número de atividades consideradas baixas (grau de intensidade 1), em relação ao número de isolados que se mostraram suscetíveis a ele. Já phAb598, que, com base no seu espectro de ação, agrupou-se ao fago ph586, por se encontrar no mesmo ramo no dendrograma, demonstrou um padrão complementar, com zonas de lise eficientes (grau de intensidade 2), nos mesmos e em isolados distintos complementares.

Já os fagos phAb568 e phAb570, também agrupados semelhantes entre si pelos ramos do dendrograma, apresentaram da mesma forma perfis de atividade parcialmente sobrepostos e complementares aos demais membros do coquetel, podendo sugerir a utilização de receptores semelhantes ou reconhecimento de variantes capsulares similares. O phAb568 foi o que exibiu o maior número de atividades líticas altas (grau de intensidade 3), isso em uma proporção significativa dos isolados testados (13 dos 63), já naqueles que apresentou baixo potencial, o phAb570 compensou com moderada a alta atividade (graus de intensidade 2 e 3), reforçando o perfil complementar do coquetel. Trabalhos recentes com coquetéis de três a quatro fagos contra *A. baumannii* mostram coberturas de 70 a 90% dos isolados clínicos e eficácia terapêutica em modelos murinos, resultados consistentes com o padrão de cobertura observado neste estudo (REGEIMBAL et al., 2016; RASTEGAR et al, 2024).

As diferenças de intensidade de inibição observada no *heatmap* (variação entre graus de intensidade 1 a 3) sugere diferenças entre os fagos principalmente em termos de taxa de adsorção. A presença de isolados completamente resistentes aos quatro fagos também é coerente com dados recentes que demonstram a capacidade de *A. baumannii* de escapar da infecção por meio de mutações em genes de biossíntese capsular ou na regulação da produção da própria cápsula, frequentemente mediadas pelo sistema *BfmRS* (BAI et al., 2023). Por outro lado, diversos estudos mostram que a resistência a fagos costuma acarretar custos de *fitness*, como perda

de virulência, diminuição da capacidade de formar biofilme e, em alguns casos, ressensibilização a carbapenêmicos (MANGALEA; DUERKOP, 2020; GAO et al., 2022), o que abre espaço para estratégias como a própria combinação fago–antibiótico, que será abordada nesse estudo e busca explorar esses *trade-offs* evolutivos.

5.1.3 Eficiência de Plaqueamento Relativa

O ensaio de eficiência de plaqueamento (EOP) de certa forma refinou a avaliação do espectro de ação dos fagos como é demonstrado no **Gráfico 2**. Observa-se que a partir dos valores normalizados em relação à hospedeira de referência (que foram respectivamente para os fagos phAb568, phAb570, phAb586 e phAb598 as bactérias Ab846, Ab605, Ab608 e Ab603), uma discrepância em relação a bactéria hospedeira selecionada inicialmente, que inclusive serviu de base para nomear tais fagos. Isso sugere que a hospedeira inicial pode não ser a melhor quando consideramos sua utilização para produção de partículas virais na intenção de se obter o maior título. Em decorrência a isso, todas as propagações, a fim de se manter um estoque de título viral ideal para realização das metodologias empregadas nesse estudo, foram realizadas nos isolados de referência encontrados por meio da EOP.

Segundo o **Gráfico 2**, a maioria das interações fago–hospedeiro que haviam produzido lise visível no ST e classificadas como grau de intensidade 2 ou 3, concentraram-se agora nas categorias de eficiência ALTA ($\geq 0,5$) ou MÉDIA ($\geq 0,1$ e $< 0,5$), enquanto as interações classificadas como BAIXAS ($> 0,001$ e $< 0,1$) foram raras e praticamente inexisteram interações na faixa INEFICIENTE (> 0 e $\leq 0,001$), isso entre os isolados com plaques detectáveis. Além disso, as interações de baixa intensidade (principalmente grau 1) no ST se mostraram ausentes na análise de EOP, o que de certa forma reduziu o espectro de ação dos fagos individualmente, mas reforçou mais uma vez a complementaridade do coquetel. Esse padrão sugere que, apesar dos fagos não produzirem alguma zona de inibição frente a todos os 63 isolados no ST, para as cepas suscetíveis a replicação fágica é significativa, produzindo EOP elevada em grande parte dos casos.

Em termos quantitativos, analisando o **Gráfico 2**, o phAb568 apresentou EOP ALTA em pelo menos 15 isolados (valores entre 0,51 e 1,00, incluindo Ab846, entre outros) e EOP MÉDIA em poucos isolados adicionais próximos do limiar de 0,5 (por

exemplo, Ab183, Ab289 e Ab612). O phAb570, por sua vez, exibiu EOP ALTA em aproximadamente 10 isolados (valores de 0,59 a 1,00) e EOP MÉDIA em pelo menos um isolado (Ab796, EOP 0,49). PhAb586 mostrou EOP ALTA em cerca de 7 isolados (valores de 0,55 a 1,00) e MÉDIA em dois (Ab576 e Ab577, 0,40 e 0,45). Finalmente, o phAb598 apresentou EOP ALTA em aproximadamente 12 isolados (como valores de 0,53 a 1,00) e MÉDIA em um dos isolados próximos ao *cut-off* máximo (por exemplo, a própria hospedeira inicial, Ab598, com valor 0,49).

Considerando todos os fagos, o coquetel manteve um espectro de ação combinado amplo, com elevada eficiência de replicação relativa nos isolados suscetíveis quando comparados a maior quantificação, mas confirmou a existência de isolados refratários, ou seja, aqueles que no ST demonstraram potencial de inibir o crescimento, porém sem formação de plaques em maiores diluições quando analisamos a abrangência dos fagos individualmente na EOP.

Comparando esses achados com o ensaio de ST discutido anteriormente, observa-se um comportamento esperado, em que o espectro de hospedeiros tende a se estreitar quando se passa de uma avaliação qualitativa de simples formação de zonas de inibição (ST) para uma análise quantitativa de replicação (EOP), com formação e quantificação de placas de lise. Tal comportamento pode ser explicado pela elevada concentração de bacteriófagos presente no lisado bruto (alta multiplicidade) utilizado no ST durante a triagem dos fagos, podendo resultar na denominada lise externa ou absorviva (também referido como *lysis from without*). Fenômeno na qual a adsorção de várias partículas virais simultaneamente em uma mesma célula bacteriana causa a desestabilização da membrana, podendo ser potencializada em decorrência da produção enzimática de depolimerases associadas às caudas dos fagos, atuando na degradação dos polissacarídeos da cápsula e consequentemente provocando o rompimento celular, sem que haja a replicação viral produtiva, levando a superestimação do *host range* neste teste (KIM et al, 2025).

Dessa forma, devemos ressaltar que o ST detecta qualquer zona de inibição frente ao crescimento bacteriano, captando desde infecções plenamente produtivas até eventos abortivos. Por isso, é um ensaio sensível, porém sujeito a “falsos positivos” em termos de infecção verdadeiramente produtiva. Já o EOP quantifica apenas as situações em que há multiplicação fágica suficiente para gerar placas de lise bem definidas, o que confere maior especificidade, mas inevitavelmente reduz a abrangência do *host range*, sobretudo em altas diluições, nas quais pequenas

variações de eficiência de adsorção ou de condições de crescimento podem impedir a visualização de plaques (GLONTI; PIRNAY, 2022). É importante salientar também que essa relação não é absoluta, já que a presença de plaques implica infecção produtiva, mas sua ausência não exclui replicação viral.

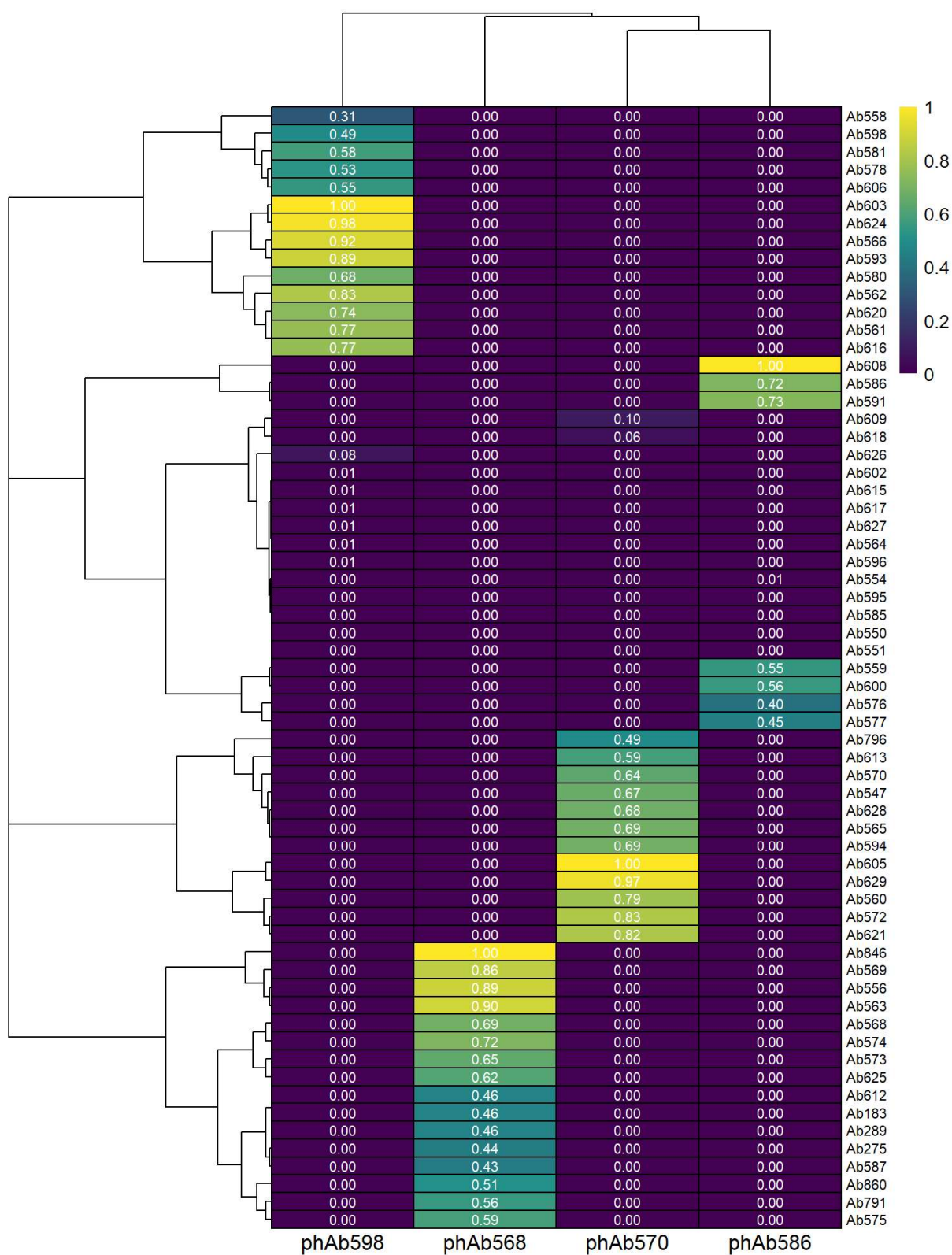
A formação de plaques depende de múltiplos fatores *in vitro* como viscosidade do ágar, densidade do inóculo, estado fisiológico do hospedeiro, estabilidade do fago e até difusão de enzimas líticas, de modo que ciclos líticos podem ocorrer de forma localizada ou em nível populacional muito abaixo do limiar necessário para originar zonas detectáveis (GLONTI; PIRNAY, 2022).

Alguns ciclos de infecção local podem causar uma zona de clareamento, e isso pode ocorrer mesmo em interações em que a replicação é instável, ou seja, quando há produção limitada de progênie viral ou a infecção é rapidamente bloqueada por mecanismos de defesa bacteriano. No ensaio de EOP, por outro lado, o critério é um pouco mais rigoroso, pois quantifica a capacidade do fago de completar ciclos produtivos em grande escala na hospedeira.

Estudos sistemáticos de cinética fágica mostram que muitas combinações que produzem “spots” discretos ou turvos exibem EOP muito baixa ou indetectável, exatamente porque a eficiência global de replicação também é baixa, seja por restrição de adsorção, seja por interferência de sistemas de defesa como CRISPR–Cas, sistemas de modificação de receptores ou mesmo imunidade abortiva da bactéria (MIRZAEI; NILSSON, 2015). Isso sugere, nesse caso, porque o número de isolados com EOP significativa é, em geral, menor que o número de isolados com qualquer sinal de lise no ST, enquanto as interações detectadas por ST e definidas como maior intensidade, tenha se confirmado em EOP elevadas, indicando boa adequação dos fagos às cepas alvo.

Do ponto de vista biológico, a queda relativa do espectro de abrangência quando se considera EOP, reflete a necessidade de compatibilidade entre o fago e o hospedeiro em múltiplas etapas do ciclo de infecção. Além do reconhecimento inicial do receptor (no caso de *A. baumannii*, majoritariamente o polissacarídeo capsular), é preciso que o fago consiga injetar o seu material genético, escapar de sistemas de defesa, sequestrar a maquinaria de replicação bacteriana e montar partículas viáveis em quantidade suficiente para gerar plaques bem definidos. Variações pontuais em algum desses processos podem permitir alguma lise inicial (visível no ST) mas impedir replicação ao longo do tempo, resultando em EOP baixo ou ineficiente.

Gráfico 2 – *Host Range* dos bacteriófagos que compõem o coquetel segundo a técnica de Eficiência de Plaqueamento Relativa



Em *A. baumannii*, estudos recentes de larga escala usando mutagênese e triagem funcional mostraram que dezenas de genes envolvidos em estrutura de

cápsula, metabolismo e sistemas de defesa modulam a susceptibilidade a fagos, muitas vezes de maneira fago-específica (BAI et al., 2023). Assim, o fato de que apenas um subconjunto das interações observadas no ST se confirmado em EOP elevada é esperado e reforça a importância de utilizar ambas as abordagens, aplicando uma triagem por ST e quantificação por EOP, quando se busca uma seleção estratégica de fagos para compor coquetéis terapêuticos (BAI et al., 2023; MIRZAEI; NILSSON, 2015).

5.1.4 Índice de Virulência

Para o cálculo do índice de virulência (VI), os valores da área sob a curva referente aos dados obtidos nos experimentos são normalizados entre 0 e 1 a fim de se estimar e sugerir a capacidade dos fagos em controlar o crescimento bacteriano ao longo do tempo em condições *in vitro*. Nesse estudo, com base no **Gráfico 3**, analisando os resultados obtidos dos quatro fagos e para o coquetel (CK), frente aos 63 isolados de *A. baumannii*, nota-se que, quando há suscetibilidade, a capacidade de supressão do crescimento bacteriano ao longo do tempo é majoritariamente alta. Na maioria das combinações fago–hospedeiro com plaques detectáveis anteriormente, o VI situou-se entre 0,7 e 0,98, indicando forte impacto sobre a densidade bacteriana, com uma menor parcela de casos intermediários e valores expressivamente baixos, enquanto permaneceu igual a zero nos isolados totalmente refratários anteriormente filtrados do ST para EOP.

Dessa forma, mais uma vez observa-se que a passagem de ST para EOP já havia filtrado interações fracas entre os fagos individualmente, e o VI confirmou que, para o subconjunto de cepas suscetíveis, os fagos não apenas infectam e formam plaques, mas também reduzem de maneira sustentada o crescimento em cultura líquida ao longo do tempo.

Novamente, essa redução de espectro de atividade e padrão de abrangência sugere um espectro de hospedeiros mais restrito quando analisamos os fagos individualmente, já que se observa de maneira geral que os isolados se mostram sensíveis a apenas um dos fagos do coquetel. Isso ocorre provavelmente devido a expressão de um tipo capsular específico ou compartilhamento de determinadas características de superfície, possivelmente direcionada a epítomos capsulares mais conservados em determinadas cepas, porém podendo ser consideravelmente

diferentes dentro da mesma espécie, promovendo essa característica complementar observada no coquetel (SOONTARACH et al., 2022). Estudos recentes demonstram que fagos com espectro restrito frequentemente exibem maior especificidade por seus receptores cognatos, o que pode resultar em maior eficiência de adsorção e replicação nos hospedeiros susceptíveis, ocasionando em uma maior eficiência de lise (LAI et al., 2016; SOONTARACH et al., 2022).

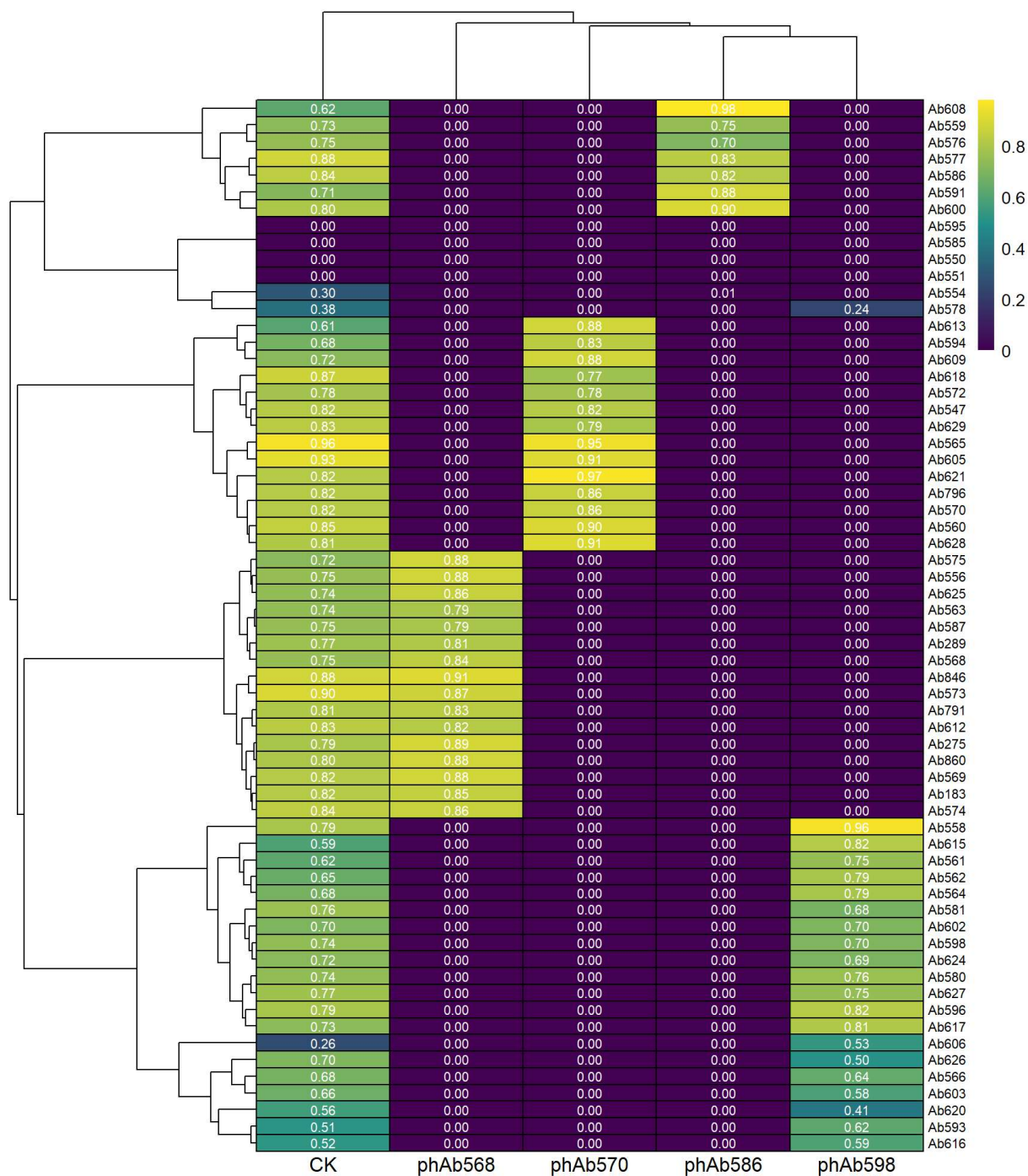
Analisando isoladamente, o phAb568 manteve VI alto ($\geq 0,79$) em cerca de 16 isolados (por exemplo Ab846), refletindo um comportamento consistente com suas EOPs elevadas nesses mesmos isolados. PhAb570 exibiu VI alto (0,77 a 0,97) em 14 isolados, os mesmos em que havia apresentado EOP ALTA e MÉDIA, mostrando boa concordância entre a eficiência de plaqueamento e a supressão do crescimento em curva. PhAb586 apresentou VI entre 0,7 e 0,98 nos 7 isolados suscetíveis a ele, com exceção de Ab554.

Já o phAb598, por fim, exibiu VI alta (0,5 a 0,9) em 19 isolados, porém abaixo de 0,5 em dois dos isolados (Ab620 e Ab578, com VI de 0,41 e 0,24 respectivamente), demonstrando a maior variabilidade de atividade em seu conjunto de isolados quando consideramos a comparação com os demais fagos. Esses dados reforçam novamente a natureza do coquetel, que foi composto por fagos com espectros complementares e com virulência eficiente, o que é considerado um requisito central para coquetéis eficazes na terapia, já que maximiza a cobertura e controla o crescimento bacteriano sem perdas significativas de atividade quando utilizados em conjunto.

Além disso, um fato que ocorreu nos resultados encontrados que corrobora para a discussão referente a utilização do coquetel é que, para o isolado Ab554, suscetível ao fago phAb586, o ST deu grau de intensidade baixo (valor categórico 1), eficiência de plaqueamento baixa, e VI individual do fago também baixo com um valor de 0,01, indicando baixa formação de plaques e controle populacional ineficiente ao longo do tempo. Isso é reforçado quando observamos a curva de crescimento demonstrada na **Figura 4-A**, onde na presença do fago isolado, nenhuma das multiplicidades conseguem controlar o crescimento bacteriano, com linhas acompanhando o controle positivo da bactéria. Porém, ainda nesse mesmo caso, quando submetido a presença do coquetel, como observado na **Figura 4-B**, o VI aumenta para 0,30, sugerindo que a ação combinada dos fagos contribuiu para o controle de crescimento desse isolado, mesmo que sem atingir níveis altamente satisfatórios. Em outros casos, também observado nos valores de VI apresentados no

heatmap (**Gráfico 3**), esse comportamento também se fez presente, como o aumento de VI do fago isolado phAb598 de 0,5 para 0,7 no isolado Ab626.

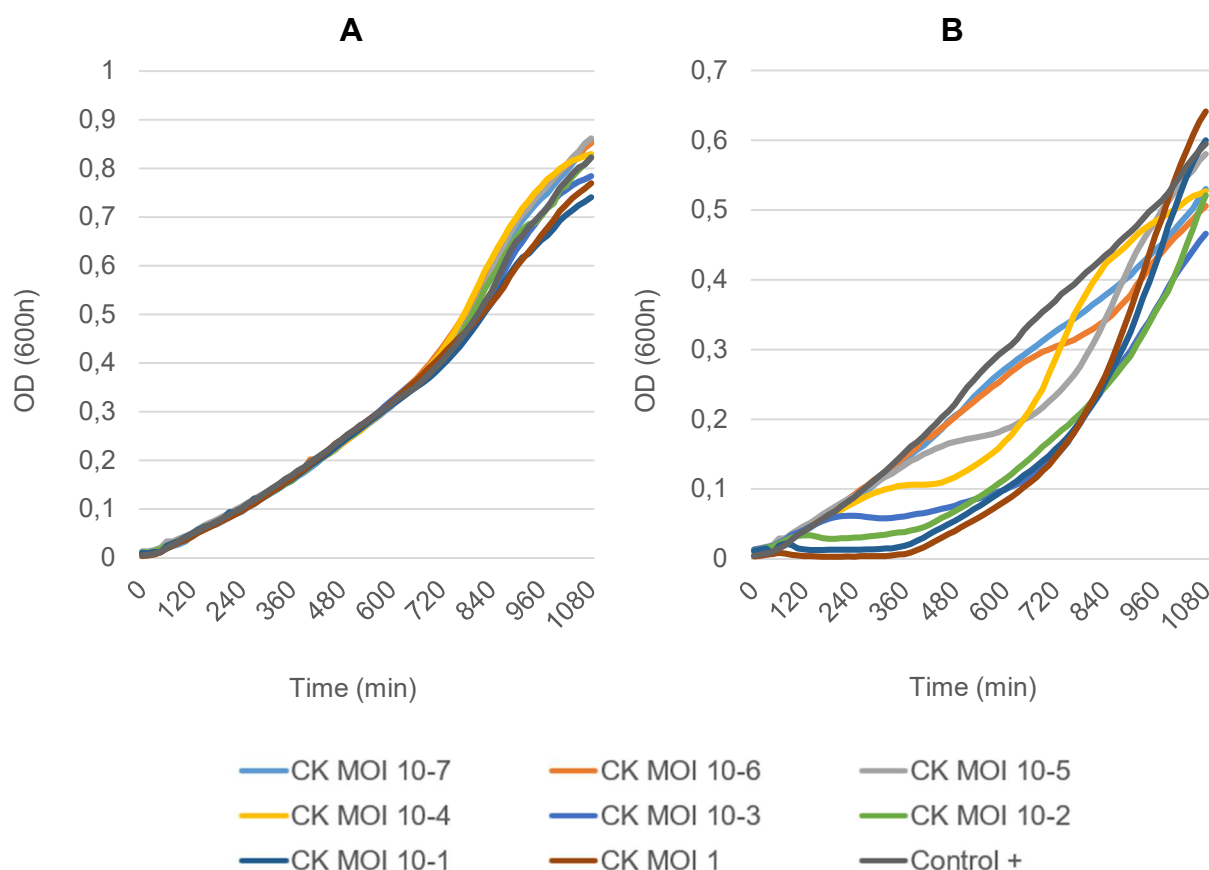
Gráfico 3 – *Host Range* dos bacteriófagos isolados e do coquetel segundo a técnica de Índice de Virulência



O contrário também se faz presente, já que em muitos casos a possibilidade de reconhecimento de algum receptor por mais de um dos fagos presentes no coquetel,

principalmente quando um deles não é capaz de produzir uma infecção produtiva, pode causar uma redução do VI nesses casos devido a competição por receptores, como é observado de forma mais significativa para os seguintes isolados: Ab615, com redução de VI 0,82 para 0,59; Ab606 com redução de VI 0,53 para 0,26; e Ab608 com redução de 0,98 para 0,62. Apesar dessa redução, os valores de VI ainda se mantêm eficientes sem grandes perdas significativas que afetariam a justificativa de aplicação do coquetel utilizando tais fagos em conjunto.

Figura 8 – Gráficos demonstrando a diferença entre a utilização de um fago isolado e o coquetel frente a curva de crescimento bacteriano. Em **A**: Curva de Virulência do fago phAb586 frente ao isolado Ab554 e em **B**: Curva de Virulência do Coquetel frente ao isolado Ab554



Quando se compara diretamente o VI com o EOP e com o ST, fica evidente a diferença de especificidade entre as técnicas. O ST detecta qualquer interação capaz de gerar zona de clareamento, mesmo que baseada em poucos ciclos replicativos, a EOP já exige replicação eficiente capaz de produzir partículas virais e plaques

isolados visíveis, e o VI integra a resposta ao longo do tempo, quantificando o quanto essa replicação se traduz em redução da curva de crescimento bacteriano, sendo proporcional a OD. Por isso, o espectro de hospedeiros tende a estreitar-se à medida que se migra de ST para EOP e, principalmente, para VI, pois cada nível exige sucesso em etapas adicionais do ciclo lítico: reconhecimento de receptor, injeção do genoma, evasão de sistemas de defesa, replicação, montagem e, finalmente, capacidade de manter pressão suficiente para frear o crescimento em uma cultura.

Especificamente a discrepância entre EOP e VI decorre de que cada método captura aspectos diferentes do ciclo de infecção fágica. A EOP é uma medida baseada em plaques, calculada como a razão entre o número de UFP/ml em uma cepa teste e o número de plaques no isolado de referência (aquele que alcançou maior título quantificável). Já o índice de virulência (VI) deriva da área sob a curva de crescimento bacteriano em caldo, analisando como a presença do fago reduz a densidade bacteriana ao longo do tempo em comparação com um controle sem fago.

Neste contexto, diferentes métricas de atividade fágica, como a EOP e o VI obtido em ensaios de cinética em microplaca, tendem a se correlacionar, mas não são idênticas, capturando aspectos complementares da capacidade do fago de controlar a população bacteriana ao longo do tempo (HAINES et al; 2021). Em termos de dinâmica de infecção fágica, diferenças em parâmetros como *burst size*, período de latência e eficiência de adsorção, que influenciam a formação de placas e a dinâmica de lise em sistemas em ágar e em caldo, podem explicar por que fagos com EOP aparentemente reduzida ainda exibem atividade lítica eficiente, sendo capazes de suprimir o crescimento bacteriano ao longo do tempo, conforme quantificado por métricas como o VI (GLONTI; PIRNAY, 2022; STORMS et al, 2019).

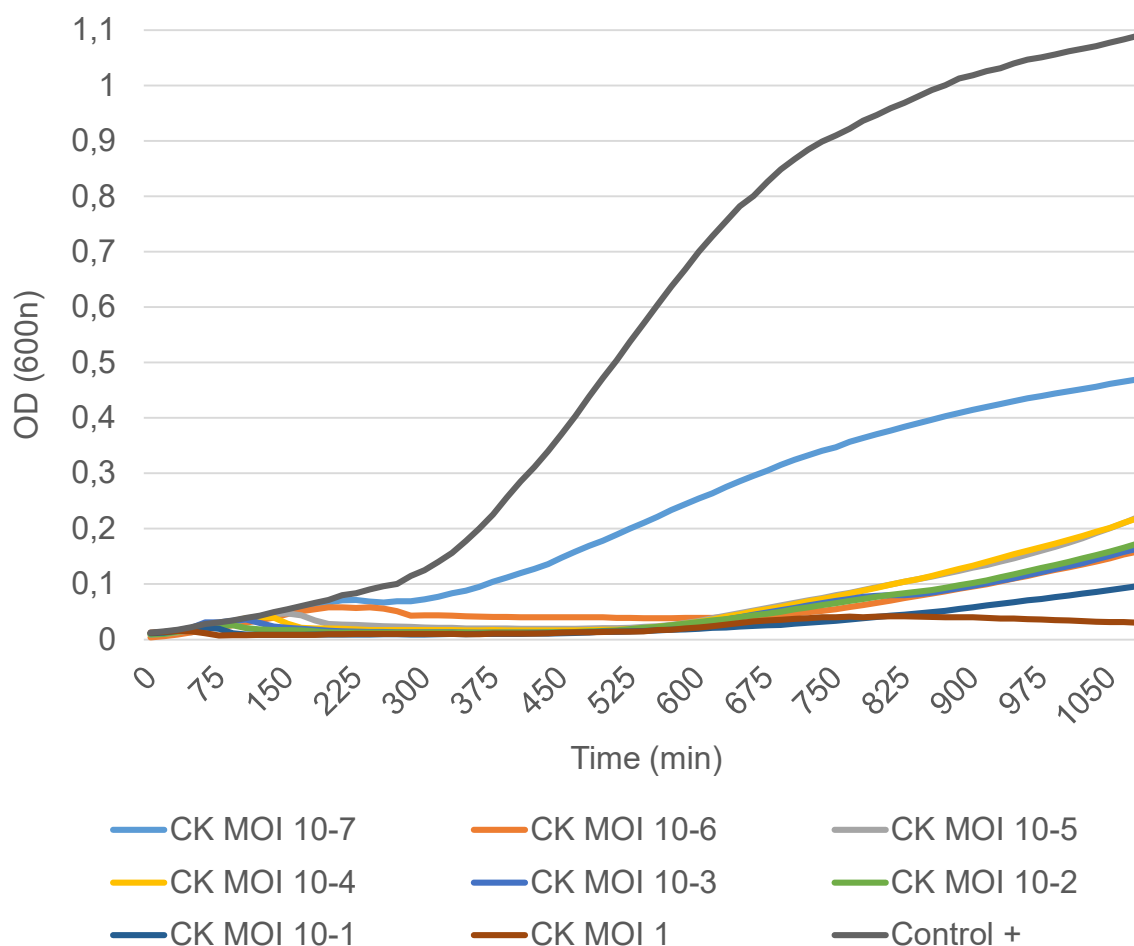
Em culturas líquidas, sucessivos ciclos de infecção, mesmo com *burst size* reduzido, podem ser suficientes para impedir que a densidade bacteriana atinja níveis elevados, resultando em curvas de crescimento controladas e, consequentemente, VI satisfatório. Por outro lado, uma EOP alta nem sempre garante VI igualmente elevado. Fagos com *burst size* grande podem formar numerosos plaques em ágar, mas, se apresentarem adsorção lenta, instabilidade em caldo ou forem inativados podem falhar em suprimir o crescimento quando se analisa as curvas, levando a um VI intermediário ou até mesmo baixo (GLONTI; PIRNAY, 2022; STORMS et al, 2019).

Frente ao conjunto de dados obtidos a respeito do *Host range*, muitas das cepas que mostraram apenas “clareamento fraco” no ST não passaram para a

categoria de EOP detectável, e entre as que apresentaram EOP mensurável, uma fração expressiva demonstrou VI elevado, o que está em linha com estudos que demonstram que nem todo fago com plaque visível é necessariamente virulento em sistemas dinâmicos.

Para os três isolados selecionados para realização dos demais testes presentes nesse estudo (Ab615, Ab576 e Ab846), os dados de virulência mostram que a classificação apenas pelo valor de VI pode até capturar o contexto geral das curvas de crescimento, mas a análise é muito mais precisa quando se avalia o comportamento ao longo do tempo e das diferentes MOIs.

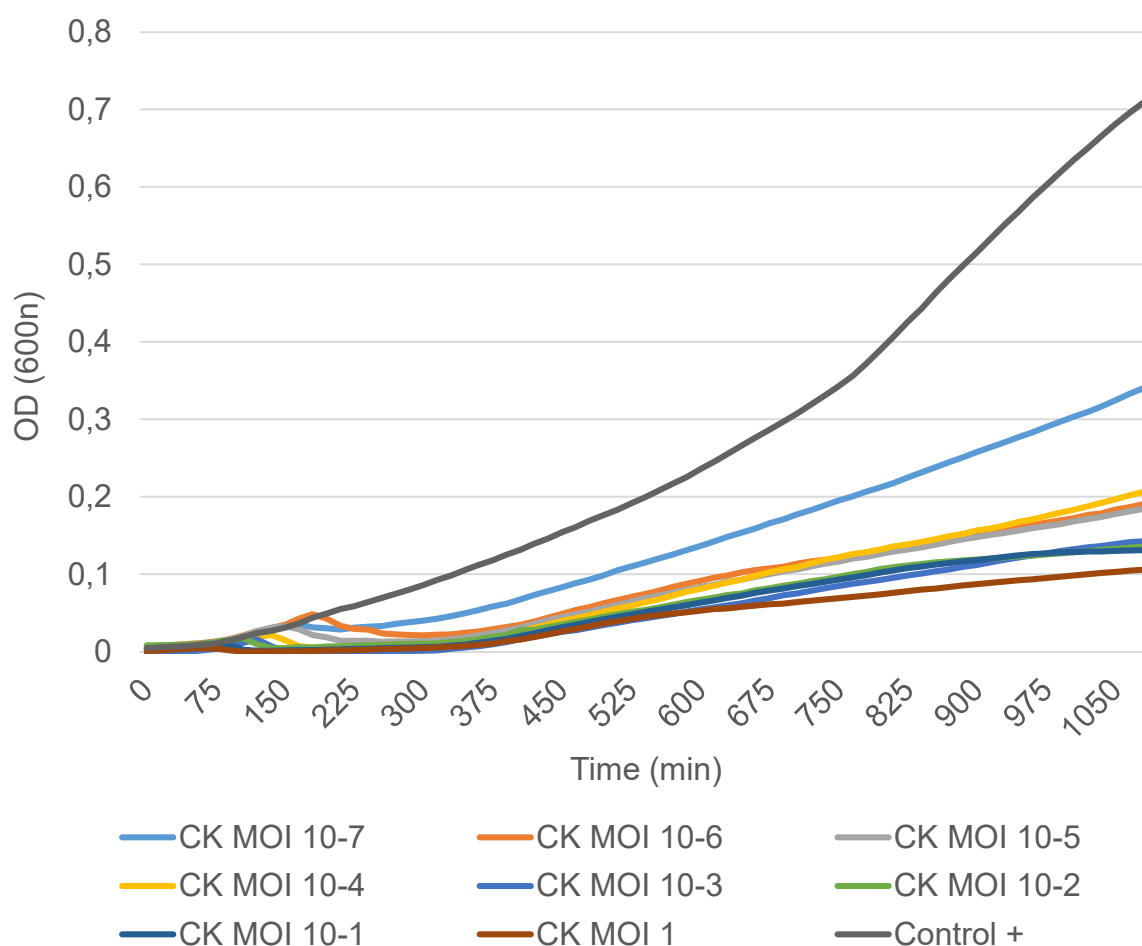
Gráfico 4 – Curva de Virulência do Coquetel frente ao isolado Ab846



No caso de Ab846, como apresentado no **Gráfico 4**, o VI do coquetel 0,88 indica alta virulência, o que é compatível com o perfil observado previamente de EOP igual a 1,0 para phAb568. Essa combinação sugere um fago altamente adaptado ao

hospedeiro, com adsorção eficiente, um provável *burst size* elevado e capacidade de manter a população bacteriana em níveis baixos durante todo o ensaio. Para os experimentos adicionais, que incluem análise antibiofilme e associação do coquetel com antibióticos por meio do *checkerboard*, Ab846 representa, portanto, um cenário de “melhor caso” para avaliar se a presença de antibióticos adiciona benefício ou se pelo menos não há efeito antagônico. Dentre todas as MOIs, como observado no gráfico, a única que demonstrou menor efeito foi 10^{-7} .

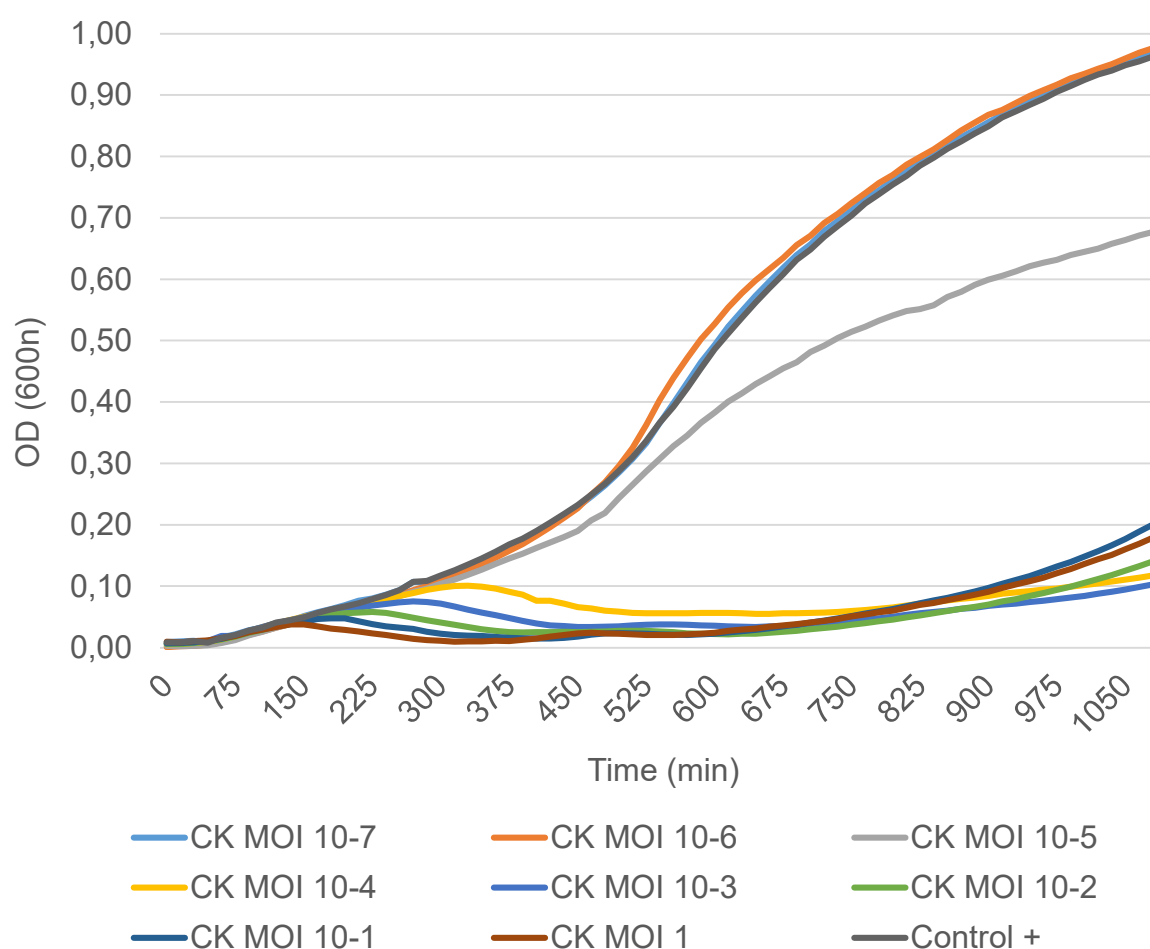
Gráfico 5 – Curva de Virulência do Coquetel frente ao isolado Ab576



Já quanto ao isolado Ab576, presente no **Gráfico 5**, com VI considerado intermediário de 0,75 quando consideramos a média do coquetel, apresenta uma curva em que o crescimento bacteriano é claramente retardado e mantido abaixo do controle por grande parte do tempo, mas com certa tendência de recuperação em fases mais tardias, especialmente nas MOIs mais baixas (10^{-7} , por exemplo). Isso

sugere um contexto de virulência moderada, em que o fago (no caso principalmente phAb586) tem condições adequadas para controlar a população, mas pode encontrar limitações relacionadas ao surgimento de subpopulações resistentes, esgotamento de hospedeiros altamente suscetíveis ou mesmo menor estabilidade da partícula fágica em cultura prolongada. Sugere-se então que Ab576 é, portanto, um modelo adequado para testar associação com antibióticos e verificar atividade contra biofilmes, verificando assim se a recuperação bacteriana que ainda ocorre na parte final da curva e continua presente mesmo nesses cenários.

Gráfico 6 – Curva de Virulência do Coquetel frente ao isolado Ab615



No caso de Ab615, apresentado no **Gráfico 6**, embora o VI do coquetel tenha ficado em 0,59, valor que, na classificação global do coquetel, foi considerado como “baixa virulência”, a curva de crescimento mostra que, nas MOIs intermediárias e altas (1 a 10^{-4}), o coquetel mantém a densidade bacteriana consideravelmente abaixo do controle por boa parte do período de 18 horas. A diferença está presente no

comportamento das MOIs mais baixas (10^{-5} a 10^{-7}), nas quais se observa as curvas mais próximas do controle. Como o VI é calculado a partir da área sob a curva, essas MOIs de menor desempenho trazem o valor médio para baixo, reduzindo o índice global. Isso sugere porque Ab615, pensado como modelo de “baixa virulência”, exibe curvas “boas” nas MOIs mais altas, porém para condições terapêuticas realistas (MOIs baixas e moderadas), sugere uma virulência apenas mediana.

5.2 MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO

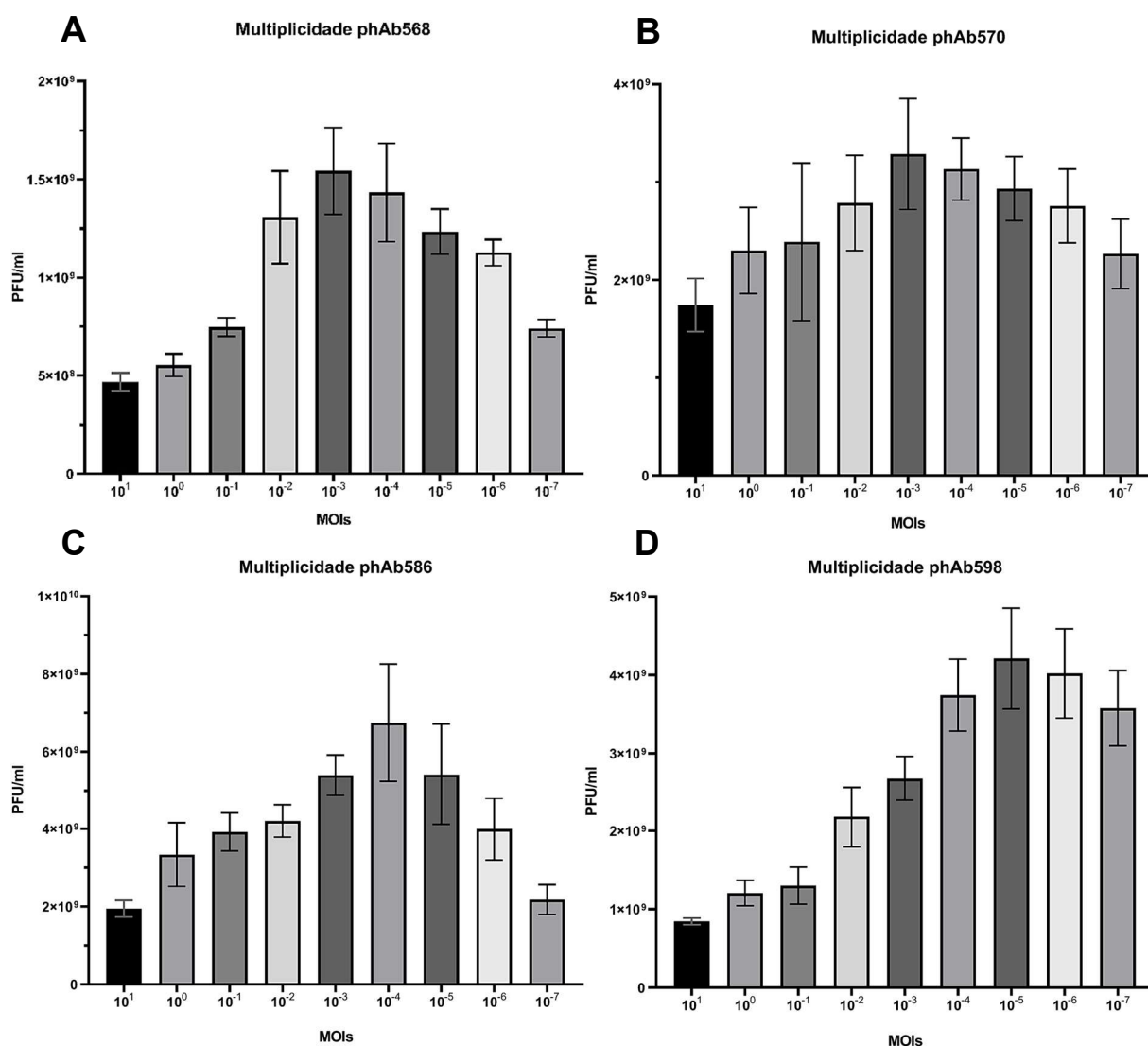
No ensaio de multiplicidade avaliamos a melhor interação fago-bactéria capaz de produzir o maior *burst size* quando submetemos ambos os microrganismos em diferentes proporções *in vitro*. Nesse estudo, os ensaios de multiplicidade de infecção (MOI) mostram que de maneira geral os fagos do coquetel mantêm uma capacidade de produzir títulos altos de partículas virais em uma ampla faixa de MOIs, porém com características particulares. O que é coerente com as EOPs elevadas e os VIs previamente observados.

Para phAb568, os títulos médios variaram de aproximadamente $4,8 \times 10^8$ PFU/mL em MOI 10^1 para picos entre $1,3 \times 10^9$ e $1,7 \times 10^9$ PFU/mL nas MOIs 10^{-2} a 10^{-4} , com queda apenas em MOIs de 10^{-6} e 10^{-7} . Esse perfil sem grandes variações significativas nas MOIs intermediárias indica que a replicação de phAb568 é mais eficiente quando não há excesso de partículas competindo por um número limitado de hospedeiros, o que se alinha aos altos EOPs e VIs observados em isolados como Ab846, Ab573 e Ab575, nos quais o fago mostrou forte capacidade de supressão da população bacteriana.

O phAb570 apresentou títulos entre $1,4 \times 10^9$ e $3,33 \times 10^9$ PFU/mL em praticamente todas as MOIs testadas, com leve aumento em 10^{-3} e 10^{-4} e apenas declínio moderado em 10^{-7} . Esse comportamento relativamente estável sugere que o fago é pouco sensível à variação da razão fago-bactéria, mantendo produção de partículas virais consistente mesmo quando infecta um número maior de células por MOI ou quando o número inicial de partículas é reduzido. Essa robustez ajuda a explicar por que phAb570 alcançou EOP e VI elevados em um conjunto de isolados classificados distintos (por exemplo Ab565 e Ab560), contribuindo de forma importante para a cobertura do coquetel mesmo em cenários em que a dose fágica efetiva possa variar. A estabilidade do título em MOIs baixas é particularmente relevante do ponto

de vista terapêutico, pois indica que o fago pode manter sua atividade lítica a partir de inóculos menores, ou mesmo quando sua viabilidade se reduza ao longo do tempo.

Figura 9 – Painel contendo os gráficos de multiplicidade de infecção de cada um dos bacteriófagos que compõem o Coquetel.



Entre os integrantes do coquetel, phAb586 foi o que alcançou os maiores títulos absolutos, com valores médios aumentando de cerca de $1,7 \times 10^9$ PFU/mL em MOI 10^1 para picos entre $6,5 \times 10^9$ e $8,5 \times 10^9$ PFU/mL em MOIs 10^{-4} e 10^{-5} , mantendo ainda títulos em torno de $2,5$ a $4,9 \times 10^9$ PFU/mL em MOI 10^{-6} e 10^{-7} . Essa forte amplificação em MOIs intermediárias é coerente com os VIs elevados obtidos em isolados como Ab576, Ab586, Ab600 e Ab608, nos quais a curva de crescimento bacteriano também foi suprimida ao longo do tempo. A combinação de *burst size*

moderado com boa eficiência de adsorção nessas condições pode explicar por que, apesar de a EOP de phAb586 ser mediano em alguns isolados (por exemplo Ab576 com EOP 0,40), o VI se mantém alto ou intermediário. Nesses casos, uma vez estabelecida a infecção, a produção cumulativa de partículas ao longo do ensaio é suficiente para controlar a população em caldo.

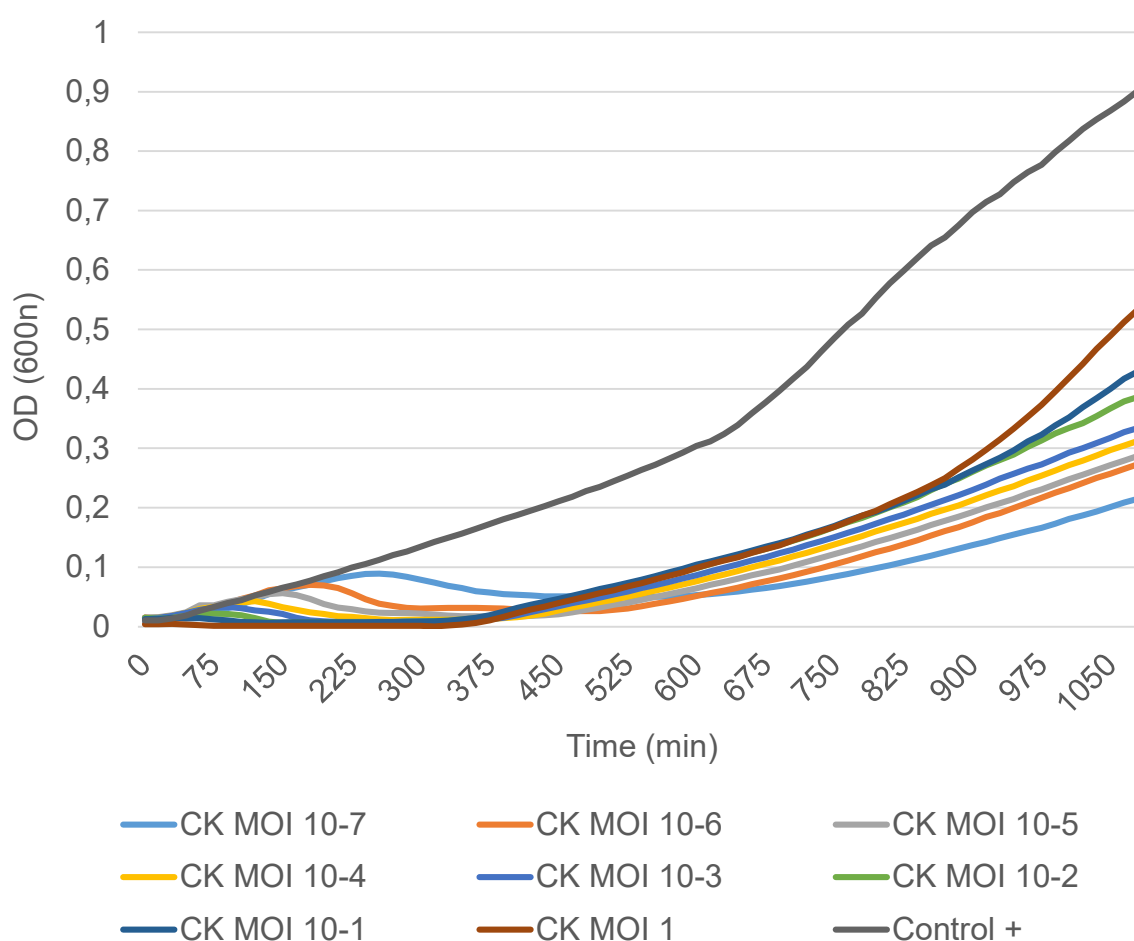
Já o phAb598 exibiu um padrão semelhante, embora com títulos absolutos ligeiramente menores que phAb586, partindo de cerca de $4 \text{ a } 8 \times 10^8$ PFU/mL em MOI 10^1 , alcançou $2,5 \text{ a } 3,0 \times 10^9$ PFU/mL em 10^{-2} e 10^{-3} e picos de $3,5 \text{ a } 4,6 \times 10^9$ PFU/mL em MOIs 10^{-4} e 10^{-6} , com manutenção de valores na faixa de $3,0 \text{ a } 3,9 \times 10^9$ PFU/mL mesmo em 10^{-7} . Esses resultados correspondem com o desempenho satisfatório de phAb598 em EOP e VI nos isolados suscetíveis a ele, reforçando que, quando encontra hospedeiros compatíveis, o fago se replica de maneira eficiente e sustenta pressão suficiente para reduzir o crescimento bacteriano ao longo da curva. Em termos de desenho do coquetel, phAb598 funciona como um generalista de alta produtividade para um conjunto de isolados de *A. baumannii*, complementando o espectro mais amplo, porém menos focado, como por exemplo nos casos de phAb568 e phAb570.

Integrando esses achados com os dados de EOP e VI, é possível sugerir algumas características biológicas de cada fago do coquetel. Fagos com EOP alta e títulos elevados em MOIs intermediárias, como phAb568 e especialmente phAb586, tendem a exibir VIs elevados porque combinam boa eficiência de adsorção com *burst size* substancial, resultando em rápida expansão da população fágica e controle duradouro da curva de crescimento bacteriano ao longo do tempo. O phAb570, apesar de títulos um pouco menores que phAb586, compensa pela estabilidade da produção viral em amplas faixas de MOIs, o que explica a sua contribuição consistente para o coquetel e os VIs altos em vários isolados que ele é capaz de produzir infecção produtiva. Já phAb598 exemplifica um fago de espectro mais amplo, já que é o fago que mais infecta isolados (20 dos 63 isolados), com boa replicação nas cepas suscetíveis, porém é o que apresentou VIs menores quando consideramos sua média de 0,67, ainda considerado alto para os padrões de literatura (STORMS et al, 2020), porém menos impactante dentro do contexto desse estudo.

Essa virulência menor pode estar relacionada com sua melhor multiplicidade ser considerada baixa. Essa interpretação é coerente com o que se observa tanto nos ensaios de multiplicidade como em diversas curvas de virulência individuais de

phAb598. Nos experimentos de multiplicidade, phAb598 atingiu títulos elevados em MOIs reduzidas (10^{-4} a 10^{-7}). Para isso, devemos considerar que um menor número de partículas virais eficientes podem levar um tempo maior para suprimir o crescimento bacteriano a níveis significativos e detectáveis. Alguns gráficos de virulência sugerem essa possibilidade, já que em MOIs menores, como no caso demonstrado no **Gráfico 7**, apresentaram uma OD reduzida nos tempos finais da curva.

Gráfico 7 – Curva de Virulência do phAb598 frente ao isolado Ab624



Isso sugere que a propagação viral a partir de um inóculo reduzido é mais lenta para esse fago em comparação com phAb586 ou mesmo phAb570. Isso pode indicar que, em MOIs baixas, a população viral leva mais ciclos para atingir densidades suficientes para impor uma pressão lítica eficiente, o que tende a aumentar a área sob a curva bacteriana e, portanto, diminuir o VI global, mesmo que ao final do ensaio o título de fagos seja alto e a cultura não atinja a mesma densidade do controle.

O comportamento observado no **Gráfico 9** do phAb598 frente ao isolado Ab624 pode ilustrar bem esse conceito, pois em MOIs mais altas, a supressão do crescimento é mais precoce, porém nos minutos finais da curva passa a acompanhar mais próximo o controle positivo. Já nas MOIs mais baixas há um período inicial em que a curva acompanha de perto o controle, com controle populacional mais lento e a curva demonstra uma inversão de papéis frente a OD. Do ponto de vista da dinâmica fago–bactéria, esse padrão é compatível com um *burst size* adequado e boa replicação em hospedeiros permissivos, mas com uma fase de “*delay*” mais pronunciada quando o número de partículas iniciais é reduzido, exigindo vários ciclos de replicação para que a população fágica se expanda a ponto de limitar o crescimento bacteriano.

Em um contexto clínico, quando consideramos MOIs baixas como ideais, trata-se de um achado interessante e promissor já que situações *in vivo* devem considerar a amplitude de um organismo, que dinâmico e complexo. A fisiologia de uma infecção exige que a terapia demonstre a capacidade de alcançar e manter a concentração no local da infecção, superar as defesas locais e sustentar a atividade lítica na presença de barreiras biológicas e mecanismos de depuração (ABEDON, 2016). Nesse caso, quando a MOI ideal é baixa, se considerarmos a perda natural do título viral ao longo do tempo dentro de um organismo, sugere-se que a atividade seja mantida em níveis satisfatórios para o controle do crescimento bacteriano mesmo na presença de um número reduzido fagos, o que reforça a utilização desse fago no coquetel.

Esses resultados nos ensaios de multiplicidade confirmam que o coquetel é formado por fagos que não apenas infectam e lisam seus hospedeiros, como demonstrado por ST, EOP e VI, mas que também apresentam capacidade considerável de replicação em condições *in vitro*, característica fundamental para sustentar o controle de crescimento bacteriano e eventualmente seu potencial uso terapêutico contra *A. baumannii* multirresistente. Além disso, demonstrou que a composição do coquetel se complementa não apenas em questão de *host range*, como já demonstrado, mas também em suas características biológicas.

5.3 TESTE DE SOBREVIVÊNCIA *IN VIVO* COM LARVAS DE *GALLERIA MELLONELLA*

O ensaio em *Galleria mellonella* confirma, em um modelo *in vivo*, mesmo que alternativo, o potencial terapêutico do coquetel de fagos frente aos 63 isolados de *A. baumannii*. Pelos dados de sobrevivência demonstrados no **Gráfico 14**, o grupo

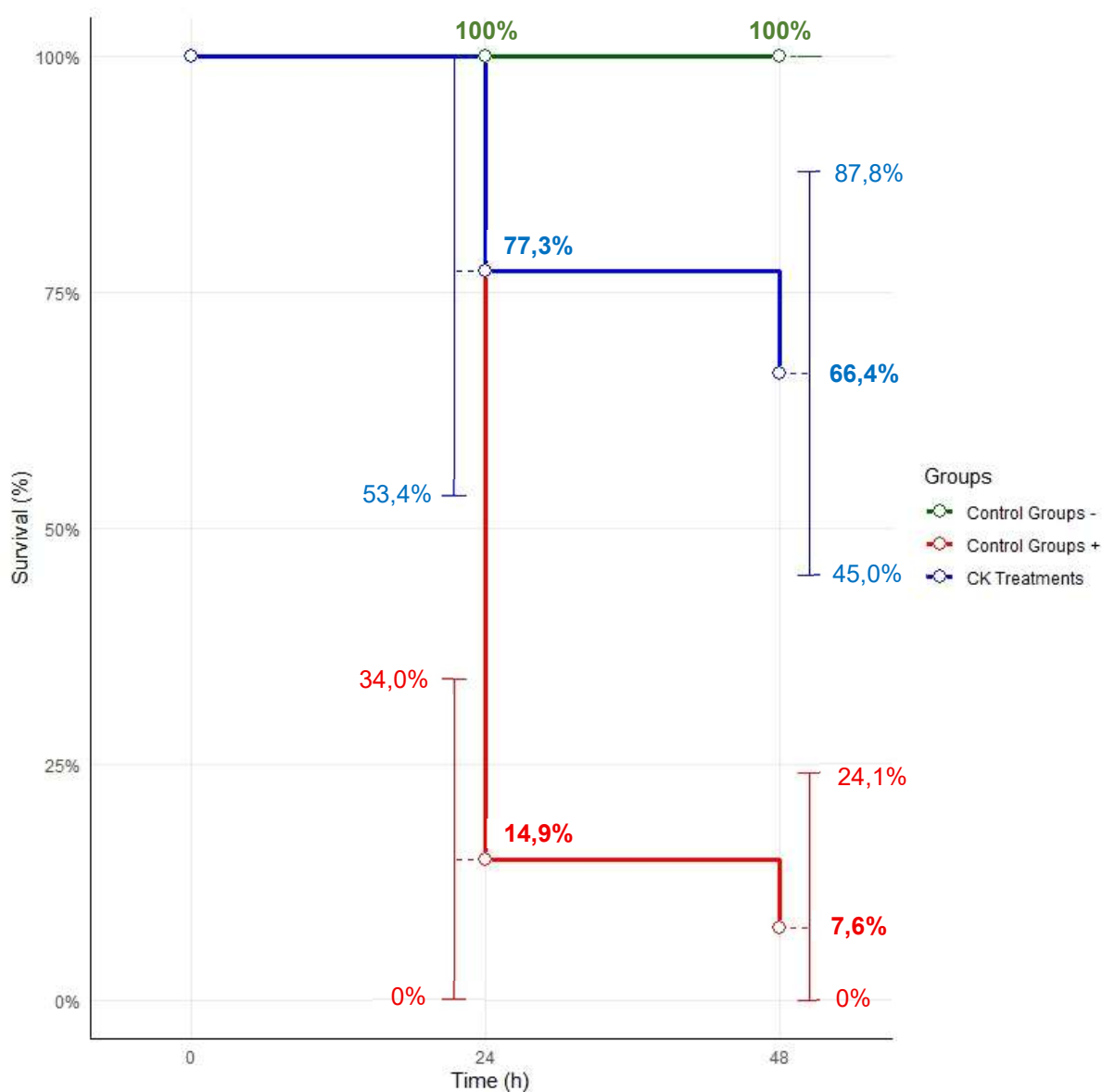
controle negativo manteve 100% de viabilidade em 24 e 48 h, indicando ausência de toxicidade do procedimento e das inoculações em si. Já o controle positivo infectado apenas com a bactéria apresentou queda acentuada de sobrevivência, com vários isolados bacterianos reduzindo o número de larvas vivas entre 0 e 2 em 48 h, refletindo a alta virulência sistêmica dessas cepas na hemolinfa. Em contraste, nos grupos tratados com o coquetel, a média de sobrevivência em 24 h situou-se em 77,3%, com alguns grupos reduzindo o desvio padrão para 53,4%. Já em 48h, os tratamentos com o coquetel manteve 45 a 87,8% das larvas vivas, como ilustrado pelo **Gráfico 8**, em que a sobrevivência média das larvas tratadas foi de aproximadamente 77,3% em 24 h e 66,4% em 48 h, enquanto o controle infectado caiu de 100% para cerca de 14,9% e 7,6%, respectivamente nos tempos do teste.

Esses resultados confirmam que, em condições fisiológicas, o coquetel é capaz de reduzir significativamente a mortalidade associada à infecção por *A. baumannii*, em concordância com os VIs observados *in vitro*. Do ponto de vista imunológico, o modelo de *G. mellonella* oferece uma maneira de observar a interação entre fagos, bactérias e um sistema de defesa inato (JEON et al, 2019). As larvas possuem hemócitos fagocíticos, produção de espécies reativas de oxigênio, síntese de peptídeos antimicrobianos (defensinas, gallerimicina, entre outros), e ativação de cascatas de melanização (PEREIRA et al., 2018). Trabalhos recentes mostraram que, quando a carga bacteriana supera a capacidade dessa resposta, a mortalidade é rápida, porém, quando agentes antimicrobianos reduzem a densidade bacteriana inicial ou a taxa de crescimento, o sistema imune da larva consegue controlar a infecção, resultando em maior sobrevivência (GRYGORCEWICZ et al., 2020; JEON et al, 2019).

No presente estudo, a melhora global de sobrevivência nos grupos tratados sugere que o coquetel de fagos não apenas exerce atividade lítica, como já demonstrado pelos altos VIs em caldo, mas também abaixa suficientemente o inóculo efetivo de *A. baumannii* na hemolinfa para que a imunidade inata da larva consiga controlar o restante da população bacteriana e mantenha sua sobrevivência dentro das 48h. Essa interpretação é consistente com alguns estudos em *G. mellonella* mostrando que fagos e antibióticos bacteriostáticos podem ser eficientes desde que a população bacteriana seja reduzida para um limiar suficiente para o sistema imune controlar o restante da infecção (GRYGORCEWICZ et al., 2020; RAMARAO et al., 2012). Assim, o ensaio *in vivo* é útil pois integra e valida os resultados anteriores que

demonstraram que fagos com alta EOP, forte virulência em curvas de crescimento e boa amplificação em suas MOIs, quando combinados em coquetel, mesmo em um hospedeiro com sistema de defesa primitivo, tem a capacidade de ter um potencial terapêutico, reforçando a necessidade de se explorar futuros estudos em modelos vertebrados para o uso de fagos em infecções por *A. baumannii* multirresistente.

Gráfico 8 – Resultado da média de sobrevivência, com desvio padrão, de larvas de *Galleria mellonella* frente aos 63 isolados de *A. baumannii* testados



Para esse gráfico utilizamos a média de sobrevivência das larvas em cada tempo de análise do teste. Dessa forma o desvio padrão representa a variação presente no número de larvas sobreviventes.

De forma geral, a infecção por *A. baumannii* em *G. mellonella* reproduz, em

escala simplificada, etapas-chave da fisiopatologia observada em vertebrados (TAO et al., 2021). Após a inoculação na hemolinfa, as bactérias multiplicam-se rapidamente, colonizam tecidos, secretam enzimas e endotoxinas e desencadeiam intensa resposta inflamatória local, com recrutamento de hemócitos, produção de espécies reativas de oxigênio e ativação da cascata de melanização, que leva ao escurecimento progressivo da larva (PEREIRA et al., 2018; CAMPBELL et al., 2024). Quando a carga bacteriana ultrapassa a capacidade desses mecanismos, ocorre falência da homeostase, comprometimento de órgãos vitais e consequentemente morte, como se observa nos grupos controles infectados, em que a maioria das larvas foram a óbito já em 24h para vários isolados altamente virulentos (TAO et al., 2021; PEREIRA et al., 2018).

Devemos considerar também que a dose letal utilizada foi DL90, com o inóculo infectante partindo de $1,5 \times 10^9$, responsável por levar a óbito 90% das larvas, portanto a recuperação nesse caso é ainda mais impactante pois sugere a eficiência do coquetel seja em reduzir e controlar a população bacteriana como também aumentar o tempo de vida desses animais. Apesar de seu sistema imunológico mais simples, *G. mellonella* compartilha com mamíferos diversos elementos fundamentais da imunidade inata, como o reconhecimento de padrões (PRRs), produção de citocinas-like, cascatas complementares funcionais e mecanismos de estresse oxidativo (COOK; MCARTHUR, 2013; LANGE et al., 2018; WOJDA et al., 2020), o que explica o uso desse modelo alternativo como uma forma preliminar de se avaliar o potencial terapêutico e a interação dos fagos com um organismo dinâmico.

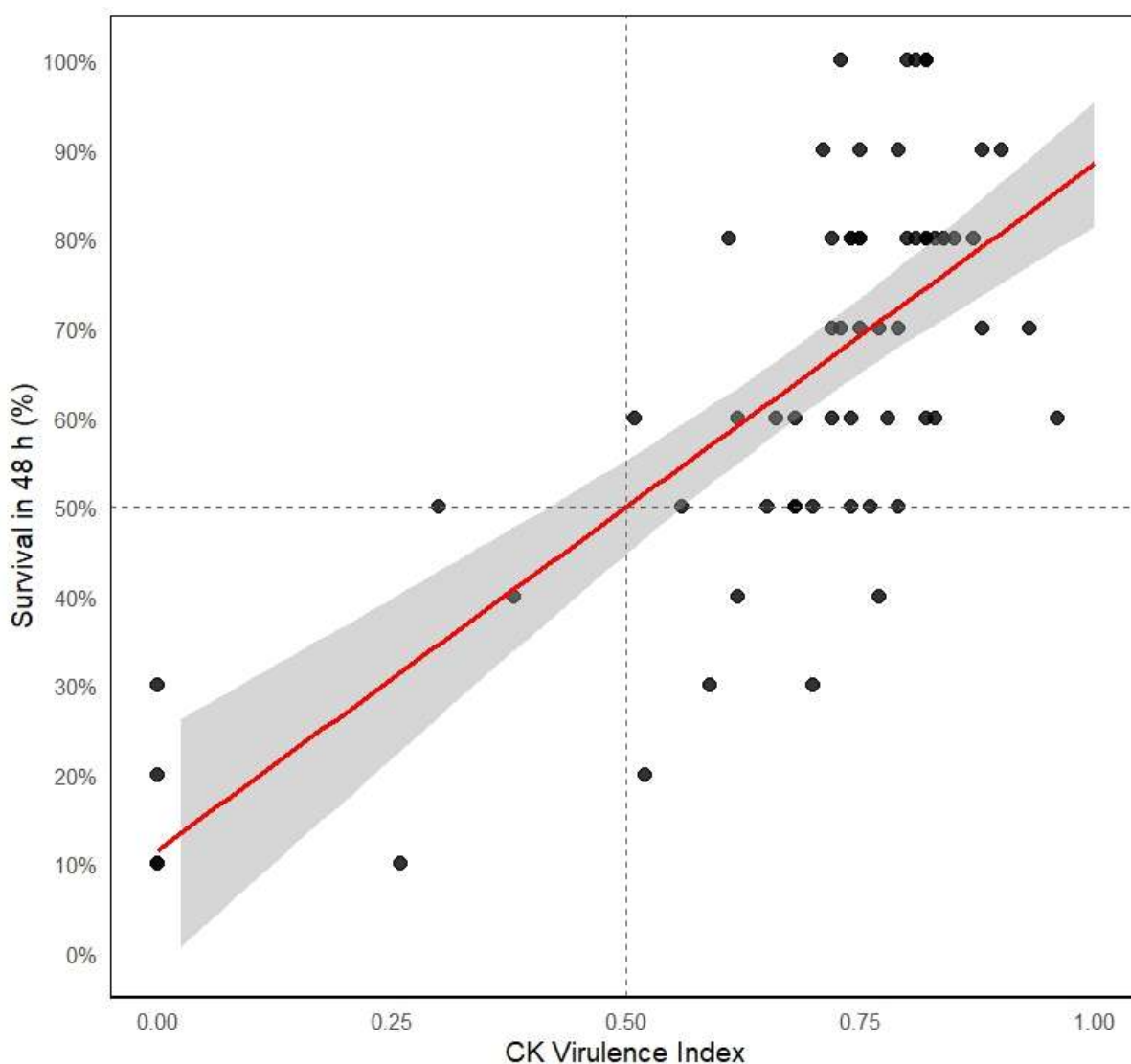
Vários estudos com novos antibióticos, nanopartículas e principalmente fagos demonstraram que compostos capazes de aumentar a sobrevivência de larvas geralmente exibem eficácia em modelos de camundongos, especialmente quando atuam reduzindo a carga bacteriana sistêmica (LIU et al, 2019). Nesse sentido, o uso de *G. mellonella* neste estudo, além de ser interpretado como uma etapa alternativa e preliminar, eticamente vantajosa e de menor custo, permite selecionar combinações fagos promissores e verificar a ausência de toxicidade aguda antes de avançar para modelos vertebrados mais complexos. A demonstração de que o coquetel testado aumenta de forma robusta a sobrevivência das larvas, em concordância com seus altos índices de virulência *in vitro*, fornece assim um argumento biológico sólido para uma próxima etapa com ensaios em camundongos, onde poderão ser examinados aspectos adicionais da fisiopatologia, como distribuição tecidual, interação com

sistema imune, resposta inflamatória sistêmica e desfechos clínicos mais próximos da infecção humana por *A. baumannii*.

5.3.1 Correlação entre Índice de Virulência e sobrevivência de larvas de *G. mellonella*

O diagrama de dispersão presente no **Gráfico 9** sugere que existe uma correlação positiva entre o VI do coquetel medido *in vitro* e a porcentagem de sobrevivência das larvas em 48 h. À medida que o VI se aproxima de 1, indicando supressão satisfatória na curva de crescimento bacteriano em caldo, a sobrevivência média em 48 h tende a se concentrar na faixa de 70 a 100%, enquanto isolados com VI baixo (<0,3) se associam a taxas de sobrevivência geralmente abaixo de 40%.

Gráfico 9 – Correlação entre virulência *in vitro* e sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella*



A regressão linear (linha vermelha), sugere que essa relação está presente quando analisamos de forma estatística, isto é, o desempenho do coquetel em reduzir a área sob a curva de crescimento bacteriano *in vitro* tem o potencial de certa forma “prever”, o grau de proteção conferido *in vivo*.

Essa correlação é biologicamente plausível pois o VI *in vitro* integra a eficiência de adsorção, período de latência e estabilidade dos fagos em caldo, resultando em uma medida de o quão eficiente esses fagos são em controlar o crescimento bacteriano. Quando o VI é alto, a densidade de *A. baumannii* inoculada na hemolinfa da larva provavelmente cai abaixo do limiar crítico em que os mecanismos de defesa inata (hemócitos, melanização, peptídeos antimicrobianos) conseguem controlar a infecção, levando a um maior tempo de sobrevivência. Já quando o VI é baixo, o coquetel apenas retarda parcialmente a expansão bacteriana, e a resposta imune da larva é vencida, reproduzindo as altas taxas de mortalidade vistas nos controles positivos com ausência de fagos, e em uma sobrevivência também reduzida quando o VI é menor. Em outras palavras, sugere-se que o VI pode funcionar para prever a capacidade do coquetel de aumentar o tempo de sobrevivência das larvas.

5.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE *A. BAUMANNII*

O perfil de resistência dos 63 isolados clínicos de *A. baumannii* revelou um cenário típico da predominância de linhagens MDR/XDR em ambiente hospitalar. Na **Tabela 2**, todos os isolados foram resistentes às cefalosporinas testadas (ceftazidima, cefepime, cefotaxima e ceftriaxona), bem como aos carbapenêmicos imipenem e meropenem, confirmando perda completa da atividade dessas classes e confirmando a provável produção de enzimas carbapenemases. De forma semelhante, 100% dos isolados apresentaram resistência a aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e tobramicina), às Fluoroquinolonas como ciprofloxacina e levofloxacina, e ao sulfametoxazol-trimetoprim, caracterizando um fenótipo de multirresistência amplo frente às principais opções terapêuticas de primeira linha.

Entre os β -lactâmicos associados a inibidores de β -lactamases, a combinação ampicilina/sulbactam ainda manteve atividade intermediária ou resistente em pequena fração das cepas (9 isolados intermediários e 54 resistentes), enquanto piperacilina/tazobactam foi inativa frente a todos os 63 isolados. As polimixinas mantiveram o melhor desempenho: para polimixina B, 47 isolados foram sensíveis, 1

intermediário e 15 resistentes; para colistina, 44 sensíveis, 6 intermediários e 13 resistentes.

O comportamento das tetraciclina destaca-se pela presença de uma proporção considerável de isolados ainda suscetíveis. Doxíciclina apresentou 24 isolados sensíveis, 5 intermediários e 34 resistentes, enquanto a tetraciclina mostrou 14 sensíveis, 8 intermediários e 41 resistentes. Essa distribuição é coerente com estudos que apontam variabilidade na presença de genes de resistência a tetraciclina (*tetA*, *tetB*, *tet39*), frequentemente associados a bombas de efluxo e plasmídeos (FOONG et al., 2020; HAMIDIAN et al., 2016), cuja prevalência depende fortemente do histórico local de uso desses fármacos.

Em cenários nos quais tetraciclina não são empregadas de forma rotineira como primeira escolha para tratamento de infecções por *A. baumannii*, a pressão seletiva para manutenção desses determinantes tende a ser menor, permitindo que clones sensíveis persistam mesmo em ambientes com intensa seleção por outras classes de antibióticos (FOONG et al., 2020). Isso provavelmente explica a sensibilidade residual observada na **Tabela 2**, em contraste com a resistência universal aos agentes mais utilizados na prática clínica do hospital.

A combinação ampicilina/sulbactam mostrou 54 isolados resistentes e apenas 9 intermediários, enquanto piperacilina+tazobactam foi ineficiente frente a todos os 63 isolados (100% resistentes). Esse padrão reflete o acúmulo de múltiplos mecanismos de resistência a β -lactâmicos em *A. baumannii*, incluindo a elevada produção de β -lactamases intrínsecas (particularmente OXA-51-like), aquisição de carbapenemases do tipo OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 e, ocasionalmente, metalo- β -lactamases (MBLs) como NDM-1 e VIM, além de alterações em PBPs e perda ou modificação de porinas. Sulbactam tem atividade contra *A. baumannii* ao se ligar a PBP1 e PBP3, e por isso algumas cepas podem apresentar sensibilidade parcial (intermediários) à combinação SBA (VEERARAGHAVAN et al, 2025; ARUN et al., 2025; DE SOUZA et al, 2025). A resistência universal a PPT é coerente com estudos que mostram que, em contextos de disseminação de OXA-23 e MBLs, o aumento da dose ou associação com tazobactam provavelmente tem baixa atividade, já que o inibidor não neutraliza carbapenemases e o componente piperacilina pode ser rapidamente hidrolisada.

Tabela 2 – Resultado do perfil de resistência dos 63 isolados de *A. baumannii* frente aos antimicrobianos testados com as técnicas de Disco-Difusão e Microdiluição em Caldo com pontos de corte definidos pelo CLSI-Ed.2023

Classe do Antibiótico	Nome do Antibiótico	Sigla	R ¹	I ²	S ³
Penicilinas + Inibidores de betalactamases	Ampicilina + Sulbactam	SBA	54	9	-
	Piperacilina + Tazobactam	PPT	63	-	-
Cefalosporinas	Ceftazidima	CAZ	63	-	-
	Cefepime	COM	63	-	-
	Cefotaxima	CTX	63	-	-
	Ceftriaxona	CRO	63	-	-
Carbapenêmicos	Imipenem	IPM	63	-	-
	Meropenem	MER	63	-	-
Aminoglicosídeos	Amicacina	AMI	63	-	-
	Gentamicina	GEN	63	-	-
	Tobramicina	TOB	63	-	-
Tetraciclínas	Doxiciclina	DOX	34	5	24
	Tetraciclina	TET	41	8	14
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	CIP	63	-	-
	Levofloxacina	LVX	55	8	-
Sulfonamidas	Sulfametoxazol + Trimetropima	SUT	63	-	-
Polimixinas ⁴	Polimixina B	PMB	15	1	47
	Colistina	COL	13	6	44

¹: Resistente; ²: Intermediário; ³: Sensível; ⁴: A técnica de Microdiluição em Caldo foi empregada apenas para a classe das Polimixinas seguindo exigências metodológicas.

Todos os 63 isolados foram resistentes a ceftazidima, cefepime, cefotaxima e ceftriaxona. Esse fenótipo pode indicar não apenas a presença de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e *AmpC* cromossômicas altamente expressas, mas também a ação combinada de carbapenemases do tipo OXA e mecanismos de alteração de permeabilidade, que conferem resistência cruzada a praticamente todo

o espectro de cefalosporinas. Em *A. baumannii*, a aquisição facilitada e inserção de genes de resistência por elementos IS (por exemplo, *ISAba1*, *ISAba125*), podem tanto aumentar a expressão de β -lactamases como também favorecer rearranjos que afetam porinas e PBPs. O resultado é uma perda completa de utilidade clínica das cefalosporinas tradicionais, o que causa o uso maciço de carbapenêmicos como “último recurso” (WONG et al, 2019; DE SOUZA et al, 2025; DEPKA et al, 2024; CARASCAL et al, 2024).

A resistência de 100% dos isolados a imipenem e meropenem reforça que o hospital possivelmente convive com uma população essencialmente CRAB (*carbapenem-resistant A. baumannii*). Esse fenótipo está fortemente associado à aquisição de genes do tipo *blaOXA-23* e, em menor frequência, dos tipos *blaOXA-24/40* e *blaOXA-58*, frequentemente integrados em ilhas de resistência ligadas a clones internacionais de alto risco (IC1, IC2, IC7, IC8). Estudos recentes indicam que a prevalência global de CRAB ultrapassa 70 a 80% em muitos países, com prevalência em UTIs e unidades de terapia prolongada (MÜLLER et al, 2023). O fato de todos os isolados serem resistentes sugere que o hospital já alcançou uma situação em que clones sensíveis foram praticamente eliminados pela pressão seletiva, restando apenas linhagens com múltiplas carbapenemases e mecanismos de impermeabilidade acoplados a bombas de efluxo *AdeABC*, *AdeIJK* e *AdeFGH*. Isso tem implicações diretas para fagoterapia, pois a forte pressão de carbapenêmicos pode favorecer mutações, que por sua vez modulam a susceptibilidade a fagos, algo descrito em estudos de evolução experimental, nos quais alterações em polissacarídeo capsular e sistema *BfmRS* afetam simultaneamente resistência a antibióticos e susceptibilidade aos fagos (BAI et al, 2023).

A resistência total a amicacina, gentamicina e tobramicina indica que tais isolados carregam um repertório amplo de genes de resistência a aminoglicosídeos, incluindo *aminoglicosídeo-modifying enzymes* (AMEs) como acetiltransferases (AAC), fosfotransferases (APH) e nucleotidiltransferases (ANT), além de possível contribuição de bombas de efluxo e alterações na permeabilidade da membrana externa. Estudos recentes em clones globais de *A. baumannii* mostram que determinados genes são frequentemente carregados em plasmídeos ou ilhas cromossômicas, muitas vezes associados e próximos a genes de carbapenemases (NADERI et al., 2023). A presença simultânea desses determinantes explica a ausência de qualquer isolado suscetível nessa classe e sugere como a pressão

combinada de aminoglicosídeos e β -lactâmicos em UTIs favorece a persistência desses genes que conferem resistência.

Nas tetraciclinas, como observado o perfil foi mais diferenciado, já que 34 isolados foram resistentes, 5 intermediários e 24 sensíveis. Para tetraciclina, 41 resistentes, 8 intermediários e 14 sensíveis. Esse cenário sugere que, embora a pressão seletiva já tenha selecionado clones com bombas de efluxo específicas ou proteínas de proteção ribossomal, esses determinantes ainda não se fixaram em toda a população, ao contrário do que se observa para carbapenêmicos e aminoglicosídeos. Estudos com coleções de CRAB demonstram que a susceptibilidade à minociclina e doxiciclina está fortemente correlacionada com a ausência de *tetB* ou com a sua baixa expressão (KIM et al., 2025; WANG et al., 2017), e que a introdução desse gene via plasmídeos ou ilhas de resistência é dependente do uso clínico local de tetraciclinas (KIM et al., 2025; VILACOBÁ et al., 2013). Na medida em que tetraciclinas não são a primeira opção para infecções graves por *A. baumannii*, a pressão de seleção por esses genes é menor, permitindo que subpopulações sensíveis persistam ao lado de clones altamente resistentes a outras classes.

A resistência completa a ciprofloxacina (63 dos 63 isolados), enquanto para levofloxacina, 55 resistentes com os demais intermediários, e nenhum sensível, indica que mutações em subunidades da DNA girase e topoisomerase IV, associadas a bombas de efluxo possivelmente se disseminaram amplamente entre os isolados. Em *A. baumannii*, a aquisição sequencial de mutações na região desses genes, combinada com a superexpressão de sistemas de efluxo, leva ao fenótipo de alta resistência a fluoroquinolonas (PARK et al., 2011), frequentemente sem custo de *fitness* significativo, o que facilita sua manutenção mesmo na ausência de maior pressão (WEBBER et al., 2013). A resistência total observada sugere o uso passado de fluoroquinolonas e/ou aquisição via elementos móveis que carregam simultaneamente genes de carbapenemase e modificação de bombas de efluxo.

Já quanto a resistência universal a sulfametoxazol-trimetoprim (63/63) indica presença disseminada de genes alternativos de dihidropteroato sintase e diidrofolato redutase (por exemplo *sul1* e *sul2*), frequentemente inseridos elementos genéticos móveis (VENKATESAN et al., 2023). Esses elementos são altamente móveis e costumam acompanhar outros determinantes de resistência, o que faz com que, em populações fortemente expostas a múltiplas classes de antibióticos, a perda de

susceptibilidade a SXT seja praticamente universal, como observado em isolados de *A. baumannii* provenientes de hospitais.

Por fim, as polimixinas representam a classe com maior diferença, pois para polimixina B, 47 isolados foram sensíveis, 1 intermediário e 15 resistentes, enquanto para colistina, 44 sensíveis, 6 intermediários e 13 resistentes. A resistência nesse grupo geralmente decorre de modificações na molécula de lipídio A do LPS, mediadas por mutações em sistemas de dois componentes *PmrAB* e *PhoPQ* ou pela aquisição de genes *mcr*, que adicionam grupos fosfoetanolamina ao lipídio A, reduzindo a afinidade pela droga (HUANG et al., 2020; ARROYO et al., 2011; CHIN et al., 2015).

Tabela 3 – Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) segundo a técnica de Microdiluição em Caldo dos isolados selecionados de *A. baumannii* utilizados nos testes de associação Coquetel-Antibiótico

Nome do Antibiótico	Isolados <i>A. baumannii</i>	CIM (µg/ml)	Definição CLSI (Ed.2023)
Levofloxacina	Ab576	32	Resistente
	Ab615	128	Resistente
	Ab846	32	Resistente
Meropenem	Ab576	32	Resistente
	Ab615	64	Resistente
	Ab846	64	Resistente
Piperacilina + Tazobactam	Ab576	256	Resistente
	Ab615	512	Resistente
	Ab846	256	Resistente
Colistina	Ab576	4	Intermediário
	Ab615	32	Resistente
	Ab846	32	Resistente

A coexistência de isolados sensíveis, intermediários e resistentes indica que as polimixinas ainda exercem pressão seletiva e permanecem em uso, com a possibilidade de resistência emergindo. Do ponto de vista microbiológico, alterações na superfície envolvidas na resistência a polimixinas (modificações no LPS) podem

também impactar na estrutura da membrana externa e na estrutura da cápsula, afetando potencialmente a infectividade de fagos que reconhecem o polissacarídeo capsular. Porém isso também nos permite verificar, como o que será abordado nos demais resultados, se a exposição combinada a polimixinas e fagos seleciona adaptações que permitam *trade-offs* entre resistência a antibiótico e susceptibilidade aos fagos.

Quanto aos dados de microdiluição em caldo, demonstrados na **Tabela 3**, e obtidos para os três isolados selecionados para os ensaios de associação (Ab576, Ab615 e Ab846) reforçam esse padrão resistência. Todos apresentaram CIMs elevadas de levofloxacina (32 e 128 µg/mL), meropenem (32 e 64 µg/mL) e piperacilina/tazobactam (256 e 512 µg/mL. Em relação à colistina, Ab615 e Ab846 exibiram CIM de 32 µg/mL (resistentes), enquanto Ab576 mostrou CIM de 4 µg/mL, interpretada como intermediária. Na prática, isso significa que, mesmo na droga de considerada de “última linha” para *A. baumannii*, já se observa perda parcial de eficácia, alinhando-se a relatos recentes de aumento de resistência a polimixinas em diversos países. A escolha desses três isolados para os testes de *checkerboard* com o coquetel de fagos é, portanto, justificada pois representam cenários clínicos desafiadores nos quais a terapia antibiótica isolada é insuficiente, e uma eventual sinergia fago-antibiótico poderia ter impacto terapêutico real.

De forma geral, perfil de resistência observado revela um conjunto de isolados de *A. baumannii* que demonstra perda de susceptibilidade frente as principais classes de antibióticos sistêmicos, com relativa sensibilidade e perfil intermediário apenas em tetraciclina e polimixinas. Esse cenário reflete a convergência de múltiplos fatores de resistência intrínsecos e adquiridos, e cria um contexto ideal para justificar a exploração de fagos e suas combinações como estratégia no combate a esse patógeno de difícil tratamento.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO COMBINADO DE BACTERIÓFAGOS E ANTIBACTERIANOS

O teste de avaliação da associação entre o coquetel de fagos e antimicrobianos foi realizado por meio de *checkerboards*. A escolha estratégica dos quatro antibióticos para associação com o coquetel de fagos decorre da resistência apresentada pelos isolados e os mecanismos de ação de cada fármaco. Dessa forma, associando ambos os agentes (fagos e antimicrobianos) podemos explorar os potenciais efeitos

combinados contra *A. baumannii* multirresistente, além disso, consideramos também os fármacos mais frequentemente em uso na rotina clínica hospitalar. Tais antibióticos representam classes amplamente utilizadas cuja eficácia foi praticamente perdida nos isolados deste estudo, mas que possuem o potencial de agir em alvos centrais da fisiologia bacteriana. Em combinação com fagos, esses fármacos, mesmo em concentrações subinibitórias, podem interferir na replicação bacteriana e modular a expressão de sistemas de defesa, podendo favorecer a adsorção e a replicação viral ou mesmo se aproveitando dos *trade-offs* genéticos envolvidos nesse processo (ALTAMIRANO, et al; 2021; WANG et al, 2021).

Na interação bactéria–fago–antibiótico, esses *trade-offs* genéticos são situações em que uma mutação que confere vantagem em um aspecto (por exemplo, resistência a um fago ou a um antibiótico), acaba gerando um custo em outro traço importante da bactéria. Um exemplo clássico em *A. baumannii* é a modificação do polissacarídeo capsular ou do LPS para escapar de um fago que usa cápsula como receptor. Ao perder ou alterar esse receptor, a bactéria pode se tornar resistente à infecção fágica, mas paga o preço de reduzir a proteção contra o sistema imune do hospedeiro, perder capacidade de formar biofilme ou até ficar mais suscetível a certos antibióticos (ALTAMIRANO, et al; 2021). Do ponto de vista genético, esses *trade-offs* surgem porque o mesmo conjunto de genes (capsula, LPS, porinas, bombas de efluxo) cumpre funções múltiplas e uma mutação que acaba solucionando um problema (entrada do fago ou alvo do antibiótico) acaba interferindo em demais funções associadas à virulência, à integridade de membrana ou ao metabolismo. Em combinações fago-antibiótico, a intenção é explorar esse efeito quando pressiona-se a bactéria a escolher entre manter resistência a um agente e tornar-se mais vulnerável ao outro.

O uso de Levofloxacina (LVX), Meropenem (MER) e Piperacilina-Tazobactam (PPT), oferece um modelo no qual eventuais efeitos combinados com fagos indicariam que a ação lítica viral é capaz de causar ressensibilização ou mesmo redução de dose em antibióticos que já perderam sua atividade isoladamente, permitindo assim alguma penetração desses fármacos ou exploração de janelas transitórias de susceptibilidade. Esse tipo de cenário tem sido proposto como forma de retardar a ineficácia de antibióticos que perderam atividade clínica, reutilizando-os em contextos associados a outro agente antimicrobiano. A inclusão de Colistina (COL), por sua vez, se baseia tanto em seu mecanismo de ação, atuando na membrana externa e

podendo desorganizar a superfície bacteriana favorecendo o acesso dos fagos aos seus receptores de superfície (WANG et al, 2021), como também sua associação pode causar redução de dose quando consideramos a classe das Polimixinas como um antibiótico de última escolha e que pode gerar diversos efeitos colaterais significativos, principalmente relacionados a danos renais (WAGENLEHNER, et al 2021; LI, et al; 2006). Diante disso, como o perfil de resistência de muitos isolados frente a COL ainda se mostrou sensível, ainda assim, a possibilidade de se reduzir as concentrações utilizadas e manter o potencial terapêutico é um fator importante e que deve ser considerado.

5.5.1 Levofloxacinina

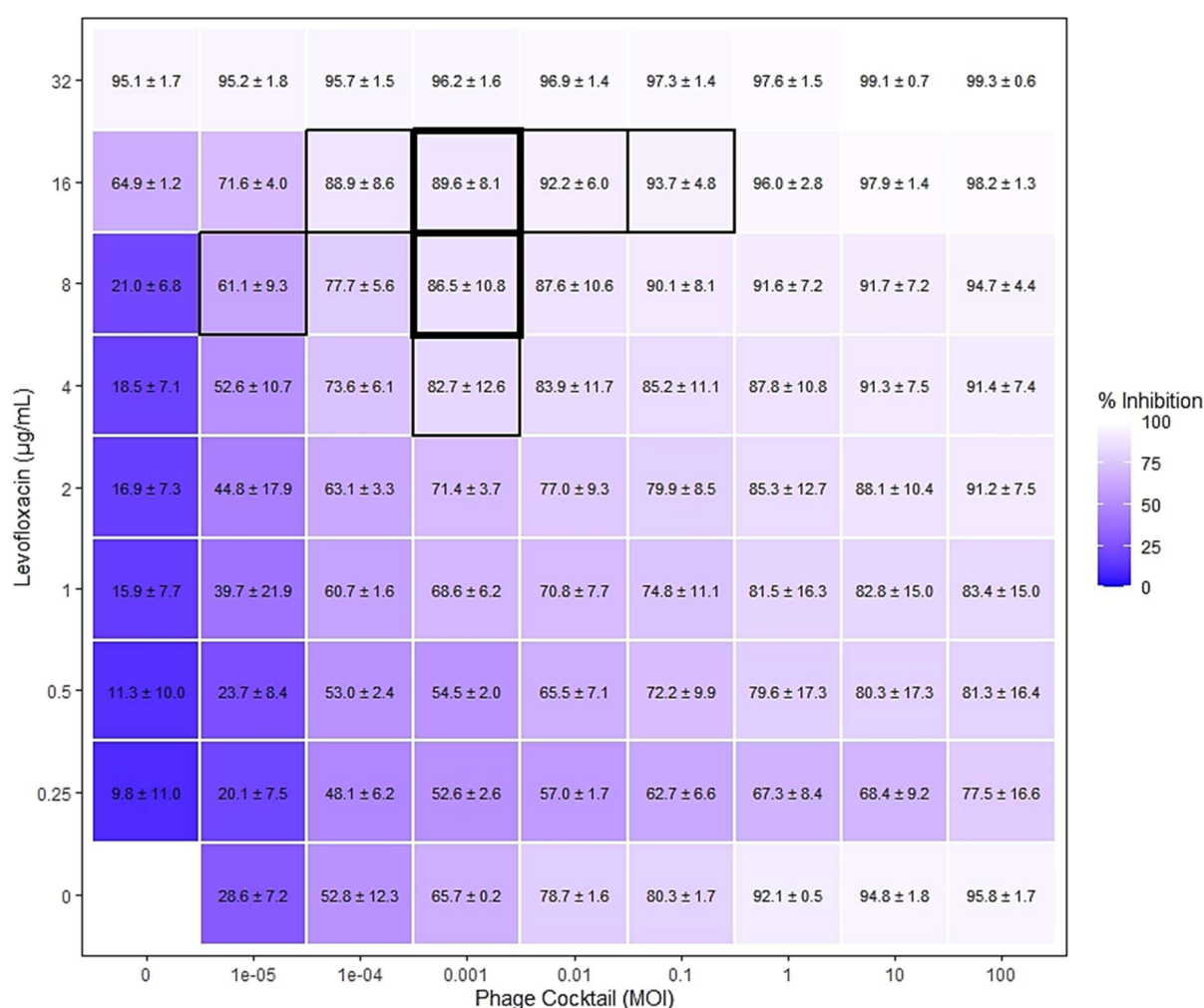
Analizando o **Gráfico 16**, referente a combinação de LVX com o CK para Ab576, observa-se a presença de provável efeito biológico em relação ao maior tratamento isolado (destacadas em preto, diferença >20%), e também algumas áreas de possível indicativo de efeito biológico da combinação (contorno simples, 10–20% de diferença) e muitas combinações sem efeito aparente ($\leq 10\%$). Nos poços em que a levofloxacinina está em concentrações intermediárias (4–16 $\mu\text{g/mL}$) e o coquetel em MOIs médias e baixas (10^{-1} a 10^{-5}), observam-se valores de inibição superiores aos esperados pelos efeitos individuais, com uma maior ocorrência de poços demarcados com indicativo e provável efeito biológico nessa área, sugerindo um potencial fenômeno sinérgico.

Nesses poços, a porcentagem de inibição atinge 82–93%, enquanto a levofloxacinina isolada nessas concentrações gera apenas cerca de 18–65% e o coquetel nas MOIs correspondentes produz cerca de 29–80% de inibição. Esse ganho adicional de pontos percentuais pode ser interpretado microbiologicamente como resultado de múltiplas interações, como a ação dos fagos em adsorver e iniciar o ciclo lítico, e ao mesmo tempo, a ação dos vírus força a bactéria a alterar sua cápsula ou mesmo comprometer sua formação, possivelmente facilitando a penetração ou o acúmulo intracelular da fluoroquinolona que passa então a agir nas topoisomerasas inibindo a replicação do DNA bacteriano (PARK et al., 2011).

Por outro lado, em concentrações muito altas de levofloxacinina (32 $\mu\text{g/mL}$), observa-se que praticamente todas as combinações com o coquetel resultam em inibição próxima de 95–99%, mas sem diferença expressiva em relação ao antibiótico

isolado nessa concentração, que já atinge 95% de inibição sozinho. Nesses poços, o efeito do fármaco é mantido, indicando que, quando a levofloxacina já exerce controle frente ao crescimento bacteriano, a contribuição adicional dos fagos não afeta negativamente seu potencial antimicrobiano. Isso se dá pois em doses muito altas de fluoroquinolonas, a população bacteriana é rapidamente bloqueada na replicação e provavelmente entra em processos de morte celular programada ou fica metabólica e estruturalmente inviabilizada, de modo que há poucas células viáveis para os fagos infectarem.

Gráfico 10 – *Checkerboard* da associação entre Levofloxacina e o Coquetel frente o isolado Ab576



Nos *heatmaps* da associação Coquetel-Antimicrobiano, as combinações destacadas em preto variam em espessura e foram classificadas de acordo com a magnitude da diferença em relação ao controle isolado mais efetivo, correspondendo aos critérios estabelecidos em relação ao potencial efeito biológico presente na associação e mencionados anteriormente na seção 4.9.1.3.

Esse tipo de padrão, em que o potencial efeito positivo causado pela combinação se dá principalmente em uma janela específica de concentrações do antimicrobiano, é encontrado inclusive nos demais ensaios, reforçando que a interação fago–antibiótico depende de janelas de concentração nas quais ambos os agentes isoladamente possuem efeitos reduzidos, no caso das fluoroquinolonas em doses bacteriostáticas ou ligeiramente bactericidas, e MOIs baixas ou intermediárias em que os fagos não consigam controlar o crescimento bacteriano de maneira eficiente.

Outra análise importante pode ser sugerida quando analisamos as faixas de combinação em que o antibiótico está em baixas concentrações (principalmente 0,25 µg/mL). Nessas doses observamos um certo antagonismo nas baixas concentrações de LVX pois mesmo em MOIs altas a porcentagem de inibição se mostrou menor que nos controles do coquetel isoladamente. Isso pode ser sugerido por efeitos fisiológicos causados pela fluoroquinolona sobre a população bacteriana e que acabam prejudicando o desempenho dos fagos. Em doses baixas subinibitórias, a levofloxacina tende a reduzir a taxa de crescimento e a alterar o estado metabólico de *A. baumannii* sem necessariamente levar à morte celular, induzindo um fenótipo de persistência ou de crescimento lento. Células em divisão mais lenta expressam menos receptores de superfície, remodelam sua superfície e entram em estados fisiológicos nos quais a síntese de macromoléculas e a replicação de DNA são parcialmente bloqueadas (PARK et al., 2011; WEBBER et al., 2013). Como o ciclo lítico fágico depende justamente de uma maquinaria metabólica ativa para produzir novas partículas, esse estado pode limitar a replicação viral e reduzir o seu efeito, apesar do alto número inicial de fagos. Dessa forma, sugere-se que a LVX em baixa dose pode submeter a população bacteriana em um estado menos suscetível à infecção, de modo que o coquetel, que sozinho teria inibição elevada, passa a atuar de forma um pouco menos eficiente.

Além disso, concentrações subinibitórias de fluoroquinolonas podem induzir respostas de estresse e SOS que aumentam a expressão de bombas de efluxo e modificam a composição da membrana externa. Em *A. baumannii*, a *up-regulation* de sistemas como *AdeABC* e *AdeIJK* e alterações em lipídios de membrana já foram associadas à diminuição da susceptibilidade a vários agentes, inclusive a mudanças na acessibilidade de receptores capsulares e de LPS empregados por fagos (YOON, et al, 2013; SUGAWARA et al, 2014; ZANG et al, 2021). Assim, também é plausível

sugerir que, nessas condições de LVX baixa, Ab576 pode responder com um rearranjo de cápsula que, ao mesmo tempo em que reduz ainda mais a eficácia do antibiótico, diminui também a eficiência de adsorção e/ou de injeção de DNA dos fagos, levando à queda da porcentagem de inibição em relação aos controles sem antibiótico. Esse tipo de antagonismo dependente de dose, em que o antibiótico induz adaptações que conferem uma tolerância à infecção fágica reforça a importância de definir faixas de concentração em que o estresse induzido pelo antibiótico seja positivo.

Por outro lado, uma hipótese sugerida para o efeito biológico observado na combinação, também pode envolver a modulação de sistemas de reparo de DNA e resposta SOS. Sabe-se que fluoroquinolonas induzem quebras de dupla fita no DNA bacteriano e ativam a resposta SOS, que em *A. baumannii* pode incluir aumento de mutabilidade e modulação de bombas de efluxo. Nesse contexto estressado, a entrada de DNA fágico pode encontrar uma maquinaria de reparo desregulada e processos de replicação comprometidos, favorecendo a montagem de partículas virais às custas da tentativa bacteriana de reparar o genoma danificado (GEISINGER et al, 2019).

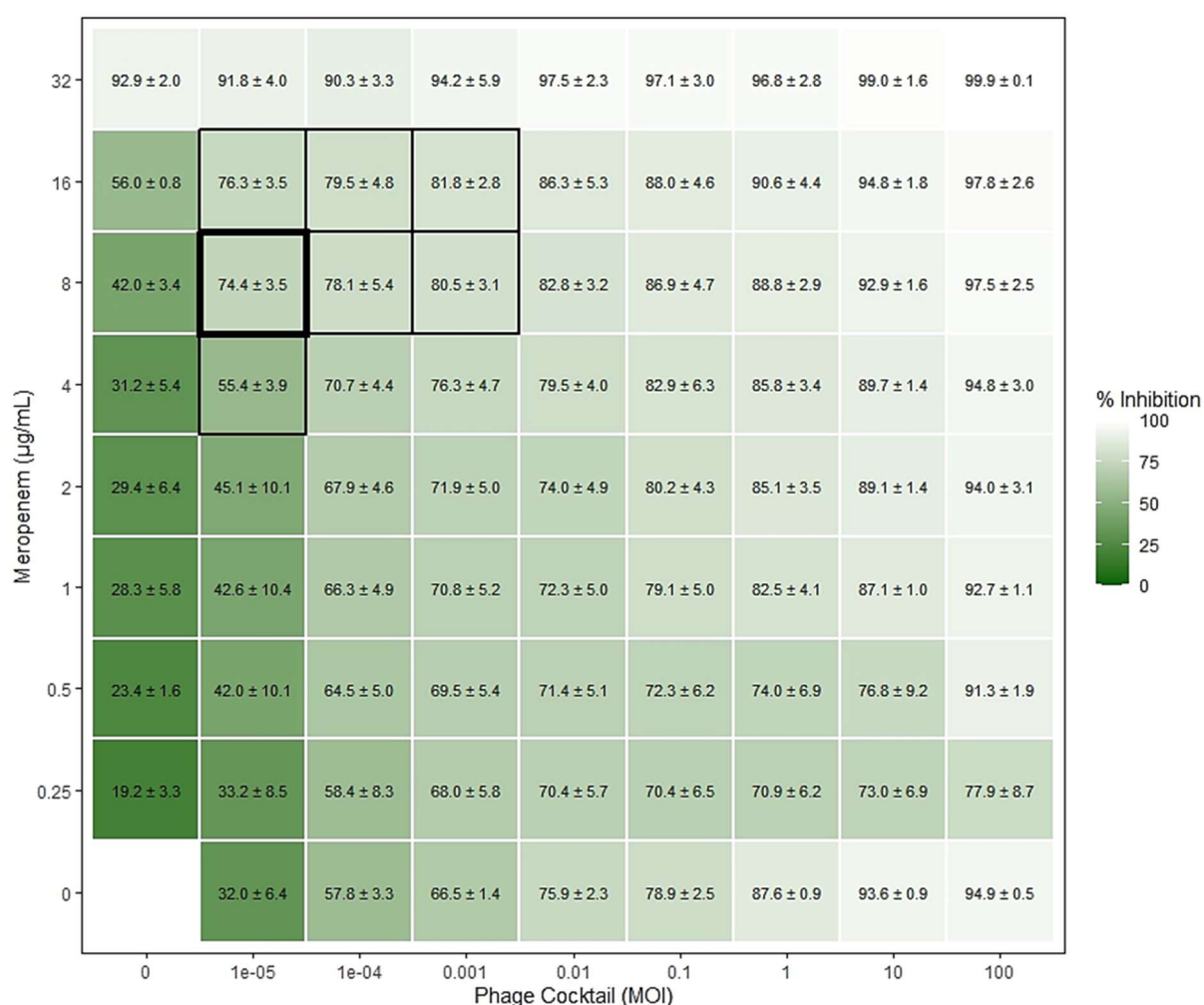
5.5.2 Meropenem

A combinação de MER e CK, demonstrada no **Gráfico 17**, apresenta um perfil de interação distinto do observado com LVX. No *heatmap*, predominam regiões classificadas como provável e forte efeito biológico, particularmente nas faixas intermediárias de MER (4–16 µg/mL) combinadas com MOIs de 10^{-3} a 10^{-5} . Nessas combinações, a porcentagem de inibição atinge valores entre 74–82%, o que se mostram superiores ao efeito isolado do MER nessas concentrações, que varia de apenas 31–56% dependendo da dose, e acima do que o coquetel sozinho produziria em suas MOIs correspondentes (32–66%). Esse ganho adicional de pontos percentuais sugere a presença de um potencial efeito sinérgico, mas com características provavelmente diferentes das observadas com fluoroquinolonas.

Por outro lado, assim como observado com LVX, em concentrações muito altas de MER (32 µg/mL), a inibição já é próxima de 92–99%, e a adição do coquetel não produz ganho expressivo ($\leq 10\%$), classificando esses poços como sem efeito biológico. Microbiologicamente, isso reflete que, quando o β -lactâmico já induz lise osmótica e morte celular, resta pouca população viável e metabolicamente ativa para

ser alvo dos fagos. Também nota-se que, diferentemente da LVX, o MER não parece induzir antagonismo significativo em baixas concentrações. Mesmo nas doses mais baixas (0,25–2 µg/mL) combinadas com as MOIs, a porcentagem de inibição tende a ser igual ou ligeiramente inferior ao controle do coquetel, sem a queda observada na combinação com LVX. Isso pode sugerir que a ação do MER sobre a parede celular não induz estados de tolerância ou persistência significativos.

Gráfico 11 – *Checkerboard* da associação entre Meropenem e o Coquetel frente o isolado Ab576



A cápsula de *A. baumannii* é um importante determinante de resistência, não apenas à fagocitose e ao complemento, mas também à penetração de antibióticos hidrofílicos como os carbapenêmicos. Em muitas linhagens CRAB, o espesso polissacarídeo capsular forma uma barreira que dificulta o acesso do MER às PBPs da parede celular e, em associação com porinas pouco expressas e bombas de efluxo,

contribui para o fenótipo de resistência, mesmo na ausência de níveis muito elevados de carbapenemases. Dessa forma, a cápsula funciona como um agente físico e eletrostático que atrasa ou reduz a quantidade de fármaco que efetivamente alcança o sítio-alvo.

Nesse contexto, fagos que utilizam o polissacarídeo capsular como receptor e codificam depolimerases associadas à cauda podem auxiliar o MER a encontrar seu alvo. Ao adsorverem-se à cápsula e degradarem seus polímeros, esses fagos desestruturam a camada capsular e diminuem a espessura da barreira (ISLAM et al, 2024; CHEN et al, 2022). Isso tende a reduzir a distância e o tempo necessários para o MER atravessar a matriz que constitui a cápsula e alcançar o espaço periplásmico, onde as PBPs se localizam, aumentando a fração de moléculas que atinge o alvo antes de serem hidrolisadas por carbapenemases. Além disso, bactérias que evoluem para escapar de fagos frequentemente perdem ou alteram sua cápsula, e tais modificações, embora forneçam resistência ao fago, torna a bactéria mais expostas a antibióticos, o que pode se traduzir em queda da CIM para MER.

Como já mencionado, o MER age inibindo a síntese de peptideoglicano ao se ligar irreversivelmente às PBPs (penicillin-binding proteins), especialmente PBP1a e PBP3 em *A. baumannii*, resultando em defeitos de parede celular e eventual lise osmótica. Em concentrações subinibitórias ou próximas à CIM, o antibiótico pode enfraquecer estruturalmente a parede, gerando uma população com paredes celulares parcialmente comprometidas, aumento de permeabilidade e alterações na morfologia bacteriana. Nesse contexto de parede fragilizada, a adsorção e a injeção de DNA fágico podem ser facilitadas já que a perda de integridade da camada de peptideoglicano reduz as barreiras físicas, e a desorganização da membrana externa pode tornar receptores mais acessíveis ou mesmo expor sítios secundários de ligação (ZAMPARA et al, 2020; ZIANG et al, 2008; DICKS et al, 2024).

Assim, uma hipótese sugerida para o sinergismo observado é que inicialmente os fagos podem atuar sobre a cápsula e posteriormente o MER fragiliza a parede da célula bacteriana, criando um ambiente no qual os fagos conseguem iniciar infecções com maior eficiência e completar ciclos líticos de forma mais produtiva do que em células intactas. Além disso, células tratadas com β -lactâmicos frequentemente ativam respostas de estresse que incluem *up-regulation* de autolisinas endógenas e disfunção de sistemas de reparo de parede, o que pode amplificar o efeito lítico dos fagos, de forma que a liberação de endolisinas fágicas em células já comprometidas

estruturalmente leva a uma lise mais eficiente.

Do ponto de vista dos *trade-offs* genéticos, a pressão combinada de MER e CK pode direcionar mutações em Ab576 para trajetórias distintas das observadas com fluoroquinolonas. Mutações que conferem resistência a carbapenêmicos geralmente envolvem aumento de expressão de carbapenemases, perda de porinas e modificação de PBPs, mas essas alterações raramente afetam diretamente o polissacarídeo capsular, que é o principal receptor fágico. Por outro lado, como já dito, mutações que conferem resistência aos fagos, como modificação capsular ou perda de cápsula, podem aumentar a permeabilidade a β -lactâmicos, tornando a bactéria mais suscetível ao MER. Assim, tal combinação explora que resistir aos fagos pode sensibilizar ao antibiótico.

Portanto, essa combinação contra Ab576 demonstra potencial sinergismo em baixas MOIs do coquetel (10^{-3} a 10^{-5}) e concentrações até 8 vezes menores que o MIC do antibiótico sozinho (queda de 32 para 8 $\mu\text{g/mL}$), como demonstra as combinações destacadas pelos critérios estabelecidos, o que novamente sugere o potencial efeito biológico decorrente da combinação.

5.5.3 Piperacilina-Tazobactam

A combinação PPT e CK representa um teste em que Ab576 é totalmente resistente a PPT de acordo com os ensaios de CIM anteriores (CIM de 256 $\mu\text{g/mL}$), indicando que, isoladamente, essa combinação de β -lactâmico e inibidor de β -lactamases não exerce controle efetivo sobre o isolado. No *heatmap* (**Gráfico 18**), observa-se que, em concentrações intermediárias e baixas (2–128 $\mu\text{g/mL}$), a atividade do fármaco sozinho é modesta, entre 3,5–48% de inibição. Esse perfil reflete a presença de múltiplos mecanismos de resistência já mencionados que saturam ou anulam a ação da Piperacilina, como enzimas carbapenemases (*OXA-likes*), β -lactamases cromossômicas, *AmpC* superexpressas, perda ou modificação de porinas e bombas de efluxo que removem o antibiótico antes de alcançar concentrações efetivas no espaço periplasmático.

Apesar disso, o *heatmap* evidencia regiões de efeito biológico quando PPT é combinada com MOIs intermediárias a baixas do coquetel (10^{-2} a 10^{-5}). Nos poços destacados em preto, especialmente na faixa de 32–128 $\mu\text{g/mL}$ de PPT com MOIs de 10^{-3} a 10^{-4} , a porcentagem de inibição salta para 63–88%, valores que superam tanto

o efeito isolado do antibiótico (que seria 10–48%) quanto do coquetel sozinho nessas MOIs (41–58%), demonstrando potencial efeito biológico sinérgico. Esse ganho de pontos percentuais sugere que a combinação pode estar retomando parcialmente a atividade de um antibiótico que sozinho é ineficaz, cenário de grande relevância para tentar retardar a crescente resistência aos β -lactâmicos.

Gráfico 12 – *Checkerboard* da associação entre Piperacilina-Tazobactam e o Coquetel frente o isolado Ab576



Microbiologicamente, uma explicação plausível envolve novamente a modulação da cápsula. Assim como discutido para MER, os fagos com depolimerases capsulares degradam o polissacarídeo, diminuindo a barreira física e facilitando a difusão da Piperacilina até as PBPs. Outro mecanismo possível envolve a seleção de subpopulações, já que na presença do coquetel, células que modificam a cápsula para escapar dos fagos podem alterar a expressão ou funcionalidade de bombas de efluxo

e porina. Caso essas alterações levarem a um aumento de permeabilidade ou redução de efluxo, a PPT passa a ter acesso mais eficiente ao espaço periplásmico nesses mutantes, resultando em inibição aumentada. Esse tipo de *trade-off* (resistência ao fago em troca de maior vulnerabilidade ao antibiótico), é consistente com o padrão de sinergismo observado e reforça a ideia de que a pressão dupla induz a bactéria para estados nos quais não consegue manter resistência simultânea a ambos os agentes.

Da mesma forma, em concentrações muito altas de PPT (256 µg/mL), a adição do coquetel não gera efeito significativo. Isso é coerente com o padrão observado para LVX e MER, quando o antibiótico já exerce controle eficiente (ainda que por mecanismos diferentes, no caso de PPT provavelmente via inativação das β-lactamases em doses extremas), o ganho adicional trazido pelos fagos é indiferente. Em contrapartida, nas faixas intermediárias e subinibitórias de PPT (16–128 µg/mL), a sinergia é mais pronunciada, sugerindo que há um intervalo de concentrações no qual a combinação pode explorar as vulnerabilidades criadas por ambos os agentes.

Um aspecto particularmente notável é que, assim como o MER, a PPT demonstra um padrão de sinergismo que parece mais acentuado em MOIs baixas, exatamente onde espera-se obter algum efeito combinado, já que a associação explora os pontos fracos de ambos os agentes buscando a melhoria sinérgica.

Já nas doses mais baixas de PPT (principalmente 2µg/mL), a porcentagem de inibição tende a ser inferior ao que seria esperado se considerássemos apenas o efeito do coquetel (MOIs de 10^{-1} a 100), caracterizando um potencial padrão de antagonismo. Enquanto o coquetel sozinho nessas MOIs atinge inibição de 76–95%, ao adicionar PPT (2µg/mL), a porcentagem cai para valores na faixa de 55–67%, com um decréscimo de pontos percentuais.

Do ponto de vista microbiológico, esse antagonismo pode ser sugerido pela interferência que β-lactâmicos exercem sobre o ciclo replicativo dos fagos quando presentes em doses que alteram a fisiologia bacteriana sem necessariamente matar as células. Em MOIs muito altas, os fagos precisam de hospedeiros metabolicamente ativos, com maquinaria de síntese proteica e de DNA funcionando para completar ciclos líticos produtivos. A Piperacilina, mesmo em concentrações subinibitórias, pode inibir a síntese de peptideoglicano e desregular a divisão celular, embora ainda viáveis, apresentam metabolismo alterado e podem entrar em estados de dormência ou persistência. Nesses estados, a replicação viral fica comprometida e a síntese de proteínas estruturais dos fagos pode ser mais lenta.

Também é possível que a combinação de MOI alta com PPT favoreça a seleção de subpopulações que, por modificações de parede induzidas pelo antibiótico, tornam-se simultaneamente menos suscetíveis à lise fágica e ainda viáveis o suficiente para contribuir à densidade óptica final, reduzindo a porcentagem de inibição calculada.

Apesar disso, do ponto de vista de aplicabilidade clínica, o resultado com PPT é promissor porque sugere que antibióticos que não demonstram efeito devido à resistência disseminada podem de alguma forma serem reutilizados em esquemas combinatórios com coquetéis fágicos, desde que a dose seja ajustada para faixas nas quais a sinergia se manifeste. Além disso, se considerarmos as combinações que demonstraram potencial efeito biológico, e principalmente forte efeito biológico, encontramos nesse caso a maior quantidade de combinações destacadas, tornando essa associação promissora para futuros estudos.

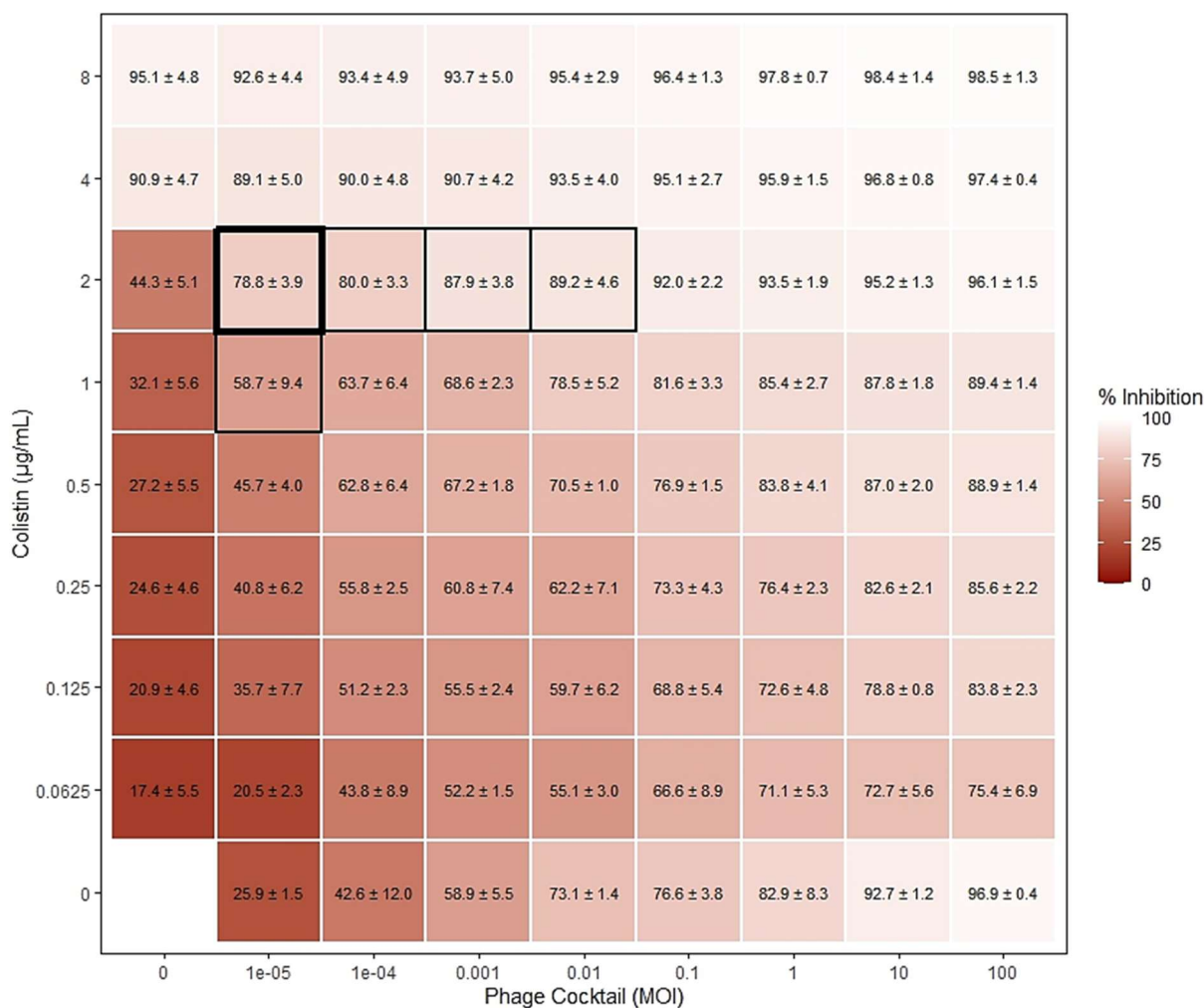
5.5.4 Colistina

No *heatmap* de Ab576, como observado no **Gráfico 19**, a colistina isolada só atinge inibição robusta nas concentrações mais altas (4–8 µg/mL), trazendo uma definição de resistência intermediária segundo o CLSI 2023. Em combinação com o coquetel, porém, observa-se que doses intermediárias (especialmente 2 µg/mL) associadas a MOIs moderadas e baixas (10^{-2} a 10^{-5}) já produzem inibições na faixa de 79–89%, com associações classificadas como potencial e forte efeito biológico, enquanto a mesma dose de colistina sozinha gera apenas cerca de 44% de inibição. Isso sugere que o coquetel permite que a mesma eficácia pode ser atingida com menos colistina, o que é particularmente relevante diante da sua nefrotoxicidade e neurotoxicidade, amplamente descritas em pacientes críticos tratados por infecções de *A. baumannii* multirresistente.

Microbiologicamente, a sinergia se explica pelo fato da COL e fagos atacarem a bactéria em níveis diferentes, mas complementares. A colistina desorganiza o lipídio A e as interações entre LPS e cátions divalentes, causando aumento da permeabilidade e formação de “buracos” na membrana externa (DUPUY et al, 2017). Os fagos, por sua vez, ligam-se a cápsula/LPS e desencadeiam a lise no decorrer de seus ciclos. Em doses submáximas de colistina, a membrana torna-se suficientemente permeável para facilitar a adsorção e a injeção de DNA fágico, além de reduzir a energia necessária para a lise final. O padrão observado em Ab576 é compatível com

esse conceito, pois ao diminuir a dose de colistina nesse caso para 2-1 $\mu\text{g/mL}$, o coquetel abre a perspectiva de regimes terapêuticos menos nefrotóxicos, mantendo a eficácia contra um patógeno de difícil tratamento.

Gráfico 13 – *Checkerboard* da associação entre Colistina e o Coquetel frente o isolado Ab576



No entanto, esse efeito também pode atrapalhar dependendo da dose, já que observando as faixas de concentração mais baixas de colistina (principalmente 0,0625 $\mu\text{g/mL}$), especialmente quando combinadas com MOIs altas (10–100), nota-se que a porcentagem de inibição também cai em relação ao esperado pelo efeito do coquetel isolado nessas MOIs, caracterizando um potencial antagonismo como já notado nos fármacos mencionados anteriormente. Enquanto o coquetel sozinho em MOI 10-100 alcançaria inibição de 92-97%, a adição de colistina em 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ reduz esse valor para cerca de 72–75%, uma queda de cerca de 20 pontos percentuais que sugere

mais uma vez interferência ativa do antibiótico em baixas doses sobre a dinâmica de replicação fágica.

Uma sugestão possível para esse achado envolve a resposta adaptativa de *A. baumannii* a doses subinibitórias de polimixinas. Concentrações muito baixas de colistina não matam as células, mas induzem modificações no LPS por meio da ativação dos sistemas *PmrAB* e *PhoPQ*, que adicionam grupos fosfoetanolamina e galactosamina ao lipídio A, reduzindo a carga negativa da superfície e diminuindo a afinidade pela droga catiônica (ARROYO et al, 2011; HUANG et al, 2020; GOGRY et al, 2021). Essas modificações de LPS alteram a membrana externa e podem, como efeito colateral, dificultar o reconhecimento e a adsorção de fagos que utilizam componentes de LPS ou estruturas adjacentes como receptores secundários ou co-receptores. Assim, em MOIs altas, quando há muitos fagos competindo por sítios de ligação, uma população bacteriana com LPS modificado pode apresentar eficiência de adsorção reduzida, levando a menor número de infecções bem-sucedidas por célula e, conseqüentemente, a menor porcentagem de inibição observada.

Além disso, outra possibilidade é que doses mais baixas subinibitórias de colistina podem desencadear respostas de estresse que incluem formação de vesículas de membrana externa (OMVs), liberação de debris celulares e acúmulo de material capsular solúvel no meio. Esses componentes podem atuar como "iscas", sequestrando partículas fágicas ao se ligarem a seus receptores sem permitir infecção produtiva, reduzindo assim a fração de fagos disponíveis para infectar células intactas (KIM et al, 2019; MANNING; KUEHN, 2011; SEED, 2015; YUN et al, 2018). Em MOIs altas, esse efeito de sequestro seria amplificado, pois com muitos fagos no meio e muitas OMVs e debris sendo liberados, a probabilidade de que partículas virais se liguem a alvos não produtivos aumenta, resultando em menor taxa de infecção efetiva e queda da porcentagem de inibição.

Outro aspecto que podemos considerar como possibilidade é que doses muito baixas de colistina podem induzir os estados de tolerância ou persistência fenotípica já mencionados. Células expostas a polimixinas subletais frequentemente reduzem sua taxa metabólica, entram em fase estacionária precoce e diminuem a expressão de receptores de superfície. Nesse estado, assim como já mencionado anteriormente, a maquinaria celular necessária para realizar a replicação fágica fica drasticamente reduzida. Mesmo que os fagos consigam adsorver e injetar DNA, a falta de recursos celulares impede a montagem eficiente de progênie, levando a ciclos abortivos ou a

períodos de latência prolongados que, no tempo de duração do ensaio (24 h), não se traduzem em inibição detectável.

Do ponto de vista de aplicação clínica, esse padrão sugere a necessidade de ajustes e manutenção mais precisa de doses em regimes combinatórios. A sinergia existe, como observada na concentração de 1-2 µg/mL, sendo promissora já que se faz presente nas MOIs reduzidas (10^{-2} a 10^{-5}), mas fora dessa janela o benefício pode ser perdido. Estudos farmacodinâmicos e de otimização de dose em modelos animais seriam essenciais para definir os regimes que maximizam o efeito sinérgico e minimizam tanto a toxicidade da colistina quanto o risco de antagonismo, garantindo que a estratégia seja implementada de forma segura e eficaz.

Tabela 4 – Resumo dos resultados obtidos no teste Coquetel-Antibiótico para os três isolados de *A. baumannii* testados, onde observa-se o número de ocorrência dos efeitos biológicos da combinação, assim como a redução na concentração de antibiótico decorrente da associação.

Isolado Bacteriano	Análises	LEV	MER	PPT	COL
Ab576	Presença de possível indicativo de efeito biológico da combinação	Sim 5	Sim 6	Sim 7	Sim 4
	Presença de provável efeito biológico da combinação	Sim 2	Sim 1	Sim 3	Sim 1
	Presença de forte efeito biológico da combinação	-	-	-	-
	CIM do antibiótico isolado (µg/mL)	32	32	256	4
	Concentração com 90% de inibição na associação com o Coquetel (µg/mL)	8	16	128	2

Ab615	Presença de possível indicativo de efeito biológico	Sim 1	Sim 3	Sim 11	Sim 7
	Presença de provável efeito biológico	Sim 3	Sim 2	-	-
	Presença de forte efeito biológico	-	-	-	-
	CIM do antibiótico isolado (µg/mL)	128	64	512	32
	Concentração com 90% de inibição na associação com o Coquetel (µg/mL)	32	32	256	8
Ab846	Presença de possível indicativo de efeito biológico na combinação	Sim 2	Sim 1	Sim 3	Sim 1
	Presença de provável efeito biológico na combinação	-	Sim 2	Sim 4	Sim 1
	Presença de forte efeito biológico na combinação	-	-	-	-
	CIM do antibiótico isolado (µg/mL)	32	64	256	32
	Concentração com 90% de inibição na associação com o Coquetel (µg/mL)	32	4	32	8

5.6 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DOS BACTERÍOFAGOS EM ASSOCIAÇÃO A ANTIMICROBIANOS

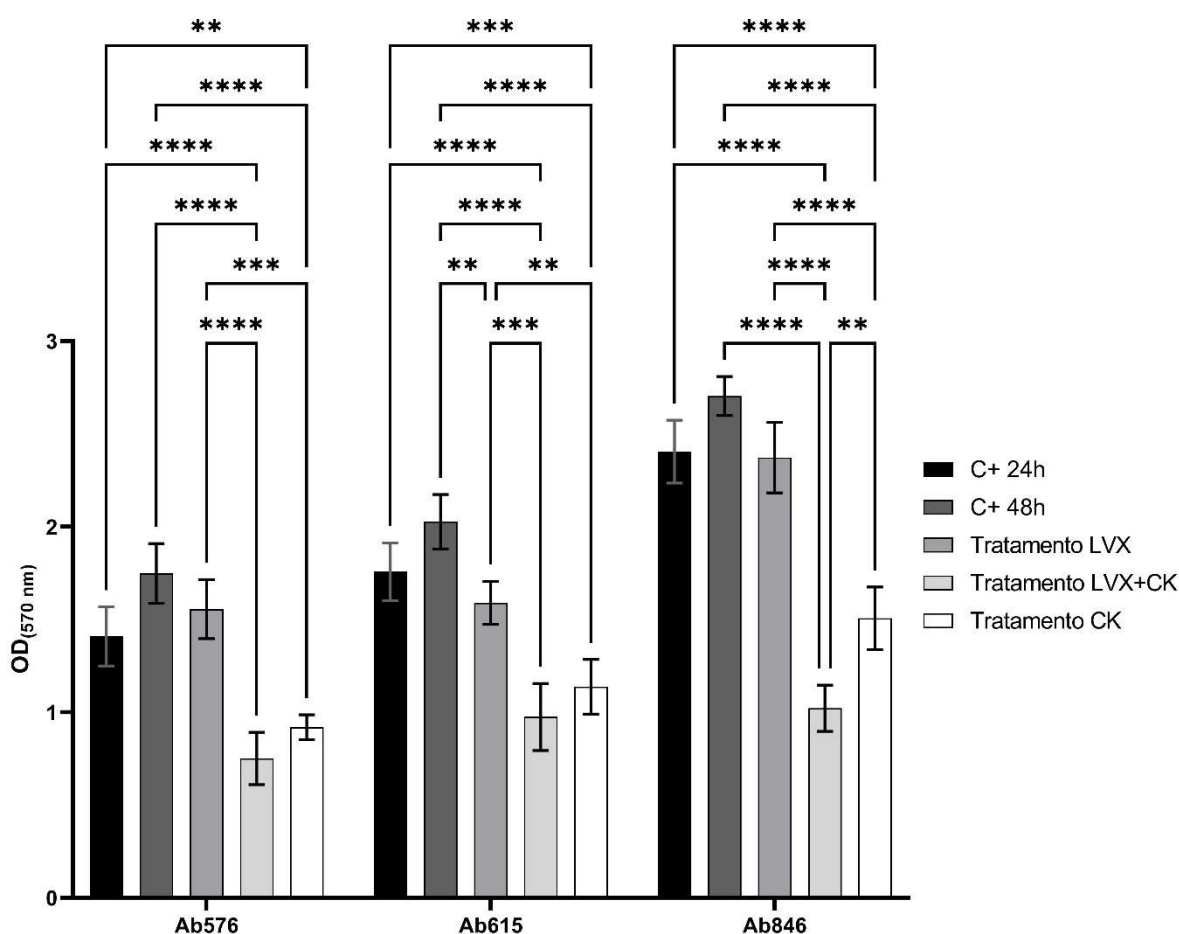
Para a combinação com levofloxacina, demonstrada no **Gráfico 20**, os resultados obtidos no ensaio de redução de biofilme demonstram que a associação

do coquetel de bacteriófagos com levofloxacina apresentou efeito antimicrobiano nos três isolados de *A. baumannii* testados. Para o isolado Ab576, observou-se que o tratamento com o coquetel isolado (CK) reduziu significativamente a densidade óptica ($OD_{570} = 0,88$), que nesse caso trata-se da atividade metabólica avaliada pelo ensaio de MTT, em comparação ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 1,36$), indicando potencial atividade lítica dos bacteriófagos. A combinação do CK com LVX resultou em redução ainda maior ($OD_{570} = 0,76$), porém sem diferença estatisticamente significativa quando comparada ao coquetel isolado. Já o tratamento apenas com levofloxacina ($OD_{570} = 1,50$) não diferiu significativamente do controle de 24 horas, evidenciando resistência ou penetração limitada do antibiótico na matriz do biofilme. A diferença insignificante entre o tratamento combinado CK+LVX e o controle de 48 horas ($OD_{570} = 1,66$) reforça a eficácia da terapia fágica em controlar o desenvolvimento do biofilme, nesse caso em termos de atividade metabólica pelo método empregado com uso de MTT.

No isolado Ab615, o padrão de resposta foi semelhante, com o coquetel isolado promovendo redução significativa ($OD_{570} = 1,15$) em relação ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 1,77$). A associação CK+LVX demonstrou a maior eficácia entre os tratamentos ($OD_{570} = 0,98$), porém assim como no caso de Ab576, não houve diferença estatística significativa em relação ao coquetel isolado, ao contrário do que se observa comparando com o antibiótico sozinho. A levofloxacina isolada ($OD_{570} = 1,58$) apresentou atividade antibiofilme discreta, sem diferença relevante. A diferença significativa entre a combinação e o controle não tratado de 48 h indica redução da atividade metabólica do biofilme pré-formado, em relação ao que seria observado após 48 h ($OD_{570} = 2,00$) de desenvolvimento sem intervenção.

Para o isolado Ab846, observou-se o perfil de maior resistência aos tratamentos isolados. O coquetel de bacteriófagos promoveu redução moderada ($OD_{570} = 1,51$) comparado ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 2,36$), enquanto a levofloxacina isolada apresentou eficácia limitada ($OD_{570} = 2,40$), sem diferença significativa em relação ao controle. A combinação CK+LVX resultou em redução relevante ($OD_{570} = 0,95$), com diferença relativamente significativa em relação ao coquetel isolado e ao antibiótico isolado. A comparação com o controle de 48 horas ($OD_{570} = 2,67$) indica que a associação fago-levofloxacina apresenta efeito antibiofilme metabólico significativo sobre biofilmes pré-formados.

Gráfico 14 – Atividade antibiofilme da combinação entre o Coquetel de bacteriófagos e Levofloxacina



Os asteriscos (*) em gráficos de ANOVA (Análise de Variância), como nesse caso, servem para indicar o nível de significância estatística das diferenças entre as médias dos grupos. Eles representam o chamado valor-p (*p-value*). 1 asterisco (*): Significância estatística, $p < 0,05$. 2 asteriscos (**): Maior significância, $p < 0,01$. 3 asteriscos (***): Alta significância, $p < 0,001$. E 4 asteriscos (****): indica um nível de significância extremamente alto, $p < 0,0001$.

Estes achados sugerem que a associação de bacteriófagos com levofloxacina apresenta potencial terapêutico variável dependente do perfil de suscetibilidade do isolado, com efeito da combinação mais pronunciado em cepas com maior capacidade de formar biofilmes, como neste caso o isolado Ab846. Esse padrão possivelmente ocorre devido à ação enzimática dos fagos sobre exopolissacarídeos da matriz, proporcionado pela provável presença de depolimerases, e potencializando a penetração e ação de fármacos (CHEN et al, 2022).

Agora quanto a avaliação da combinação do coquetel de bacteriófagos com

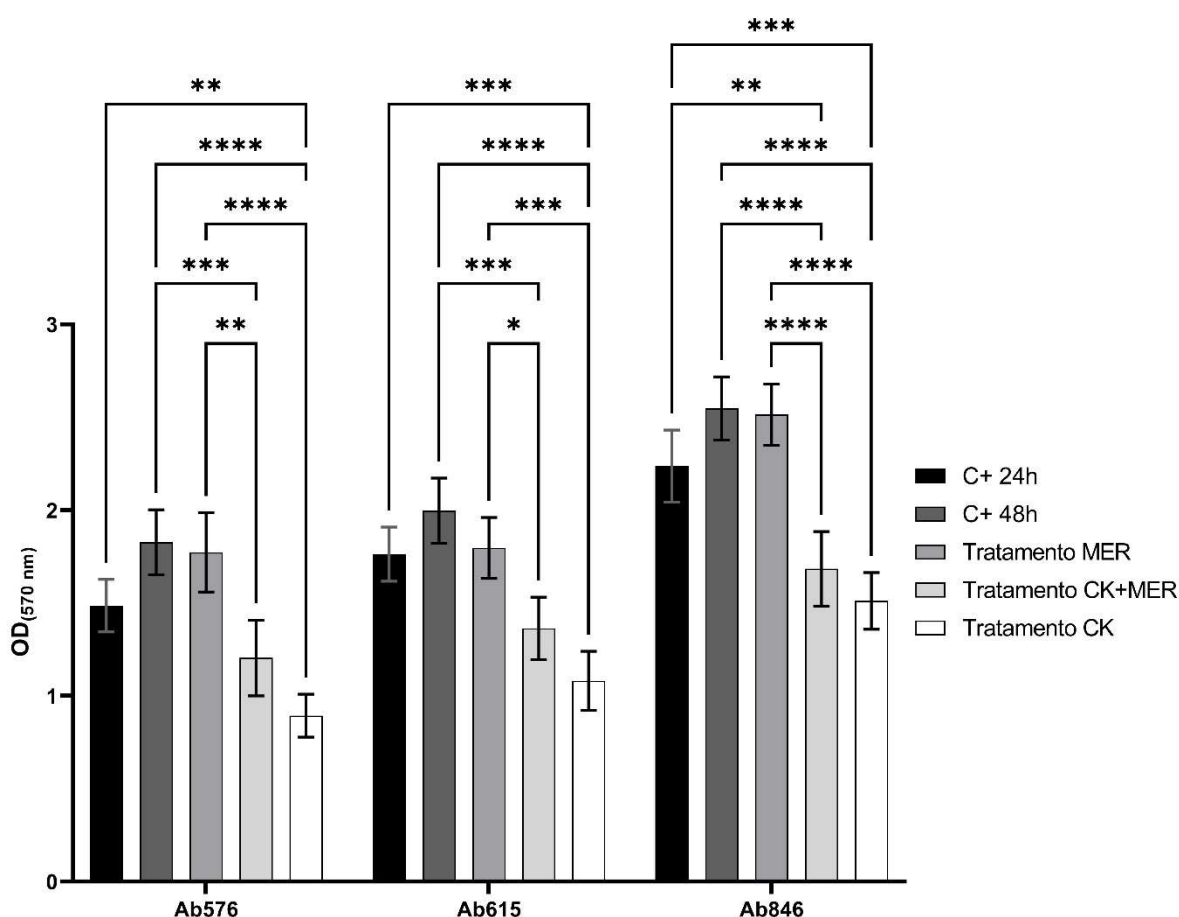
MER, presente no **Gráfico 21**, observa-se resultados distintos em relação ao observado com levofloxacina. No isolado Ab576, o tratamento com o coquetel isolado (CK) demonstrou redução significativa do metabolismo ($OD_{570} = 0,84$) comparado ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 1,47$), confirmando a atividade dos bacteriófagos. A combinação CK+MER resultou em redução moderada ($OD_{570} = 1,19$), porém apresentou valores superiores ao coquetel isolado, sem diferença estatisticamente significativa entre ambos. O MER isolado ($OD_{570} = 1,74$) também não demonstrou uma diferença relevante, não diferindo do controle de 48 horas. As diferenças entre o tratamento combinado e o controle de 48 horas ($OD_{570} = 1,78$) demonstram que, embora a associação possa não tenha potencializado o efeito do coquetel, mesmo assim os fagos foram capazes de conter o metabolismo bacteriano ao longo do tempo, sugerindo que a associação do antibiótico com o coquetel não produziu efeito negativo que atrapalhe o coquetel a desempenhar sua efeito antibacteriano.

Para o isolado Ab615, observou-se padrão semelhante com o coquetel isolado promovendo redução substancial ($OD_{570} = 1,09$) em relação ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 1,69$). A associação CK+MER apresentou eficácia intermediária ($OD_{570} = 1,39$), ainda superior ao MER isolado ($OD_{570} = 1,78$) mas inferior ao coquetel isolado, embora sem significância estatística nesta última comparação. O MER isolado não demonstrou atividade antibiofilme relevante, mantendo valores próximos ao controle não tratado. A diferença significativa entre o tratamento combinado e o controle de 48 horas ($OD_{570} = 1,96$) mais uma vez reforça que a presença do antibiótico não prejudicou a ação dos fagos, mas também não contribuiu para a redução metabólica avaliada no teste.

No isolado Ab846, mais uma vez a resposta foi mais favorável à combinação, embora ainda distante do potencial efeito combinado observado com levofloxacina. O coquetel isolado reduziu significativamente o biofilme ($OD_{570} = 1,45$) comparado ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 2,30$). A combinação CK+MER apresentou redução mais pronunciada ($OD_{570} = 1,70$), com diferença estatística significativa em relação ao MER isolado ($OD_{570} = 2,58$) e ao controle de 48 horas ($OD_{570} = 2,61$). Entretanto, a comparação entre CK+MER e CK isolado não revelou diferença substancial, indicando efeito neutro quando comparado com o observado na combinação com fluoroquinolona. O MER isolado mostrou-se ineficaz, apresentando valores superiores inclusive ao controle de 24 horas, possivelmente devido à estimulação da produção

de matriz extracelular como resposta ao estresse subletal do antibiótico (NAVIDIFAR et al., 2019).

Gráfico 15 – Atividade antibiofilme da combinação entre o Coquetel de bacteriófagos e Meropenem



Estes resultados indicam que a associação de bacteriófagos com MER apresenta eficácia limitada na erradicação de biofilmes de *A. baumannii*, possivelmente devido à impermeabilidade da matriz exopolissacarídica aos carbapenêmicos ou à expressão de β -lactamases de diferentes classes (OXA e metalo- β -lactamases) por células sésseis (MENDES et al, 2023; WANG et al, 2016). A ausência de efeito combinado de forma pronunciada contrasta com os achados envolvendo levofloxacina, sugerindo que a classe do antibiótico e seu mecanismo de ação podem influenciar no potencial de interação com a terapia fágica em biofilmes, ou mesmo a concentração pode ser um fator relacionado além da classe do antimicrobiano (AKTURK et al, 2019; NICHOLLS et al, 2023).

Para o fármaco PPT, a combinação com o coquetel demonstrada no **Gráfico 22**, revelou perfil de interação similar ao observado com MER, com variações na magnitude da resposta entre os isolados testados. No isolado Ab576, o tratamento com o coquetel isolado promoveu redução metabólica ($OD_{570} = 1,01$) em comparação ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 1,41$), demonstrando novamente a potencial eficácia dos bacteriófagos. A combinação CK+PPT resultou em redução moderada ($OD_{570} = 0,93$), apresentando valores ligeiramente inferiores ao coquetel isolado, porém sem diferença estatística significativa entre ambos os tratamentos. A PPT isolada ($OD_{570} = 1,51$) mostrou-se ineficaz, com densidade óptica similar ao controle não tratado. As diferenças estatísticas observadas entre o tratamento combinado e os controles indicam que a atividade antibiofilme é atribuída predominantemente aos bacteriófagos, com contribuição marginal do antibiótico β -lactâmico associado ao inibidor de β -lactamase.

Para o isolado Ab615, o coquetel isolado apresentou maior redução ($OD_{570} = 1,04$) comparado ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 1,67$). A associação CK+PPT demonstrou eficácia similar ao coquetel isolado ($OD_{570} = 0,86$), sem diferença estatística significativa, caracterizando efeito aditivo sem potencialização. A PPT isolada ($OD_{570} = 1,69$) não diferiu do controle de 24 horas, confirmando a resistência intrínseca do biofilme ao antibiótico β -lactâmico mesmo na presença do inibidor enzimático. A comparação entre o tratamento combinado e o controle de 48 horas ($OD_{570} = 1,78$) evidencia que a associação preveniu o desenvolvimento adicional do biofilme em termos de metabolismo, embora sem promover erradicação superior à obtida apenas com o coquetel de fagos.

No isolado Ab846, observou-se o padrão mais resistente aos tratamentos, porém proporcional a capacidade de produção de biofilme dessa bactéria. O coquetel isolado reduziu significativamente o biofilme ($OD_{570} = 1,49$) em relação ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 2,36$). A combinação CK+PPT apresentou redução mais acentuada ($OD_{570} = 1,39$), estatisticamente inferior ao tratamento com PPT isolado ($OD_{570} = 2,56$) e ao controle de 48 horas ($OD_{570} = 2,66$). Entretanto, a ausência de diferença significativa entre CK+PPT e CK isolado reforça a conclusão de efeito aditivo, sem efeito decorrente da combinação. Sugere-se que a PPT isolada possa não ter sido eficaz em termos de viabilidade metabólica, apresentando valores superiores ao controle de 24 horas, que assim como no caso do MER, demonstra a possibilidade de

antibióticos β -lactâmicos testados anteriormente, evidenciando um perfil de interação mais complexo e variável entre os isolados. No isolado Ab576, o tratamento com o coquetel isolado (CK) promoveu redução significativa do biofilme ($OD_{570} = 1,03$) comparado ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 1,42$), confirmando a atividade lítica dos bacteriófagos. A combinação CK+COL resultou em menor densidade óptica ($OD_{570} = 0,77$), apresentando diferença apesar de não ser considerada estatisticamente significativa em relação ao coquetel isolado, assim como a redução comparada com o controle de 24 horas. A colistina isolada ($OD_{570} = 1,53$) mostrou-se ineficaz, não diferindo do controle não tratado.

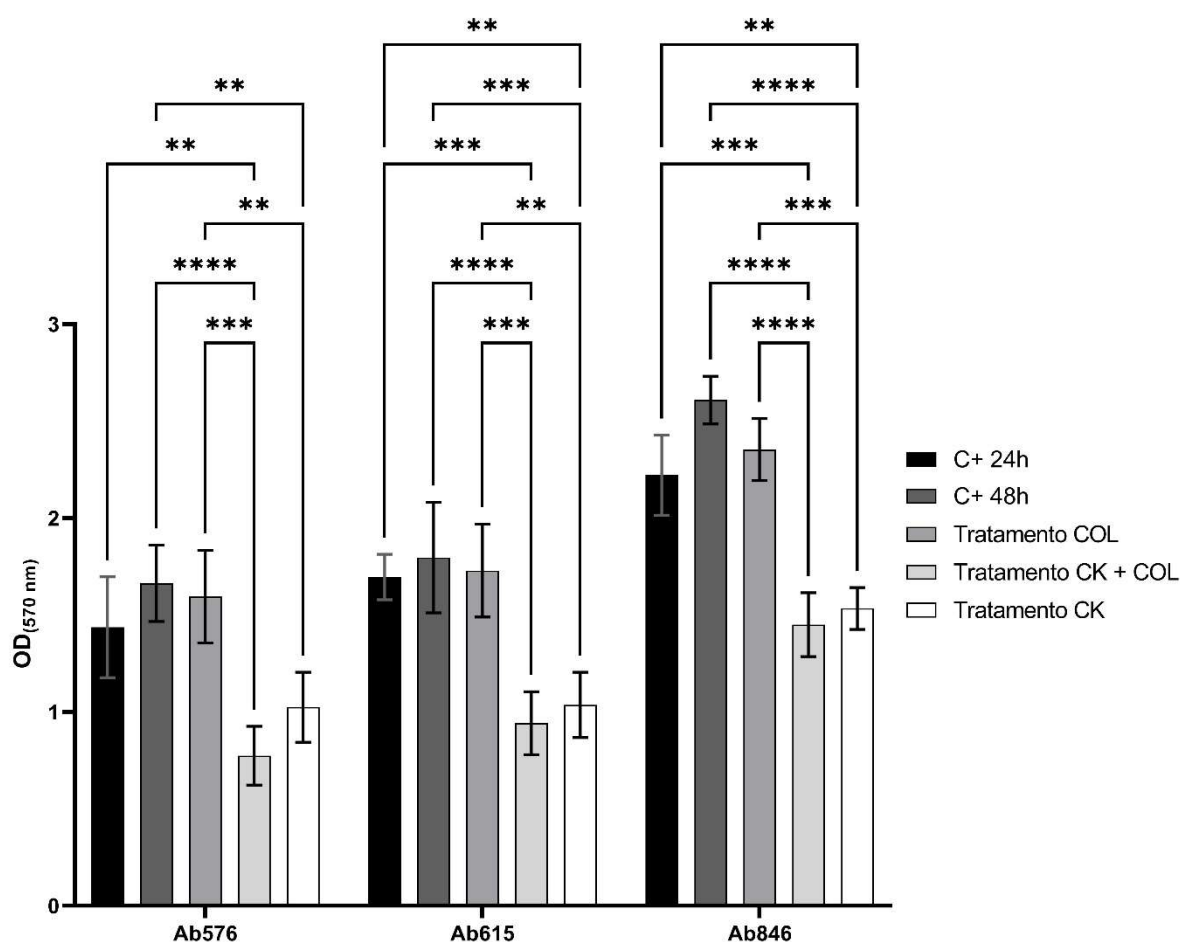
Para o isolado Ab615, o coquetel isolado demonstrou redução substancial ($OD_{570} = 1,06$) em relação ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 1,64$). A associação CK+COL apresentou eficácia similar ($OD_{570} = 0,93$), com diferença significativa em relação ao controle de 24 horas e altamente significativa comparada ao controle de 48 horas ($OD_{570} = 1,75$), mas sem diferença estatística em relação ao coquetel isolado. A colistina isolada ($OD_{570} = 1,66$) manteve-se ineficaz contra o biofilme, com valores próximos aos controles não tratados. A comparação entre CK+COL e COL isolada revelou diferença altamente significativa, onde mais uma vez a atividade antibiofilme da associação decorre principalmente da ação dos fagos.

No isolado Ab846, o coquetel isolado reduziu significativamente o biofilme ($OD_{570} = 1,46$) comparado ao controle de 24 horas ($OD_{570} = 2,24$). A combinação CK+COL apresentou redução similar ($OD_{570} = 1,44$), estatisticamente inferior ao controle de 24 horas e altamente inferior ao controle de 48 horas ($OD_{570} = 2,62$), porém sem diferença significativa em relação ao coquetel isolado. A colistina isolada ($OD_{570} = 2,38$) também não demonstrou atividade antibiofilme, apresentando valores próximos ao controle de 48 horas. A diferença altamente significativa entre CK+COL e COL isolada indica que a presença do antibiótico não potencializou nem antagonizou a ação dos fagos, resultando em efeito estritamente aditivo.

Os achados com colistina revelam que, embora esta polimixina atue diretamente sobre a membrana externa bacteriana através da interação com o LPS, sua eficácia contra biofilmes de *A. baumannii* permanece limitada quando administrada isoladamente (SATO et al, 2018). A ausência de efeito combinatório consistente entre colistina e bacteriófagos, similar ao observado com levofloxacina no isolado Ab615, contrasta com os resultados envolvendo fluoroquinolonas e sugere

que o mecanismo de ação baseado em desestabilização de membrana pode não se beneficiar significativamente da degradação enzimática da matriz exopolissacarídica pelos fagos. Este fenômeno pode estar relacionado à expressão de genes de resistência à colistina, bem como à neutralização do antibiótico pela matriz do biofilme. Os resultados reforçam que a eficácia de terapias combinadas fago-antibiótico é altamente dependente da classe farmacológica, do perfil de resistência do isolado e das características físico-químicas da matriz do biofilme (WANG et al, 2016; SATO et al, 2018; MENDES et al, 2023).

Gráfico 17 – Atividade antibiofilme da combinação entre o Coquetel de bacteriófagos e Colistina



De maneira geral, os resultados desse teste demonstraram que a combinação entre bacteriófagos e antibióticos apresenta um cenário sem efeito biológico decorrente da combinação em termos de viabilidade metabólica. Mesmo com a ação lítica do coquetel, os antibióticos testados ainda assim não conseguem traduzir essa

vantagem em efeitos antimicrobianos superiores comparados à ação isolada dos fagos. Este fenômeno sugere que a problemática em biofilmes vai além da simples barreira física, podendo envolver alterações fenotípicas nas células, redução das taxas metabólicas, expressão diferencial de bombas de efluxo e, particularmente para alguns antibióticos, a presença de mecanismos de resistência cromossômicos que permanecem expressos (MENDES et al, 2023; SZELACHOWSKA et al, 2022)).

Ainda assim, independentemente da classe farmacológica o coquetel de bacteriófagos isolado demonstra-se capaz de produzir reduções significativas e biologicamente relevantes no metabolismo do biofilme. Enquanto a levofloxacina apresentou efeito combinatório com os fagos, particularmente no isolado Ab846, os demais antibióticos não demonstraram esse mesmo cenário. Contudo, essa observação não invalida a relevância clínica da terapia combinada, já que a ausência de efeito negativo entre os agentes testados, indica que a administração de bacteriófagos e antibióticos não prejudica a eficácia fágica desse coquetel, e em contextos realistas, fora do ambiente controlado do *in vitro*, tais associações ainda podem oferecer benefícios.

6 CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apresentados nesse estudo demonstram que o coquetel fágico isolado apresenta ampla atividade lítica frente a isolados de *A. baumannii* MDR, e que essa atividade se traduz em benefício biológico em modelo *in vivo* alternativo, aumentando de forma consistente a sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella*. As correlações observadas entre o Índice de Virulência *in vitro* e a taxa de sobrevivência em 48 h sugerem que os parâmetros de dinâmica fágica obtidos em caldo são bons preditores da eficácia em hospedeiro, isso quando consideramos um sistema imunológico exclusivamente inato.

Nos ensaios de combinação, o coquetel foi capaz de reduzir as doses de levofloxacina, meropenem, piperacilina-tazobactam e colistina em níveis significativos, reabilitando parcialmente β -lactâmicos considerados inativos e permitindo, no caso das polimixinas, alcançar inibição com concentrações ligeiramente menores, o que é especialmente relevante diante da nefrotoxicidade desse fármaco. Os *heatmaps* revelaram zonas de sinergia robusta em faixas intermediárias de dose, mas também situações de antagonismo em concentrações baixas e MOIs muito elevadas, indicando que a interação fago–antibiótico nesse caso deve ser explorado em concentrações adequadas.

Quanto ao seu desempenho contra biofilmes formados observamos que sozinho o coquetel já é capaz de controlar de forma eficiente essas comunidades bacterianas, e a associação com antibióticos não produziu efeito significativo. Em conjunto, esses achados apoiam o uso racional de coquetéis fágicos como adjuvantes de antibióticos em infecções por *A. baumannii* MDR/XDR, apontando para a possibilidade de reduzir doses de fármacos, recuperar parcialmente moléculas obsoletas e explorar *trade-offs* genéticos entre resistência a fagos e susceptibilidade a antimicrobianos.

Tais achados reforçam a necessidade de se explorar ainda mais a fagoterapia direcionada a *A. baumannii*, principalmente em pesquisas que envolva combinações semelhantes a essas exploradas nesse estudo, porém utilizando modelos *in vivo* mais robustos, para que no futuro pacientes acometidos por infecções graves causadas por esse patógeno possa de alguma forma ter alguma opção de tratamento.

7 REFERÊNCIAS

- ABEDON, S. T. Bacteriophage Exploitation of Bacterial Biofilms: Phage Preference for Less Mature Targets? **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 3, fev. 2016a.
- ABEDON, S. T. et al. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 66–85, mar. 2011.
- ABEDON, S. T. Lysis from without. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 46–49, jan. 2011.
- ABEDON, S. T. Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). **Bacteriophage**, v. 6, n. 3, p. e1220348, 2 jul. 2016b.
- ABEDON, S. T.; DANIS-WLODARCZYK, K. M.; WOZNIAK, D. J. Phage cocktail development for bacteriophage therapy: Toward improving spectrum of activity breadth and depth. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 10, 1 out. 2021.
- ABEDON, S. T.; KATSAOUNIS, T. I. Basic phage mathematics. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.1.] Humana Press Inc., 2018. v. 1681p. 3–30.
- ABEDON, S. T.; YIN, J. Bacteriophage Plaques: Theory and Analysis. Em: CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. (Eds.). **Methods in Molecular Biology**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. v. 501p. 161.
- ADRIAENSSENS, E. M. et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2017 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee. **Archives of Virology**, v. 163, n. 4, p. 1125–1129, 1 abr. 2018.
- AGHAEE, B. L. et al. Sewage and sewage-contaminated environments are the most prominent sources to isolate phages against *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 132, 1 maio 2021.
- AHMAD, I. et al. *Csu* pili dependent biofilm formation and virulence of *Acinetobacter baumannii*. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 9, p. 101, 14 dez. 2023.
- AHUATZIN-FLORES, O. E.; TORRES, E.; CHÁVEZ-BRAVO, E. *Acinetobacter baumannii*, a multidrug-resistant opportunistic pathogen in new habitats: a systematic review. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 644, 23 mar. 2024.

AKTURK, E. et al. Synergistic action of phage and antibiotics: parameters to enhance the killing efficacy against mono and dual-species biofilms. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 103, 25 jul. 2019.

AKTURK, E. et al. Synergistic action of phage and antibiotics: parameters to enhance the killing efficacy against mono and dual-species biofilms. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 103, 25 jul. 2019.

ALHARBI, N. M.; ZIADI, M. M. Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 8, p. 4358–4364, 16 abr. 2021.

ARROYO, L. A. et al. The *pmrCAB* operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3743–3751, ago. 2011.

ARUN, B. et al. Ampicillin/sulbactam in combination with ceftazidime/avibactam against metallo- β -lactamase-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: a genomics-informed mechanism-based model. **Journal of Infectious Diseases**, 12 nov. 2025.

BAGIŃSKA, N. et al. Biological properties of 12 newly isolated *Acinetobacter baumannii*-specific bacteriophages. **Viruses**, v. 15, n. 1, p. 231, 13 jan. 2023.

BAI, J. et al. Genome-wide phage susceptibility analysis in *Acinetobacter baumannii* reveals capsule modulation strategies that determine phage infectivity. **PLOS Pathogens**, v. 19, n. 6, p. e1010928, 8 jun. 2023.

BASHIRI, S. et al. Growth phase-and desiccation-dependent *Acinetobacter baumannii* morphology: an atomic force microscopy investigation. **Langmuir**, v. 37, p. 1110–1119, 2021.

BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M.; STANIER, R. Y. A study of the *Moraxella* group II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **Journal of Bacteriology**, v. 95, p. 1520–1541, 1968.

BEIJERINCK, M. W. Pigmenten als oxydatieproducten door bacterien gevormd. **Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen te Amsterdam**, 1911.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistics notes: measurement error. **BMJ**, v. 312, n. 7047, p. 1654, 1996.

BOUTZOUKAS, A.; DOI, Y. The global epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 7, n. 4, p. dlaf134, 28 ago. 2025.

BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 228–240, 1986.

BREWER, G. A.; JOHNSON, M. J. Activity and Properties of para-Aminobenzyl Penicillin. **Appl Microbiol.**, v. 4, n. 1, p. 163–166, 1 jul. 1953.

CAMPBELL, J. S. et al. Characterising phagocytes and measuring phagocytosis from live *Galleria mellonella* larvae. **Virulence**, v. 15, n. 1, p. 2313413, 14 fev. 2024.

CARASCAL, M. B.; DESTURA, R. V.; RIVERA, W. L. Molecular genotyping reveals multiple carbapenemase genes and unique blaOXA-51-like (oxaAb) alleles among clinically isolated *Acinetobacter baumannii* from a Philippine tertiary hospital. **Tropical Medicine and Health**, v. 52, n. 1, p. 62, 26 set. 2024.

CAVALLO, I. et al. *Acinetobacter baumannii* in the critically ill: complex infections get complicated. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1196774, 22 jun. 2023.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, Georgia: [s.n].

CENENS, W. et al. Phage–host interactions during pseudolysogeny: Lessons from the Ptd/dgo interaction. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 2, p. e25029, fev. 2013.

CHEN, X. et al. Phage-derived depolymerase as an antibiotic adjuvant against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 845500, 25 mar. 2022.

CHEN, X. et al. Phage-derived depolymerase as an antibiotic adjuvant against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 845500, 25 mar. 2022.

CHIN, C. Y. et al. A PmrB-regulated deacetylase required for lipid A modification and polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7911–7914, dez. 2015.

CHRISTENSEN, S. B. Drugs that changed society: History and current status of the early antibiotics: Salvarsan, sulfonamides, and β -lactams. **Molecules**, v. 26, n. 19, 1 out. 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M100: performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 36. ed. Wayne: **CLSI**, 2026.

CLOKIE, M. R. J. et al. Phages in nature. *Bacteriophage*, v. 1, n. 1, p. 31–45, jan. 2011.

CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. (EDS.). **Bacteriophages**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. v. 501

COMEAU, A. M. et al. Phage-antibiotic synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. **PLOS ONE**, v. 2, n. 8, e799, 29 ago. 2007.

DARBY, E. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, p. 280–295, 2023.

DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 13 maio 2020.

DE SOUZA, J. et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms, therapeutics, and innovations. **Microorganisms**, v. 13, p. 1501, 2025.

DEPKA, D. et al. Insertion sequences within oxacillinases genes as molecular determinants of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems: a pilot study. **Microorganisms**, v. 12, p. 2057, 2024.

DIALLO, K.; DUBLANCHET, A. A Century of Clinical Use of Phages: A Literature Review. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2023.

DICKS, L. M. T.; VERMEULEN, W. Bacteriophage–host interactions and the therapeutic potential of bacteriophages. **Viruses**, v. 16, p. 478, 2024.

DJAHANSCHIRI, B. et al. Evolutionarily stable gene clusters shed light on the common grounds of pathogenicity in the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex. **PLOS Genetics**, v. 18, n. 6, e1010020, 2022.

DOERN, C. D. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, 2014.

DUGGAR, B. M. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 51, n. 2, p. 177–181, 30 nov. 1948.

DUPUY, F. G. et al. Selective interaction of colistin with lipid model membranes. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 4, p. 919–928, 27 fev. 2018.

EHRLICH, J. et al. Chloromycetin, a New Antibiotic From a Soil Actinomycete. **Science**, v. 106, n. 2757, 31 out. 1947.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, n. 3, p. 226–236, jun. 1929.

FOONG, W. E. et al. Tigecycline efflux in *Acinetobacter baumannii* is mediated by TetA in synergy with RND-type efflux transporters. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 5, p. 1135–1139, maio 2020.

GAO, D. et al. Fitness *trade-offs* in phage cocktail-resistant *Salmonella enterica* serovar Enteritidis results in increased antibiotic susceptibility and reduced virulence. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, p. e02914-22, 26 set. 2022.

GEISINGER, E. et al. The landscape of phenotypic and transcriptional responses to ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii*: acquired resistance alleles modulate drug-induced SOS response and prophage replication. **mBio**, v. 10, n. 3, p. e01127-19, 11 jun. 2019.

GELPI, A.; GILBERTSON, A.; TUCKER, J. D. Magic bullet: Paul Ehrlich, Salvarsan

and the birth of venereology. **Sexually Transmitted Infections**, v. 91, n. 1, p. 68–69, 1 fev. 2015.

GHASEMI, M. et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.

GIAMMANCO, A. et al. Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant Gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. **mSphere**, v. 2, e00310-16, 2017.

GLONTI, T.; PIRNAY, J. P. In vitro techniques and measurements of phage characteristics that are important for phage therapy success. **Viruses**, v. 14, n. 7, p. 1490, 7 jul. 2022.

GOGRY, F. A. et al. Current update on intrinsic and acquired colistin resistance mechanisms in bacteria. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 677720, 12 ago. 2021.

GORDILLO ALTAMIRANO, F. L. et al. Phage-antibiotic combination is a superior treatment against *Acinetobacter baumannii* in a preclinical study. **eBioMedicine**, v. 80, p. 104045, jun. 2022.

GORDILLO ALTAMIRANO, F. L.; BARR, J. J. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32, n. 2, e00066-18, 16 jan. 2019.

GOTTIG, S. et al. Reservoirs of *non-baumannii* *Acinetobacter* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 49, 31 jan. 2016.

HAINES, M. E. K. et al. Analysis of selection methods to develop novel phage therapy cocktails against antimicrobial resistant clinical isolates of bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 29 mar. 2021.

HAINES, M. E. K. et al. Analysis of selection methods to develop novel phage therapy cocktails against antimicrobial resistant clinical isolates of bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 613529, 29 mar. 2021.

HAMIDIAN, M. et al. A small *Acinetobacter* plasmid carrying the tet39 tetracycline resistance determinant. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 269–

271, jan. 2016.

HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91–102, fev. 2018.

HATFULL, G. F.; DEDRICK, R. M.; SCHOOLEY, R. T. Annual Review of Medicine Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. **Annual Review of Medicine**, v. 73, p. 197–211, 24 ago. 2022.

HERNANDEZ-MORALES, A. C. et al. Genomic and biochemical characterization of *Acinetobacter* podophage Petty reveals a novel lysis mechanism and tail-associated depolymerase activity. **Journal of Virology**, v. 92, n. 6, p. e01064-17, 26 fev. 2018.

HIGGINS, P. G. et al. Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179228, 14 jun. 2017.

HUANG, J. et al. Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: roles of two-component systems PhoPQ and PmrAB. **Future Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 445–459, abr. 2020.

HUFF, W. E. et al. Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 1944–1947, dez. 2004.

HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 72–80, 1 out. 2019.

INCHAI, J. et al. Prognostic factors associated with mortality of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. **Journal of Intensive Care**, v. 3, n. 9, p. 1–8, 2 mar. 2015.

IOVLEVA, A.; FOWLER JUNIOR, V. G.; DOI, Y. Treatment approaches for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Drugs**, v. 85, 2024.

ISLAM, M. M. et al. Phage-encoded depolymerases as a strategy for combating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Cellular and Infection**

Microbiology, v. 14, p. 1462620, 24 out. 2024.

JEON, J.; PARK, J. H.; YONG, D. Efficacy of bacteriophage treatment against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in *Galleria mellonella* larvae and a mouse model of acute pneumonia. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 70, 2 abr. 2019.

KARRULI, A. et al. Cefiderocol and sulbactam-durlobactam against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antibiotics**, v. 12, n. 12, p. 1729, 14 dez. 2023.

KIM, M. K. et al. Bacteriophage therapy for multidrug-resistant infections: current technologies and therapeutic approaches. **Journal of Clinical Investigation**, v. 135, n. 5, 2 mar. 2025.

KIM, S. Y. et al. The sensor kinase BfmS controls production of outer membrane vesicles in *Acinetobacter baumannii*. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 301, 21 dez. 2019.

KIM, T. et al. Minocycline susceptibility of carbapenem-resistant ***Acinetobacter baumannii*** blood isolates from a single center in Korea: role of tetB in resistance. **Infection and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, fev. 2025.

KNIREL, Y. et al. Mechanisms of *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharide cleavage by phage depolymerases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, p. 567–574, 2020.

LAI, M. J. et al. The tail associated protein of *Acinetobacter baumannii* phage Φ AB6 is the host specificity determinant possessing exopolysaccharide depolymerase activity. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0153361, 14 abr. 2016.

LAWS, M.; SHAABAN, A.; RAHMAN, K. M. Antibiotic resistance breakers: Current approaches and future directions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 5, p. 490–516, 10 jun. 2019.

LEMOIGNE, M.; GIRARD, H.; JACOBELLI, G. Soil bacteria easily utilizing 2-3, butanediol. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 82, p. 389–398, 1952.

LI, J. et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 589–601, set. 2006.

LIN, M. et al. Isolation and identification of a newly discovered broad-spectrum *Acinetobacter baumannii* phage and therapeutic validation against pan-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Virologica Sinica**, v. 40, n. 4, p. 587–600, ago. 2025.

LINZENMEIER, G. Behavior of *Diplococcus mucosus* (B. antitratum) in experimental resistance tests. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, v. 163, p. 348–352, 1955.

LIU, Y. et al. The capsule depolymerase Dpo48 rescues *Galleria mellonella* and mice from *Acinetobacter baumannii* systemic infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 545, 18 mar. 2019.

LOB, S. H. et al. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, p. 317–323, 2016.

ŁUSIAK-SZELACHOWSKA, M. et al. Bacteriophages and antibiotic interactions in clinical practice: what we have learned so far. **Journal of Biomedical Science**, v. 29, p. 23, 2022.

MAGILL, S. S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, p. 1198–1208, 2014.

MANGALEA, M. R.; DUERKOP, B. A. Fitness trade-offs resulting from bacteriophage resistance potentiate synergistic antibacterial strategies. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 7, p. e00926-19, 22 jun. 2020.

MANNING, A. J.; KUEHN, M. J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 258, 1 dez. 2011.

MENDES, S. G. et al. Co-regulation of biofilm formation and antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from mechanisms to therapeutic strategies. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 42, n. 12, p. 1405–1423, dez. 2023.

MILLER, W. R.; ARIAS, C. A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22,

n. 10, p. 598–616, 1 out. 2024.

MIRZAEI, M. K.; NILSSON, A. S. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, 11 mar. 2015.

MOHR, K. I. History of antibiotics research. Em: How to Overcome the Antibiotic Crisis. [s.l.] **Springer Verlag**, 2016. v. 398p. 237–272.

MOTULSKY, H. J. Intuitive biostatistics: a nonmathematical guide to statistical thinking. 3. ed. **New York: Oxford University Press**, 2014.

MUKHOPADHYAY, H.; BAIRAGI, A. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a study on its pathogenesis and therapeutics. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 8, p. 100331, 5 dez. 2024.

MULESHKOVA, T. et al. Exploring the multifaceted genus *Acinetobacter*: the facts, the concerns and the opportunities the dualistic genus *Acinetobacter*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. e2411043, 25 fev. 2025.

MÜLLER, C. et al. A global view on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **mBio**, v. 14, n. 6, p. e02260-23, 19 dez. 2023.

NADERI, G. et al. Mobile genetic elements carrying aminoglycoside resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to global clone 2. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1172861, 5 maio 2023.

NAGHAVI, M. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. **The Lancet**, v. 404, p. 1199–1226, 2024.

NALE, J. Y. et al. An optimized bacteriophage cocktail can effectively control *Salmonella* in vitro and in *Galleria mellonella*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 21 jan. 2021.

NAUREEN, Z. et al. Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. **Acta Biomedica**, v. 91, p. 1–13, 9 nov. 2020.

NAVIDIFAR, T.; AMIN, M.; RASHNO, M. Effects of sub-inhibitory concentrations of

meropenem and tigecycline on the expression of genes regulating pili, efflux pumps and virulence factors involved in biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 1099–1111, 7 maio 2019.

NAYLOR, N. R. et al. Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2018

NICHOLLS, P. et al. Class-driven synergy and antagonism between a *Pseudomonas* phage and antibiotics. **Infection and Immunity**, v. 91, n. 8, p. e00065-23, 16 ago. 2023.

OTTEN, H. Domagk and the development of the sulphonamides. **Journal of Antimicrobial Chemothera**, v. 17, n. 6, p. 689–696, 1 jun. 1986.

PARK, S. et al. Alterations of gyrA, gyrB, and parC and activity of efflux pump in fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 2, n. 3, p. 164–170, dez. 2011.

PARTE, A. C. et al. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 5607–5612, 2020.

PEREIRA, T. C. et al. Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 128, 26 nov. 2018.

PHILLIPS, N. J. et al. *In vitro* activity of sulbactam-durlobactam and standard-of-care antibiotics against *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolates from wound and urinary tract sources: ACNBio Study 2023–2025. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 12, suppl. 2, p. ofaf695.1408, 31 dez. 2025.

PIECHAUD, D.; PIECHAUD, M.; SECOND, L. Proteolytic types of *Moraxella Lwoffii* and *Moraxella glucidolytica* (*Bacterium anitratum*). **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 90, p. 517–522, 1956.

PIECHAUD, M.; SECOND, L. Studies of 26 strains of *Moraxella lwoffii*. *Annales de*

l'Institut Pasteur, v. 80, p. 97–99, 1951.

QUINN, G. A. et al. Streptomyces from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 1040–1048, 21 jul. 2020.

RASTEGAR, S. et al. Synergistic effects of bacteriophage cocktail and antibiotics combinations against extensively drug-resistant **Acinetobacter baumannii**. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, p. 1208, 2024.

REGEIMBAL, J. M. et al. Personalized therapeutic cocktail of wild environmental phages rescues mice from *Acinetobacter baumannii* wound infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 5806–5816, out. 2016.

RELLER, L. B. et al. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749–1755, 1 dez. 2009.

RIBEIRO, J. M. et al. Comparative analysis of effectiveness for phage cocktail development against multiple *Salmonella* serovars and its biofilm control activity. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

RISS, T. L. et al. Cell viability assays. In: MARKOSSIAN, S. et al. (ed.). Assay guidance manual. Bethesda: Eli Lilly & Company; **National Center for Advancing Translational Sciences**, 2016.

RUEKIT, S. et al. Molecular characterization of multidrug-resistant ESKAPEE pathogens from clinical samples in Chonburi, Thailand (2017–2018). **BMC Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2022.

SALMOND, G. P. C.; FINERAN, P. C. A century of the phage: Past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 777–786, 1 dez. 2015.

SALMOND, G. P. C.; FINERAN, P. C. A century of the phage: Past, present and future. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 777–786, 1 dez. 2015.

SATO, Y. et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p.

e0194556, 19 mar. 2018.

SCHATZ, A.; BUGIE, E.; WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 437, n. 1, p. 3–6, ago. 2005.

SCHAUB, I. G.; HAUBER, F. D. A biochemical and serological study of a group of identical unidentifiable Gram-negative bacilli from human sources. **Journal of Bacteriology**, v. 56, p. 379–385, 1948.

SEED, K. D. Battling phages: how bacteria defend against viral attack. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004847, 11 jun. 2015.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H. P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 47–47, 12 mar. 2013.

SHELENKOV, A.; AKIMKIN, V.; MIKHAYLOVA, Y. International clones of high risk of *Acinetobacter baumannii*: definitions, history, properties and perspectives. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 2115, 19 ago. 2023.

SIEIRO, C. et al. A hundred years of bacteriophages: Can phages replace antibiotics in agriculture and aquaculture? **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 1–30, 1 ago. 2020.

SIMMONDS, P. et al. Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 161–168, 13 fev. 2017.

SINGH, J. K.; ADAMS, F. G.; BROWN, M. H. Diversity and function of capsular polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 3301, 9 jan. 2019.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Effectiveness of Phages in Treating Experimental *Escherichia coli* Diarrhoea in Calves, Piglets and Lambs. **Journal of General Microbiology**, v. 129, n. 8, p. 2659–2675, ago. 1983.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. **Journal of General Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 307–310, fev. 1982.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B.; SHAW, K. M. The Control of Experimental *Escherichia coli* Diarrhoea in Calves by Means of Bacteriophages. **Journal of General Microbiology**, v. 133, n. 5, p. 1111–1126, maio 1987a.

SMITH, H. W.; HUGGINS, M. B.; SHAW, N. M. Factors Influencing the Survival and Multiplication of Bacteriophages in Calves and in Their Environment. **Journal of General Microbiology**, v. 133, n. 5, p. 1127–1128, maio 1987b.

SOON, R. L. et al. Atomic force microscopy investigation of the morphology and topography of colistin-heteroresistant *Acinetobacter baumannii* strains as a function of growth phase and in response to colistin treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 4979–4986, 2009.

SOONTARACH, R. et al. Isolation and characterisation of bacteriophage selective for key *Acinetobacter baumannii* capsule chemotypes. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 4, p. 443, 2 abr. 2022.

SORESSA BAKALA, G.; MOTUMA, D. Review of bacteriophage and its applications. **International Journal of Veterinary Science and Research**, v. 8, n. 3, p. 133–147, 27 set. 2022

SPAGNOLO, F.; TRUJILLO, M.; DENNEHY, J. J. Why Do Antibiotics Exist? **American Society for Microbiology**, v. 12, n. 6, 7 dez. 2021.

STACHURSKA, X. et al. Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, 1 nov. 2021.

STENNETT, H. L.; BACK, C. R.; RACE, P. R. Derivation of a precise and consistent timeline for antibiotic development. **Antibiotics**, v. 11, n. 9, p. 1237, 12 set. 2022.

STORMS, Z. J. et al. The virulence index: a metric for quantitative analysis of phage virulence. **Phage**, v. 1, n. 1, p. 27–36, 1 mar. 2020.

STRATHDEE, S. A. et al. Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. **Cell**, v. 186, n. 1, p. 17–31, 5 jan. 2023.

SUGAWARA, E.; NIKAIDO, H. Properties of AdeABC and AdeIJK efflux systems of *Acinetobacter baumannii* compared with those of the AcrAB-TolC system of

Escherichia coli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7250–7257, dez. 2014.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649–659, mar. 2001.

SUMMERS, W. C. Bacteriophage therapy. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 437–451, 2001.

TAO, Y.; DUMA, L.; ROSSEZ, Y. *Galleria mellonella* as a good model to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1483, 14 nov. 2021.

TASLEM MOUROS, J. et al. Understanding bacteriophage tail fiber interaction with host surface receptor: the key “blueprint” for reprogramming phage host range. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, p. 12146, 2022.

TURNER, D. et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. **Archives of Virology**, v. 168, n. 2, p. 74, 23 jan. 2023.

TURNER, D.; KROPINSKI, A. M.; ADRIAENSSENS, E. M. A roadmap for genome-based phage taxonomy. **Viruses**, v. 13, n. 3, 1 mar. 2021.

TWORT, F. W.; LOND, L. R. C. P. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. **The Lancet**, v. 186, n. 4814, p. 1241–1243, 4 dez. 1915.

VAN TWEST, R.; KROPINSKI, A. M. Bacteriophage enrichment from water and soil. In: CLOKIE, M. R. J.; KROPINSKI, A. M. (ed.). Bacteriophages. **Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, 2009. v. 501.

VEERARAGHAVAN, B. et al. A microbiological and structural analysis of the interplay between sulbactam/durlobactam and imipenem against penicillin-binding proteins (PBPs) of *Acinetobacter spp.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. e01627-24, 2 abr. 2025.

VENKATESAN, M. et al. Molecular mechanism of plasmid-borne resistance to sulfonamide antibiotics. **Nature Communications**, v. 14, p. 4031, 7 jul. 2023.

VILACOPA, E. et al. Emergence and spread of plasmid-borne tet(B):ISCR2 in minocycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 651–654, fev. 2013.

VUKOTIC, G. et al. Characterization, antibiofilm, and depolymerizing activity of two phages active on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 426, 18 ago. 2020.

WAGENLEHNER, F. et al. Systematic review on estimated rates of nephrotoxicity and neurotoxicity in patients treated with polymyxins. **Clinical Microbiology and Infection**, 6 jan. 2021.

WAKSMAN, S. A.; SCHATZ, A.; REYNOLDS, D. M. Production of antibiotic substances by actinomycetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1213, n. 1, p. 112–124, 22 dez. 2010.

WALKER, P. J. et al. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). **Archives of Virology**, v. 164, n. 9, p. 2417–2429, 1 set. 2019.

WANG, P. et al. Contribution of the TetB efflux pump to minocycline susceptibility among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 9, p. e01176-17, set. 2017.

WANG, X. et al. Colistin-phage combinations decrease antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* via changes in envelope architecture. **Emerging Microbes and Infections**, v. 10, n. 1, p. 2205–2219, dez. 2021.

WANG, Y. C. et al. Individual or combined effects of meropenem, imipenem, sulbactam, colistin, and tigecycline on biofilm-embedded *Acinetobacter baumannii* and biofilm architecture. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4670–4676, 22 jul. 2016.

WEBBER, M. A. et al. Clinically relevant mutant DNA gyrase alters supercoiling, changes the transcriptome, and confers multidrug resistance. **mBio**, v. 4, n. 4, p. e00273-13, 23 jul. 2013.

WENDT, C. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1394–1397, jun. 1997.

WHO. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022. [s.l.] **World Health Organization**, 9 dez. 2022.

WHO. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024. [s.l: s.n.].

WONG, D. et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter infections*: a century of challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 409–447, jan. 2017.

WONG, M. H. et al. Over-expression of ISAba1-linked intrinsic and exogenously acquired OXA type carbapenem-hydrolyzing-class D- β -lactamase-encoding genes is key mechanism underlying carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2809, 4 dez. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: **World Health Organization**, 2024.

XIANG, Y. et al. Crystal and cryoEM structural studies of a cell wall degrading enzyme in the bacteriophage phi29 tail. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 28, p. 9552–9557, 15 jul. 2008.

YOON, E. J.; COURVALIN, P.; GRILLOT-COURVALIN, C. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 2989–2995, jul. 2013.

YUN, S. H. et al. Antibiotic treatment modulates protein components of cytotoxic outer membrane vesicles of multidrug-resistant clinical strain, *Acinetobacter baumannii* DU202. **Clinical Proteomics**, v. 15, p. 28, 31 ago. 2018.

ZAMAN, S. BIN et al. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**, 28 jun. 2017.

ZAMPARA, A. et al. Exploiting phage receptor binding proteins to enable endolysins to kill Gram-negative bacteria. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12087, 21 jul. 2020.

ZANG, M. et al. The membrane composition defines the spatial organization and function of a major *Acinetobacter baumannii* drug efflux system. **mBio**, v. 12, n. 3, p. e01070-21, 29 jun. 2021.

ZEIDLER, S.; MÜLLER, V. The role of compatible solutes in desiccation resistance of *Acinetobacter baumannii*. **MicrobiologyOpen**, v. 8, e740, 2019.

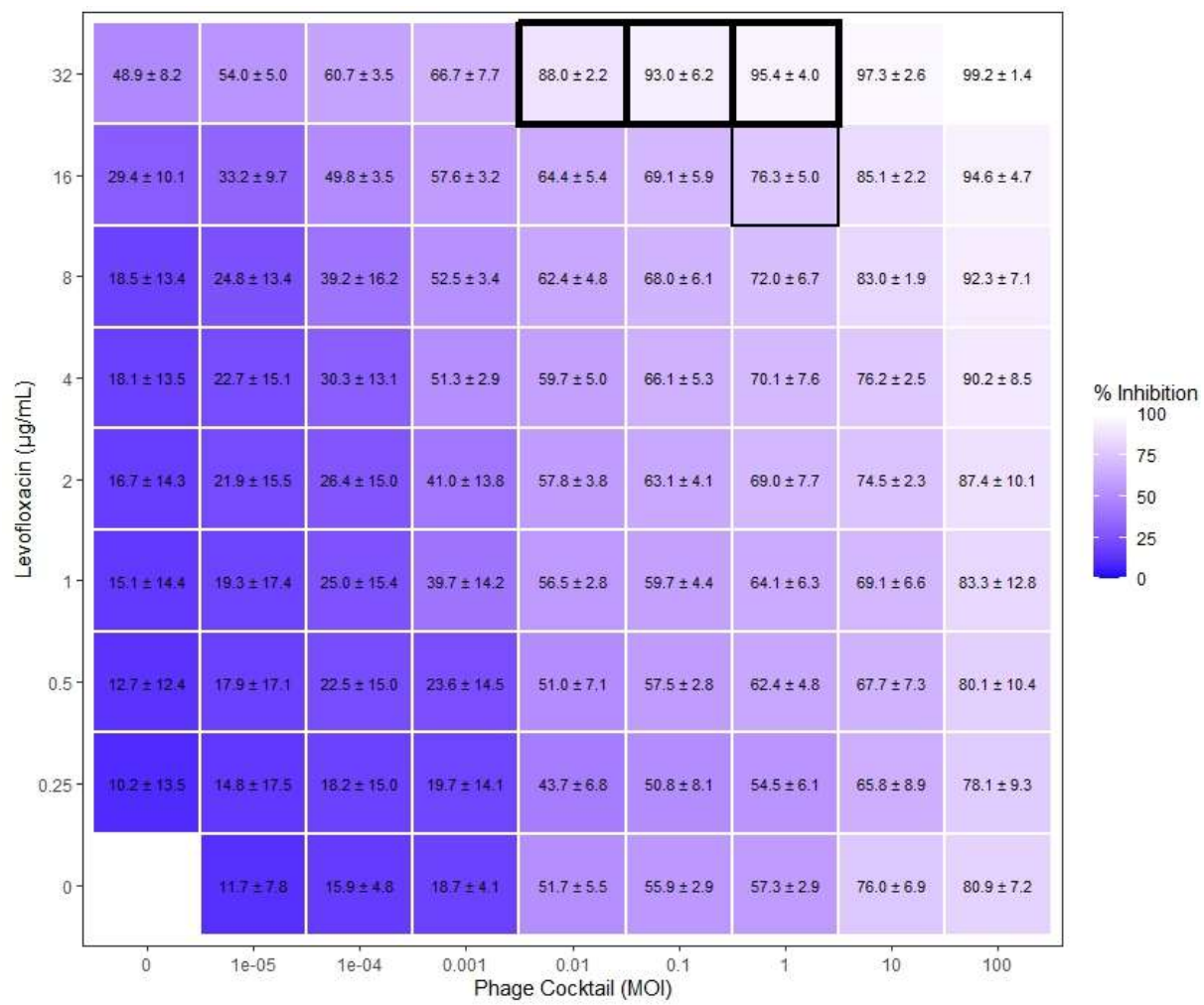
ZHANG, S. et al. An integrative review on the risk factors, prevention, and control strategies for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization in critically ill patients. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1519906, 10 jan. 2025.

ZHANG, S.; AHN, J. Phage therapy as a novel alternative to antibiotics through adaptive evolution and fitness *trade-offs*. **Antibiotics**, v. 14, n. 10, p. 1040, 17 out. 2025.

ZHAO, J. et al. Characterizing the biology of lytic bacteriophage vB_EaeM_φEap-3 infecting multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 420, 5 mar. 2019.

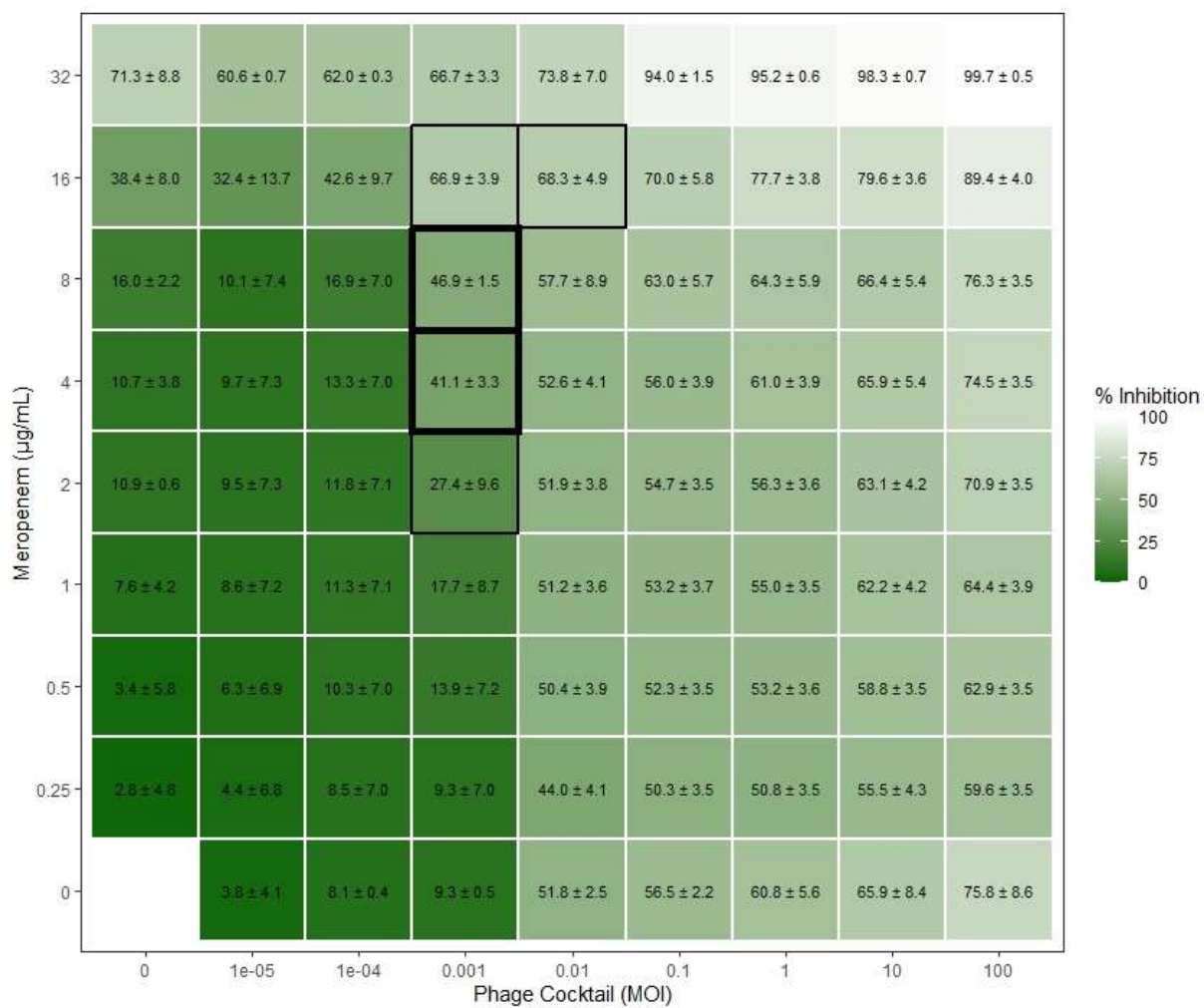
8 ANEXOS

ANEXO 1 – *Checkerboard* da associação entre Levofloxacina e o Coquetel frente o isolado Ab615



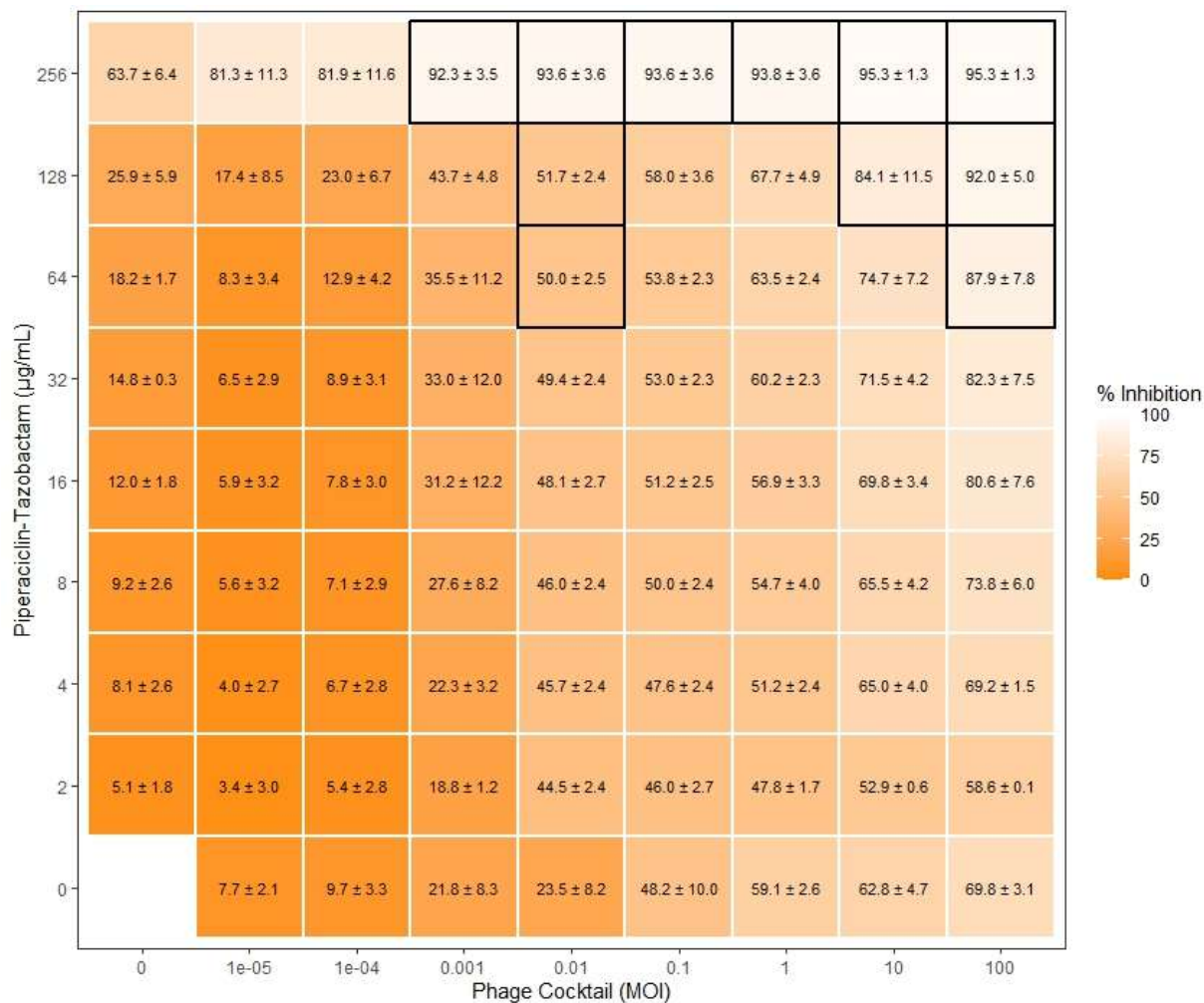
Fonte: o próprio autor (2026).

ANEXO 2 – *Checkerboard* da associação entre Meropenem e o Coquetel frente o isolado Ab615



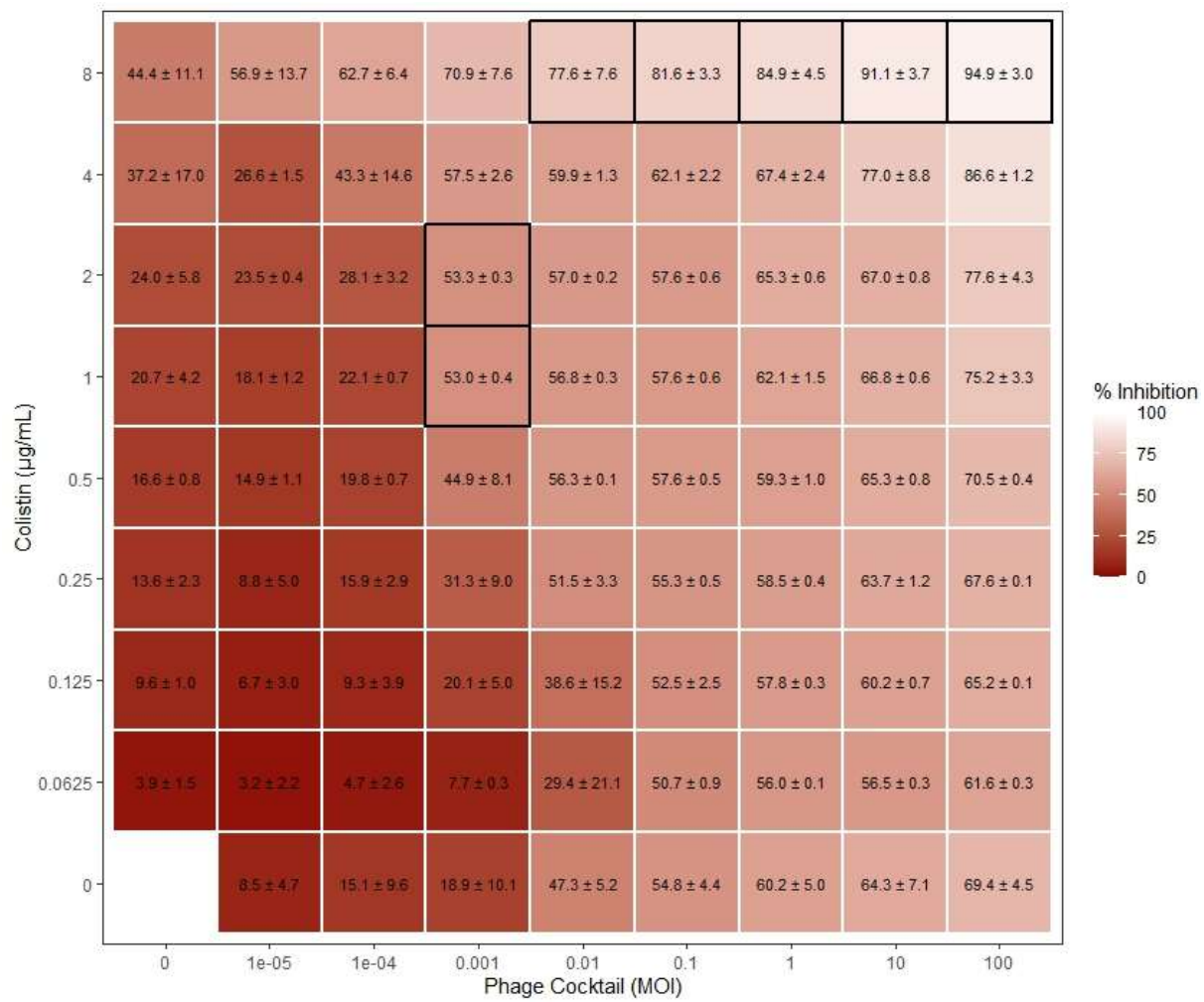
Fonte: o próprio autor (2026).

ANEXO 3 – *Checkerboard* da associação entre Piperacilina-Tazobactam e o Coquetel frente o isolado Ab615



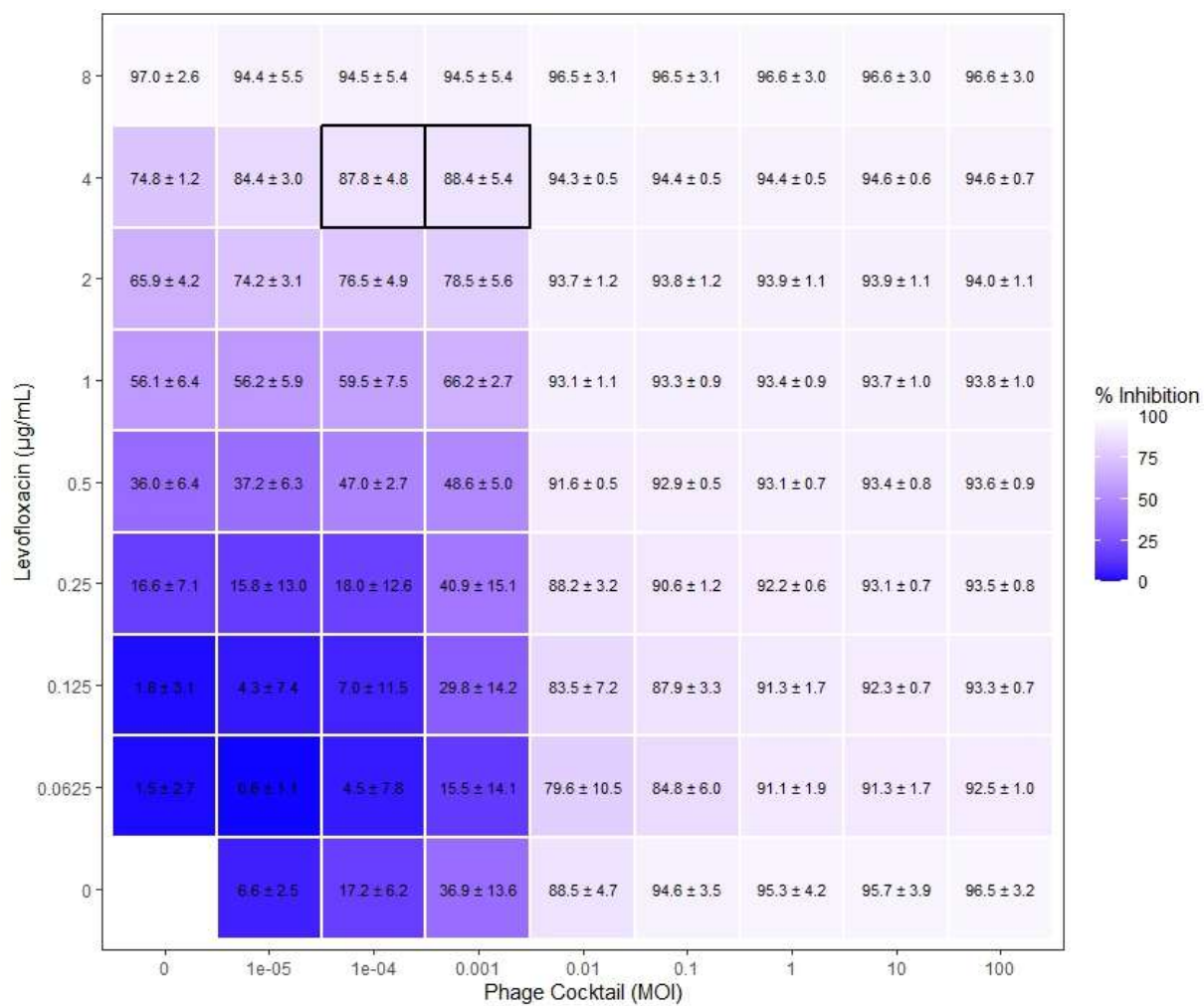
Fonte: o próprio autor (2026).

ANEXO 4 – *Checkerboard* da associação entre Colistina e o Coquetel frente o isolado Ab615



Fonte: o próprio autor (2026).

ANEXO 5 – *Checkerboard* da associação entre Levofloxacina e o Coquetel frente o isolado Ab846



Fonte: o próprio autor (2026).

ANEXO 6 – *Checkerboard* da associação entre Meropenem e o Coquetel frente o isolado Ab846



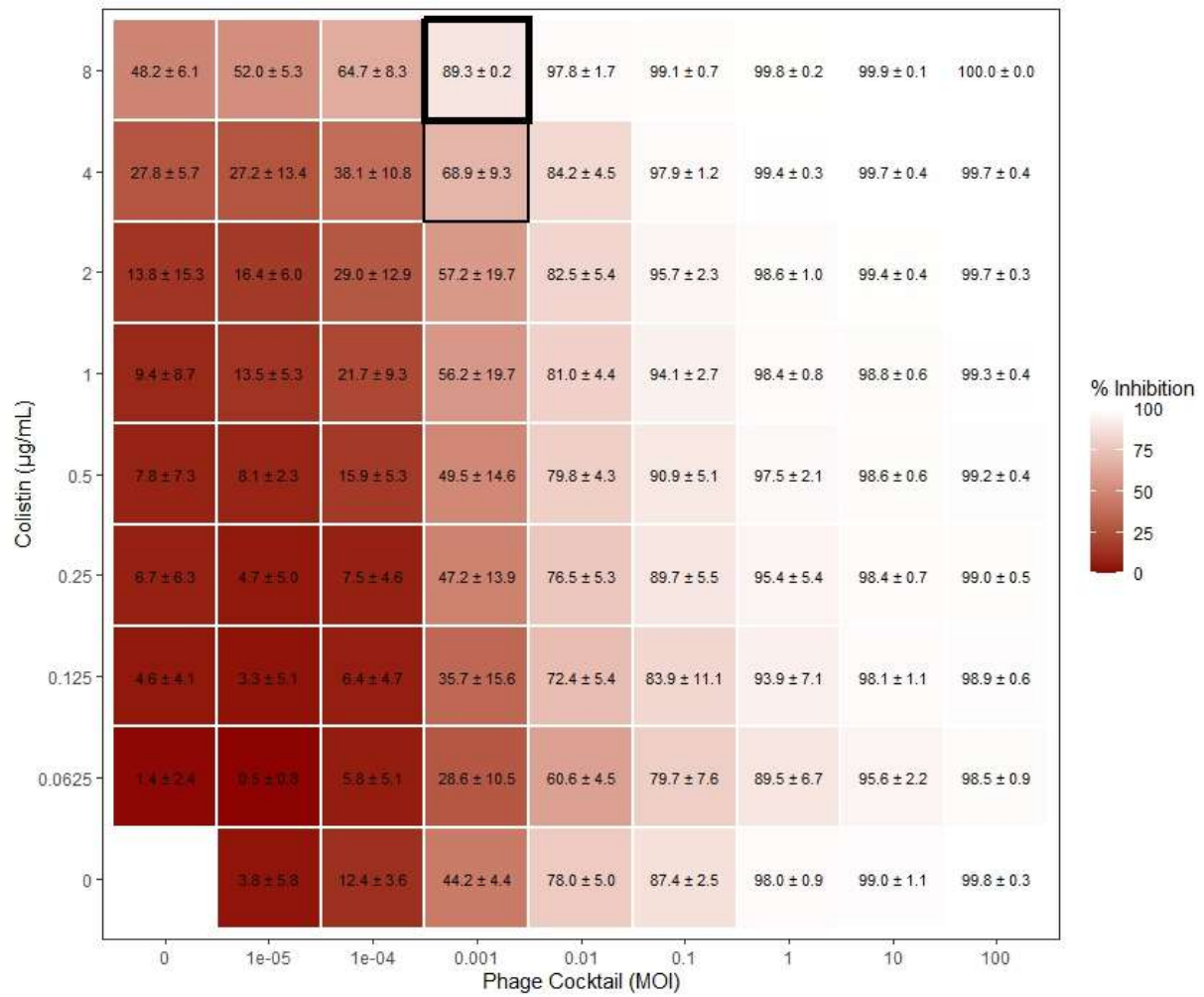
Fonte: o próprio autor (2026).

ANEXO 7 – *Checkerboard* da associação entre Piperacilina-Tazobactam e o Coquetel frente o isolado Ab846



Fonte: o próprio autor (2026).

ANEXO 8 – *Checkerboard* da associação entre Colistina e o Coquetel frente o isolado Ab846



Fonte: o próprio autor (2026).