



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JHONATAN MACEDO RIBEIRO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
NOVO BACTERÍÓFAGO CONTRA CEPAS DE  
*ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE *KLEBSIELLA  
PNEUMONIAE* CARBAPENEMASE (KPC) E BETA-  
LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)**

---

Londrina  
2019

JHONATAN MACEDO RIBEIRO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
NOVO BACTERIÓFAGO CONTRA CEPAS DE  
*ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE *KLEBSIELLA  
PNEUMONIAE* CARBAPENEMASE (KPC) E BETA-  
LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina  
2019

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

R484i Ribeiro, Jhonatan Macedo.

Isolamento, caracterização e aplicação de novo bacteriófago contra cepas de *Escherichia coli* produtora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) / Jhonatan Macedo Ribeiro. - Londrina, 2019.  
65 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.

) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2019.  
Inclui bibliografia.

1. Bacteriófagos - . 2. Fagoterapia - . 3. Resistência bacteriana - . 4. Antimicrobianos - . I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

CDU 579

JHONATAN MACEDO RIBEIRO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE  
NOVO BACTERÍÓFAGO CONTRA CEPAS DE  
*ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE *KLEBSIELLA  
PNEUMONIAE* CARBAPENEMASE (KPC) E BETA-  
LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata K. T. Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ligia Carla Faccin Galhardi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de março de 2019.

"Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta."

Carl Sagan

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer ao povo brasileiro, especialmente à maioria que é pobre e trabalha demais todos os dias, por financiar todo o meu estudo e qualificação nestes dois anos de mestrado. Espero retornar esse investimento para a sociedade brasileira, em especial à vocês.

Agradeço também aos meus irmãos e minha tia por me darem certas condições para poder continuar me qualificando e seguindo a área acadêmica e da pesquisa, tão desvalorizada e em crise no Brasil atual. Aqueles que escolhem seguir essa área são pessoas muito corajosas e apaixonadas, ainda mais quando as condições financeiras são precárias ou vulneráveis. Dessa forma, assim como meus colegas de profissão, me considero uma pessoa corajosa e apaixonada pela pesquisa e que merece um enorme agradecimento por se manter firme e lutar muito, sem fraquejar nos diversos momentos de crise durante toda essa trajetória.

Aos meus professores, minha sincera gratidão por todo o tempo investido no meu aprendizado, desde a primeira série até a conclusão do mestrado em Microbiologia. A Educação transforma, liberta e dá vida a um ser humano! Todos contribuíram de alguma forma para a formação do meu conhecimento atual. Ao Professor Dr. Gerson Nakazato, agradeço pela oportunidade e pela liberdade de expor e testar minhas ideias.

Aos meus parceiros de laboratório, gratidão pela companhia de todos os dias, pelas conversas de bar e de laboratório, pelas festas e pelos dias de experimentos. Com certeza vocês tornaram esse período muito melhor e influenciaram no processo de finalização deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros por todo o suporte nos momentos ruins e bons e nas diversas conversas e apoio. À Mariana por toda a ajuda nessa etapa final, bem como em diversos momentos em que sua presença foi importante. Meu mais sincero obrigado!

Agradeço às mais diversas pessoas que contribuíram para que eu chegasse a essa etapa e finalizasse esse trabalho! Seriam tantos nomes para citar que necessitaria de mais 65 páginas escritas.

Obrigado pela ajuda!

RIBEIRO, Jhonatan Macedo. **Isolamento, caracterização e aplicação de novo bacteriófago contra cepas de *Escherichia coli* produtora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)**. 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

## RESUMO

Entre as bactérias multirresistentes mais importantes estão as produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) e produtoras de carbapenemases (KPC), especialmente *Escherichia coli*, que leva à um aumento da mortalidade associada a essas infecções. Neste estudo foi isolado um bacteriófago denominado ph\_EcoPphJ96 de amostras de camas de frango e avaliada a atividade contra cepas de *E. coli* produtoras de ESBL e KPC, além de enterohemorrágicas (O157:H7). Microscopia Eletrônica de Transmissão mostrou que phJ96 possui morfologia similar aos da família *Podoviridae*. Inicialmente, phJ96 foi capaz de infectar 11 de 24 cepas de *E. coli* com uma atividade lítica resultante de 45%. Após a adaptação do bacteriófago, sua atividade lítica aumento de 45% para 58%, com apenas uma passagem. A curva de crescimento mostrou o comportamento de phJ96 em contato com sua cepa hospedeira (*E. coli* J96) em diferentes multiplicidades de infecção. Além disso, este método também mostrou que para duas *E. coli* Enterohemorrágica O157:H7, a multiplicidade de infecção de 10 pôde inibir o crescimento bacteriano por 10 horas. A potencial utilização dos bacteriófagos juntamente com outras substâncias alternativas ou como parte de um coquetel de fagos, representa uma possível estratégia terapêutica contra *E. coli* produtora de ESBL e KPC, em razão do aumento contínuo da resistência antimicrobiana em todo o mundo.

**Palavras-chave:** adaptação de bacteriófagos; resistência antimicrobiana, infecção do trato urinário.

RIBEIRO, Jhonatan Macedo. **Isolation, characterization and application of new bacteriophage against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing (KPC) and Extended spectrum beta-lactamase-producing (ESBL) *Escherichia coli* strains.** 2019. 65 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina. 2019.

## ABSTRACT

One of the most important multidrug-resistant bacteria is extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing (ESBL) bacteria, especially *Escherichia coli*, which leads to an increase in the mortality associated with resulting infections. In this study we isolated a bacteriophage named ph\_EcoP-phJ96 from chicken litter samples. Transmission electron microscopy showed that phJ96 had the similar morphology as those of the *Podoviridae* family. Initially, phJ96 was able to infect 11 out of 24 *E. coli* strains with a lytic activity of 45%. After bacteriophage adaptation, its lytic activity was increased from 45% to 58% with just one adaptation series. Growth curve showed phJ96's behavior in contact with its host strain at different multiplicities of infection. Besides that, this method also showed that for two EHEC O157:H7 strains, multiplicity of infection of 10 could inhibit bacterial growth for 10 hours. The potential use of this bacteriophage together with other alternative substances or as a part of a phage cocktail represent a possible therapeutic strategy against ESBL-producing *E. coli*, in view of the continuing increase of antimicrobial resistance worldwide.

**Key words:** bacteriophage adaptation; antibiotic resistance; urinary tract infection.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01** – A: Microscopia Eletrônica de Transmissão de um bacteriófago representante da família *Myoviridae*. B: Estrutura clássica de um bacteriófago caudado.....22
- Figura 02** – Estruturas morfológicas de vírus de procariotos .....23

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> – Características dos vírus de procariotos .....	24
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
β	Beta
α	Alfa
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
AMI	Amicacina
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
AZT	Aztreonam
C	Circular
CAZ	Ceftazidima
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEP	Cefalotina
CFU	Colony Forming Unit
CFZ	Cefazolina
CH <sub>4</sub>	Metano
CIP	Ciprofloxacina
CL	Confluent Lysis
CLI	Clindamicina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPM	Cefepima
CR	Resistente a carbapenêmicos
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTX	Cefotaxima
D-Ala-D-Ala	D-Alanina-D-Alanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Decreasing Period
ds	Double-strand
EHEC	Enterohemorrhagic Escherichia coli
ERT	Ertapenem

ERY	Eritromicina
ESBL	Extended-spectrum Beta-Lactamase
g	Grama
GEN	Gentamicina
h	Hora
H <sub>2</sub>	Hidrogênio molecular
HC	Hemorrhagic Colitis
H <sub>2</sub> O	Água
HUS	Hemolytic Uremic Syndrome
ICTV	International Committee of Taxonomy of Viruses
i.e.	For example
IMP	Imipenem
IP	Increasing Period
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
L	Linear
LB	Luria-Bertani
LNZ	Linezolida
LPS	Lipopolissacarídeo
LVX	Levofloxacina
M	Molar
MDR	Multidrug resistance
mg	Miligrama
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicity of Infection
MRP	Meropenem
NaCl	Cloreto de Sódio
NH <sub>3</sub>	Amônia
nm	Nanômetro
NOR	Norfloxacina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilina

pb	Pares de base
PDR	Pandrug-resistant
PEG	Polietilenoglicol
PEN	Penicilina
PFU	Plaque Forming Units
pH	Potencial de hidrogênio
PIB	Produto Interno Bruto
PTZ	Piperacilina + tazobactam
R	Resistente
RAND	Research ANd Development
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundo
S	Superenovelado
SCL	Semi-confluent lysis
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
SP	Stationary Point
ss	Single-strand
STR	Estreptomicina
SXT	Sulfametoxazol + trimetoprim
s/nt	Substituições por nucleotídeo
stx	Shiga toxina
TEM	Transmission Electron Microscopy
TET	Tetraciclina
UEL	Universidade Estadual de Londrina
URSS	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
WHO	World Health Organization
XDR	Extensively drug-resistant

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1	VÍRUS E A ORIGEM DA VIDA .....	15
2.2	A DESCOBERTA DOS BACTERÍOFAGOS E SUA APLICAÇÃO.....	17
2.3	BACTERÍOFAGOS: EVOLUÇÃO.....	20
2.4	ESTRUTURA E DINÂMICA DOS BACTERÍOFAGOS .....	21
2.5	BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES: PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA MUNDIAL.....	27
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
4.1	ARTIGO: AN ALTERNATIVE AGAINST ESBL-PRODUCING ESCHERICHIA COLI AND ENTEROHEMORRHAGIC ESCHERICHIA COLI SEROTYPE O157:H7 .....	37
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana de bactérias patogênicas está alcançando níveis alarmantes a cada ano e sua rápida disseminação representa uma ameaça à saúde pública global. Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) está incentivando urgentemente a pesquisa e desenvolvimento de novas alternativas para o combate à esses patógenos.

Um dos grupos de bactérias multirresistentes mais importantes atualmente são as produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), especialmente *Escherichia coli*, que leva ao aumento da mortalidade associada às suas infecções. Outro grupo importante de *E. coli* são as Enterohemorrágicas ou EHEC, responsáveis por diversos surtos e casos esporádicos de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica em países como Estados Unidos, Canadá, Japão, Reino Unido, entre outros, atribuída principalmente ao sorotipo O157:H7. Frente a esse problema, a pesquisa por novas alternativas e estratégias antimicrobianas, a fim de aprimorar ou substituir a antibioticoterapia são necessárias.

Descobertos em 1917 por Felix d'Herelle, os bacteriófagos ou simplesmente fagos, são utilizados na prática médica na Europa Oriental em países como Georgia, Armenia, Ucrânia e Rússia e possui ótimos resultados aprovados por médicos e pacientes. Diversos estudos no passado e presente focaram no tratamento de infecções bacterianas utilizando fagos, visando o tratamento de queimaduras, infecções respiratórias e diversas outras.

Apesar de ser uma alternativa potencial aos antimicrobianos, a fagoterapia ainda possui alguns obstáculos: os bacteriófagos precisam ser estritamente líticos; a resistência bacteriana ao fago geralmente resulta de uma mutação em receptores de superfície; quando administrado intravenosamente, a meia-vida de decaimento está entre 2 e 4 minutos, isto é, dentro de 10 minutos mais de 90% dos vírus circulantes são eliminados, principalmente pelas células de Kupffer no fígado. Devido ao tamanho maior dos bacteriófagos, quando comparado a pequenas moléculas como antibióticos, a constante de difusão é muito menor. Consequentemente os

antibióticos irão atuar nas bactérias quase instantaneamente enquanto que os bacteriófagos podem levar horas.

A fim de superar alguns desses obstáculos, uma estratégia de adaptação pode ser empregada juntamente com o isolamento de novos bacteriófagos. A estratégia de adaptação consiste na seleção artificial de bacteriófagos mutantes capazes de infectar bactérias que antes eram resistentes, ou aumentar a atividade lítica contra bactérias com baixa sensibilidade. Dessa forma, este estudo reporta o isolamento e adaptação de um novo bacteriófago denominado ph\_EcoP-phJ96, da família *Podoviridae*, contra isolados clínicos de *E. coli* produtora de ESBL e KPC e duas cepas de EHEC sorotipo O157:H7.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Vírus e a origem da vida

“A vida não seria possível na ausência dos microrganismos.” – Louis Pasteur. Os microrganismos são os pilares da vida na Terra. A origem do planeta Terra e o início da evolução da vida foram processos longos e datam aproximadamente 4,5 e 3,5 bilhões de anos, respectivamente (PERRY; STALEY; LORY, 2002). Por bilhões de anos, os microrganismos evoluíram em todos os nichos habitáveis no planeta, incluindo as profundezas dos oceanos, fontes termais, geleiras e outros locais antes não conhecidos como passíveis de suportar formas de vida (GREGORACCI, 2010; GRANT; HORIKOSHI, 1998). Seja nas profundezas dos oceanos, nas fontes termais ou em diversos outros locais do planeta, os microrganismos modificaram seu ambiente (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008), que por bilhões de anos resultaram em grandes transformações no planeta, refletindo em nosso meio ambiente atual.

Contudo, antes dos microrganismos dominarem o planeta Terra, processos químicos progressivos foram necessários para que houvesse o surgimento das primeiras formas de vida. A atmosfera primitiva da Terra continha pouco ou nenhum oxigênio e era rica em dióxido de carbono (TIRARD, 2017). Quando os raios ultravioleta provenientes do Sol agem sobre uma mistura de água, dióxido de carbono e amônia, uma grande variedade de compostos orgânicos são formados, como açúcares e compostos presentes na composição de proteínas, originando a famosa “sopa primordial”. Segundo Haldane (TIRARD, 2017), as primeiras formas originárias de vida eram possivelmente grandes moléculas, sintetizadas pelas reações ocorridas devido à energia proveniente dos raios ultravioleta do Sol, capazes de se replicar no ambiente no qual eram sintetizadas.

A complexidade dessas reações aumentaram progressivamente assim como a quantidade de moléculas diferentes. Para se ter uma ideia, Haldane define que a célula consiste de moléculas replicantes associadas à moléculas auxiliares suspensas em água e envolvidas por um filme de óleo. Dessa

forma, as condições para a formação das primeiras células se fez presente nos oceanos primordiais (TIRARD, 2017). Contudo, antes da formação das primeiras células, um “estado viral” perdurou por milhões de anos para chegar em uma complexidade suficiente para o surgimento de uma célula. Oparin, um cientista soviético, publicou um artigo no mesmo período de Haldane apresentando ideias semelhantes sobre o surgimento da vida na Terra. Dessa forma, iniciava-se então a criação de hipóteses sobre o surgimento da vida na Terra com base na química prebiótica. Um experimento realizado por Stanley Miller, na década de 50, ficou marcado nessa área de pesquisa. O experimento consistia em submeter uma mistura de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{H}_2$  à descargas elétricas por uma semana, obtendo como resultado, aminoácidos como glicina,  $\alpha$ -alanina e  $\beta$ -alanina (TIRARD, 2017; MILLER, 1953).

Mesmo com o avanço das pesquisas sobre a origem da vida, com os diversos trabalhos que se seguiram com química prebiótica, ainda não se possui uma teoria amplamente aceita sobre a origem da vida na Terra.

Enquanto alguns pesquisadores focam na descrição da origem da vida na Terra de forma ascendente, isto é, buscando explicar como as primeiras moléculas orgânicas e as primeiras formas potenciais de vida surgiram, outros tentam buscar de forma descendente – realizando o caminho inverso percorrido pela evolução dos seres vivos na Terra.

Uma forma de tentar se aproximar do início da vida na Terra é buscando a compreensão da origem e evolução dos vírus. A evolução baseia-se na reprodução ou multiplicação e na variabilidade. Dessa forma, nos deparamos com o termo replicon, definido como “uma entidade que carrega a instrução em forma de código para sua própria replicação” (DOMINGO; PARRISH, HOLLAND, 2008). Os replicons podem ser obrigatórios, onde mesmo que haja cópias erradas, elas serão replicadas, como por exemplo os ácidos nucleicos. Já os replicons opcionais, são oligonucleotídeos e oligopeptídeos de crescimento autocatalítico, isto é, sem a necessidade de enzimas, além de perderem a capacidade de serem moldes para a replicação caso haja um resíduo de aminoácido ou nucleotídeo trocado por outro. Moléculas autorreplicantes bem conhecidas são os príons, que além de alterar a forma de outras proteínas saudáveis, podem produzir

réplicas de si mesmos.

Existem duas hipóteses principais para a origem dos vírus, em específico os de RNA: eles são remanescentes de um período em que moléculas de RNA eram dominantes na Terra ou são derivações modernas das células, originados em RNAs celulares que adquiriram replicação autônoma (DOMINGO; PARRISH, HOLLAND, 2008). Células e vírus compartilham diversos módulos funcionais como polimerases, proteases, enzimas envolvidas no metabolismo dos ácidos nucleicos, entre outros. Contudo, com base nas proteínas específicas para a replicação viral e na troca genética entre vírus, o conceito de um antigo mundo viral foi proposto por Koonin et al. (2006). Os vírus e as células possuem grandes diferenças que valem a pena destacar. O DNA cromossomal de *Escherichia coli* possui uma complexidade de cerca de  $4 \times 10^6$  pares de base (pb), enquanto que vírus de RNA possuem em torno de  $3 \times 10^3$  pb. Além disso, estima-se que a taxa de mutação em uma célula bacteriana seja de aproximadamente  $10^{-9}$  substituições por nucleotídeo (s/nt) (FRIEDBERG et al., 2006), enquanto que para um vírus de RNA seja em torno de  $10^{-3}$  s/nt (DOMINGO, 2005). Dessa forma, os vírions resultantes da infecção de uma única célula podem ser geneticamente heterogêneos.

Comparações de genomas virais sugerem de forma sólida que todos os vírus existentes possuem raízes evolucionárias profundas e antigas (GORBALENYA, 1995; VILLARREAL, 2005). Portanto, os vírus são entidades biológicas muito antigas no planeta Terra e seu entendimento contribui para uma maior compreensão da origem das formas de vida.

## **2.2 – A descoberta dos bacteriófagos e sua aplicação**

A riqueza microbiana da biosfera é enorme, ainda assim, menos de 1% é cultivável (PEDRÓS-ALIÓ, 2012; RAPPÉ; GIOVANONNI, 2003). Grande parte desses microrganismos é benéfica, diretamente ou indiretamente, para o ser humano e outros animais. Contudo, uma pequena parcela é patogênica, responsável, muitas vezes, por doenças de grande importância médica e impactos sociais enormes. Por milhares de anos, a humanidade foi afligida por grandes epidemias como sífilis, varíola, tifo, febre amarela, lepra,

tuberculose, Gripe Espanhola, cólera, peste negra, entre diversas outras. Centenas de milhões morreram (HAENSCH et al., 2010; KOOL, 2005). Bactérias e vírus como causadores de doenças, medidas profiláticas como vacinas ou até mesmo drogas efetivas como antibióticos eram completamente desconhecidas. O tratamento era realizado de acordo com o conhecimento popular e empírico. Médicos do antigo Egito, Pérsia, e Grécia, por exemplo, tratavam seus pacientes com compressas e remédios à base de ervas, bolores e compostos orgânicos (MOHR, 2016). Contudo, no final do século XIX um grande passo no tratamento de infecções bacterianas ocorreu, com a primeira descrição de um antibiótico natural purificado por Bartolomeo Gosio em 1893 (GOSIO, 1896; BENTLEY, 2000; KARWEHL; STADLER, 2016), seguido por Ernest Duchesne, que descreveu a atividade antibacteriana de fungos em 1897, onde muitos anos depois descobriu-se que se tratava da penicilina (DUCHESNE, 1897; DUCKETT, 1999).

Na busca incessante por compostos que pudessem ser utilizados no tratamento de doenças infecciosas, Frederick Twort, em 1915, publicou um trabalho sobre “as lises bacterianas transmissíveis”, embora a era dos bacteriófagos não tenha se iniciado até a impactante publicação sobre “bacteriófagos obrigatórios” por Félix d’Herelle, em 1917 (TWORT, 1915; D’HERELLE, 1917). Após a publicação desses trabalhos e a descoberta dos bacteriófagos ou fagos, isto é, vírus que infectam bactérias, microbiologistas começaram a incorporar as ideias trazidas por d’Herelle e Twort, iniciando quase que imediatamente a pesquisa com bacteriófagos. Ainda no mesmo período diversos outros bacteriófagos foram isolados capazes de lisar *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria meningitidis* (FRUCIANO; BOURNE, 2007).

Pouco tempo após sua descoberta, d’Herelle utilizou bacteriófagos para o tratamento de disenteria, o qual provavelmente foi a primeira tentativa de utilização de bacteriófagos terapêuticamente. Um menino de 12 anos que sofria de disenteria grave foi tratado com fagos, resultando em sua completa recuperação em poucos dias com apenas uma dose (SUMMERS, 2001). Após esse feito, d’Herelle e outros cientistas realizaram diversos tratamentos em humanos, obtendo grande sucesso.

Em 1923, juntamente com George Eliava, fundou na Geórgia o Instituto Eliava, ativo até os dias atuais (ELIAVA INSTITUTE). Além disso, em 1933 inaugurou o Laboratoire du Bacteriophage, onde comercializava 5 coquetéis de fagos para diversas infecções (ABEDON et al., 2011). Esse feito atraiu a atenção de grandes empresas farmacêuticas da época como Ely Lilly, Parke-Davis e Abbot, as quais investiram na pesquisa e aplicação terapêutica dos bacteriófagos (FRUCIANO; BOURNE, 2007). Durante o período de 1920 à meados de 1930, os bacteriófagos foram amplamente utilizados no mundo no combate à infecções bacterianas e com elevadas taxas de sucesso (ABEDON et al., 2011; SCHOOLNIK; SUMMERS; WATSON, 2004).

Um estudo conduzido em 1938 (CHANISHVILI, 2012) pelo Instituto de Dermatologia em Tbilisi, avaliou o tratamento de infecções purulentas de pele por *Staphylococcus aureus* utilizando bacteriófagos. Um total de 90 pacientes com infecções profundas incluindo furunculose, abscessos e hidradenite foram tratados com bacteriófagos por 4-5 vezes. Todos os 40 pacientes com furunculose aguda foram curados; 12 de 13 pacientes com infecção subaguda foram curados; de 20 pacientes com furunculose crônica, 13 obtiveram sucesso no tratamento, enquanto que dos 7 pacientes sem sucesso, 4 obtiveram melhora significativa do quadro clínico; de 10 pacientes com abscessos, 7 responderam ao tratamento resultando em cura. O tratamento mais efetivo reportado foi o de 7 pacientes com hidradenite, onde todos foram tratados com sucesso em 3-5 dias.

Durante a Segunda Guerra Mundial, o exército soviético realizou com sucesso o tratamento de feridas utilizando fagos. Um estudo, por exemplo, avaliou que feridos do campo de batalha que receberam fagos anti-*Clostridium*, possuíam 80% de sobrevida, enquanto que aqueles que receberam tratamentos diferentes a sobrevida foi de 60% (KUTTER, 2009).

Contudo, esse período de grande entusiasmo e expectativas com a fagoterapia diminuiu amplamente no ocidente. Uma série de três artigos de revisão criticando a falta de ensaios clínicos controlados e randomizados que comprovassem a eficácia dos bacteriófagos (SULAKVELIDZE; ALAVIDZE; MORRIS, 2001), além de alguns estudos que indicavam que se tratava de uma enzima (SUMMERS, 2012), impactaram negativamente na fagoterapia.

Além disso, com o início da era dos antibióticos, a fagoterapia foi sendo substituída por eles logo após a Segunda Guerra Mundial, permanecendo como objeto de estudo apenas como ferramenta na biologia molecular.

Entretanto, na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) e em parte da Europa oriental, as pesquisas com bacteriófagos visando a fagoterapia continuou prosperando até a queda da URSS, apesar de continuar até os dias atuais nas regiões correspondentes como Polônia, Georgia e Rússia (ABEDON et al., 2011; BURROWES, 2011). Nesse período, os médicos administraram bacteriófagos oralmente, em forma líquida ou cápsula; topicamente, para infecções de pele, olhos e cavidade auditiva; por aerossol para infecções respiratórias e, em raras ocasiões, administração intravenosa para tratar infecções sanguíneas (KUTTER; SULAKVELIDZE, 2004). O Instituto Eliava continua até os dias atuais produzindo e fornecendo coquetéis de bacteriófagos para o tratamento de infecções bacterianas.

### **2.3 Bacteriófagos: evolução**

Devido à enorme quantidade estimada no planeta ( $10^{31}$  bacteriófagos), os bacteriófagos podem ser considerados como a entidade biológica de maior sucesso em número (DOMINGO; PARRISH; HOLLAND, 2008). Para se ter uma noção do quão grande e incompreensível é esse valor, enfileirando todos os bacteriófagos do planeta um a frente do outro, de uma ponta a outra haveria uma distância de 200 milhões de anos-luz! Para comparação, nossa galáxia, a Via Láctea, possui um diâmetro de 105,7 mil anos-luz. Seriam necessárias 1.892 Vias Láctea para equiparar a distância.

Além disso, presume-se que a substituição por novos vírus ocorra em uma semana, ou seja,  $10^{31}$  novos fagos são produzidos toda semana. Isso requer que haja  $10^{24}$  infecções produtivas por segundo no planeta (DOMINGO; PARRISH; HOLLAND, 2008). Cada uma dessas infecções é uma possibilidade de mutação durante a multiplicação ou de recombinação com DNA hospedeiro. Somando esse processo ao período de aproximadamente 3.5 bilhões de anos, não há como sequer imaginar a complexidade e grandeza da variabilidade genética desses vírus.

Susskind e Botstein (SUSSKIND; BOTSTEIN, 1975) propuseram em

1975 a Teoria da Evolução Modular do Fagos, que apresenta a ideia de que os fagos geram novas composições genômicas através de trocas de módulos genéticos sequenciais, também chamados de “hotspots” de recombinação. Dessa forma, a variabilidade genética desses vírus ocorre de forma controlada em sítios específicos. Contudo, apenas as mutações que permitem o fago continuar ativo e replicante serão consideradas de sucesso, ou seja, recombinações funcionalmente comprometidas são rapidamente removidas das populações por seleção natural.

Aproximadamente 90-95% do genoma total dos fagos possuem genes codificantes de proteínas e o restante do genoma consiste de sequências regulatórias como promotores (DOMINGO; PARRISH; HOLLAND, 2008). Pode-se observar que são altamente eficientes e econômicos, uma vez que a alta pressão de seleção não permite tais vírus possuírem quantidades significativas de material genético dispensável.

Em 2012, pouco mais de 5000 bacteriófagos haviam sido isolados e apenas 300 caracterizados morfológica e geneticamente. Além disso, é necessário destacar que há um viés de isolamento e caracterização de fagos para bactérias que consideramos importantes como *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* e outros, além do fato de que as bactérias hospedeiras são aquelas passíveis de cultivo em ambiente laboratorial.

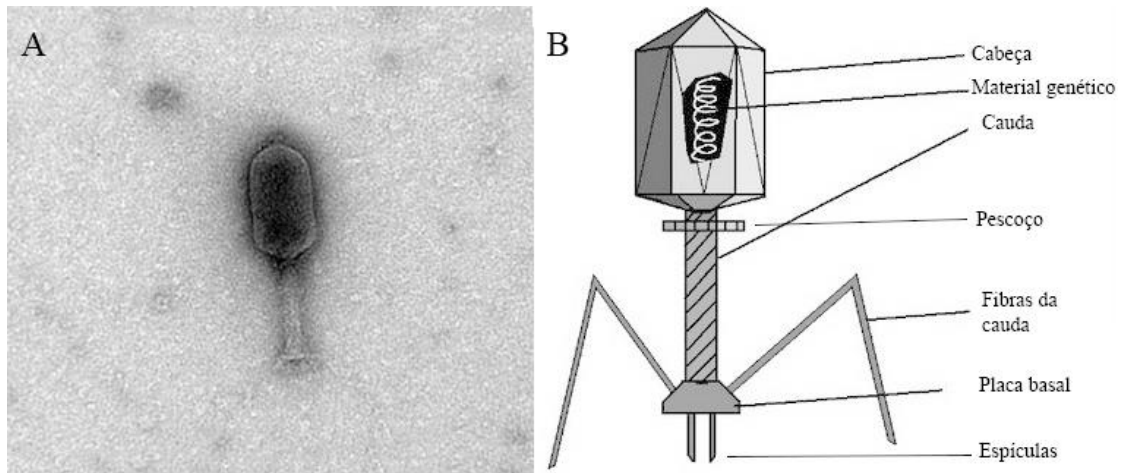
#### **2.4 Estrutura e dinâmica dos bacteriófagos**

Assim como os vírus de plantas e células eucariontes, os bacteriófagos são constituídos por ácidos nucleicos e proteínas (ORLOVA, 2012). O material genético dos bacteriófagos é diverso e pode variar em tamanho e estrutura, podendo ser de DNA ou RNA, de fita simples (ss) ou dupla (ds), em conformação linear, circular ou superenovelada (GRATH; VAN SINDEREN, 2007). Contudo, em sua maioria, os bacteriófagos apresentam DNA dupla fita.

Apesar da grande variabilidade morfológica, os bacteriófagos caracterizados apresentam em sua maioria uma estrutura comum: uma cabeça de simetria icosaédrica associada a uma cauda proteica de simetria helicoidal (Figura 1) (ORLOVA, 2012). A cabeça é formada pelo capsídeo,

uma estrutura composta por subunidades proteicas que envolvem o material genético (KOSKELLA; MEADEN, 2013).

**Figura 1** – A: Microscopia Eletrônica de Transmissão de um bacteriófago representante da família *Myoviridae*. Fonte: (KALATZIS et al., 2016) B: Estrutura clássica de um bacteriófago caudado.

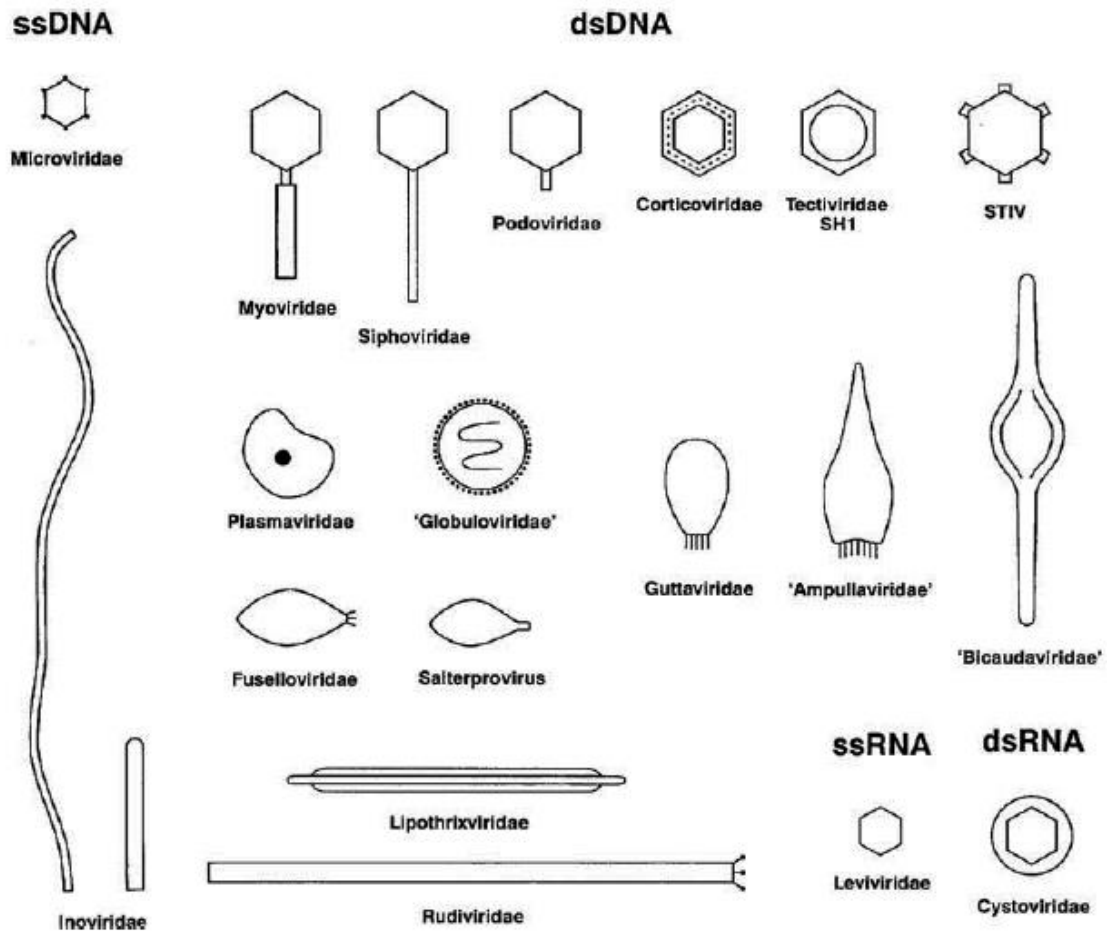


**Fonte:** adaptado de: <http://www.ciencias.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=2180&evento=3>.

A estrutura de junção do capsídeo à cauda denomina-se pescoço, sendo responsável por assegurar que o genoma do virion seja liberado apenas quando adsorvido à célula hospedeira (HANLON, 2007). A região distal da cauda consiste em uma placa basal com associação de 6 fibras e espículas, constituídas de proteínas, responsáveis primariamente pela especificidade e reconhecimento do receptor da célula hospedeira, desempenhando um papel central no processo de infecção (HANLON, 2007). A cauda pode ser contrátil ou não, dependendo do bacteriófago (ACKERMANN, 2009) e alguns fagos podem conter lipídeos em envelopes ou estruturas internas ao capsídeo, o que o torna sensível à clorofórmio e éter.

A quantidade de fagos que possuem a morfologia conhecida ultrapassa 5.500 tipos (Figura 2). Dados de 2009 mostram que os bacteriófagos encontram-se divididos em 14 famílias e 37 gêneros (Tabela 1) com base na morfologia, natureza do material genético e elementos genéticos comuns. Contudo, o International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV) está longe de ter um padrão fechado de classificação de bacteriófagos (ACKERMANN, 2009).

**Figura 2** – Estruturas morfológicas de vírus de procaríotos.



**Fonte:** (ACKERMANN, 2009).

**Tabela 1** – Características dos vírus de procariotos.

Forma	Ácido nucleico	Família	Gênero	Particularidade	Exemplo	Membros
Caudado	dsDNA (L)	<i>Myoviridae</i>	6	Cauda contrátil	T4	1.320
		<i>Siphoviridae</i>	7	Cauda longa, não contrátil	$\lambda$	3.229
		<i>Podoviridae</i>	4	Cauda curta	T7	771
Poliédrico	ssDNA (C)	<i>Microviridae</i>	4	Capsômeros conspícuos	$\phi$ X174	40
	dsDNA (C, S)	<i>Corticoviridae</i>	1	Capsídeo complexo, lipídeos	PM2	3?
	dsDNA (L)	<i>Tectiviridae</i>	1	Capsídeo duplo, lipídeos, pseudo-cauda	PRD1	19
	dsDNA (L)	SH1*		Capsídeo duplo, lipídeos	SH1	1
	dsDNA (C)	STIV*		Protrusões em forma de torre	STIV	1
	ssRNA (L)	<i>Leviviridae</i>	2	Tipo Poliovirus	MS2	39
	dsRNA (L, M)	<i>Cystoviridae</i>	1	Envelope, lipídeos	$\phi$ 6	3
Filamentoso	ssDNA (C)	<i>Inoviridae</i>	2	Filamentos longos, hastes curtas	M13	67
	dsRNA (L)	<i>Lipothrixviridae</i>	4	Envelope, lipídeos	TTV1	7
	dsRNA (L)	<i>Rudiviridae</i>	1	Hastes rígidas, tipo TMV	SIRV-1	3
Pleomórfico	dsDNA (C, S)	<i>Plasmaviridae</i>	1	Envelope, sem capsídeo, lipídeos	L2	5
	dsDNA (C, S)	<i>Fuselloviridae</i>	1	Forma de limão, envelope, lipídeos?	SSV1	11
	dsDNA (L, S)	-	1**	Forma de limão, envelope	His1	1
	dsDNA (C, S)	<i>Guttaviridae</i>	1	Forma de gota	SNDV	1
	dsDNA (L)	<i>Ampullaviridae</i> *		Forma de garrafa, nucleocapsídeo helicoidal	ABV	1
dsDNA (C)	<i>Bicaudaviridae</i> *		Duas caudas, nucleocapsídeo helicoidal	ATV	1	
dsDNA (L)	<i>Globuloviridae</i> *		Envelope, esférico, lipídeos, nucleocapsídeo helicoidal	PSV	1	

C: circular; L: linear; M: multipartido; S: superenovelado; - sem nome; \* não classificado; \*\* gênero *Salterprovirus*.

Fonte: (ACKERMANN, 2009).

De todos os fagos descritos até 2012, 96% pertencem à ordem *Caudovirales*, grupo caracterizado pela presença de cauda. Dentro desta ordem, podemos dividir em 3 famílias: *Myoviridae*, onde a cauda consiste em um pescoço, uma bainha contrátil e um tubo central, sendo maior que os outros grupos e incluir alguns dos maiores e mais desenvolvidos fagos caudados (~1.300 observações, 25% dos caudados); *Siphoviridae*, com cauda simples, não contrátil e tubos rígidos ou flexíveis, além de serem os mais numerosos dentre os caudados (acima de 3.200 observações, 61%); *Podoviridae*, possuem caudas curtas e não contráteis (~750 observações, 14.5%).

O processo de infecção e replicação viral pode ser dividido didaticamente em uma sequência de etapas que tem início na adsorção, processo no qual ocorre a interação entre as proteínas de superfície do bacteriófago com os receptores de superfície da bactéria hospedeira (RAKHUBA et al., 2010). Estruturas como flagelos, pili, cápsula, LPS e proteínas são passíveis de serem receptores de ligação dos bacteriófagos, permitindo que diferentes fagos infectem uma mesma bactéria ou que um mesmo fago infecte uma bactéria por diferentes receptores (LETELLIER et al., 2004). Dessa forma, apesar da enorme especificidade e espectro de hospedeiros restrito, há estudos que demonstram a infecção de bactérias de gêneros diferentes por um mesmo vírus (WEITZ et al., 2013).

A etapa de adsorção pode ser dividida em dois processos: inicialmente ocorre uma ligação reversível com a superfície bacteriana, realizada pelas fibras da cauda (LETELLIER et al., 2004); em seguida, uma ligação específica e irreversível dos receptores do fago com os receptores bacterianos promove alterações conformacionais no vírus, permitindo a liberação do conteúdo presente no capsídeo. Sendo assim, o material genético do vírus é inserido no citoplasma bacteriano. Uma vantagem dos fagos que possuem caudas contráteis é a possibilidade de penetrar a parede celular e injetar diretamente o seu genoma no citoplasma bacteriano (ANDRES et al., 2010).

No processo de inserção do material genético viral na bactéria hospedeira, mecanismos envolvendo gradiente eletroquímico, moléculas de ATP e digestão enzimática da parede celular por hidrolases podem ocorrer

(RAKHUBA et al., 2010). Após a penetração, a partícula viral vazia continua associada à superfície bacteriana.

Dependendo do bacteriófago e do estado fisiológico da célula bacteriana, o ciclo de replicação viral pode divergir em dois caminhos: o ciclo lítico (fagos virulentos) representa o estado mais virulento de um bacteriófago, onde ocorre a lise bacteriana; já o ciclo lisogênico (fagos temperados), genes reguladores interferem na “decisão inicial” entre lise e lisogenia, isto é, integração do genoma viral em regiões do genoma bacteriano. A ocorrência de um ciclo em detrimento do outro é influenciado por diversos fatores, tanto ambientais quanto fisiológicos, como estado nutricional, metabólico, dimensão da célula e a multiplicidade de infecção (MAURICE et al., 2010; SINGH; WEINBERGER, 2009). Quando a quantidade de células hospedeiras é grande, a ocorrência do ciclo lítico não compromete a sobrevivência e perpetuação dos vírus, enquanto que quando a população bacteriana está reduzida, a estratégia mais vantajosa e que favorece a perpetuação viral é a realização do ciclo lisogênico.

Resumidamente, no ciclo lítico o processo de replicação viral ocorre logo após a penetração. Para isso, inicialmente ocorre o recrutamento da RNA polimerase bacteriana ou caso o vírus possua o gene para codificação de sua própria polimerase, esta será utilizada no processo de replicação. As primeiras proteínas transcritas, também chamadas de proteínas reguladoras, modificam a célula hospedeira, impedindo-a de replicar e transcrever o seu próprio genoma (GRATH; VAN SINDEREN, 2007). Portanto, a partir desse momento a maquinaria metabólica da bactéria está sob domínio viral, transformando-a em uma “fábrica de vírus”. Ao final, enzimas que danificam a membrana plasmática e a parede celular, como a holina e lisina, são sintetizadas a fim de liberar as partículas virais maduras recém-formadas (LOBA, 2014).

Já o ciclo lisogênico ocorre quando o genoma de um bacteriófago temperado se integra no cromossomo ou plasmídeo bacteriano. A partir desse momento, ele recebe o nome de prófago e comporta-se como um seguimento gênico bacteriano, sendo replicado junto com o restante do material genético do hospedeiro. Para isso, é necessário a expressão de proteínas repressoras do promotor dos genes envolvidos no ciclo lítico

(LOBA, 2014). Contudo, esse estado é reversível e pode ser afetado por fatores ambientais como danos celulares, temperatura ou outras alterações fisiológicas (GOLDING, 2011).

## **2.5 Bactérias multirresistentes: problema de saúde pública mundial**

Após o início da era dos antibióticos e a queda da fagoterapia no ocidente, o tratamento de infecções bacterianas era realizado exclusivamente com antimicrobianos, não havendo necessidade de utilização e pesquisa com bacteriófagos devido à grande eficiência desses compostos. Entretanto, desde a utilização dos primeiros antimicrobianos são relatados casos de resistência bacteriana a essas substâncias.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais é um problema de saúde pública mundial, pois atinge desde ambientes hospitalares até a comunidade e o meio ambiente. A importância dos antimicrobianos está relacionada com o aumento na expectativa e qualidade de vida; porém o risco da resistência microbiana é relevante já que esses medicamentos causam uma pressão seletiva sobre os microrganismos. A resistência antimicrobiana em bactérias patogênicas está atingindo níveis alarmantes a cada ano e a rápida disseminação global torna-se uma ameaça à saúde pública mundial tão importante que a OMS está incentivando pesquisadores a encontrar alternativas para combater esses patógenos (WHO, 2014; COLLINGNON et al., 2016). Em 2050, estima-se que infecções por bactérias multirresistentes causará a morte de 10 milhões de pessoas por ano, caso nada seja feito para combater esses microrganismos (O'NEIL, 2014).

Estima-se que nos Estados Unidos, a cada ano, pelo menos 17 milhões de pessoas são infectadas por bactérias resistentes a antibióticos, e pelo menos 23 mil pessoas morrem devido à consequências diretas dessas infecções (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015; MAGIORAKOS et al., 2012). Estudos realizados pelas corporações RAND Europe e KPMG estimaram os custos econômicos globais e os índices de mortalidade até 2050 e se medidas não forem tomadas com relação à resistência bacteriana, nos próximos 35 anos 300 milhões de pessoas vão

morrer e o PIB mundial será de 2 a 2,5% inferior ao que seria de outra maneira (O'NEILL, 2014).

De acordo com Magiorakos e colaboradores (2012), os microrganismos podem ser classificados em três categorias baseadas no perfil de resistência aos antimicrobianos: (a) microrganismos resistentes a múltiplas drogas (MDR, multidrug-resistant) apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano em, no mínimo, três diferentes classes; (b) microrganismos extensamente resistentes (XDR, extensively drug resistant) apresentam resistência a todos os antimicrobianos de todas as classes, exceto duas; (c) microrganismos pan-resistentes (PDR, pandrug resistant) possuem resistência a todos os antimicrobianos de todas as classes disponíveis.

A resistência aos betalactâmicos tem sido frequente, pois esses antimicrobianos são muito utilizados. Existem quatro grupos de betalactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos) que são resultado dos esforços de pesquisas farmacêuticas para aumentar o espectro de ação dos antimicrobianos. Os betalactâmicos compartilham o mesmo mecanismo de ação já que possuem em comum o anel betalactâmico e, portanto, atuam seletivamente na inibição da síntese da parede celular bacteriana (KASMAR; HOOPER, 2009).

O anel betalactâmico é um análogo estrutural do dipeptídeo D-Ala-D-Ala (substrato das transpeptidases bacterianas, enzimas envolvidas na síntese da parede celular bacteriana). Portanto, os betalactâmicos acabam interferindo no processo de transpeptidação. Assim, as transpeptidases acabam se ligando aos betalactâmicos ao invés de se associarem ao substrato natural (D-Ala-D-Ala) (KASMAR; HOOPER, 2009).

No entanto, as bactérias utilizam estratégias para driblar a ação desses antimicrobianos. Em Gram negativas é comum a presença de enzimas que inativam os betalactâmicos, conhecidas como betalactamases, que por sua vez possuem sítio ativo que ataca o anel betalactâmico na mesma região em que este é alvo das transpeptidases. Uma hidroxila livre presente na enzima betalactamase ataca o anel betalactâmico, e como resultado de uma reação de hidrólise ocorre liberação de água, ácido penicilônico, enzima em estado ativo e antimicrobiano inativo (SILVA;

LINCOPAN, 2012). Entre os patógenos Gram-negativos multirresistentes, merecem destaque as bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases, especialmente a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) causadora de grandes problemas clínicos (CANTAS et al., 2013).

ESBL e KPC hidrolizam o anel betalactâmico, inativando o antimicrobiano (QUEENAN; BUSH, 2007; DRAWZ; BONOMO, 2010). ESBLs são responsáveis pela maioria das resistências aos betalactâmicos, e os carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) são drogas de escolha para o controle de infecções causadas por bactérias produtoras dessas betalactamases de espectro estendido (DHILLON; CLARK, 2012; SILVA; LINCOPAN, 2012). Contudo, carbapenemases reduzem as opções de tratamento pois são capazes de inativar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007).

Além da produção de enzimas que conferem resistência à diversos antimicrobianos, outras cepas de *E. coli* produzem toxinas altamente potentes, tornando-as cepas altamente virulentas. Um exemplo é *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) sorotipo O157:H7, microrganismo altamente virulento, zoonótico e presente em alimentos. Pode levar à diarreia sanguinolenta grave e síndrome hemolítica urêmica (SHU). Infecções por essa bactéria atingiu níveis alarmantes nos Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Japão, França e diversos outros países (MONEY et al., 2010; BAVARO, 2012; KING et al., 2014; TERAJIMA et al., 2014; GAULIN et al., 2015), estando relacionadas principalmente ao consumo de carnes mal cozidas. Além disso, o tratamento com antimicrobianos não é recomendado pois leva ao aumento da produção de *stx*, toxina que inibe a síntese proteica (DAVIS et al., 2013). Dessa forma, estratégias alternativas se fazem necessárias para o combate desses patógenos, possibilitando a utilização de bacteriófagos no controle do crescimento e no tratamento de infecções por EHEC sorotipo O157:H7 (WANG et al., 2017).

A alta disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos utilizados na prática clínica está relacionada com a pressão de seleção exercida sobre esses na utilização cotidiana desses fármacos. A situação se complica ainda mais, como por exemplo, no caso dos países da

América Latina e em especial no Brasil, devido a alguns fatores: fiscalização e controle da utilização dos antimicrobianos serem pouco eficientes; dificuldade na organização dos dados nacionais relacionados à resistência bacteriana em virtude da falta de publicações oficiais; e falta de higiene e de condições mínimas para o controle desses patógenos em hospitais devido ao escasso investimento na saúde pública por parte do governo federal (REINERT et al., 2007; ROSSI, 2011). Além disso, a disseminação da resistência bacteriana afeta não somente a área médica, como também a área veterinária e agrônômica (SFACIOTTE; VIGNOTO; WOSIACKI, 2014).

Todos os fatores supracitados contribuem para a disseminação de microrganismos multirresistentes, e este problema gera consequências importantíssimas como: o aumento do custo e do tempo de tratamento, pela utilização de medicamentos mais caros e mais tóxicos; aumento do tempo de hospitalização; isolamento do paciente; aumento da frequência e da gravidade das infecções hospitalares e aumento da taxa de mortalidade associada a este tipo de infecção (GURGEL; CARVALHO, 2008).

Esses fatores levaram ao redescobrimto da fagoterapia no ocidente. Harald Brussow (BRUSSOW, 2012) em seu artigo intitulado “O que é necessário para a fagoterapia se tornar realidade na medicina ocidental?”, discute sobre as vantagens e desvantagens da utilização da fagoterapia, abordando os aspectos atuais sobre resistência. Além disso, traz o questionamento de que um dos motivos do pouco investimento na fagoterapia seja que “a indústria farmacêutica concluiu que não é rentável, não quer competição entre fagoterapia e antibióticos, não está familiarizada com as práticas com fagos ou não possui competência para trabalhar no campo”.

Contudo, para tornar a fagoterapia uma alternativa no ocidente contra microrganismos multirresistentes, diversas pesquisas estão sendo realizadas atualmente (TINOCO et al., 2017; GUO et al., 2017; COLOM et al., 2017; GARCIA et al., 2017; KIM et al., 2017).

O crescente interesse da comunidade científica na fagoterapia demonstra o ressurgimento da “cura esquecida” e o grande potencial dos bacteriófagos no combate a microrganismos multirresistentes. Isso mostra o quanto os microrganismos nos possibilita responder novos questionamentos e resolver problemas antes sem respostas, permitindo o progresso do conhecimento de nosso planeta e o benefício da humanidade.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDON, S.T.; KUHL, S.J.; BLASDEL, B.G.; KUTTER, E.M. Phage treatment of human infections. **Bacteriophage**. v.1,n.2, p.66-85. Mar 2011.
- ANDRES, D.; HANKE, C.; BAXA, U.; SEUL, A.; BARBIRZ, S.; SECKLER, R. Tailspike interactions with lipopolysaccharide effect DNA ejection from phage P22 particles in vitro. **J Biol Chem**. v.285, n.47, p.36768-75. Nov 2010.
- BAVARO, M.F. E. coli O157:H7 and other toxigenic strains: the curse of global food distribution. **Curr Gastroenterol Rep**. v.14, n.4, p.317-23. Aug 2012
- BENTLEY, R. Mycophenolic Acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. **Chemical reviews**, v. 100, n. 10, p. 3801-3826, 2000.
- BRUSSOW, H. What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine?. **Virology**. v. 434, n. 2, p. 138-142. 2012.
- BURROWES, B.; HARPER, D. R.; ANDERSON, J.; McCONVILLE, M.; ENRIGHT, M. C. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 9, p. 775-785, 2011.
- CANTAS, L.; SHAH, S.Q.; CAVACO, L.M.; MANAIA, C.M.; WALSH, F.; POPOWSKA, M.; GARELICK, H.; BÜRGMANN, H.; SØRUM, H. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Frontiers in Microbiology**. v. 4, n. 96, p. 1–14. May 2013.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic/Antimicrobial resistance**. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/>>. Acesso em: 27 dez. 2018.
- CHANISHVILI, N. A literature review of the practical application of bacteriophage research. Tblisi: **Nova Biomedical**, 2012. 292p.
- COLLIGNON, P.J.; CONLY, J.M.; ANDREMONT, A.; MCEWEN, S.A.; AIDARAKANE, A.; World Health Organization Advisory Group, Bogotá Meeting On Integrated Surveillance Of Antimicrobial Resistance (WHO-AGISAR) AGERSO, Y.; ANDREMONT, A.; COLLIGNON, P.; CONLY, J.; DANG, NINH. T.; DONADOGODOY, P.; FEDORKA-CRAY, P.; FERNANDEZ, H.; GALAS, M.; IRWIN, R.; KARP, B.; MATAR, G.; MCDERMOTT, P.; MCEWEN, S.; MITEMA, E.; REID-SMITH, R.; SCOTT, H.M.; SINGH, R.; DEWAAL, C.S.; STELLING, J.; TOLEMAN, M.; WATANABE, H.; WOO, G.J. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. **Clin Infect Dis**. v.63, n.8, p.1087-1093. Oct 2016.
- COLOM, J.; CANO-SARABIA, M.; OTERO, J.; ARÍÑEZ-SORIANO, J.; CORTÉZ, P.; MASPOCH, D.; LLAGOSTERA, M. Microencapsulation with alginate/CaCO<sub>3</sub>: A strategy for improved phage therapy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 41441. Jan 2017.
- DAVIS, T.K.; MCKEE, R.; SCHNADOWER, D.; TARR, P.I. Treatment of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. **Infect Dis Clin North Am**. v.27,n.3, p.577-97. Sep 2013.

- D'HERELLE, F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. **Res Microbiol.** Sep 2007. v.158, n.7, p.553-4. 1917.
- DHILLON, R. H. P.; CLARK, J. ESBLs: A clear and present danger? **Critical Care Research and Practice.** 625170. 2012.
- DOMINGO, E. Virus entry into error catastrophe as a new antiviral strategy. **Virus Research.** v.107, p.115–228. 2005.
- DOMINGO, E.; PARRISH, C.R.; HOLLAND, J.J. **Origin and evolution of viruses.** 2°Ed. Elsevier. 2008;
- DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 23, n. 1, p. 160–201. Jan 2010.
- DUCHESNE, E. Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les microorganismes: antagonisme entre les microbes et les moisissures. 1897. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, Lyon. 1897.
- DUCKETT, S. Ernest Duchesne and the concept of fungal antibiotic therapy. **Lancet,** v. 354, n. 9195, p. 2068-2071, 1999.
- FALKOWSKI, P. G.; FENCHEL, T.; DELONG, E. F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. **Science,** v. 320, n. 5879, p. 1034-1039, 2008.
- FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W.; WOOD, R.D.; SCHULTZ, R.A.; ELLENBERGER, T. **DNA Repair and Mutagenesis** . Washington, DC : American Society for Microbiology. 2006.
- FRUCIANO, D.E.; BOURNE, S. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. **Can J Infect Dis Med Microbiol.** v.18, n.1, p.19-26. Jan 2007.
- GARCIA, K. C. O. D.; CORRÊA, I. M. O.; PEREIRA, L. Q.; SILVA, T. M.; MIONI, M. S. R.; IZIDORO, A. C. M.; BASTOS, I. H. V.; GONÇALVES, G. A. M.; OKAMOTO, A. S.; FILHO, R. L. A. Bacteriophage use to control Salmonella biofilm on surfaces presente in chicken slaughterhouses. **Poultry Science,** v. 96, n. 9, p. 3392-3398, Sep 2017.
- GAULIN, C.; RAMSAY, D.; CATFORD, A.; BEKAL, S. Escherichia coli O157:H7 Outbreak Associated with the Consumption of Beef and Veal Tartares in the Province of Quebec, Canada, in 2013. **Foodborne Pathog Dis.** v.12, n.7, p.612-8. Jul 2015.
- George Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology. Disponível em <<http://www.eliava-institute.org/?rid=2>>. Acesso em: 10 jan. 2019.
- GOLDING, I. Decision making in living cells: lessons from a simple system. **Annu Rev Biophys.** v.40, p.63-80. Jan 2011.
- GORBALENYA, A.E. (1995) Origin of RNA viral genomes; approaching the problem by comparative sequence analysis . In: **Molecular Basis of Virus Evolution** ( A. Gibbs , C.H. Calisher and F. Garcia-Arenal , eds) , pp. 49 – 66 . Cambridge : Cambridge University Press. 1995.

- GOSIO, B. Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais. **Riv. d'igiene e sanità pubblica**, 1896.
- GRANT, W. D.; HORIKOSHI, K. **Extremophiles – Microbial life in extreme environments**. Nova lorque: Wiley-Liss, 1998. 322 p.
- GRATH, S. MC; VAN SINDEREN, D. **Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology**. 2007.
- GREGORACCI, G. B. Terapia experimental com bacteriófagos. 2010. 81 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2010.
- GUO, J.; GAO, S. H.; LU, J.; BOND, P. L.; VERSTRAETE, W.; YUAN, Z. Copper oxide nanoparticles induce lysogenic bacteriophage and metal resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **ACS Appl Mater Interfaces**. v. 9, n. 27, p. 22298-22307. 2017.
- GURGEL, T. C.; CARVALHO, W. S. A assistência farmacêutica e o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 27, n. 1, p. 118–123. 2008.
- HAENSCH, S.; BIANUCCI, R.; SIGNOLI, M.; RAJERISON, M.; SCHULTZ, M.; KACKI, S.; VERMUNT, M.; WESTON, D. A.; HURST, D.; ACHTMAN, M.; CARNIEL, E.; BRAMANTI, B.; Distinct clones of *Yersinia pestis* caused the black death. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, e1001134, 2010.
- HANLON, G.W. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. **Int J Antimicrob Agents**. v.30, n.2, p.118-28. Aug 2007.
- KALATZIS, P.G.; BASTÍAS, R.; KOKKARI, C.; KATHARIOS, P. Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages,  $\phi$ St2 and  $\phi$ Grn1; Phage Therapy Application for Biological Control of *Vibrio alginolyticus* in Aquaculture Live Feeds. **PLoS One**. v.11, n.3, e0151101. Mar 2016.
- KARWEHL, S.; STADLER, M.; Exploitation of fungal biodiversity for discovery of novel antibiotics. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 398, p. 303-338, 2016.
- KASMAR, A. G.; HOOPER, D. Farmacologia das infecções bacterianas: síntese da parede celular. In: GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica e da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (Ed.), 2009. p. 562 – 578.
- KIM, S. G.; JUN, J.W; GIRI, S. S.; YUN, S.; KIM, H. J.; CHI, C.; KIM, S. W.; PARK,S.C.Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Bacteriophage p Sa-3. **Genome announcements**, v. 5, n. 21, e00182-17, May 2017.
- KING, L.A.; LOUKIADIS, E.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; HAEGHEBAERT, S.; WEILL, F.X.; BALIERE, C.; GANET, S.; GOUALI, M.; VAILLANT, V.; PIHIER, N.; CALLON, H.; NOVO, R.; GAILLOT, O.; THEVENOT-SERGEANT, D.; BINGEN, E.; CHAUD, P.; DE VALK, H. Foodborne transmission of sorbitolfermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: Na outbreak in northern France, 2011. **Clin Microbiol Infect**. v.20, p.O1136–O1144. Dec 2014.

- KOOL, J. L. Risk of person-to-person transmission of pneumonic plague. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 8, p. 1166-1172, 2005.
- KOONIN, E.V.; SENKEVICH, T.G.; DOLJA, V.V. The ancient Virus World and evolution of cells. **Biol Direct**. v.1, p.29. Sep 2006.
- KOSKELLA, B.; MEADEN, S. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. **Viruses**. v.5, n.3, p. 806-823. Mar 2013.
- KUTTER, E. M. **Bacteriophage therapy: past and present**. Encyclopedia of Microbiology. Oxford: Elsevier, 2009. p. 258-66.
- KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. **Bacteriophages: Biology and Application**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 400 p.
- LETELLIER, L.; BOULANGER, P.; PLANÇON, L.; JACQUOT, P.; SANTAMARIA, M. Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. **Front Biosci**. v.9, p.1228-339. May 2004.
- LOBA, A.F.F.R. Fagoterapia como alternativa ao uso de antibióticos convencionais. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.
- MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, n. 3, p. 268–281. Mar 2012.
- MAURICE, C.F.; BOUVIER, T.; COMTE, J.; GUILLEMETTE, F.; DEL GIORGIO, P.A. Seasonal variations of phage life strategies and bacterial physiological states in three northern temperate lakes. **Environ Microbiol**. v.12, n.3, p.628-41. Mar 2010.
- MILLER, S.L. A production of amino acids under possible primitive earth conditions. **Science**. v.117, n.3046, p.528-9. May 1953.
- MOHR, K. I. History of antibiotics research. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 398, p. 237-272, 2016.
- MONEY, P.; KELLY, A.F.; GOULD, S.W.; DENHOLM-PRICE, J.; THRELFALL, E.J.; FIELDER, M.D. Cattle, weather and water: mapping Escherichia coli O157:H7 infections in humans in England and Scotland. **Environ Microbiol**. v.12, n.10, p.2633-44. Oct 2010.
- O'NEILL, J. Tackling a crisis for the health and wealth of nations. London: Review on Antimicrobial Resistance; 2014.
- Oparin A. I. 1924 Proiskhozhdenie zhizny (The origin of life, Ann. Synge. Trans.) In The origin of life (ed. J. D. Bernal), Weidenfeld and Nicholson, London.
- ORLOVA, E. V. **“Bacteriophage and Their Structural Organisation”** in Bacteriophages, I. Kurtboke, Ed. 2012.
- PEDRÓS-ALIÓ, C. The rare bacterial biosphere. **Annual review of marine Science**, v. 4, p. 449-466, 2012.

PERRY, J. J.; STALEY, J. T.; LORY, S. **Microbial Life**. 1<sup>a</sup> Ed. Sinauer Associates Inc, 2002. 800 p.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 3, p. 440–458. Jul 2007.

RAKHUBA, D.V.; KOLOMIETS, E.I.; DEY, E.S.; NOVIK, G.I. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. **Pol J Microbiol**. v.59, n.3, p.145-55. 2010.

REINERT, R. R.; LOW, D. E.; ROSSI, F.; ZHANG, X.; WATTAL, C.; DOWZICKY, M. J. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, n. 5, p. 1018–1029. Nov 2007.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin Infect Dis**. v.52, n.9, p.1138-43. May 2011.

SCHOOLNIK, G.K.; SUMMERS, W.C.; WATSON, J.D. Phage offer a real alternative. **Nat Biotechnol**. v.22, n.5, p.505-6. May 2004.

SFACIOTTE, R. A. P.; VIGNOTO, V. K. C.; WOSIACKI, S. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**. v. 1, n. 1, p. 29–38. 2014.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.

SINGH, A.; WEINBERGER, L.S. Stochastic gene expression as a molecular switch for viral latency. **Curr Opin Microbiol**. v.12, n.4, p.460-6. Aug 2009.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J.G. Bacteriophage therapy. **Antimicrob Agents Chemother**. v.45,n.3,p.649-59. 2001.

SUMMERS, W. C. Bacteriophage therapy. **Annual review of microbiology**, v. 55, p. 437-451, 2001.

SUMMERS, W.C. The strange history of phage therapy. **Bacteriophage**. v.2, n.2,p.130-133. Apr 2012.

SUSSKIND, M.M.; BOTSTEIN, D. Mechanism of action of Salmonella phage P22 antirepressor. **J Mol Biol**. v.98, n.2, p.413-424. Oct 1975.

TERAJIMA, J.; IYODA, S.; OHNISHI, M.; WATANABE, H. Shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli in Japan. **Microbiol Spectr**. v.2, n.5, p.1–9. Oct 2014.

TINOCO, J. M.; LISS, N.; ZHANG, H.; NISSAN, R.; GORDON, W.; TINOCO, E.; SASSONE, L.; STEVENS, R. Antibacterial effect of genetically-engineered bacteriophage  $\phi$ Ef11/ $\phi$ FL1C( $\Delta$ 36)PnisA on dentin infected with antibiotic-resistant Enterococcus faecalis. **Archives of oral biology**. v. 82, p. 166-170. 2017.

TIRARD, S. J. B. S. Haldane and the origin of life. **J Genet**. v.96, n.5, p.735-739. Nov 2017.

TWORT, F. W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. **The Lancet**, v. 186, n. 4814, p. 1241-1243, 1915.

VILLARREAL , L.P. **Viruses and the Evolution of Life** . Washington DC : ASM Press . 2005.

WANG, L.; QU, K.; LI, X.; CAO, Z.; WANG, X.; LI, Z.; SONG, Y.; XU, Y. Use of Bacteriophages to Control Escherichia coli O157:H7 in Domestic Ruminants, Meat Products, and Fruits and Vegetables. **Foodborne Pathog Dis.** v.14, n.9, p.483-493. Sep 2017.

WEITZ, J.S.; POISOT, T.; MEYER, JR.; FLORES, C.O.; VALVERDE, S.; SULLIVAN, M.B.; HOCHBERG, M.E. Phage-bacteria infection networks. **Trends Microbiol.** v.21, n.2, p.82-91. Feb 2013.

WOMMACK, E. K. et al. **Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1 Isolation, Characterization, and Interactions.** CLOKIE, M R. J., KROPINSKI, A (Eds.). v.501, n.1, Humana Press. 2009.

World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. (WHO, 2014).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 ARTIGO**

Os resultados e discussão, juntamente com a metodologia necessária ao desenvolvimento deste trabalho de mestrado, foram apresentados na forma de artigo, seguindo as normas de formatação da revista para qual será submetido (com modificações para se adequar ao presente manuscrito).

1 ARTIGO

**An alternative against ESBL-producing, KPC-producing  
*Escherichia coli* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype  
O157:H7**

Ribeiro, J.M.<sup>1</sup>; Nicolete, G.<sup>1</sup>; Nishio, E.K.<sup>1</sup>; Kobayashi, R.K.T.<sup>1</sup>; Nakazato, G.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, CP 6001.

**\*Corresponding author:** Gerson Nakazato, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP 86055-990, Londrina, PR, Brazil, Phone: +55(43) 3371-4396, Fax: +55 (43) 3371-4788, e-mail: gnakazato@uel.br.

## ABSTRACT

One of the most important multidrug-resistant bacteria are extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing (ESBL) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) bacteria, especially *Escherichia coli*, which leads to an increase in the mortality associated with resulting infections. In this study we isolated a bacteriophage named ph\_EcoP-phJ96 from chicken litter samples. Transmission electron microscopy showed that phJ96 had the similar morphology as those of the *Podoviridae* family. Initially, phJ96 was able to infect 11 out of 24 *E. coli* strains with a lytic activity of 45%. After bacteriophage adaptation, its lytic activity was increased from 45% to 58% with just one adaptation series. Growth curve showed phJ96's behavior in contact with its host strain at different multiplicities of infection. Besides that, this method also showed that for two EHEC O157:H7 strains, multiplicity of infection of 10 could inhibit bacterial growth for 10 hours. The potential use of this bacteriophage together with other alternative substances or as a part of a phage cocktail represent a possible therapeutic strategy against ESBL-producing *E. coli*, in view of the continuing increase of antimicrobial resistance worldwide.

**Keywords:** Bacteriophage adaptation, multidrug-resistance, urinary tract infection.

## INTRODUCTION

Antimicrobial resistance in bacterial pathogens is reaching alarming levels each year and the rapid global spread has been a growing threat to world public health. Therefore the World Health Organization (WHO) are incentivizing researchers to develop and find alternatives urgently to combat this bacterial pathogens.<sup>1,2</sup>

One of the most important and emergent multidrug-resistant bacteria is extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing (ESBL) bacteria, especially *Escherichia coli*, that leads to an increase in the mortality associated with resulting infections.<sup>3</sup> Another important group of *E. coli* is Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) that is responsible for numerous outbreaks and sporadic cases of severe hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic uremic syndrome (HUS), major attributed to the serotype O157:H7.<sup>4, 5</sup> Front of this problem, the search for new antimicrobial strategies is of high importance, replacing the conventional antibiotic therapy.

Discovered in 1917 by Felix d'Herelle, currently, bacteriophage (phage) therapy is a registered medicine and very used in Eastern Europe countries like Georgia, Armenia, Ukraine and Russia, and has great results that are well accepted by physicians and patients.<sup>6</sup> Several studies in the past focus on the treatment of bacterial infections with bacteriophages, targeting purulent infections,<sup>7, 8</sup> methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections,<sup>9, 10</sup> burns,<sup>11-13</sup> respiratory tract infections,<sup>7, 8, 14-16</sup> sepsis,<sup>7, 17</sup> and urogenital tract infections.<sup>18-21</sup> Abedon et al., reviewed in detail the bacteriophage treatment of human infections, reporting the historically use of bacteriophages.<sup>22</sup>

As a potential alternative against bacterial infections, phage therapy still has some obstacles: phages must be strictly virulent; the resistance to infection by a phage may

typically involve a mutation in bacterial surface antigen for phage adhesion, however, phages will themselves be under evolutionary selection to overcome the new resistance, what doesn't happen to antibiotics;<sup>23</sup> when administered intravenously, the decay half-life is between 2 and 4 minutes, i.e., within 10 minutes more than 90% of the circulating viruses are eliminated, primarily by the Kupffer cells in the liver; due to the larger size of the bacteriophage when compared to small molecules like antibiotics, the diffusion constant is much smaller, whereby the antibiotics will act on the bacterium almost instantaneously whereas the bacteriophage can take hours;<sup>24</sup> and the narrow lytic range against bacterial strains.

To overcome some of these obstacles a strategy of adaptation of phages can be employed together with isolation of new bacteriophages.<sup>6, 25</sup> Here we report a newly isolated bacteriophage named ph\_EcoP-*phJ96* within the *Podoviridae* family against ESBL-producing and KPC-producing *E. coli* clinical isolates and two strains of EHEC O157:H7.

## RESULTS

### Isolation and preliminary characterization

Bacteriophage ph\_EcoP-*phJ96* or just *phJ96* was isolated from poultry litter samples at State University of Londrina, Brazil, and was capable to infect initially 11 out of the 24 *E. coli* strains tested (Table 1). The antibiotics resistance profile is shown in Table 2 for 11 *E. coli* clinical strains and in Table 3 for 6 *E. coli* strains. Upon infecting its original host strain *E. coli* J96 and with artificial selection based on plaque visible time, clarity or turbidity and diameter, clear plaques of 3-4 mm in diameter were formed. In the control isolation test, no plaque or inhibition appeared.

The highest progeny of *phJ96* in 4 h was at MOI 0.01, reaching at  $4.43 \times 10^9$  PFU mL<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>. This MOI was used in other steps in order to maximize the number of virions.

## **Analysis and Adaptation of Host Range**

The lytic activity of *phJ96* on the 24 *E. coli* strains was initially of 45% where Confluent Lysis (CL) appeared in 3 strains, including strain 8624 (EHEC O157:H7), strain 6824 and the host strain *E. coli* J96. Semi-confluent Lysis (SCL) was formed in 8 strains, including strain EDL 933 (EHEC O157:H7) and KPC and ESBL-producing clinical strains. There were 14 *E. coli* strains resistant to *phJ96* in a preliminary spot test.

However, after the adaptation with just one passage, the lytic activity increased to 56%. For two clinical strains and one from American Type Culture Collection (ATCC), semi-confluent lysis appeared. Therefore, these 3 strains that *phJ96* was unable to infect became sensitive by means of selection of mutants-*phJ96* (*m-phJ96*). In control, no lysis or inhibition were visible. An example of confluent and semi-confluent lysis is shown in Figure 1. In addition, apparently, there is no correlation between antibiotic and bacteriophage susceptibility/resistance.

## **Evaluation of growth kinetics of host strain**

To evaluate the growth kinetics of host strain in contact with bacteriophage *phJ96*, a spectrophotometry method was performed. Firstly, a growth curve was performed for the host strain *E. coli* J96 to understand indirectly the behavior of *phJ96* (Figure 2). In the first 90 min there is no visual difference in bacterial growth between control (only bacteria) and the tests (MOIs). After 100 min, the MOIs of 10 and 1 maintain the absorbance in the same range as the beginning, while the control and other MOIs' absorbance start to increase. MOIs of 10 and 1 maintains the same range of absorbance all the 300 min, which means that the phage was able to control the bacterial growth for 300 min.

Between 125 and 225 min a series of events occurred in the MOIs 0.1 to 0.0001. For MOI 0.1 a slight growth occurred for 25 min (between 120 and 125 min) but then there was a

decrease in bacterial population, reaching the initial levels at 175 min. The same event occur for MOI 0.01 but in this case the growth occurred for 50 min and then decreased for more 50 min, reaching at 300 min a value similar to MOI 0.1.

The absorbance for MOI 0.001 reached a greater value than MOIs already presented. Bacterial growth occurred until 180 min then decreased for about 50 min and stabilized in 230 min. Although the bacterial population has decreased, the absorbance value in 300 min did not reached the initial values. Bacterial growth for MOI 0.0001 was indistinguishable of control until 210 min, where suddenly there was a decrease in absorbance for about 50 min and stabilized at 0.22 absorbance value. The control curve had an expected behavior, presenting the lag and log phase, reaching the highest absorbance levels at 300 min.

### **Evaluation of growth kinetics of EHEC O157:H7 strains**

The growth kinetics of EHEC O157:H7 strains EDL 933 and 8624 was similar (Figure 3). In both bacteria, MOI 10 had the best result. For EDL 933 strain (Figure 3B), *phJ96* at MOI 10 controlled the bacterial growth for about 700 min (11.6 h), while that for 8624 strain (Figure 3A) the increase in absorbance starts in 600 min (10 h). After 700 min, EDL 933's growth was slow, reaching an absorbance value at 1080 min (18 h) far below the next MOI. For 8624, after 600 min, the growth recovery was faster, reaching absorbance values greater than EDL 933 at 18 hours.

For both bacteria, MOI ranging from 1 to 0.00001 didn't show much visual differences. MOIs of 1 to 0.001 slowed down the growth of EDL 933 in 200 min, but it recovered growth approximately 120 min after. The same occurred for 8624 but in the MOIs of 1 to 0.0001. MOI of 0.0001 and 0.00001 did not show significant visual difference when compared to control for EDL 933 while for 8624 the growth was indistinguishable until 300 min, but then slowed down at MOI 0.00001 up to 18 h.

### **Transmission electron microscopy of *phJ96***

The analysis of the TEM micrographs (Figure 4) showed that *phJ96* has morphological features typical of the members of the *Podoviridae* family, characterized by a head of icosahedral symmetry with a diameter of approximately 30 nm and a short and noncontractile tail of approximately 16 nm (Figure 4B).<sup>26</sup> Bacteriophage  $\lambda$  was submitted to the same conditions of TEM that *phJ96* and is shown as a comparative morphological factor, once  $\lambda$  is from *Siphoviridae* family, characterized for long and noncontractile tail (Figure 4A).

### **DISCUSSION**

Antimicrobials resistance crisis is a public health problem in worldwide and this is not a surprise because even Alexander Fleming reported that bacteria could develop resistance to antibiotics. In addition, this indeed happened few years after the large application of antibiotics to population. Although, actually this problem is reaching alarming levels that World Health Organization is calling the scientific community to urgently develop alternatives to combat multidrug-resistant bacteria.<sup>2</sup> If nothing is done until 2050, is estimated that antimicrobial resistance could cause 10 million deaths a year.<sup>27</sup>

It is not new that bacteriophages could be an alternative against bacterial infections<sup>22</sup>, since it was discovered a century ago. Because of that, this possibility is resurging more real each year, especially in Western Medicine.<sup>28</sup> In response to WHO, many works are being published with newly isolated bacteriophages and strategies targeting different bacteria and as an alternative treatment for infections.<sup>29-32</sup>

In this way, here we report the isolation of a new bacteriophage targeting ESBL-producing *E. coli*, KPC-producing *E. coli* and EHEC O157:H7. Bacteriophage was named

based in previous suggestion<sup>33</sup> with modifications as ph\_EcoP-*phJ96*. This bacteriophage belongs to *Podoviridae* family (Figure 4) and its host strain is *E. coli* J96.

The spot test demonstrated different results in bacteriophage-bacterium interactions (Table 1). These interactions were classified as CL and SCL for positive results but with different degree of effectiveness, and R for negative results. Initially, for *E. coli* J96, 8624 (EHEC O157:H7) and 6824 (clinical strain) a CL were formed, indicating that this interaction was the most effective. These bacteria have a great clinical importance because J96 was isolated from a human pyelonephritis patient and has virulence factors like adhesins (*pap*, *prs*, *foc*, and *fim* genes), alpha-hemolysins (*hly* gene) and the cytotoxic necrotizing factor;<sup>34</sup> EHEC O157:H7 produce and release a potent Shiga toxin that induces cell death in endothelial cells, primarily in the urinary tract;<sup>35</sup> and 6824 is a KPC-producing *E. coli*.

The SCL morphology for 8 strains reflect less lytic activity, although it is a positive result. Initially, from 24 *E. coli* strains tested 13 were resistant, resulting in a lytic activity of 45%. This difference in activity could be partially by less affinity for the bacterial receptor, cell-surface modifications that inhibit phage entry,<sup>36</sup> abortive infection mechanisms leading to cell death after phage infection,<sup>37</sup> and intracellular mechanisms like restriction-modification or CRISPR-Cas system.<sup>38, 39</sup> Besides that, taking into account the affinity for the bacterial receptor, spot test have an important factor that could also explain differences on degree of lysis. Lysis from without, a mechanism that happens when an overload of phages simultaneously infects a bacterium leading to lysis, could explain the very clear spots.

Furthermore, in this study, based on the note of d'Herelle<sup>25</sup> we performed an adaptation test, in order to expand the host range of *phJ96*. With just one series of adaptation, 3 *E. coli* strains that was classified as R, presented a SCL spot morphology. This strategy is based on the mutation rate that occurs when *phJ96* infects it host and then could increase the

affinity to resistant strains' receptor or overcome intracellular defense mechanisms. After the adaptation, the lytic activity was increased from 45% to 58%, that is, an increase in 13% with just one series of adaptation. Antagonistic substances like bacteriocins or others was discarded because no lytic activity was presented in solution extracted from suspension containing the bacterial cultures of choice with low or no susceptibility to *phJ96* and the host bacterium *E. coli* J96.

Regarding resistance that 10 *E. coli* strains have to *phJ96*, a new study demonstrated that bacteria could naturally produce molecules that insert into DNA and are able to block phage replication.<sup>40</sup> Therefore, the resistance of this 10 strains could be due to the production of similar molecules. In this case further studies will be developed to investigate this possibility and how it can be overcome.

Another method to analyze the interaction of bacteria and bacteriophage generated interesting results. A growth curve based on the absorbance presented the kinetic of growth of bacteria in the presence of different MOIs of *phJ96*. Figure 2 demonstrates that for host strain, *phJ96* have an expected behavior. The lower the MOI, the longer the Increasing Period (IP), i.e., the period that the rate of multiplication of bacteria is higher than the rate of lysis.

It is important to highlight that in 100 min the bacteriophage was able to attach, translocate the nucleic acid into bacterial cytoplasm and take control of bacterial machinery, because in 100 min, the absorbance of control and MOIs from 0.1 to 0.0001 start to increase while the absorbance of MOI 1 and 10 stay the same. This can be explained by the fact that as the proportion of these lasts are 1:1 and 10:1, in theory, there is no bacteria uninfected, and thus the bacterial multiplication is not significant to increase the absorbance value.

The duration of the Decreasing Period (DP) after the Stationary Point (SP), i.e., the point where the rate of multiplication of bacteria is equal to the rate of lysis, for all the MOIs

that bacteria could increase the absorbance value, were of 50 min. Therefore, this could be a feature of *phJ96*.

As presented in Figure 3, *phJ96* at MOI 10 was able to control the growth of EHEC strains. For EDL 933, bacteriophage controlled the bacterial growth for 700 min (11.6 h) while for 8624 the bacterial growth starts at 600 min (10 h). These values represent a great interval for a new dose of phages.

Combining phage therapy with other alternatives like honey<sup>41</sup> or essential oils<sup>42</sup> could compensate for the narrow host range of *phJ96* at the current stage of investigation, and thus could be used against ESBL-producing *E. coli* and EHEC O157:H7 strains. Besides that, the combination of different phages in a cocktail could also to be a great therapeutic alternative against these bacteria.

In summary, although the disadvantages of the narrow host range, the combination with other substances and/or phages is a promising strategy to reduce pathogenic *E. coli* growth. More studies will be developed on this phage and its antibacterial activity.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains**

In this study, 11 ESBL-producing *Escherichia coli* clinical strains isolated from urine and 6 KPC *E. coli* clinical strains isolated from urine, tracheal secretion and tissue fragment, were provided from University Hospital, State University of Londrina, Brazil. One KPC and ESBL-producing *E. coli* clinical strain (strain 5616) isolated from urine provided by MSc. Erika Saeki (Scientific director of Adolfo Lutz Institute, Presidente Prudente-SP, Brazil), *E. coli* ATCC 25922, two *E. coli* strains provided by Laboratory of Basic and Applied

Bacteriology (strains number 167 and O152) and two Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotype O157:H7 (strains EDL 933 and 8624) were used to evaluate the host range of bacteriophage. *E. coli* J96 was used as host for bacteriophage isolation. All strains were stored at -80 °C in stocks containing glycerol (2.5M).

### **Bacteriophage Isolation, Propagation and Titering**

Bacteriophage *phJ96* was isolated from poultry litter samples collected in March 2017 at a fowl at State University of Londrina, Brazil. The isolation and propagation of bacteriophage was performed as described previously<sup>43</sup> and titering was performed using the agar overlay method<sup>44</sup>. As isolation control, *E. coli* J96 was grown in the same conditions but without the poultry litter samples to confirm that the isolated bacteriophage came from samples and not from host bacterium. Ten rounds of infection and picking of isolated plaques were done to obtain pure bacteriophages suspensions. Plaques were artificially selected by means of plaque visible time, clarity or turbidity and diameter (mm).

### **Concentration and Purification of Bacteriophages**

Bacteriophage *phJ96* was concentrated by NaCl/PEG 8000 precipitation<sup>45</sup>. Purification was performed according to the same authors with modifications. Briefly, 3 mL of concentrated phage suspension was centrifuged at 110,000 x g for 2 h then the supernatant was discarded and the “glassy pellet” was resuspended in SM buffer (50 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.5) for further studies.

### **Determination of Host Range**

The activity of *phJ96* against different clones of *Escherichia coli* was performed by using a spot test method<sup>6</sup> with modifications. In this method, bacterial cultures were grown in Luria-Bertani broth (LB) (Difco®, USA) for 18-24 h at 37 °C to reach a concentration of 10<sup>9</sup>

Colony Forming Units (CFU)  $\text{mL}^{-1}$  and were diluted 10 fold (final concentration of  $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) in the same media. Then, 100  $\mu\text{L}$  of the diluted culture was added to a conical tube (50 mL) containing 4 mL of soft agar (0.7% LB agar), previously melted and cooled to 48-50 °C. This mixture was carefully agitated and poured on the top of a solidified LB agar (1.5-2 % agar). After solidification time (10 minutes), 10  $\mu\text{L}$  of *phJ96* suspension with a dilution of  $10^7$  Plaque Forming Units (PFU)  $\text{mL}^{-1}$  was placed on the top of the soft agar and the plates were let to dry for 20-30 minutes and then incubated for 18-24 h at 37 °C. The results were visually evaluated by differing the clear zones by their intensity and structure. The positive results were classified as “CL” (Confluent Lysis), when a clear zone was formed on the bacterial lawn and “SCL” (Semi-Confluent Lysis), when a not fully cleared zone was formed. The negative results were classified as “R” (Resistant), when no lysis was formed.

### **Adaptation of bacteriophage *phJ96***

The adaptation of *phJ96* aims at the expansion of lytic activity by selection of mutant bacteriophages (*m-phJ96*). This procedure is based on the note of d’Herelle<sup>25</sup> with modifications. Bacteriophage was propagated in a suspension containing the bacterial cultures of choice with low or no susceptibility to *phJ96* and the host bacterium *E. coli* J96. As control, a suspension without *phJ96* containing the bacterial culture of choice and the host bacterium *E. coli* J96 was used. Both mixtures were submitted to isolation and titrating processes.

### **Evaluation of phage-bacterium growth kinetics**

To evaluate the bacteria kinetics of growth of a suspension containing bacteria and bacteriophages, a spectrophotometry method was performed. Bacterial strain of choice was suspended in saline and adjusted to 0.5 on the McFarland scale, which corresponds to  $1.5 \times 10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . These suspensions were plated in 96-well plates at a concentration of  $1.5 \times 10^7$

CFU mL<sup>-1</sup> containing LB broth. Different concentrations of *phJ96* suspension were added to each well, resulting in different multiplicity of infection (MOI) rates from 10 to 10<sup>-5</sup>, with 10-fold decreasing intervals. The plates were incubated at 37 °C for 18 h, and then optical density values at 595 nm were determined at 15 min intervals using a Bio-Rad Microplate Reader (model 3550).

### **Determination of Multiplicity of Infection (MOI)**

Bacteriophage stocks were serially diluted (10-fold) by SM buffer. Aliquots of each dilution were added to the host strain culture at 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, resulting in different MOI, ranging from 10 to 10<sup>-5</sup>. These mixtures were incubated for 4 h at 37 °C. Each mixture was titrated to determine the highest production as the optimal MOI.<sup>45</sup>

### **Scanning Electron Microscopy (SEM)**

Previously purified bacteriophage suspensions were processed by standard negative/positive stain<sup>26</sup>, and observed by a Jeol JEM 1400 scanning electron microscopy to analyze the bacteriophage morphology. Briefly, 5 µL of the concentrated phage suspension was deposited on a carbon-coated grid and allowed to absorb for 1 min and then stained with 2% uranyl acetate (pH 4-4.5). After 1 min more, the liquid was drained off with filter paper. The grid dries instantly and is ready for examination. Bacteriophage λ was used as control.

## **REFERENCES**

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. (WHO, 2014).
2. Collignon, P.J. et al. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management

- strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Clin. Infect. Dis.* **63**, 1087–1093 (2016).
- 3 - Sharaha, U. et al. Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Using Infrared Microscopy and Machine-Learning Algorithms. *Anal. Chem.* **91**, 2525-2530 (2019).
  - 4 - Gomes T.A. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol.* **47**, 3-30 (2016).
  - 5 - Kaper, J.B., O'Brien, A.D. Overview and Historical Perspectives. *Microbiol. Spectr.* **2**, 28; 10.1128/microbiolspec.EHEC-0028 (2014).
  - 6 - Sybesma, W. et al. Bacteriophages as Potential Treatment for Urinary Tract Infections. *Front. Microbiol.* **7**, 465; 10.3389/fmicb.2016.00465 (2016).
  - 7 - Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., Górski, A. Bacteriophage therapy for infections in cancer patients. *Clin. Appl. Immun. Rev.* **1**, 131-134 (2001).
  - 8 - Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., Kucharewicz-Krukowska, A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **35**, 569-583 (1987).
  - 9 - Slopek, S., Kucharewicz-Krukowska, A., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. VI. Analysis of treatment of suppurative staphylococcal infections. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **33**, 261-273 (1985).
  - 10 - Slopek, S., Kucharewicz-Krukowska, A., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. V. Evaluation of the results obtained in children. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **33**, 241-259 (1985).

- 11 - Soothill, J.S. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns*. **20**, 209-211 (1994).
- 12 - Abul-Hassan, H.S., El-Tahan k Massoud, B., Gomaa, R. Bacteriophage therapy of *Pseudomonas* burn wound sepsis. *Annals MBC*. **3**, (1990).
- 13 - Merabishvili, M. et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS ONE*. **4**, 4944; 10.1371/journal.pone.0004944 (2009).
- 14 - Debarbieux, L. et al. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J. Infect. Dis.* **201**, 1096- 1104 (2010).
- 15 - Carmody, L.A. et al. Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *J. Infect. Dis.* **201**, 264-271 (2010).
- 16 - Golshahi, L., Seed, K.D., Dennis, J.J., Finlay, W.H. Toward modern inhalational bacteriophage therapy: nebulization of bacteriophages of *Burkholderia cepacia* complex. *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug. Deliv.* **21**, 351-360 (2008).
- 17 - Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., Gorski, A. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplant. Proc.* **35**, 1385-1386 (2003).
- 18 - Eaton, M.D., Bayne-Jones, S. Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections (I). *J. Am. Med. Assoc.* **103**, 1769-1776 (1934).
- 19 - Eaton, M.D., Bayne-Jones, S. Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections (II). *J. Am. Med. Assoc.* **103**, 1847-1853 (1934).

- 20 - Eaton, M.D., Bayne-Jones, S. Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections (III). *J. Am. Med. Assoc.* **103**, 1934-1939 (1934).
- 21 - Letkiewicz, S., Miedzybrodzki, R., Fortuna, W., Weber-Dabrowska, B., Gorski, A. Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis—case report. *Folia. Microbiol.* **54**, 457-461 (2009).
- 22 - Abedon, S.T., Kuhl, S.J., Blasdel, B.G., Kutter, E.M. Phage treatment of human infections. **1**, 66-85 (2011).
- 23 - Nilsson, A.S. Phage therapy—constraints and possibilities. *Ups. J. Med. Sci.* **119**, 192–198 (2014).
- 24 - Merril, C.R., Scholl, D., Adhya, S. *Phage therapy* (ed. Calendar, R.) 725-741 (New York: Oxford University Press, 2006).
- 25 - D'Herelle, F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res Microbiol.* **158**, 553-554 (2007).
- 26 - Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M. *Bacteriophages Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions.* 113-140 (Humana Press, 2009).
- 27 - O'Neill J. Tackling a crisis for the health and wealth of nations. London: Review on Antimicrobial Resistance; 2014.
- 28 - Brüßow, H. What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology.* **434**, 138–142 (2012).

- 29 - Green, S.I. et al. Bacteriophages from ExPEC Reservoirs Kill Pandemic Multidrug-Resistant Strains of Clonal Group ST131 in Animal Models of Bacteremia. *Sci. Rep.* **7**, 46151; 10.1038/srep46151 (2017).
- 30 - Garcia, K.C.O.D et al. Bacteriophage use to control Salmonella biofilm on surfaces present in chicken slaughterhouses. *Poult. Sci.* **96**, 3392–3398 (2017).
- 31 - Bosák, J.; Mikalová, L.; Čejková, D.; Šmarda, J.; Šmajš, D. Complete Genome Sequence of Bacteriophage SEN8, a Temperate Phage Isolated from *Salmonella enterica* subsp. *salamae*. *Genome Announc.* **5**, 239-17; 10.1128/genomeA.00239-17 (2017).
- 32 - Kim, S.G. et al. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Bacteriophage pSa-3. *Genome Announc.* **5**, 182-17; 10.1128/genomeA.00182-17 (2017).
- 33- Adriaenssens, E.; Brister, J.R. How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. *Viruses.* **9**, 70; 10.3390/v9040070 (2017).
- 34 - Klein, E.A.; Gitai, Z. Draft Genome Sequence of Uropathogenic *Escherichia coli* Strain J96. *Genome Announc.* **1**, 245-12. 10.1128/genomeA.00245-12 (2013).
- 35 - Pacheco, A.R.; Sperandio, V. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* **2**, 81 (2012).
- 36 - Cumby, N.; Edwards, A.M.; Davidson, A.R.; Maxwell, K.L. The bacteriophage HK97gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein. *J Bacteriol.* **194**, 5012–5019 (2012).
- 37 - Molineux, I. J. Host–parasite interactions: recent developments in the genetics of abortive phage infections. *New Biol.* **3**, 230–236 (1991).

- 38 - Tock, M. R., Dryden, D. T. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 466–472 (2005).
- 39 - Barrangou, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* **315**, 1709–1712 (2007).
- 40 - Kronheim, S. et al. A chemical defence against phage infection. *Nature.* **564**, 283-286 (2018).
- 41 - Nishio, E.K. et al. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Sci Rep.* **6**, 21641; 10.1038/srep21641 (2016).
- 42 - Scandorieiro, S. et al. Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Front Microbiol.* **7**, 760; 10.3389/fmicb.2016.00760 (2016).
- 43 - Jassim, S.A.A., Limoges, R.G. Bacteriophages: *Practical Applications for Nature's Biocontrol*, 2-8 (Springer Nature, 2017).
- 44 - Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., Johnson, R. P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol. Biol.* **501**, 69–76 (2009).
- 45 - Peng, F. et al. Characterization, sequencing and comparative genomic analysis of vB\_AbaM-IME-AB2, a novel lytic bacteriophage that infects multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *BMC Microbiol.* **14**, 181; 10.1186/1471-2180-14-181 (2014).

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thank you to CAPES for the scholarship. Thanks are also due to Professor Celso Nakamura for the possibility of using the Transmission Electron Microscopy.

#### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Ribeiro, J.M. designed the study. Nicolete, G. and Ribeiro, J.M. performed the experiments. Nishio, E.K. and Ribeiro, J.M. analyzed and interpreted the data. Ribeiro, J.M., Kobayashi, R.K.T. and Nakazato, G. wrote the manuscript.

#### **COMPETING FINANCIAL INTERESTS**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### **CAPTIONS**

**Table 1** - Results of spot tests on 24 *E. coli* strains using *phJ96*.

**Table 2** - Antibigram of 11 ESBL-producing *E. coli* strains isolated from the urine of patients with Urinary Tract Infections.

**Table 3** - Antibigram of 6 KPC *E. coli* strains isolated from urine, tracheal secretion and tissue fragment.

**Figure 1** – Plaque morphology of *E. coli* strains. (A) Confluent Lysis (CL) in EHEC O157:H7 strain 8624. (B) Semi-Confluent Lysis (SCL) in EHEC O157:H7 strains EDL 933. Different clear zones can be observed.

**Figure 2** – Growth curve of *E. coli* J96 (host strain) with *phJ96* for 5 hours at different Multiplicities of Infection (MOIs).

**Figure 3** – Growth curve of EHEC serotype O157:H7 strains (A) 8624 and (B) 8624 EDL 933 with *phJ96* for 18 hours at different Multiplicities of Infection (MOIs).

**Figure 4** – Transmission electron micrographs of (A) phage  $\lambda$  and (B) *phJ96* negatively stained with uranyl acetate.

TABLE 1

<i>E. coli</i> strain number	Bacterial typing	<i>phJ96</i>	
		Before adaptation	After adaptation
J96*	UPEC	CL	CL
150	ESBL	SCL	SCL
5616	ND	SCL	SCL
6824	KPC	CL	CL
8624	EHEC O157:H7	CL	CL
7069	KPC	SCL	SCL
6675	KPC	SCL	SCL
144	ESBL	SCL	SCL
EDL 933	EHEC O157:H7	SCL	SCL
192	ESBL	SCL	SCL
181	ESBL/KPC	SCL	SCL
167	ND	R	R
176	ESBL	R	R
159	ESBL	R	R
154	ESBL	R	SCL
142	ESBL	R	SCL
6729	KPC	R	R
O152	ND	R	R
ATCC 25922	ND	R	SCL
6999	KPC	R	R
162	ESBL	R	R
126	ESBL	R	R
7047	KPC	R	R
194	ESBL	R	R

Lytic activity

45%

58%

\*Host Strain; CL: Confluent Lysis; SCL: Semi-Confluent Lysis; R: Resistant; ND: Not Defined. ATCC: American Type Culture Collection

**TABLE 2**

<b><i>E. coli</i> strain</b>	<b>Antibiotic resistance profile</b>
126	AMC, FOX, CTX, CAZ, TET, CAM, GEN, NA, CIP, NOR, ENR, SXT
142	CTX, TET, NA, CIP, NOR, ENR
144	CTX, GEN, NA, CIP, NOR, ENR
150	CTX, TET, GEN, NA, CIP, NOR, ENR
154	CTX, TET, CAM, CIP, SXT
159	CTX, TET, CAM, NFT, NA, CIP, NOR, ENR, SXT
162	CTX, TET, CAM, NA, CIP, NOR, ENR, SXT
176	CTX, NA
181	AMC, FOX, CTX, CAZ, TET, CAM, NA, CIP, NOR, ENR, SXT
192	NA, CIP, NOR, ENR, SXT
194	CTX, TET, CAM, NA, CIP, NOR, ENR, SXT

AMC: Amoxicillin/Clavulanate; FOX: Cefoxitin; CTX; CAZ: Ceftazidime; TET: Tetracycline; CAM: Chloranphenicol; GEN: Gentamicin; NFT: Nitrofurantoin; NA: Nalidixic Acid; CIP: Ciprofloxacin; NOR: Norfloxacin; ENR: Enrofloxacin; SXT: Trimethoprim-Sulphamethoxazole;

**TABLE 3**

<i>E. coli</i> strain	Antibiotic resistance profile
7069	AMP, CXM, FOX, CAZ, CRO, FEP, ETP, IPM, MEM, TZP, CIP, LVX, SXT, PMB
6675	GEN, AMP, CXM, FOX, CAZ, CRO, FEP, ETP, IPM, MEM, TZP, CIP, SXT
6729	AMK, AMP, CXM, CAZ, CRO, FEP, ETP, IPM, TZP
6999	AMP, CXM, FOX, CAZ, CRO, FEP, ETP, IPM, MEM, TZP, CIP, SXT
7047	GEN, AMP, CXM, FOX, CAZ, CRO, FEP, ETP, IPM, MEM, TZP, CIP, SXT
6824	ETP, IPM, MEM

AMK: Amikacin; GEN: Gentamicin; AMP: Ampicillin; CXM: Cefuroxime; FOX: Cefoxitin; CAZ: Ceftazidime; CRO: Ceftriaxone; FEP: Cefepime; ETP: Ertapenem; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; TZP: Piperacillin/Tazobactam; CIP: Ciprofloxacin; LVX: Levofloxacin; SXT: Trimethoprim-Sulphamethoxazole; PMB: Polimixin B.

FIGURE 01

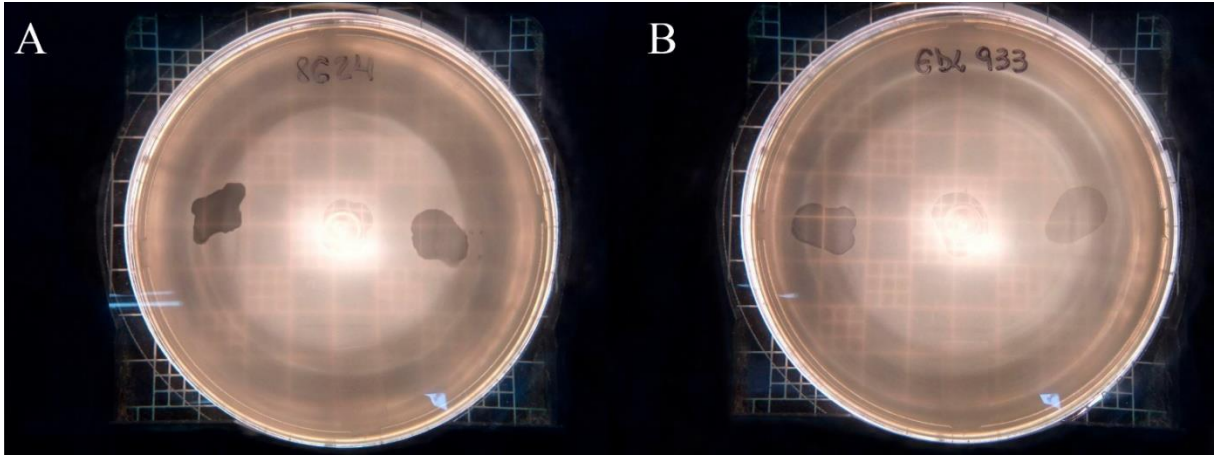


FIGURE 02

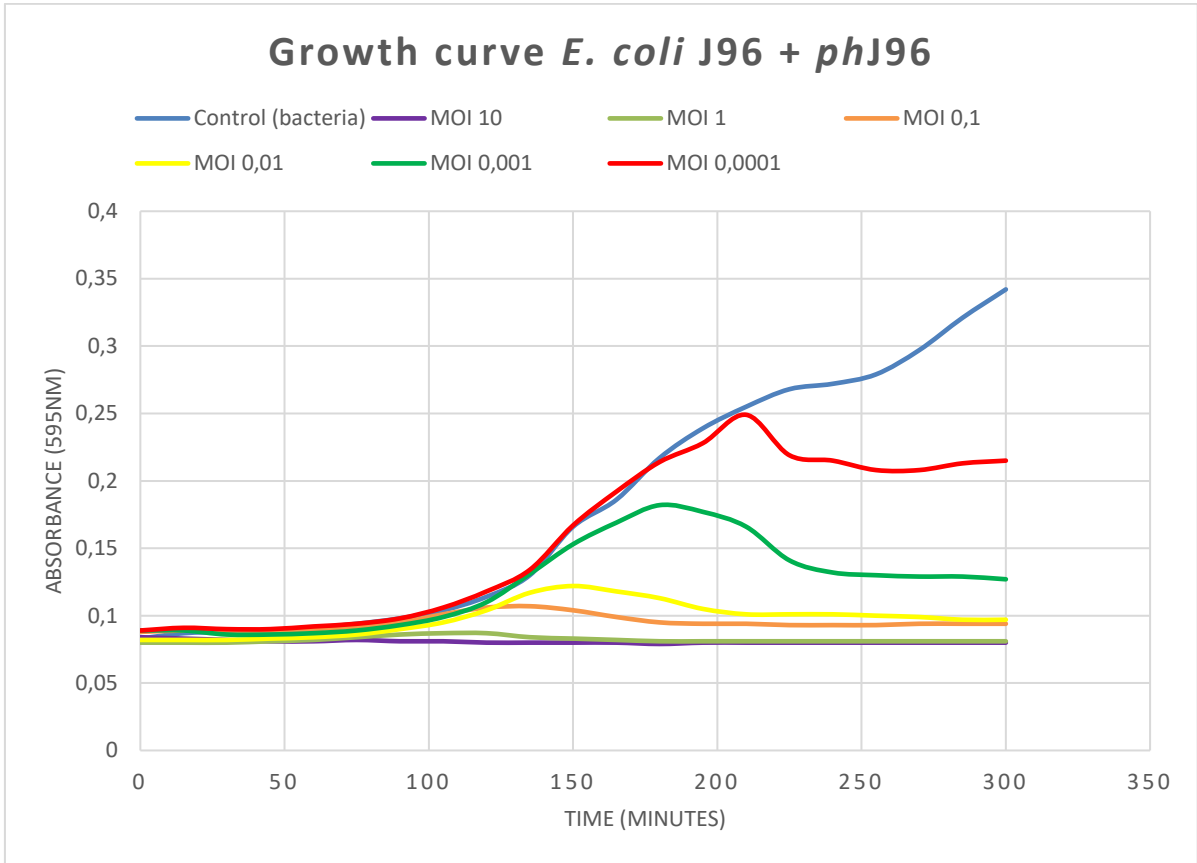
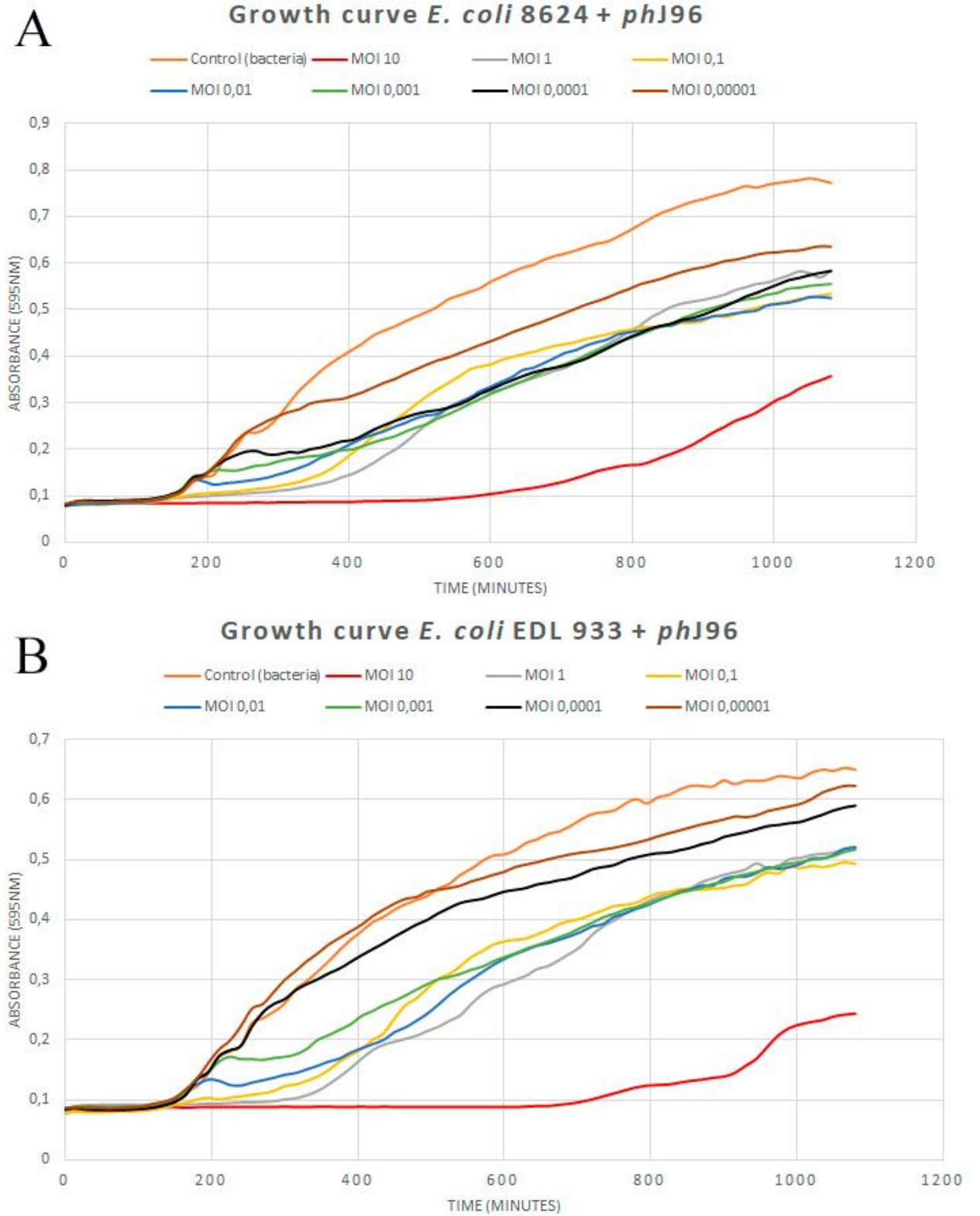
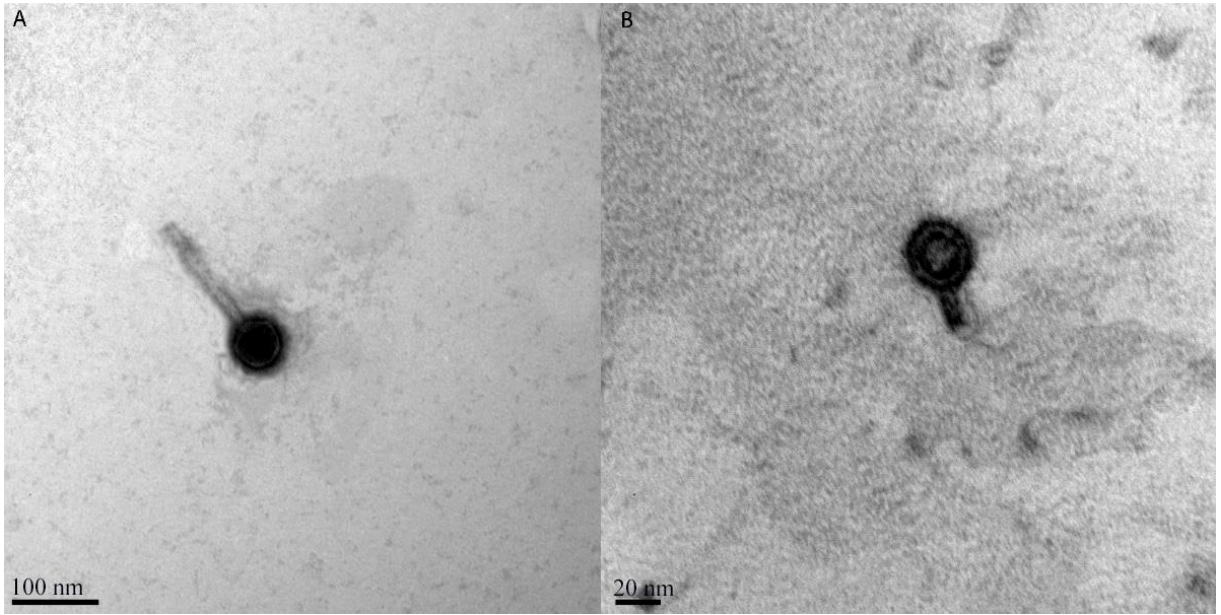


FIGURE 03



**FIGURE 04**



## 5 - CONCLUSÃO

Um novo bacteriófago foi isolado e denominado ph\_EcoP-phJ96, possuindo morfologia característica dos membros da família *Podoviridae*. Possui como microrganismo hospedeiro *Escherichia coli* J96, do qual foi isolado.

O espectro de atividade lítica desse bacteriófago engloba amostras clínicas de *E. coli* produtora de ESBL e KPC. Além disso, duas cepas importantes de EHEC sorotipo O157:H7 são infectadas e lisadas por esse vírus, como demonstrado nos testes de atividade. Ademais, através de adaptações, foi possível expandir o espectro de ação lítica de fago *phJ96*.

Novas caracterizações são necessárias para que esse bacteriófago possa ser aplicado no combate às bactérias alvo, assim como possíveis formulações com antimicrobianos naturais ou coquetéis de bacteriófagos tornam-se uma alternativa a ser estudada.