UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

VIVIANE DE CÁSSIA OLIVEIRA

**Bacteriófagos com potencial aplicabilidade em tubos endotraqueais:
avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme**

RIBEIRÃO PRETO
2021

VIVIANE DE CÁSSIA OLIVEIRA

**Bacteriófagos com potencial aplicabilidade em tubos endotraqueais:
avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme**

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Linha de pesquisa: Fundamentação teórica, metodológica e tecnológica do processo de cuidar

Orientador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

RIBEIRÃO PRETO

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Oliveira, Viviane de Cássia

Bacteriófagos com potencial aplicabilidade em tubos endotraqueais: avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme. Ribeirão Preto, 2021.

193 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

1. Bacteriófagos. 2. Biofilmes. 3. Respiração Artificial. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. Resistência a antibióticos.

OLIVEIRA, Viviane de Cássia

Bacteriófagos com potencial aplicabilidade em tubos endotraqueais: avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Aprovado em / /

Presidente

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Dedicatória

A **Deus e Nossa Senhora** por iluminar meus caminhos, dar-me forças e capacitar-me diariamente para chegar aos objetivos almejados.

Aos meus pais, **Geraldo e Albertina**, pessoas que me deram a vida, os primeiros que me amaram e me ensinaram a sonhar. Que me mostraram a importância da família, da honestidade e da persistência. Que sempre lutaram para que todos os meus sonhos fossem realizados. Que me ajudaram quando eu achava que não era mais possível.

Papai e Mamãe, saibam que cada conquista minha é também de vocês!

Ao meu amado esposo **Enio**, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo desse trabalho. Por partilhar deste sonho que se realiza e por dividir a certeza de que realizaremos todos os outros sonhos juntos.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Evandro Watanabe**, agradeço a orientação, o incansável incentivo e a oportunidade de trabalhar em sua linha de pesquisa! Seu exemplo de Mestre, Pesquisador, Profissional e Ser Humano serão lembrados com grande carinho e gratidão. Meu respeito e admiração por sua serenidade e sabedoria durante a condução deste trabalho e de todos os outros vinculados ao seu grupo de pesquisa.

À **Profa. Dra. Débora Cristina Coraça-Huber**, agradeço a carinhosa receptividade na Universidade de Innsbruck. Os momentos que tive ao seu lado me proporcionaram crescimento e amadurecimento pessoal e profissional, que levarei em cada etapa da minha vida. Sou muito grata por tudo que compartilhamos!

Às **Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos**, **Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva** e **Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza**, agradeço por todo o conhecimento compartilhado e inestimável ajuda em todos os momentos. Vocês são exemplos para mim! Agradeço a confiança, os ensinamentos e a oportunidade de sempre aprender com vocês!

À **Prof. Dra. Denise de Andrade**, agradeço por toda sua torcida e por me acolher no Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Nunca esquecerei suas palavras afetuosas de apoio e incentivo!

“Mestre e discípulo se completam, se fazem mestre e discípulo. E o discípulo é o mestre do mestre, pois o ensina a ensinar. O mestre é o discípulo do discípulo, pois aprende a compreender e a ensinar. Mestre é mestre. Silêncio e precisão absolutos. Discípulo é discípulo. Dúvidas e questionamentos. Finalmente fundidos. Aonde quer que o discípulo vá, o mestre estará junto. Gratidão incomensurável.”

Monja Coen

À **Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, representada pela diretora Profa. Dra. Maria Helena Palucci Marziale, agradeço por ter me acolhido e contribuído para minha formação profissional.

Ao **Programa de Pós Graduação em Enfermagem Fundamental** representado pela coordenadora Profa. Dra. Andrea Bernardes, agradeço a oportunidade de desenvolver este trabalho e o apoio recebido.

Ao *Laboratory for Biofilms and Implant Associated Infections – University of Innsbruck*, agradeço a oportunidade de realizar o estágio sanduíche e suporte na condução dos ensaios de microscopia eletrônica de varredura e expressão gênica.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, em todo o seu corpo de funcionários e laboratórios, agradeço o inestimável suporte técnico e científico.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, agradeço o financiamento e a oportunidade de elaboração deste trabalho (Processos 2018/09757-0, 2019/13271-9, 2020/03405-5).

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, agradeço o financiamento do presente estudo (Processo 405622/2018-0).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)**, agradeço o apoio na realização do presente trabalho.

Aos **Profa. Dra. Doris Wilflingseder, Profa. Dra. Débora Cristina Coraça-Huber, Prof. Dr. Cláudio Costa Neto, Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos e Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva**, agradeço a disponibilização do laboratório de pesquisa e equipamentos multiusuários para a condução dos ensaios referentes a este trabalho.

À minha querida amiga **Ana Paula Macedo**, agradeço o carinho, amizade e a excelência na realização dos passos técnicos e científicos, fundamentais na execução deste estudo. Muito

obrigada pelo apoio, por todos os conselhos e ajuda na interpretação dos resultados. Agradeço por tudo que aprendi com você, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim. Foi muito bom poder trabalhar com você. Muito obrigada pelo nosso convívio e laços criados nesses anos!

Aos pesquisadores **Luís Daniel Rodrigues de Melo** e **Sílvio Branco Santos**, da Universidade do Minho, Braga, Portugal, agradeço a ajuda nas análises de bioinformática e valiosas sugestões para a condução deste trabalho.

Aos técnicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, **Nilza Letícia Magalhães** e **Lucas Alexandre Ramazzotto de Faria**; da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, **Emerson de Souza Santos** e **Luciana Ambrósio**; da Universidade de Innsbruck, **Stephan Steixner**; e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **José Augusto Maulim**, agradeço os ensinamentos e a extrema habilidade técnica e científica no suporte à condução dos ensaios.

Agradeço ao **Felipe Lazarini Bim**, **Lucas Lazarini Bim**, **Pedro Castania Amadio Domingues**, **Rachel Maciel Monteiro** e demais membros do NEPECISS a amizade e o apoio na resolução das dificuldades encontradas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a toda **minha família**, à **família do Enio** (que hoje também é minha) e a todos os **meus Amigos** da Universidade de São Paulo e da Vida, por terem tornado o período do Doutorado mais leve. Obrigada pelo convívio e pelo apoio incondicional de todos vocês!

Agradeço ao **Prof. Dr. Gilberto Antonio de Oliveira** (*in memoriam*) e **Dr. Cleidson de Pádua Alves** por terem despertado a inquietação e o desejo pela investigação e pesquisa científica.

Enfim, agradeço a todos que me emprestaram uma caixa de ponteiras, um “pouquinho” de enzima, um “pouquinho” de tampão, uma parte de bancada, um pouco de corante, um artigo, um resumo, um pedacinho do seu tempo e de sua experiência. Muito obrigado por me auxiliarem a tornar esta pesquisa possível!

“Nenhuma teoria resolve todos os enigmas com os quais se confronta em um determinado momento. Nem todas as soluções já obtidas são geralmente perfeitas. Ao contrário, é exatamente a imperfeição e a suficiência de ajustes dos dados existentes que em qualquer época, definem muitos dos desafios que caracterizam a Ciência”.

(Kuhn, T.S.)

Resumo

RESUMO

OLIVEIRA, Viviane de Cássia. **Bacteriófagos com potencial aplicabilidade em tubos endotraqueais: avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme.** 2021, 193 f. Tese (Doutorado – Enfermagem Fundamental) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O objetivo deste estudo foi isolar bacteriófagos com potencial aplicabilidade no controle de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em tubos endotraqueais. Os bacteriófagos isolados foram expandidos, titulados e caracterizados quanto ao perfil genômico, morfologia, tipo de material genético, especificidade de hospedeiros, eficiência de plaqueamento, atividade lítica, curva de crescimento e estabilidade às variações de pH e temperatura. A inibição do crescimento planctônico e a atividade antibiofilme, *in vitro*, foram avaliadas contra 15 cepas de *P. aeruginosa*. A atividade antibiofilme de tubos endotraqueais revestidos com os bacteriófagos foi avaliada em um modelo de biofilme em fluxo contínuo. A influência dos bacteriófagos sobre os fatores de virulência de *P. aeruginosa* foi avaliada pela inibição da formação de biofilme, produção de piocianina e proteases extracelulares e expressão dos genes *pslA*, *lasI*, *lasB* e *phzH*. Os dados referentes a área recoberta por biofilme após o tratamento com os bacteriófagos e a atividade antibiofilme de tubos endotraqueais revestidos apresentaram distribuição não normal e foram analisados em um Modelo Linear Generalizado ($\alpha=5\%$). A influência dos bacteriófagos sobre os fatores de virulência de *P. aeruginosa* também apresentou distribuição não normal e foi analisada pelo teste de Kruskal–Wallis ($\alpha=5\%$). Todas as demais variáveis apresentaram distribuição normal e variância homogênea e foram analisadas por ANOVA ($\alpha=5\%$). Vinte e cinco bacteriófagos foram isolados a partir de amostras do esgoto doméstico. Do total, 5 bacteriófagos foram selecionados para caracterização integral e avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme. Eles foram designados como vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3, vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25. Os bacteriófagos pertencem à ordem Caudovirales, família Myoviridae, com genoma constituído por DNA dupla fita (dsDNA), variando de ~62 a ~65 kb e codificam de 65 a 89 proteínas. Os bacteriófagos produziram de 27 a 46 partículas virais após 30 minutos de incubação e foram estáveis às variações de pH e temperatura. Os bacteriófagos exibiram um amplo espectro lítico e foram capazes de infectar *P. aeruginosa*, incluindo cepas multirresistentes. Eles também reduziram o crescimento de *P. aeruginosa* na forma planctônica, e a carga microbiana e atividade metabólica quando aplicados a biofilmes associados aos tubos endotraqueais. A área recoberta por biofilme foi significativamente reduzida após a exposição de biofilmes maduros aos bacteriófagos. A aplicação *in situ* dos bacteriófagos no revestimento de tubos endotraqueais mostrou que o coquetel composto por vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_18 alterou a colonização bacteriana e o desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*, sem afetar substancialmente a atividade metabólica. Avaliando os fatores de virulência de *P. aeruginosa* foi observado que os vírus promoveram mudanças no crescimento do biofilme apenas até 8 horas de cocultivo. Também, após 8 horas de cocultivo foi observado que vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3 promoveram filamentação da morfologia bacteriana. A presença de bacteriófagos não alterou a produção de piocianina e proteases extracelulares por *P. aeruginosa*. No entanto, alterações no nível de expressão de genes relacionados a fatores de

virulência foram detectadas, principalmente, após 2 e 48 h de cocultivo. A atividade lítica no biofilme de *P. aeruginosa* formado por cepas multirresistentes indica que os bacteriófagos isolados neste estudo podem ser considerados bons candidatos para estudos terapêuticos.

Palavras chaves: 1) Bacteriófagos; 2) Biofilmes; 3) Respiração Artificial; 4) *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract

ABSTRACT

OLIVEIRA, Viviane de Cássia. **Potential applicability of bacteriophages on endotracheal tubes: evaluation of antibacterial and antibiofilm activities.** 2021, 193 f. Thesis (Doctorate – Fundamental Nursing) – College of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The objective of this study was to isolate bacteriophages and potentially apply it against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on endotracheal tube surfaces. The isolated bacteriophages were propagated, titrated, and characterized in terms of their genomic profile, viral morphology, type of genetic material, host range investigation, efficiency of plating, lytic activity, growth curve, and pH and thermal stability. The inhibition of planktonic growth and antibiofilm activity, *in vitro*, were evaluated against 15 *P. aeruginosa* strains. The antibiofilm activity of endotracheal tubes coated with bacteriophages was evaluated in a continuous flow biofilm model. The bacteriophages influence on development of virulence mechanisms on *P. aeruginosa* was evaluated by the inhibition of biofilm growth, production of pyocyanin and extracellular proteases, and expression of *pslA*, *lasI*, *lasB* and *phzH* genes. Data referring to the residual aggregated biofilm after treatment with bacteriophages and the antibiofilm activity of endotracheal tubes coated with bacteriophages showed non-normal distribution and were analyzed in a Generalized Linear Model ($\alpha=5\%$). The bacteriophage's influence on development of virulence mechanisms on *P. aeruginosa* also showed non-normal distribution and was analyzed by Kruskal–Wallis test ($\alpha=5\%$). All other data had normal distribution and homogeneous variance and were analyzed using ANOVA ($\alpha=5\%$). Twenty-five bacteriophages were isolated from domestic sewage samples. Of these, 5 bacteriophages were selected for complete characterization and evaluation of antibacterial and antibiofilm activities. They were designated as vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3, vB_PaeM_USP_18 and vB_PaeM_USP_25. All of them belong to the order Caudovirales, Myoviridae family, and they have a double-stranded DNA (dsDNA) genome ranging from ~62 kb to ~65 kb that codes from 65 to 89 proteins. The bacteriophages produced from 27 to 46 particles after 30 minutes of incubation and were pH and heat stable. Bacteriophages exhibited a broad lytic spectrum and were able to infect *P. aeruginosa*, including multidrug-resistant strains. They also reduced the growth of *P. aeruginosa* strains in planktonic form, and microbial load and metabolic activity when applied to biofilms associated with endotracheal tubes. Biofilm-coated area were significantly reduced after treatment of mature biofilms with bacteriophages. The *in situ* application of bacteriophages in endotracheal tubes revealed that the cocktail composed by vB_PaeM_USP_2 and vB_PaeM_USP_18 promoted changes in colonization and biofilm growth processes without, substantially, altering the metabolic activity. Assessing the virulence mechanisms of *P. aeruginosa* it was observed that the virus promoted changes in *P. aeruginosa* biofilm growth only up to 8 h of co-incubation. In addition, after 8 h of co-incubation, it was observed that vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 and vB_PaeM_USP_3 promoted filamentation of bacterial morphology. Bacteriophage presence did not alter both pyocyanin and protease production by *P. aeruginosa*. However, changes in the expression level of genes related to virulence factors were detected mainly after 2 and 48 h of co-culture. The lytic activity

on multidrug-resistant *P. aeruginosa* biofilm indicates that isolated bacteriophages in this study may be considered as good candidates for therapeutic studies.

Keywords: 1) Bacteriophages; 2) Biofilms; 3) Artificial respiration; 4) *Pseudomonas aeruginosa*.

Resumen

RESUMEN

OLIVEIRA, Viviane de Cássia. **Aplicabilidad potencial de los bacteriófagos en tubos endotraqueales: evaluación de las actividades antibacteriana y antibiopelícula.** 2021, 193 f. Tesis (Doctorado – Enfermería Fundamental) – Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

El objetivo de este estudio fue aislar los bacteriófagos y aplicarlos potencialmente contra biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre superficies de tubos endotraqueales. Los bacteriófagos aislados se propagaron, ajustaron y caracterizaron según su perfil genómico, morfología viral, tipo de material genético, investigación del rango de hospedador, eficiencia del enchapado, actividad lítica y curva de crecimiento en un solo paso y estabilidad base ácida y térmica. La inhibición del crecimiento planctónico y la actividad antibiopelícula *in vitro* se evaluó frente a 15 cepas de *P. aeruginosa*. La actividad antibiopelícula de los tubos endotraqueales cubiertas por bacteriófagos se evaluó en un modelo de biopelícula de flujo continuo. La influencia de los bacteriófagos en el desarrollo de mecanismos de virulencia en *P. aeruginosa* se evaluó mediante la inhibición del crecimiento de biopelículas, la producción de proteasas extracelulares, la piocianina y la expresión de genes *pslA*, *lasI*, *lasB* y *phzH*. Los datos relativos al agregado residual tras el tratamiento con bacteriófagos y la actividad de los antibióticos de los tubos endotraqueales recubiertos con bacteriófagos mostraron una distribución no normal y se analizaron en un modelo lineal generalizado ($\alpha=5\%$). La influencia del bacteriófago sobre el desarrollo de mecanismos de virulencia también mostró una distribución no normal y fue analizados mediante la prueba de Kruskal–Wallis ($\alpha=5\%$). Todos los demás datos tuvieron una distribución normal y una varianza homogénea y se analizaron con la prueba ANOVA ($\alpha=5\%$). En total, se aislaron 25 bacteriófagos de las muestras de aguas residuales domésticas. De estos, se seleccionaron 5 bacteriófagos para la caracterización y evaluación completas de las actividades antibacterianas y antibiopelículas, los cuales recibieron los nombres vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3, vB_PaeM_USP_18 y vB_PaeM_USP_25. Todos ellos pertenecen al orden Caudovirales, familia Myoviridae, debido a un genoma de ADN de doble hebra (dsDNA) que va desde ~62 kb hasta ~65 kb y codifica entre 65 a 89 proteínas. En este estudio, los bacteriófagos produjeron de 27 a 46 partículas después de 30 minutos de incubación y exhibieron un amplio espectro lítico, infectando el 69,7% de las cepas de *P. aeruginosa*, incluidas las cepas multidrogasresistentes. Adicionalmente, los bacteriófagos redujeron el crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa* en la forma planctónica y la carga microbiana y la actividad metabólica cuando se aplicaban a biopelículas asociadas con tubos endotraqueales. Asimismo, la superficie cubierta por biopelículas se redujo significativamente tras el tratamiento de biopelículas maduras con bacteriófagos. La aplicación *in situ* de bacteriófagos en tubos endotraqueales reveló que el cóctel compuesto por vB_PaeM_USP_2 y vB_PaeM_USP_18 promovió cambios en los procesos de colonización y crecimiento de biopelículas sin alterar sustancialmente la actividad metabólica. Al evaluar los mecanismos de virulencia de *P. aeruginosa* se observó que el virus promovía cambios en el crecimiento de biopelículas *P. aeruginosa* sólo hasta las 8 h de coincubación. Después de 8 h de coincubación, se observó que vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 y vB_PaeM_USP_3 desarrollaron el filamento de la morfología bacteriana.

La presencia de bacterias no alteró de manera significativa la producción de piocianina como la proteasa por *P. aeruginosa*. Sin embargo, se detectaron cambios en el nivel de expresión de los genes relacionados con factores de virulencia, principalmente después de 2 y 48 h de co-cultura. La actividad lítica sobre las biopelículas de *P. aeruginosa* multidrogorresistentes indica que los bacteriófagos aislados pueden considerarse buenos candidatos para estudios terapéuticos.

Palabras clave: 1) Bacteriófagos; 2) Biopelículas; 3) Respiración artificial; 4) *Pseudomonas aeruginosa*.

Lista de Ilustrações

Figura 1	Diagrama esquemático das etapas e metodologia utilizada no estudo	62
Figura 2	Cultivo de efluentes domésticos para isolamento de bacteriófagos	64
Figura 3	Isolamento de bacteriófagos. A) Gotejamento da suspensão sobre a camada de meio de cultura; B) Placa de lise após 24 h de cultivo; C) Coleta da placa de lise para posterior purificação	65
Figura 4	Seleção de 5 placas de lise, morfologicamente distintas para posterior propagação e purificação	66
Figura 5	Determinação do título dos bacteriófagos	67
Figura 6	Reação de PCR para avaliação da pureza do material genético	69
Figura 7	Construção das bibliotecas. A) seleção dos índices e B) normalização das bibliotecas com o uso de microesferas magnéticas	70
Figura 8	Curva de crescimento dos bacteriófagos após 30 minutos de cultivo	74
Figura 9	Espécimes de tubo endotraqueal	76
Figura 10	Remoção dos espécimes da placa de cultivo após a ação dos bacteriófagos sobre o biofilme	77
Figura 11	Avaliação da atividade respiratória após a ação dos bacteriófagos sobre o biofilme	78
Figura 12	Avaliação da taxa de biofilme aderido após a ação dos bacteriófagos. A) Indicação dos campos; B) Estimativa da intensidade de fluorescência das áreas recobertas por biofilme	80
Figura 13	Sistema de formação de biofilme em fluxo contínuo. A) Alimentação dos tubos com meio de cultura SCFM2; B) Retirada dos fragmentos para avaliação do biofilme	81
Figura 15	Quantificação da produção de piocianina	85
Figura 14	Reação de qPCR para avaliação da expressão de genes de virulência	87
Figura 16	Placas de lise dos bacteriófagos isolados da coleta 2. A) Bacteriófago_2.1; B) Bacteriófago_2.2; C) Bacteriófago_2.3; D) Bacteriófago_2.4; E) Bacteriófago_2.5	93
Figura 17	Amostras do material genético dos bacteriófagos 1 a 25 em gel de agarose, após extração	95
Figura 18	Amostras de material genético dos bacteriófagos 1 a 25 em gel de agarose, após	

	tratamento com DNase	96
Figura 19	Amplificação do gene 16S do rRNA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96
Figura 20	Comparação dos genomas dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3. A) Representação do genoma (Preto: proteínas hipotéticas; Verde: proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA; Azul: proteínas envolvidas no empacotamento e morfogênese do DNA; Vermelho: proteínas envolvidas na lise celular). A linha azul representa o conteúdo de GC (%). B) Diferenças do genoma dos bacteriófagos	98
Figura 21	Comparação dos genomas dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25. A) Representação do genoma (Preto: proteínas hipotéticas; Verde: proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA; Azul: proteínas envolvidas no empacotamento e morfogênese do DNA; Vermelho: proteínas envolvidas na lise celular). A linha azul representa o conteúdo de GC (%). B) Diferenças do genoma dos bacteriófagos	99
Figura 22	Caracterização dos bacteriófagos isolados. AI – AV) Placas de lise; BI – BV) Fotomicrografias eletrônica de transmissão após coloração com acetato de uranila (2%); CI – CV) Características morfológicas das placas de lise e dos vírus	100
Figura 23	Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a estabilidade dos bacteriófagos.....	101
Figura 24	Atividade lítica dos bacteriófagos. A) Presença de placas de lise em cultura de <i>P. aeruginosa</i> ; B) Ausência de placas de lise	102
Figura 25	Curva de crescimento dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3, vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25	104
Figura 26	Densidade óptica após 2, 4, 6, 8 e 24 horas de cultivo na presença dos bacteriófagos	107
Figura 27	Viabilidade ($\log_{10}$ UFC/cm ²) e atividade respiratória (absorbância 492 nm) de diferentes isolados de <i>P. aeruginosa</i> após o tratamento com os bacteriófagos.....	109
Figura 28	Micrografia eletrônica de varredura após tratamento do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> ATCC com os bacteriófagos. A) Controle; B) vB_PaeM_USP_1; C) vB_PaeM_USP_2; D) vB_PaeM_USP_3; E) vB_PaeM_USP_18; F) vB_PaeM_USP_25	110
Figura 29	Biofilme remanescente (μm^2) de diferentes isolados de <i>P. aeruginosa</i> após o	

	tratamento com os bacteriófagos	111
Figura 30	Imagens de microscopia de fluorescência após o tratamento do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 com os bacteriófagos. A) Controle; B) vB_PaeM_USP_1; C) vB_PaeM_USP_2; D) vB_PaeM_USP_3; E) vB_PaeM_USP_18; F) vB_PaeM_USP_25	112
Figura 31	Unidades Formadoras de Colônias – $\log_{10}$ UFC/cm ² (eixo y direita) e atividade metabólica – absorvância 492 nm (eixo y esquerda) do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 formado em tubos endotraqueais controle e revestidos com bacteriófagos	113
Figura 32	Unidades Formadoras de Colônias – $\log_{10}$ UFC/cm ² (eixo y direita) e atividade metabólica – absorvância 492 nm (eixo y esquerda) do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 2110 formado em tubos endotraqueais controle e revestidos com bacteriófagos	114
Figura 33	Unidades Formadoras de Colônias – $\log_{10}$ UFC/cm ² (eixo y direita) e atividade metabólica – absorvância 492 nm (eixo y esquerda) do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 2112 formado em tubos endotraqueais controle e revestidos com bacteriófagos	114
Figura 34	Micrografias eletrônicas de varredura representativas de tubos não revestidos (controle) e revestidos com o coquetel de bacteriófagos, após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de cultivo	116
Figura 35	Redução da formação de biofilme – $\log_{10}$ UFC/cm ² (eixo y esquerda) e presença do coquetel de bacteriófagos na superfície do tubo – UFP/cm ² (eixo y direita) após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de cultivo. A) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853; B) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 2110; C) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 2112.....	117
Figura 36	Capacidade de formação de biofilme (intensidade de fluorescência) de <i>P. aeruginosa</i> após 2 (A), 8 (B), 24 (C) e 48 h (D) de cocultivo com os bacteriófagos.....	118
Figura 37	Imagens de fluorescência do biofilme formado por <i>P. aeruginosa</i> após cocultivo com os bacteriófagos. A) vB_PaeM_USP_1; B) vB_PaeM_USP_2; C) vB_PaeM_USP_3; D) vB_PaeM_USP_18; E) vB_PaeM_USP_25; F) Controle. I) 2 h; II) 8 h; III) 24 h; IV) 48 h	119
Figura 38	Microscopia eletrônica de varredura do biofilme formado por <i>P. aeruginosa</i> após cocultivo com os bacteriófagos. A) vB_PaeM_USP_1; B) vB_PaeM_USP_2; C)	

vB_PaeM_USP_3; D) vB_PaeM_USP_18; E) vB_PaeM_USP_25; F) Controle.

I) 2 h; II) 8 h; III) 24 h; IV) 48 h 120

Figura 39 Produção de piocianina ($\mu\text{g/mL}$) por *P. aeruginosa* ATCC 27853, após 2, 8, 24 e 48 h de cocultivo com os bacteriófagos 121

Figura 40 Produção de proteases extracelulares por *P. aeruginosa* ATCC 27853, após 2, 8, 24 e 48 h de cocultivo com os bacteriófagos 122

Figura 41 Níveis de expressão dos genes *lasI* e *pslA* ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) por PCR em tempo real, da cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, após 2, 8, 24 e 48h de cocultivo com os bacteriófagos 124

Figura 42 Níveis de expressão dos genes *lasB* e *phzH* ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) por PCR em tempo real, da cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, após 2, 8, 24 e 48h de cocultivo com os bacteriófagos 125

Lista de Tabelas

Tabela 1	Sequências iniciadoras e tamanho dos fragmentos de amplificação dos genes envolvidos em <i>quorum sensing</i> e produção de elastase e piocianina 88
Tabela 2	Local de coleta e título (UFP/mL) dos 25 bacteriófagos isolados 94
Tabela 3	Concentração (ng/μL) e razão 260/280 nm do material genético dos bacteriófagos..... 95
Tabela 4	Características genômicas dos bacteriófagos isolados 99
Tabela 5	Espectro lítico dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3, vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25 103
Tabela 6	Número de <i>P. aeruginosa</i> infectadas, no tempo “zero”, tempo do <i>burst size</i> (minutos) e bacteriófagos livres no tempo de crescimento exponencial (UFP/mL) 104
Tabela 7	Eficiência de plaqueamento das 24 cepas de <i>P. aeruginosa</i> positivas para infecção com os bacteriófagos 105

Lista de Siglas e abreviaturas

ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i> .
BLAST	do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> .
BLASTP	do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool: Protein</i> .
cDNA	do inglês <i>complementary desoxiribonucleic acid</i> .
CDSs	do inglês <i>Coding sequences</i> .
DEPC	do inglês <i>Diethyl pyrocarbonate</i> .
DNA	do inglês <i>desoxiribonucleic acid</i> .
dsDNA	do inglês <i>double stranded desoxiribonucleic acid</i> .
EDTA	do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> .
EERP/USP	Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de Paulo.
EOP	do inglês <i>efficiency of plating</i> .
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos.
FASTA	Formato baseado em texto para representar tanto sequências de nucleotídeos quanto de peptídeos.
FORP/USP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
HCl	Ácido clorídrico.
IBM	do inglês <i>International Business Machines Corporation</i> .
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde.
K₂SO₄	Sulfato de potássio.
lasB	Gene relacionado à produção de elastase; do inglês <i>elastase structural</i> .
lasI	Gene relacionado à síntese de homoserina lactona; do inglês <i>Acyl-homoserine-lactone synthase</i> .
log₁₀	Função logarítmica base 10.
MgCl₂	Cloreto de magnésio.
MEV	Microscopia eletrônica de varredura.
MOI	do inglês <i>multiplicity of infection</i> .
myRAST	do inglês <i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i> .
NCBI	do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i> .

NEPECISS	Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde.
OD	do inglês <i>optical density</i> .
OMS	Organização Mundial de Saúde.
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica.
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i> .
PCR	do inglês <i>polymerase chain reaction</i> .
pH	Potencial hidrogeniônico.
<i>phzH</i>	Gene relacionado com a produção de piocianina; do inglês <i>secreted pyocyanin</i> .
<i>pslA</i>	Gene relacionado com a produção de polissacarídeos; do inglês <i>polysaccharide synthesis</i> .
PVDF	Fluoreto de polivinilideno.
PVC	Policloreto de vinila
qPCR	do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i> .
tRNAs	do inglês <i>transfer ribonucleic acid</i> .
RNA	do inglês <i>ribonucleic acid</i> .
SDS	do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i> .
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético.
SPE	Matriz de substâncias poliméricas extracelulares.
SPSS	do inglês <i>statistical package for the social sciences</i> .
ssDNA	do inglês <i>single stranded desoxiribonucleic acid</i> .
Tris-HCl	do inglês <i>Trizma hydrochloride</i> .
TSA	Ágar de cultura <i>Tryptic Soy Agar</i> .
TSBS	Meio de cultura <i>Tryptic Soy</i> semissólido.
TSB	Caldo de cultura <i>Tryptic Soy</i> .
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro de inóculo bacteriano.
UFP/mL	Unidades formadoras de placa por mililitro de inóculo viral.
XTT	Ensaio para avaliação da atividade metabólica pela redução de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida.

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução	47
2. Objetivos	57
2.1 Objetivo geral	57
2.2 Objetivos específicos	57
3. Material e Métodos	61
3.1 Tipo de estudo e local	61
3.2 PRIMEIRA ETAPA	63
3.2.1 Isolamento, propagação e purificação de bacteriófagos	63
3.2.2 Caracterização genômica dos bacteriófagos	67
3.2.2.1 Extração do material genético dos bacteriófagos	67
3.2.2.2 Caracterização do material genético dos bacteriófagos	68
3.2.2.3 Sequenciamento e análise do material genético dos bacteriófagos	69
3.2.2.4 Análises de bioinformática	71
3.2.3 Caracterização morfológica microscópica	72
3.2.4 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade dos bacteriófagos	72
3.2.5 Avaliação da especificidade de hospedeiros e atividade lítica dos bacteriófagos ...	73
3.2.6 Curva de crescimento dos bacteriófagos	73
3.2.7 Eficiência de plaqueamento	74
3.3 SEGUNDA ETAPA	74
3.3.1 Atividade antibacteriana sobre células planctônicas	74
3.3.2 Atividade antibiofilme sobre biofilmes maduros	76
3.3.2.1 Avaliação do número de unidades formadoras de colônias	77
3.3.2.2 Avaliação da atividade respiratória	78
3.3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura	78
3.3.2.4 Avaliação da taxa de biofilme remanescente após ação dos bacteriófagos ...	79
3.4 TERCEIRA ETAPA	80
3.4.1 Atividade antibiofilme de tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos	80
3.4.1.1 Avaliação do número de unidades formadoras de colônias	81
3.4.1.2 Avaliação da atividade respiratória	82
3.4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura	82

3.4.1.4 Permanência dos bacteriófagos na parede do tubo	82
3.5 QUARTA ETAPA	83
3.5.1 Influência dos bacteriófagos sobre os fatores de virulência de <i>P. aeruginosa</i> ..	83
3.5.1.1 Inibição da formação de biofilme	83
3.5.1.2 Produção de piocianina	84
3.5.1.3 Produção de proteases	85
3.5.1.4 Expressão gênica por PCR em tempo real	85
3.6 Análise dos dados	88
4. Resultados	93
4.1 PRIMEIRA ETAPA	93
4.1.1 Isolamento, propagação e purificação de bacteriófagos	93
4.1.2 Caracterização genômica dos bacteriófagos	94
4.1.3 Sequenciamento do material genético dos bacteriófagos e análises de bioinformática.....	97
4.1.4 Caracterização morfológica microscópica	98
4.1.5 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade dos bacteriófagos	100
4.1.6 Avaliação da especificidade de hospedeiros e atividade lítica dos bacteriófagos..	101
4.1.7 Curva de crescimento dos bacteriófagos	104
4.1.8 Eficiência de plaqueamento	104
4.2 SEGUNDA ETAPA	105
4.2.1 Atividade antibacteriana sobre células planctônicas	105
4.2.2 Atividade antibiofilme sobre biofilmes maduros	108
4.3 TERCEIRA ETAPA	112
4.3.1 Atividade antibiofilme de tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos.....	112
4.4 QUARTA ETAPA	117
4.4.1 Influência dos bacteriófagos sobre os fatores de virulência de <i>P. aeruginosa</i>	117
4.5 Divulgação dos resultados	126
5. Discussão	129
5.1 PRIMEIRA ETAPA	129
5.2 SEGUNDA ETAPA	132
5.3 TERCEIRA ETAPA	136
5.4 QUARTA ETAPA	140
6. Conclusão	149
7. Referências	153

Apêndices	171
Anexos	189

1. Introdução

A ciência dos biofilmes é um campo de intensa discussão no meio científico desde que essas comunidades foram descritas. Apesar de comum, a formação de biofilmes é um processo complexo que envolve várias etapas. Primeiramente é necessário que a superfície para aderência esteja condicionada pela presença de macromoléculas do fluido circulante. Havendo características favoráveis os micro-organismos realizam aderência inicial, produzem moléculas sinalizadoras, desenvolvem e produzem uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) compostas por polissacarídeos, proteínas, DNA, lipídios e água. Concomitante a essas etapas, células planctônicas podem se desprender do biofilme e colonizar outros locais (ARAÚJO; LEMOS; SIMÕES, 2012; FLEMMING et al., 2016b) reestabelecendo o ciclo. As interações sinérgicas e antagonistas entre as espécies microbianas, a adaptação a diversos ambientes e alterações fenotípicas, são fatores que influenciam a patogenicidade do biofilme, bem como seu impacto à saúde humana (PETERS et al., 2012; CHANG, 2018; LOHSE et al., 2018).

Geralmente, as infecções causadas por biofilme são persistentes e de difícil controle, e a matriz de SPE tem especial influência nesse processo, uma vez que promove coesão mecânica e diminui a exposição dos micro-organismos presentes no biofilme aos agentes antimicrobianos e outros estresses (AZEVEDO; CERCA, 2012; FLEMMING, 2016a). Ainda, a redução na cinética de crescimento das células microbianas é outro fator importante na elevada resistência aos antimicrobianos (CONLON et al., 2015).

Os biofilmes são a causa de uma ampla variedade de infecções, dentre as quais destacam-se as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) provenientes principalmente pela colonização por *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida* spp., e bactérias gram-negativas multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*, cujas terapias antimicrobianas atuais não são totalmente eficazes (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2012; BUDAYANTI et al., 2020).

O controle de biofilmes nas diferentes áreas do conhecimento tem despertado vários estudos. Há atualmente, métodos físico-químicos para remoção de biofilmes (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010; AGARWAL et al., 2014), terapia fotodinâmica antimicrobiana (SHARMA et al., 2011; FUMES et al., 2018), indução de desprendimento de biofilme (CERCA et al., 2013), degradação da matriz de SPE (GANESH et al., 2015) e os inibidores de *quorum sensing* (KALIA et al., 2015; LUO et al., 2017). Novas pesquisas com a finalidade de prevenir a formação de biofilmes são relatadas mediante o desenvolvimento de superfícies antiaderentes (GAO et al., 2011; KESEL et al., 2014;

SALWICZEK et al., 2014; BONEZ et al., 2017) e inibidores específicos da aderência bacteriana (CEGELSKI et al., 2009; PIMENTEL et al., 2014).

Dispositivos médico-hospitalares, como cateteres, válvulas cardíacas e tubos endotraqueais apresentam condições adequadas para formação de biofilmes e, consequentemente, o surgimento de infecções (FRANÇA; CERCA, 2012; PERCIVAL et al., 2015). A presença do tubo endotraqueal é considerada um fator preditivo para a ocorrência de pneumonia, devido à formação de biofilme na superfície do dispositivo (GILPEROTIN et al., 2012, SOUZA et al., 2014). Nseir et al. (2011) discutem que a etiologia da pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) está relacionada com o biofilme presente no tubo endotraqueal, o qual atua como um reservatório de micro-organismos. A PAV é a IRAS mais comum nos pacientes críticos sob cuidados intensivos, com uma alta prevalência e prognóstico negativo em virtude da presença de micro-organismos multirresistentes às principais classes de antibióticos disponíveis (SKRUPKY et al., 2012; RUSSOTTO et al., 2015).

O Consórcio Internacional de Controle de Infecção Hospitalar acompanhou 50 países no período de 2010 a 2015 e relatou que as infecções nosocomiais por *P. aeruginosa* são um problema de saúde mundial (ROSENTHAL et al., 2016). A *P. aeruginosa* é um micro-organismo encontrado em diversos ambientes. É considerado um patógeno oportunista, sendo responsável por 10 a 20% das infecções em hospitais (FAZELI et al., 2012). Ademais, *P. aeruginosa* é considerada um patógeno importante nos mecanismos de resistência a antimicrobianos, guiando, dessa forma, a alertas sobre as taxa de mortalidade envolvendo esse micro-organismo (SKARIYACHAN et al., 2018). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) solicitou o direcionamento prioritário de pesquisas para desenvolvimento de novos antimicrobianos para enfrentamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (WHO, 2017). Essa publicação visa incentivar tanto a comunidade científica quanto a indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas alternativas para combater patógenos multirresistentes.

Apesar do notório efeito das estratégias de controle dos biofilmes, existe um crescente anseio por produtos e métodos eficazes, principalmente, em relação aos micro-organismos multirresistentes e aos biofilmes maduros. O interesse no desenvolvimento de agentes antimicrobianos em superfícies de dispositivos médico-hospitalares capazes de reduzir a aderência bacteriana em tubos endotraqueais é crescente, uma vez que o uso sistêmico de antibióticos não é capaz de controlar o biofilme formado nas superfícies internas e externas do tubo (FERNÁNDEZ-BARAT et al., 2012; HAAS et al., 2014). O

revestimento ou impregnação com agentes antimicrobianos como partículas de prata e clorexidina nas paredes dos tubos endotraqueais demonstraram diminuição na formação de biofilme (BERRA et al., 2004; MILENKOVIC et al., 2014; TOKMAJI et al., 2015). No entanto, a presença de compostos químicos é implicada na resistência bacteriana (CIEPLIK et al., 2019) e frequentemente associada a potenciais riscos citotóxicos (LESSA et al., 2010; MAO et al., 2018). Dessa maneira, novas abordagens para o controle do biofilme formado por *P. aeruginosa* multirresistente em tubos endotraqueais devem ser investigadas. Uma alternativa antimicrobiana promissora, no entanto, ainda pouco discutida envolve a utilização de bacteriófagos para controle de biofilmes em dispositivos médico-hospitalares.

Há diferentes relatos a respeito da descoberta dos bacteriófagos, ou fagos. O primeiro ocorreu em 1896, quando Ernest Hankin notou a existência de atividade antimicrobiana contra *Vibrio cholerae*, nas águas dos rios Jumna e Ganges na Índia. Naquela época foi sugerido que alguma substância limitava a expansão das epidemias de cólera na região (MINGRONE, 2011). Decorrido cerca de 20 anos, o bacteriologista Frederick Twort relatou um fenômeno semelhante ao de Hankin, no qual ocorria a lise de bactérias contaminantes durante o cultivo de vírus (SULAKVELIDZE et al., 2001). Em 1917, o termo bacteriófago (vírus que infectam bactérias) foi proposto por meio das pesquisas de Félix d'Hérelle, um microbiologista do Instituto Pasteur (VAN HELVOORT, 1992).

Os bacteriófagos são considerados os micro-organismos mais simples e abundantes na Terra. Estima-se que existam cerca de 10 fagos para cada célula bacteriana. Eles são classificados com base em critérios como morfologia, tipo de ácido nucleico e modo de infecção. Os bacteriófagos são parasitas intracelulares obrigatórios, necessitando da maquinaria de biossíntese da bactéria para produzirem sua progênie. A maioria dos bacteriófagos apresenta um ciclo de vida lítico, provocando a lise e morte bacteriana após a infecção (MELO; SILLANKORVA; AZEREDO, 2012). Todos os gêneros bacterianos, incluindo as cianobactérias, arqueobactérias e micoplasmas são susceptíveis à infecção por bacteriófagos (SHARMA et al., 2017).

Os bacteriófagos são amplamente distribuídos em vários ecossistemas (PRIGENT et al., 2005; SUTTLE, 2005; SAWSTROM et al., 2008; LIN et al., 2010), sendo a água do mar, o solo, a saliva e efluentes domésticos e industriais ambientes com elevada concentração desses micro-organismos (WILLIAMSON et al., 2005; SYNNOTT et al., 2009; BREITBART, 2012; NAIDU et al., 2014; TOPKA et al., 2019). Há hipóteses de que

os bacteriófagos podem ser encontrados onde quer que seus hospedeiros estejam presentes (PRIDE et al., 2012).

A descoberta dos antibióticos a partir da década de 1940, bem como seu desenvolvimento, produção e uso em larga escala contribuíram para o declínio da pesquisa com bacteriófagos. Considerando que a resistência dos micro-organismos aos principais antibióticos é crescente, e que formas de controle de biofilme são urgentes, tem-se observado novos interesses pela fagoterapia (PAISANO; BOMBANA, 2010). O principal exemplo é observado pela utilização bem sucedida de bacteriófagos na indústria de alimentos. Há disponibilidade de produtos comerciais com bacteriófagos para descontaminação de alimentos e animais antes do abate. As empresas de biotecnologia *Intralix Inc.* (Baltimore, MD, EUA), *OmniLytics Inc.* (Sandy, UT, EUA), *BiomX* (Ness Ziona, Israel), *Pherecydes Pharma* (Nantes, França) e *MicreosBV* (Wageningen, Holanda) dedicam-se à pesquisa e desenvolvimento de novas formulações com bacteriófagos para o controle de patógenos no setor agrícola, alimentício, industrial e farmacêutico (GUTIERREZ et al., 2016). Além disso, segundo a Sociedade Internacional para Vírus de Micro-organismos (ISVM), cerca de outras 50 empresas estão disponibilizando bacteriófagos, ou produtos enzimáticos produzidos pelos vírus, para pesquisa e desenvolvimento de ensaios pré-clínicos de terapia fágica (ISVM, 2020).

Além da aplicação em sítos de infecção, a potencial aplicabilidade de bacteriófagos em dispositivos médico-hospitalares tem despertado interesse em diversas áreas, incluindo a urologia (CURTIN; DONLAN, 2006; CARSON et al., 2010; FU et al., 2010; LIAO et al., 2012; LEHMAN; DONLAN, 2015; MELO et al., 2016; NZAKIZWANAYO et al., 2016; BAO et al., 2020), infecções relacionadas aos cateteres venosos (LUNGREN et al., 2013; LUNGREN et al., 2014) e infecções relacionadas às próteses ortopédicas (KAUR et al., 2014; BARROS et al., 2020). Ademais, outras abordagens clínicas foram conduzidas utilizando a fagoterapia no controle de diarreia e infecções do trato gastrointestinal (SARKER et al., 2017; NIKKHAHI et al., 2017; VAHEDI et al., 2018), cicatrização de feridas (CHENG et al., 2018), septicemia (JENNES et al., 2017; SCHNEIDER et al. 2018; KAABI; MUSAFER, 2019), infecções de pele e tecidos moles (WAND et al., 2020), infecções oculares (WEI et al., 2019), auditivas (KURABI et al., 2013) e dentárias (PINTO et al., 2016) e infecções do trato respiratório (ROACH et al., 2017; DUFOUR et al., 2019; FONG et al. 2019).

Diferentes enfoques têm sido utilizados para controle e erradicação do biofilme formado por *P. aeruginosa*, os quais têm como alvo fatores de aderência e maturação,

dispersão e virulência (SKARIYACHAN et al., 2018). A utilização da terapia bacteriofágica, em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, conduzidos em biofilmes e sítios de infecção, demonstrou que a aplicação de bacteriófagos é eficaz na redução da quantidade de *P. aeruginosa* (WRIGHT et al., 2009; ROSE et al., 2014; OECHSLIN et al., 2017; WATERS et al., 2017; CHAN et al., 2018; CAFORA et al., 2019; de MELO et al., 2019; YUAN et al., 2019; ADNAN et al., 2020). As vantagens da utilização da terapia bacteriofágica envolvem baixo dano à microbiota residual, capacidade de autorreplicação na presença da bactéria hospedeira, especificidade de hospedeiros, rápida seleção e caracterização e baixo custo. Todavia, são reportadas desvantagens envolvendo a liberação de toxinas bacterianas *in situ* e transformação lisogênica (LOC-CARRILLO; ABEDON, 2011; TREND et al., 2017). Ademais, a literatura tem apontado que muitos mecanismos antivirais podem ser empregados pelas células hospedeiras para evitar a infecções por bacteriófagos, como bloqueio da adsorção, nucleases de restrição, produção de matriz extracelular, produção de inibidores competitivos e inibição mediada por CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; SEED, 2015; CAFLISCH; SUH; PATEL, 2019).

De acordo com as diferenças moleculares e estruturais intrínsecas de células eucarióticas e procarióticas, a exposição e a evolução do sistema imunológico humano aos inúmeros bacteriófagos durante toda a vida permitem inferir a segurança do seu uso por meio da eliminação dos bacteriófagos de forma inofensiva e ausência de toxicidade às células humanas (DABROWSKA et al., 2005; BORYSOWSKI et al., 2017). Contrariamente, outros estudos apontaram que os bacteriófagos podem influenciar as funções de diferentes tipos celulares, incluindo, células dendríticas, monócitos, neutrófilos e linfócitos, envolvidos tanto na indução da resposta imune inata quanto adaptativa (GÓRSKI et al., 2012; AN et al., 2014).

Melo e colaboradores (2020) compararam diferentes vias de administração, efeito da dosagem e diferentes combinações de bacteriófagos em estudos pré-clínicos e clínicos de diferentes tipos de infecções. Os autores ressaltaram que na última década, foram feitos notáveis esforços para conduzir estudos mais detalhados a respeito da utilização *in vivo* de bacteriófagos no controle de infecções. Além da utilização direta dos bacteriófagos para controle ou prevenção de infecções, a literatura tem mostrado que enzimas produzidas pelos vírus podem ser aplicadas diretamente em sítios de infecção ou serem utilizadas como adjuvantes do tratamento (GUO et al., 2017; YANG et al., 2018; JAULT et al., 2019; KIM et al., 2020). As endolisinas produzidas pelos bacteriófagos são alternativas promissoras

aos antibióticos devido à sua natureza enzimática, com a capacidade de degradar rapidamente o peptidoglicano bacteriano, causando a morte das células (SANTOS; AZEREDO, 2019). Outros autores têm sugerido uma atividade sinérgica entre bacteriófagos e antibióticos, a qual é capaz de controlar infecções por bactérias amplamente resistentes aos antibióticos (CHAUDHRY et al., 2017; SEGALL; ROACH; STRATHDEE, 2019).

O uso terapêutico de bacteriófagos em alguns países da Europa, como a Polônia são de longa tradição, a exemplo do centro “*Phage Therapy Unit*”, que desenvolve pesquisas e formas de utilização da fagoterapia (MIEDZYBRODZKI et al., 2012). O advento das técnicas de microscopia de alta resolução alinhado às análises moleculares tem revelado aplicações biotecnológicas inovadoras para os bacteriófagos, além de permitir novas funções em uma ampla variedade de campos (SANTOS; AZEREDO, 2019). Dentre novas funções, podem-se elencar os estudos que têm utilizado bacteriófagos como veículos de administração de fármacos, no tratamento de doenças como Alzheimer, Parkinson e câncer (SERWER; WRIGHT, 2018). No entanto, a terapia fágica ainda é controversa devido a algumas preocupações relacionadas à sua segurança e eficácia (SPECK; SMITHYMAN, 2016; OOI et al., 2019; FABIJAN et al., 2020). Embora o isolamento de bacteriófagos tenha sido relatado há bastante tempo, há um número restrito de estudos avaliando o isolamento, caracterização, avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme e o efeito sobre os fatores de virulência das bactérias hospedeiras.

Como a heterogeneidade fenotípica em populações bacterianas conduz ao desenvolvimento de células tolerantes a antimicrobianos (VEGA; GORE, 2014), o surgimento de bactérias resistentes à infecção por bacteriófagos pode comprometer o sucesso e a eficácia da fagoterapia. Embora a fagoterapia seja promissora, existem poucos estudos que examinaram a resposta ao estresse em relação à infecção por bacteriófagos e o desenvolvimento de mecanismos de virulência em *P. aeruginosa* e as incertezas científicas sobre o aspecto coevolutivo dessa interação permanecem sem resposta. Diante desses aspectos, é imprescindível avaliar se a infecção por bacteriófagos poderia atuar seletivamente, durante o crescimento bacteriano, favorecendo a expressão de mecanismos de virulência por *P. aeruginosa*.

Diante do exposto, é possível evidenciar abordagens promissoras para o controle e erradicação de biofilmes com o uso de bacteriófagos (AZEREDO; SUTHERLAND, 2008; BASU et al., 2015; MELO et al., 2016). Embora o uso da terapia bacteriofágica já tenha sido reportado para infecções do trato respiratório (ROACH et al., 2017; WATERS et al.,

2017; DUFOUR et al., 2019; FONG et al., 2019; OOI et al., 2019), não há relatos da utilização da fagoterapia no controle de biofilmes presentes nos tubos endotraqueais. A utilização de bacteriófagos contra espécies formadoras de biofilmes em dispositivos médicos pode preservar a homeostase e diminuir o risco de infecções. Ademais, essa questão se torna ainda mais importante pelo fato que a PAV tem índice de mortalidade variando de 3 a 17% (NSEIR et al., 2011; BARBIER et al., 2013). Do ponto de vista financeiro, os custos da PAV são alarmantes, sendo a segunda IRAS mais dispendiosa, custando cerca de US\$40.000 por caso (MELSEN et al., 2013; ZIMLICHMAN et al., 2013; BOEV; KISS, 2017).

A potencial aplicabilidade de bacteriófagos em tubos endotraqueais precisa ser adequadamente investigada, a fim de se determinar a eficácia dos vírus como recurso terapêutico e preventivo à formação de biofilmes. Portanto, o objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar e selecionar bacteriófagos com potencial aplicabilidade antibacteriana e antibiofilme para o controle de *P. aeruginosa* em tubos endotraqueais. Além disso, em vista do potencial patogênico do biofilme e sua implicação na saúde e segurança dos pacientes, este estudo avaliou, *in situ*, a ação de bacteriófagos na prevenção da colonização de tubos endotraqueais por *P. aeruginosa*, visando o desenvolvimento de um dispositivo com atividade antibiofilme. Por fim, a influência dos bacteriófagos sobre os fatores de virulência de *P. aeruginosa* na presença dos bacteriófagos também foi avaliada.

A hipótese nula deste estudo foi que a presença dos bacteriófagos não influenciaria o crescimento planctônico, a formação de biofilme e também não teria ação sobre o biofilme maduro e sobre os fatores de virulência de *P. aeruginosa*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a aplicabilidade de tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos, visando vencer os desafios associados ao biofilme e à resistência bacteriana.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar, purificar, selecionar e caracterizar bacteriófagos com atividades antibacteriana e antibiofilme contra *P. aeruginosa*.
- Avaliar o potencial lítico e a especificidade de ação dos bacteriófagos isolados.
- Mensurar as atividades antibacteriana e antibiofilme dos bacteriófagos contra bactérias nas formas planctônicas e em biofilmes maduros, respectivamente.
- Desenvolver tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos.
- Determinar a atividade antibiofilme dos tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos, por até 7 dias, em um modelo de formação de biofilme em fluxo contínuo.
- Avaliar a formação de biofilme e produção de piocianina e proteases por *P. aeruginosa* após 2, 8, 24 e 48 h de cocultivo com os bacteriófagos.
- Estimar a expressão de genes relacionados ao mecanismo de *quorum sensing* e virulência (*lasI*, *pslA*, *lasB*, *phzH*) em *P. aeruginosa* após 2, 8, 24 e 48 h de cocultivo com os bacteriófagos.
- Criar vídeo educacional para divulgação da pesquisa científica dentro da Universidade de São Paulo e para a comunidade em geral.

3. Material e Métodos

3.1 Tipo de estudo e local

Trata-se de um estudo *in vitro* desenvolvido no Laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) junto a Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de Paulo (EERP/USP) e Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP). O estudo foi realizado em quatro etapas. A primeira etapa consistiu no isolamento, purificação e caracterização dos bacteriófagos. Os dados oriundos dessa etapa compreenderam variáveis nominais / qualitativas. A segunda etapa envolveu a avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme dos bacteriófagos contra 15 diferentes cepas de *P. aeruginosa* nas formas planctônica e associados a biofilmes maduros, respectivamente. Na terceira etapa foi avaliada a atividade antibiofilme de tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos, contra três diferentes cepas de *P. aeruginosa*, em um modelo de formação de biofilme em fluxo contínuo. Por fim, a quarta etapa avaliou a influência dos bacteriófagos sobre os fatores de virulência de *P. aeruginosa* após diferentes tempos de cocultivo. Os dados da segunda, terceira e quarta etapa compreenderam variáveis quantitativas contínuas. A figura 1 ilustra, esquematicamente, todas as etapas metodológicas envolvidas no desenvolvimento deste estudo.

Para a condução deste estudo, e acesso ao patrimônio genético dos bacteriófagos, foram cumpridas todas as instruções da Lei 13.123/2015. O estudo foi cadastrado junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob número AD5DDB2 (Anexo A).

O desenvolvimento do estudo envolveu a utilização de linhagens de referência de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), bem como o painel de *P. aeruginosa* multirresistente (ATCC MP-23™), o qual apresenta sete cepas avaliadas contra uma variedade de classes de antibióticos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, quinolonas e aminoglicosídeos. Além disso, outras 26 cepas clínicas de *P. aeruginosa* isoladas a partir de saliva, biofilme de próteses bucais, urina, secreção traqueal e sangue periférico foram utilizadas. As cepas bacterianas foram utilizadas como hospedeiras nos processos de isolamento, purificação, propagação, viabilidade e atividades antibacteriana e antibiofilme.

Figura 1: Diagrama esquemático das etapas e metodologia utilizada no estudo.

3.2 PRIMEIRA ETAPA

3.2.1 Isolamento, propagação e purificação de bacteriófagos

As etapas de isolamento, propagação e purificação dos bacteriófagos seguiram os critérios definidos por Melo et al. (2014). Primeiramente, as cepas de *P. aeruginosa* foram semeadas em 5 mL de caldo de cultura *Tryptic Soy* (TSB) (BD Difco, Sparks, MN, USA) e incubadas a 37°C por 24 h. Amostras de biofilme de prótese total superior (n = 16), água doce (n = 6), água salgada (n = 2), efluentes domésticos (n = 3) e efluentes de equipamentos odontológicos (n = 4) foram coletadas no período de março a novembro de 2018, nas quais se buscou por bacteriófagos capazes de infectar *P. aeruginosa*.

- **Coleta 1:** Amostras de 10 mL de biofilme de 16 próteses totais superiores foram obtidas por escovação com escova de cerdas macias e tampão *phosphate buffered saline* (PBS). As amostras foram coletadas em março de 2018 durante atendimento da disciplina de Prótese Total na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP). Após a coleta as amostras formaram um *pool* de cerca de 160 mL.
- **Coleta 2:** Amostra de 500 mL de efluentes domésticos, coletada em março de 2018 (Ribeirão Preto / SP, Estação de Tratamento de Esgotos – Ambient Serviços Ambientais, Subsetor Norte - 15 (N-15), 21°06'17.9"S 47°48'45.4"W).
- **Coleta 3:** Amostra de 500 mL de água do lago do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, coletada em abril de 2018 (Ribeirão Preto / SP, Subsetor Oeste - 11 (N-11), 21°10'12.2"S 47°51'20.3"W).
- **Coleta 4:** Amostra de 500 mL de água do Oceano Atlântico, coletada em abril de 2018 (Praia Grande, Santos / SP, 24°02'24.4"S 46°30'02.0"W).
- **Coleta 5:** Amostra de 500 mL de água do Oceano Pacífico, coletada em abril de 2018 (Iquique, região de Tarapacá, Chile, 20°14'59.9"S 70°08'16.8"W).
- **Coleta 6:** Amostra de 500 mL de água do Córrego Borrachudo, coletada em maio de 2018 (Matutina / MG, 19°13'05.9"S 45°57'58.0"W).
- **Coleta 7:** Amostra de 500 mL de água do lago da Fazenda Buracão, coletada em junho de 2018 (Mococa / SP, 21°30'11.5"S 47°02'50.4"W).
- **Coleta 8:** Amostra de 500 mL de água do Córrego Ribeirão Preto, coletada em julho de 2018 (Ribeirão Preto / SP, Subsetor Norte - 8 (N-8), 21°07'08.3"S 47°48'11.3"W).
- **Coleta 9:** Amostra de 500 mL de água do Córrego dos Campos, coletada em agosto de 2018 (Ribeirão Preto / SP, Subsetor Norte - 3 (N-3), 21°07'26.4"S 47°49'09.0"W).
- **Coleta 10:** Amostra de 500 mL de efluentes domésticos, coletada em setembro de 2018

(Araxá / MG, Estação de Tratamento de Esgotos – ETE COPASA, 19°32'51.7"S 46°57'13.4"W).

- **Coleta 11:** Amostra de 500 mL de efluentes domésticos, coletada em novembro de 2018 (Araxá / MG, Estação de Tratamento de Esgotos – ETE COPASA, 19°32'51.7"S 46°57'13.4"W).
- **Coleta 12:** Amostra de 500 mL de água da lagoa da Pampulha, coletada em novembro de 2018 (Belo Horizonte / MG, Pampulha, 19°51'29.0"S 43°58'44.2"W).
- **Coleta 13:** Amostra de 500 mL de efluentes da bomba de sucção de 4 equipos odontológicos, coletada em novembro de 2018 (Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto FORP/USP).

Uma alíquota de 50 mL de cada amostra foi acrescentada a 50 mL de TSB em concentração dupla. À suspensão foram adicionados 100 µL de *P. aeruginosa* em fase exponencial de crescimento. A mistura foi incubada (Incubadora Shaker, Mod. CE-320, CienLab, Campinas, SP, Brasil) a 37°C por 24 h, sob agitação de 120 rpm (Figura 2).

Figura 2: Cultivo de efluentes domésticos para isolamento de bacteriófagos.

Decorrido o período de incubação, cada amostra foi centrifugada a 4.000 g por 10 minutos e filtrada em membrana hidrofílica de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µm (TPP, Trasadingen, Suíça). Uma alíquota de 100 µL de *P. aeruginosa* (ATCC) e *P. aeruginosa* multirresistente [10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro de inóculo bacteriano – UFC/mL (concentração ajustada em espectrofotômetro com leitura de

absorbância 0,45 a 600 nm) foi adicionada a 3 mL de TSB semissólido (TSBS a 0,8% ágar) fundido a 45°C. Após agitação manual, a mistura resultante foi vertida em placa de Petri (60 × 15 mm) contendo 3 mL de meio *Tryptic Soy Agar* (TSA – 1,5% ágar) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Maharashtra, Índia). Após solidificação do meio semissólido, 10 µL do filtrado foram gotejados sobre o TSBS. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Decorrido o período de incubação, a presença de placas de lise foi observada na cultura com *P. aeruginosa* e *P. aeruginosa* multirresistentes. Para prosseguir com o isolamento e purificação dos bacteriófagos, as amostras consideradas positivas foram aquelas que apresentaram placas de lise para ambas as condições de cultivo.

As placas de lise foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno (TPP) contendo 5 mL de tampão de diluição – SM (1 M Tris-HCl pH 7,5 (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, EUA); 10 mM MgSO₄ (Sigma–Aldrich); 10 mM NaCl (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) – (Figura 3).

Figura 3: Isolamento de bacteriófagos. A) Gotejamento da suspensão sobre a camada de meio de cultura; B) Placa de lise após 24 h de cultivo; C) Coleta da placa de lise para posterior purificação.

Os tubos contendo as placas de lise foram agitados em agitador de tubos (Phoenix, AP 56, Araraquara, SP, Brasil) e as suspensões foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-8} . Uma alíquota de 100 µL de *P. aeruginosa* (10^8 UFC/mL) foi adicionada a 100 µL das suspensões diluídas. A mistura foi gentilmente agitada e incubada a 37°C por 15 minutos. A seguir, a mistura foi adicionada a 3 mL de meio de cultura TSBS, fundido a 45°C, e vertida em placa de Petri (60 × 15 mm) com 3 mL de TSA. Cinco placas de lise, morfologicamente distintas foram coletadas com auxílio de uma ponteira de 10 µL (Figura 4) e cultivadas, individualmente, de forma sucessiva em placas de Petri (60 × 15 mm) com TSA até a obtenção de um único tipo de bacteriófago (7 passagens), por meio da avaliação da morfologia macroscópica da

placa de lise. Em seguida, seguiram-se as etapas de propagação e purificação dos bacteriófagos.

Figura 4: Seleção de cinco placas de lise, morfologicamente distintas para posterior propagação e purificação dos bacteriófagos.

Na 7ª passagem, foram adicionados 5 mL de tampão de diluição a cada placa de Petri, as quais foram levadas à incubação a 4°C por 24 h, sob agitação de 120 rpm (Go Shaker, SK-180-Pro, Scilogex, Hartford, CT, EUA). A fase líquida foi recolhida, e NaCl a uma concentração final de 1 M foi adicionado à suspensão. As amostras foram mantidas a 4°C por 1 hora e, posteriormente, foram centrifugadas a 4200 g por 20 minutos, sob refrigeração. Foi adicionado polietilenoglicol 8.000 (Sigma–Aldrich) a 10% (p/v) ao sobrenadante. A mistura foi incubada a 4°C durante 19 h e, posteriormente, centrifugada a 4200 g por 20 minutos, a 4°C. Os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 10 mL de tampão de diluição e 5 mL de clorofórmio (Sigma–Aldrich). Os tubos foram agitados por 30 segundos e centrifugados a 3.000 g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e filtrado através de membranas de 0,22 µm. As soluções fágicas purificadas foram armazenadas a 4°C.

Para a titulação, 100 µL das soluções fágicas diluídas (10^{-1} a 10^{-8}) e 100 µL de uma suspensão de *P. aeruginosa* em fase de crescimento exponencial foram incubadas a 37°C por 15 minutos. A suspensão foi adicionada a 3 mL de TSBS e a mistura resultante foi vertida em placa de Petri (60 × 15 mm) com 3 mL de TSA. Após solidificação, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Decorrido esse período, a presença de placas de lise foi observada, contando-se o número de halos transparentes na diluição que forneceu

halos equidistantes, sem sobreposição (Figura 5). Os valores foram expressos em unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL) de amostra, de acordo com a seguinte fórmula:

$UFP/mL = n \cdot 10^x / v$, tendo em vista que:

n é igual ao número de placa de lises contadas;

x é o valor absoluto da diluição na qual foi encontrado o valor de **n**;

v é o volume semeado.

Figura 5: Determinação do título dos bacteriófagos.

3.2.2 Caracterização genômica dos bacteriófagos

3.2.2.1 Extração do material genético dos bacteriófagos

As etapas envolvendo a caracterização genômica dos bacteriófagos foram conduzidas utilizando a metodologia descrita por Khal (2016). Primeiramente, foi extraído o material genético dos bacteriófagos. A fim de remover resíduos de DNA e RNA bacteriano, as soluções fágicas foram tratadas com 10 U de DNase I (1 U/ μ L) (Sigma–Aldrich) e 10 μ L RNase A (20 mg/mL) (Sigma–Aldrich). As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora, e as enzimas foram inativadas a 70°C por 15 minutos. A seguir, foram adicionados a cada amostra 40 μ L EDTA (0,5M) (Sigma–Aldrich), 5 μ L de proteinase K (10 mg/mL) (Sigma–Aldrich) e 50 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma–Aldrich) a 10% (p/v). A mistura foi agitada e incubada a 56°C por 60 minutos, com agitação a cada 20 minutos. Decorrido o período de incubação, adicionou-se igual volume de uma mistura de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma–Aldrich). Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 21.000 g a 4°C por 10 minutos. A fase aquosa superior foi coletada e foi adicionado igual volume de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1), seguindo homogeneização e centrifugação a 21.000 g por 10 minutos, a 4°C. A

fase aquosa superior foi coletada, e a etapa anterior foi repetida mais uma vez, garantindo a obtenção de uma interfase completamente “limpa”. A fase aquosa superior foi coletada, e o material genético foi precipitado com o dobro do volume de isopropanol (Sigma–Aldrich) gelado (acerca -20°C) e 1/10 do volume de acetato de sódio a 3 M (Sigma–Aldrich).

O material foi centrifugado a 21.000 g por 10 minutos, a 4°C . A fase líquida foi removida, 500 μL de etanol 70% (v/v) (Sigma–Aldrich) foram adicionados, e o tubo foi centrifugado a 21.000 g por 2 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi descartado, e a etapa anterior repetida 4 vezes. O *pellet* resultante foi seco à temperatura ambiente e eluído em 25 μL de água ultrapura esterilizada livre de DNase e RNase (Sigma–Aldrich). A quantificação e determinação da pureza do material genético foram realizadas em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia) com leituras nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm. A integridade do material genético foi atestada através de eletroforese em gel de agarose (Agargen, Laboratorios Espanagar, Torrejon de Ardoz, Madri, Espanha). O gel foi preparado a 1% (p/v) pela solidificação da agarose fundida em tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0). O gel foi acondicionado em cuba de eletroforese (Major Science, Saratoga, CA, EUA) 10×10 cm com tampão TE e em cada poço do gel foi colocada uma mistura de 1 μL de tampão de carregamento (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), 1 μL de corante *Gel Red* (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) diluído 1:500 e 2 μL da amostra. A corrida seguiu a 100 V por 30 minutos. O gel foi visualizado e analisado em fotodocumentador E-BOX VX5 (Fisher Biotec, Perth, Austrália Ocidental, Austrália), e após a confirmação da integridade, as amostras foram estocadas a -20°C .

3.2.2.2 Caracterização do material genético dos bacteriófagos

O tipo do material genético dos bacteriófagos foi caracterizado por meio da incubação com RNase A ou DNase I. Duas amostras isoladas contendo 1 μg do material genético dos bacteriófagos, anteriormente extraído, foram incubadas, separadamente, com 1 U de DNase I e 10 $\mu\text{g/mL}$ de RNase A a 37°C por 30 minutos. As amostras digeridas foram aplicadas em gel de agarose a 1%, conforme descrito, anteriormente, juntamente a um marcador de peso molecular.

Visando analisar a presença de contaminação das amostras virais com material genético bacteriano, uma reação de PCR foi realizada com o emprego de *primers* (Sigma–

Aldrich) para o gene do 16S rRNA de *P. aeruginosa* (*Forward* GGGGGATCTTCGGACCTCA; *Reverse* TCCTTAGAGTGCCCACCCG) – (SPILKER et al., 2004). Para amplificação, uma mistura contendo 10 pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 5 nmol de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) (Qiagen, Hilden, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha), 1,5 U de Taq DNA polymerase (Sigma–Aldrich), 10% de tampão (v/v) (Sigma–Aldrich) e 50 ng do material genético extraído, em um volume final de 25 µL, foi submetida à ciclagem térmica (Figura 6). A ciclagem foi realizada em termociclador (Amplitem Thermal Cyclers, Madison, WI, EUA) com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. A extensão final foi a 70°C por 5 minutos. Como controle positivo foi utilizado DNA de *P. aeruginosa*. A eletroforese em gel de agarose a 1% foi realizada para avaliar os resultados da PCR.

Figura 6: Reação de PCR para avaliação da pureza do material genético.

3.2.2.3 Sequenciamento do material genético dos bacteriófagos

Inicialmente, a quantificação precisa da quantidade de DNA de cada amostra foi realizada pelo kit *QuantiFluor® ONE dsDNA* (Promega, Madison, WI, EUA), por fluorimetria (excitação em 504 nm e emissão em 531 nm) (Synergy II, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). Posteriormente, a partir do DNA dos bacteriófagos foram construídas bibliotecas, utilizando o kit *Nextera Library Preparation* (Illumina, San Diego,

CA, EUA). Nessa etapa, o DNA foi fragmentado, e às extremidades dos fragmentos de DNA foram ligados adaptadores com sequência conhecida. Uma reação de PCR em tempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), com o uso de *primers* complementares aos adaptadores, foi realizada para adição dos índices, os quais permitiram reconhecer o fragmento nas etapas posteriores (Figura 7A). Após a reação de qPCR, por meio de um gel de eletroforese, confirmou-se o tamanho médio dos fragmentos (aproximadamente 500 pares de bases).

A normalização das bibliotecas foi realizada utilizando microesferas magnéticas (*beads*) com capacidade limitada de carregamento (Figura 7B).

Figura 7: Construção das bibliotecas. A) seleção dos índices e B) normalização das bibliotecas com o uso de microesferas magnéticas.

As amostras foram novamente quantificadas por PCR em tempo real (Applied Biosystems) por meio do kit *Nebnext® Library Quant Kit for Illumina®* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA). A seguir, as amostras foram transferidas para a placa de sequenciamento (*Flowcell*), e os adaptadores / índices presentes nas extremidades dos fragmentos se ligaram a adaptadores presentes na placa. O DNA foi sequenciado de maneira *paired-end* (2×300 bp), na qual o mesmo fragmento foi lido em ambos os sentidos, na plataforma MiSeq (Illumina). Os fragmentos foram submetidos ao sequenciamento baseado em síntese (SBS), na qual uma fita de DNA foi amplificada clonalmente em fase sólida por PCR em ponte (*Bridge PCR*). Após a amplificação e consequente formação dos *clusters*, as duplas fitas de DNA (dsDNA) foram linearizadas e

convertidas a fitas simples (ssDNA). A síntese de uma nova fita foi realizada com desoxinucleotídeos contendo diferentes marcadores fluorescentes. A incidência de um feixe de raios laser excitou os fluoróforos, proporcionando emissão de luz que diferiu em função da base incorporada. Esse ciclo se repetiu até que toda a extensão do DNA fosse registrada para determinar a sequência de bases das fitas molde.

A etapa de sequenciamento foi realizada na plataforma de sequenciamento de nova geração da Central Multiusuário de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Plataforma de sequenciamento MiSeq (Illumina).

3.2.2.4 Análises de bioinformática

As análises de bioinformática dos bacteriófagos foram realizadas em parceria institucional com o *Bacteriophage Biotechnology Group* no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga, Portugal em junho de 2019.

Após o sequenciamento, os arquivos foram disponibilizados em nuvem de armazenamento *Basespace* (Illumina). As sequências geradas foram pré-processadas com objetivo de remover regiões de baixa qualidade (ferramenta *FASTQ Toolkit*). Os fragmentos (*reads*) resultantes foram alinhados (ferramenta *Velvet de novo assembly*) baseando-se em regiões de sobreposição entre eles, produzindo sequências únicas denominadas *contigs*. As sequências foram exportadas em formato FASTA.

Sequências potencialmente codificantes (CDSs) foram anotadas de acordo com metodologia descrita por Melo et al. (2018) usando a ferramenta *myRAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology)*. A pesquisa de potenciais códigos iniciadores (*start codons*) ou CDSs não anotadas foi posteriormente realizada no *software* de bioinformática para análise de sequências de dados *Geneious Prime* versão 2019.2.1 (Biomatters, Ltd., Auckland, Nova Zelândia), pela pesquisa de similaridade entre genomas já descritos através da ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Foram consideradas proteínas homólogas a genomas de bacteriófagos caudados, com alta similaridade ($\geq 80\%$) e baixo *E-value* ($\leq 10^{-5}$) para anotação. A definição de função às proteínas foi realizada por meio da pesquisa de domínios proteicos conservados pelas ferramentas *Toolkit Bioinformatics* (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/>) e *InterProScan* (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>). A localização de domínios transmembrana foi realizada pela submissão das sequências aos sites *TMHMM*

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) e *Phobius* (<http://phobius.sbc.su.se/>). A presença de RNA transportadores (tRNAs) foi avaliada através das ferramentas *tRNAscan-SE* (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) e *Aragorn* (<http://mbioserv2.mbioekol.lu.se/ARAGORN/>). Ao final da anotação manual, as sequências foram exportadas para posterior submissão ao banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, GeneBank).

3.2.3 Caracterização morfológica microscópica

A caracterização morfológica microscópica seguiu o protocolo descrito por Melo et al. (2014). Um volume de 500 µL das suspensões fágicas foi centrifugado a 21.800 *g* durante 60 minutos, a 4°C. O sedimento foi lavado duas vezes em água ultrapura esterilizada, seguindo sempre uma nova centrifugação. Uma alíquota (50 µL) de cada bacteriófago foi aplicada sobre uma tela de microscopia eletrônica, de níquel ou cobre, previamente, revestida com carbono. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, as telas foram coradas com acetato de uranila a 2% (pH 4,0) por 5 minutos. As placas foram incubadas por 40 minutos à temperatura ambiente antes da deposição da tela na caixa de armazenamento. As telas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (JEOL, JEM-100CXII, Akishima, Tóquio, Japão) no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.2.4 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade dos bacteriófagos

A fim de avaliar a sensibilidade dos bacteriófagos às variações de pH e temperatura, os bacteriófagos foram incubados em diferentes faixas de temperaturas e pH, conforme metodologia descrita por Cui et al. (2016). Para avaliar a estabilidade ácido-base, uma alíquota de 100 µL da suspensão de bacteriófagos (10^8 UFP/mL) foi adicionada a 900 µL de tampão SM, com pH ajustado em 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0. A viabilidade dos bacteriófagos foi avaliada após 2 h de incubação a 37°C. A contagem das placas de lise foi realizada mediante a semeadura pela técnica de sobrecamada em ágar, conforme descrita anteriormente.

Para a avaliação da estabilidade térmica, uma alíquota de 100 µL da suspensão de bacteriófagos (10^8 UFP/mL) foi adicionada a 900 µL de tampão SM e incubada em diferentes temperaturas (37°C, 42°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C) por 2 h. A contagem das

placas de lise foi realizada mediante a semeadura pela técnica de sobrecamada em ágar, conforme descrita anteriormente.

3.2.5 Avaliação da especificidade de hospedeiros e atividade lítica dos bacteriófagos

Os espectros líticos dos bacteriófagos foram avaliados frente a 26 isolados clínicos e 8 linhagens de *P. aeruginosa* ATCC (27853, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114). As cepas clínicas foram isoladas a partir de saliva, biofilme de próteses bucais, urina, secreção traqueal e sangue periférico. O perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos foi determinado pelo método de disco difusão. O teste de suscetibilidade, classes de antimicrobianos, concentração de antibióticos e ponto de corte para *P. aeruginosa* foram definidos de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019). Para as cepas ATCC, o perfil de resistência definido pela instituição detentora da coleção foi utilizado. Ademais, cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25927), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram empregadas para confirmar a especificidade de infecção dos vírus isolados.

3.2.6 Curva de crescimento dos bacteriófagos

A curva de crescimento dos bacteriófagos (período de latência e *Burst Size*) foi determinada a partir da mudança dinâmica do número total de bacteriófagos livres de acordo com o tempo de cultivo. Inicialmente, 5 mL de uma suspensão de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) a uma concentração de $\sim 10^{11}$ UFC/mL, diluída em TSB, foram adicionados a 5 mL de uma suspensão de bacteriófagos a uma concentração de $\sim 5 \times 10^8$ UFP/mL, diluída em tampão SM. A razão entre o número de bacteriófagos e o número de bactérias nessa suspensão foi 5/1000, o que caracterizou uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,005. Essa razão indica uma baixa MOI, gerando, virtualmente, uma taxa de infecção de 1 vírus / célula bacteriana ($\sim 5 \times 10^8$ células infectadas), conforme a distribuição de Poisson (THOMAS, 2001).

A mistura foi mantida a 37°C por 5 minutos. A seguir foi centrifugada a 7000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* foram adicionados 10 mL de TSB estéril, e esse momento foi determinado como o tempo “zero” da curva de crescimento. Nesse tempo, 100 µL da suspensão foram adicionados a 850 µL de tampão SM e 50 µL de clorofórmio. A adição de clorofórmio causa a lise bacteriana e, consequentemente, permite a quantificação das partículas fágicas intracelulares. Outros 100 µL da suspensão, sem lise

de *P. aeruginosa*, foram utilizados para avaliar a carga de bacteriófagos livres (extracelulares) no tempo “zero”. A taxa de infecção foi calculada pela diferença do número de UFP/mL das amostras lisadas e não lisadas.

As amostras foram incubadas a 37°C, em agitação de 120 rpm, e a cada 5 minutos, alíquotas de 500 µL da suspensão foram coletadas. Amostras dos 13 tempos de cultivo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 minutos) foram centrifugadas a 7000 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram diluídos e cultivados em meio TSBS, conforme protocolo descrito anteriormente, avaliando-se o aumento dos bacteriófagos livres (Figura 8).

Figura 8: Curva de crescimento dos bacteriófagos após 30 minutos de cultivo.

O número de bacteriófagos livres foi verificado a cada tempo, sendo definido como tempo de latência o tempo em que ocorreu o aumento exponencial do número de placas de lise (lise celular e liberação exponencial de bacteriófagos maduros). O *Burst size* foi calculado pela razão entre o número de placas de lise no tempo em que se atingiu o crescimento *Plateau* e o número de bactérias, inicialmente infectadas, determinadas a partir da lise celular com clorofórmio, dividido pelo título inicial. Esse dado indicou o número de bacteriófagos produzidos por célula bacteriana infectada.

As amostras foram preparadas e inoculadas em meio TSBS, conforme protocolo, anteriormente, descrito. Após solidificação do meio de cultura, alíquotas de 10 µL das amostras contendo bacteriófagos foram, cuidadosamente, pipetadas sob a superfície do meio de cultura. As placas de Petri foram incubadas a 37°C durante 24 h. A observação de diferentes graus de lise bacteriana nos pontos de aplicação das amostras foi avaliada.

3.2.7 Eficiência de plaqueamento

A eficiência de plaqueamento (EOP) dos bacteriófagos foi determinada contra todas as cepas de *P. aeruginosa* positivas para a atividade lítica, realizada na etapa 3.2.5. Alíquota de 100 µL de *P. aeruginosa* (10^8 UFC/mL) foi adicionada a 3 mL de TSBS fundido a 45°C. Após agitação manual, a mistura resultante foi vertida em placa de Petri (60 × 15 mm) com 3 mL de TSA. Após solidificação do meio semissólido, 10 µL dos bacteriófagos em concentrações conhecidas (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 UFP/mL) foram gotejados sobre o TSBS. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Decorrido esse período, as placas de lise foram registradas para cada concentração dos bacteriófagos. A EOP foi calculada como a razão do número de placas de lise (UFP/mL) obtida de cada isolado clínico dividido pelo número de placas de lise (UFP/mL) obtido no cultivo com a cepa padrão de *P. aeruginosa*. A EOP foi registrada como alta, baixa e ineficiente, segundo as taxas de infecção de > 1 , 0,1 a 1 e $< 0,1\%$, respectivamente (MELO et al., 2014).

3.3 SEGUNDA ETAPA

3.3.1 Atividade antibacteriana sobre células planctônicas

Para a condução dos ensaios biológicos envolvendo a ação dos bacteriófagos sobre células planctônicas e sobre biofilme maduro, as 15 cepas de *P. aeruginosa* com os valores de EOP mais elevados foram selecionadas.

Para verificar a atividade antibacteriana dos bacteriófagos sobre células planctônicas, seguiu-se o protocolo descrito por Melo et al. (2014). Para o preparo do inóculo as 15 amostras de *P. aeruginosa* foram descongeladas, inoculadas em caldo TSB e incubadas a 37°C por 48 h. A carga bacteriana de $\sim 10^9$ UFC/mL foi ajustada em espectrofotômetro com leitura de absorbância a 600 nm (absorbância 0,6). Os ensaios de infecção foram realizados em microplacas de 96 poços de fundo chato (TPP). As placas receberam 100 µL de cada uma das amostras de *P. aeruginosa* e 100 µL de cada um dos bacteriófagos em concentração de 5×10^7 UFP/mL (MOI 0,05). As placas foram incubadas a 37°C sob agitação orbital a 80 rpm. A densidade óptica foi aferida a 600 nm a 2, 4, 6, 8 e 24 h após o início da cultura. O experimento foi realizado em três momentos independentes em triplicata. Como controle positivo, para o crescimento bacteriano, empregou-se tampão SM sem bacteriófagos. Por outro lado, como controle negativo, com ausência de crescimento, foi utilizado TSB esterilizado.

3.3.2 Atividade antibiofilme sobre biofilmes maduros

A inoculação dos bacteriófagos isolados sobre biofilme *in vitro* foi realizada em espécimes de 5 mm de diâmetro de tubo endotraqueal (Rüsh Health Systems, Meridian, MS, EUA). Os 1620 espécimes foram obtidos com auxílio de um perfurador de papel (Figura 9), embalados em envelopes grau cirúrgico (Cremer, Blumenau, SC, Brasil) e esterilizados por plasma de peróxido de hidrogênio Sterrad® (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, EUA).

Figura 9: Espécimes de tubo endotraqueal

A metodologia de formação dos biofilmes seguiu o protocolo descrito por Lopes et al. (2014). Para o preparo do inóculo, as 15 amostras de *P. aeruginosa*, foram descongeladas, inoculadas em caldo TSB e incubadas a 37°C por 48 h. A carga bacteriana de $\sim 10^7$ UFC/mL foi ajustada em espectrofotômetro com leitura de absorbância a 600 nm (absorbância 0,3). Os espécimes foram distribuídos em placa de cultura celular de 48 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e receberam 400 µL de TSB inoculado, com cada uma das 15 amostras de *P. aeruginosa*. As placas foram incubadas em atmosfera úmida, a 37°C, sob agitação de 75 rpm. Após 24 h de incubação, metade do meio de cultura foi trocado por meio de cultura recém-preparado, e as placas foram novamente incubadas a 37°C por 24 h. Na sequência, o meio de cultura foi retirado e cada espécime foi cuidadosamente transferido, com auxílio de pinças cirúrgicas esterilizadas, para uma nova placa com 400 µL de meio de cultura esterilizado e 10^8 UFP/mL de bacteriófagos diluídos em tampão SM. Amostras controles receberam meio de cultura e tampão SM sem

bacteriófagos. As placas foram incubadas a 37°C, 75 rpm, por 24 h, e a seguir foi determinada a atividade antibiofilme *in vitro* dos bacteriófagos. Foram avaliados o número de UFC de *P. aeruginosa* / cm² dos espécimes, a atividade respiratória das bactérias (XTT) e o aspecto do biofilme visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A taxa de biofilme remanescente, após o tratamento com os bacteriófagos, foi avaliada por microscopia de fluorescência (*Operetta high content system*), diretamente no biofilme formado no fundo de placa de 96 poços.

3.3.2.1 Avaliação do número de unidades formadoras de colônias

Para determinar o número de UFC/cm², os espécimes foram removidos das placas com auxílio de pinças cirúrgicas esterilizadas (Figura 10), enxaguados em PBS e transferidos para microtubos (Kasvi) com 2 mL de PBS. Os microtubos com os espécimes foram colocados em uma cuba de ultrassom (40 kHz, 200 W) (Alt Equipamentos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 20 minutos. Em seguida, os microtubos foram agitados por 30 segundos, em agitador de tubos, e diluições decimais seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ da suspensão foram semeadas em placas de Petri com TSA. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para posterior determinação do número de UFC/cm². O ensaio foi realizado em três momentos independentes em triplicata.

Figura 10: Remoção dos espécimes da placa de cultivo após a ação dos bacteriófagos sobre o biofilme.

3.3.2.2 Avaliação da atividade respiratória

Para avaliação da atividade respiratória, foi realizado o ensaio de redução de [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida] (XTT) em formazan,

segundo protocolo utilizado por Da Silva et al. (2008). Após a exposição aos bacteriófagos, os espécimes foram removidos das placas, com auxílio de pinças cirúrgicas esterilizadas e transferidos a outra placa de 48 poços contendo: 316 μL de PBS suplementado com 100 mM de glicose (Sigma–Aldrich), 80 μL de XTT a 1 mg/mL (Sigma–Aldrich) e 4 μL de menadiona a 0,4 mM (Sigma–Aldrich). As placas foram incubadas, protegidas da luz, a 37°C durante 2 h (Figura 11). Decorrido o tempo de incubação, as placas foram agitadas gentilmente, e 100 μL da solução foram transferidos para microplacas de 96 poços de fundo chato (TPP). Foram realizadas 3 leituras a 492 nm utilizando um leitor de microplacas (Thermo Scientific), e a média das alterações colorimétricas foi registrada. O ensaio foi realizado em três momentos independentes em triplicata.

Figura 11: Avaliação da atividade respiratória após a ação dos bacteriófagos sobre o biofilme.

3.3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliação do aspecto do biofilme, por MEV, após a ação dos bacteriófagos, apenas os espécimes com biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram avaliados. Dois espécimes de cada condição experimental (controle e tratamento com os bacteriófagos) foram fixados por 60 minutos em glutaraldeído a 2,5% (v/v) (Sigma–Aldrich) por 24 h. Em seguida, os espécimes foram desidratados por imersão em soluções de etanol [30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% (v/v)], por 30 minutos cada. As superfícies dos espécimes foram revestidas por ouro e avaliadas topograficamente por um microscópio

eletrônico de varredura (JEOL, JSM-6510LV, Akishima, Tóquio, Japão) em ampliações de 2000× e 5000×.

3.3.2.4 Avaliação da taxa de biofilme remanescente após ação dos bacteriófagos

Para avaliação da taxa de biofilme aderido após a ação dos bacteriófagos, o ensaio foi realizado em placa de 96 poços preta com fundo de vidro (Corning Inc., Corning, NY, EUA). Placas pretas são projetadas para reduzir o *background* em ensaios que envolvam fluorescência. Para o preparo do inóculo, as 15 amostras de *P. aeruginosa* foram descongeladas e incubadas conforme protocolo descrito anteriormente.

O biofilme foi formado a partir de 10^7 UFC/mL em 200 µL de TSB, a 37°C, em atmosfera úmida, sob agitação de 75 rpm. Após 24 h de cultivo, metade do meio de cultura foi trocado por meio de cultura recém-preparado, e as placas foram novamente incubadas a 37°C por 24 h. Decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi removido cuidadosamente com pipeta posicionada a um ângulo de 45°, evitando tocar nas laterais e no fundo dos poços, e 200 µL de TSB esterilizado contendo 10^8 UFP/mL de bacteriófagos diluídos em tampão SM foram adicionados aos biofilmes. Amostras controles receberam meio de cultura e tampão SM sem bacteriófagos. Após 24 h de incubação, os poços foram lavados cuidadosamente com PBS e corados por 15 minutos, protegidos da luz, com o *kit* de viabilidade de biofilme LIVE / DEAD™ (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EUA).

As placas foram escaneadas pelo microscópio confocal *Operetta CLS High Content* (PerkinElmer, Dinamarca). Foram adquiridas 15 imagens de cada poço com ampliação de 40×. Todas as imagens foram obtidas na mesma região para todos os poços (Figura 12A), usando os mesmos parâmetros de contraste e brilho, e a análise dos dados foi realizada pela mesma configuração de parâmetros. Para avaliar a taxa de biofilme remanescente, após a ação dos bacteriófagos, as áreas (µm²) com células aderidas foram quantificadas usando o *software Harmony High Imaging Imaging and Analysis* (PerkinElmer) (Figura 12B). O ensaio foi realizado em triplicata, totalizando 45 imagens para cada cepa.

Figura 12: Avaliação da taxa de biofilme aderido após a ação dos bacteriófagos. A) Indicação dos campos; B) Estimativa da intensidade de fluorescência das áreas recobertas por biofilme.

3.4 TERCEIRA ETAPA

3.4.1 Atividade antibiofilme de tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos

Para avaliação *in situ* da inibição da formação de biofilme na superfície interna de tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos, empregou-se um modelo de biofilme em fluxo contínuo. Para simular as condições *in vivo*, foi empregado o meio de cultura SCFM2 [4 g DNA de esperma de salmão (GoldBio, St Louis, MO, EUA), 5 g de mucina do estômago suíno (Sigma–Aldrich), 5 g casaminoácidos (Difco), 5,9 mg de ácido dietilenotriaminopentaacético (Sigma–Aldrich), 5 g de NaCl (Dinâmica), 2,2 g de KCl (Dinâmica), 5 mL emulsão de gema de ovo, água destilada 1000 mL, pH 6,9)], o qual mimetiza um modelo de fibrose cística (DARCH et al., 2017). Foram avaliadas três linhagens de *P. aeruginosa*. As cepas *P. aeruginosa* ATCC 2110 e ATCC 2112 foram selecionadas devido ao maior espectro de resistência aos antibióticos testados. Já a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi selecionada como controle, devido à inexistência de resistência aos antibióticos avaliados.

As extremidades do tubo foram removidas para permitir a sua ligação ao sistema. Após a remoção das extremidades, o comprimento do tubo foi de 31 cm. O diâmetro do tubo utilizado foi de 8,5 cm, o que conferiu uma superfície interna de 82,8 cm². Dessa

maneira, a fim de alcançar um revestimento de $\sim 10^7$ UFP/cm², 17 mL de tampão SM contendo $\sim 8 \times 10^7$ UFP/mL de um coquetel composto por dois bacteriófagos (escolhidos pelas melhores atividades antibacteriana e antibiofilme em cepas multirresistentes) foram adicionados ao tubo. As extremidades do tubo foram seladas, e o sistema permaneceu em repouso por 20 h à temperatura ambiente. A seguir, o sistema foi lavado com tampão SM, com objetivo de remover os bacteriófagos não ligados à superfície do tubo. Dois fragmentos de 1 cm² foram removidos para avaliar a presença de bacteriófagos na superfície do tubo no início do cultivo (Tempo “zero”).

Os tubos foram então conectados na bomba peristáltica com três canais e alimentados com um fluxo contínuo (150 µL/min) de meio de cultura SCFM2 inoculado com 10^6 UFC/mL de *P. aeruginosa*, durante 24 h (Figura 13A). A partir de 24 h, o sistema foi alimentado somente com meio de cultura por até 168 h. Nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h, quatro fragmentos de 1 cm² foram retirados de cada tubo (Figura 13B) para a avaliação do número de UFC/cm² do tubo, a atividade respiratória (XTT) do biofilme formado, o aspecto do biofilme em MEV e a permanência dos bacteriófagos na parede do tubo. O ensaio foi realizado em triplicata. Como controle, utilizaram-se tubos endotraqueais sem bacteriófagos.

Figura 13: Sistema de formação de biofilme em fluxo contínuo. A) Alimentação dos tubos com meio de cultura SCFM2; B) Retirada dos fragmentos para avaliação do biofilme.

3.4.1.1 Avaliação do número de unidades formadoras de colônias

Os fragmentos referentes a cada período de análise ($n = 6$) foram transferidos para tubos de polipropileno com capacidade para 50 mL (Kasvi) contendo 10 mL de tampão PBS e pérolas de vidro. O conjunto foi levado a cuba ultrassônica por 20 minutos (200 W, 40 kHz) e posteriormente agitado por 1 minuto em agitador vórtex. Diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) da suspensão foram semeadas em meio de cultura Cetrimide (Difco) e incubadas por 24 h a 37°C. Decorrido o período de incubação o número de colônias foi registrado e o número de UFC/cm² foi determinado e expresso em log₁₀UFC/cm².

3.4.1.2 Avaliação da atividade respiratória

O ensaio de redução do XTT foi realizado conforme descrito na seção 3.3.2.2. Resumidamente, os fragmentos referentes a cada período de análise ($n = 6$) foram transferidos uma placa de 24 poços (TPP) contendo 1145,5 µL de PBS suplementado com 100 mM de glicose, 290 µL de XTT a 1 mg/mL e 14,5 µL de menadiona a 0,4 mM. As placas foram incubadas, protegidas da luz, a 37°C durante 2 h. A seguir a alteração colorimétrica foi registrada através de 3 leituras da suspensão a 492 nm utilizando um leitor de microplacas (Thermo Scientific). Foi considerada como “branco” a reação sem a presença dos espécimes.

3.4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

Um fragmento referente a cada período de análise foi observado por MEV. O fragmento foi fixado em glutaraldeído a 2,5% (v/v) por 2 horas, desidratado em série de etanol e analisado em microscópio eletrônico de varredura, conforme descrito na seção 3.3.2.3.

3.4.1.4 Permanência dos bacteriófagos na parede do tubo

A presença de bacteriófagos na superfície do tubo endotraqueal, em todos os tempos de análise, foi avaliada mediante a semeadura pela técnica de sobrecamada em ágar. Para preparo das placas, uma alíquota de 100 µL de *P. aeruginosa* (10^8 UFC/mL) foi adicionada a 3 mL de TSBS fundido a 45°C, e a mistura foi vertida em placa de Petri (60 × 15 mm) com 3 mL de TSA.

Os fragmentos obtidos no tempo “zero” foram transferidos para 10 mL de tampão SM e agitados em agitador vórtex por 1 minuto. Para os demais tempos de análise foi utilizada a suspensão aplicada na avaliação do número de UFC/cm². A seguir, 100 µL das suspensões obtidas em cada tempo foram transferidas para um microtubo contendo 850 µL de tampão SM. Adicionou-se 50 µL de clorofórmio, e agitou-se o tubo por 30 segundos. Diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁶) foram gotejadas sobre o TSBS, e as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Decorrido esse período, as placas de lise foram registradas e expressas em log₁₀UFP/cm².

3.5 QUARTA ETAPA

3.5.1 Influência dos bacteriófagos sobre os fatores de virulência de *P. aeruginosa*

Nesta etapa, buscou-se avaliar se a presença dos bacteriófagos influenciaria a expressão de fatores de virulência em culturas de *P. aeruginosa*. Os ensaios referentes a essa etapa foram realizados somente com a linhagem de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853. Foram avaliadas a capacidade de formação de biofilme e a produção de piocianina e proteases em culturas de *P. aeruginosa*, após o contato da bactéria com os bacteriófagos. Além disso, a expressão de genes relacionados ao mecanismo de *quorum sensing* (*lasI*), secreção de polissacarídeos (*pslA*), produção de proteases (*lasB* – elastase) e piocianina (*phzH*) foram avaliadas.

3.5.1.1 Inibição da formação de biofilme

Para avaliação da formação de biofilme, o ensaio foi realizado em placa de 96 poços preta com fundo de vidro (Corning) para avaliação por microscopia de fluorescência e em espécimes de tubo endotraqueal para visualização por MEV.

Para o preparo do inóculo, *P. aeruginosa* foi descongelada e incubada conforme protocolo descrito anteriormente. Para avaliação por microscopia de fluorescência, a cepa bacteriana (10⁶ UFC/mL) foi cocultivada com 6 × 10⁶ UFP/mL dos bacteriófagos em 200 µL de TSB, a 37°C, em atmosfera úmida, sob agitação de 75 rpm. Após 2, 8, 24 e 48 h o meio de cultura foi removido, os biofilmes foram lavados cuidadosamente com PBS e corados por 15 minutos, protegidos da luz, com o *kit* de viabilidade de biofilme LIVE / DEAD™, conforme protocolo descrito anteriormente. As placas foram escaneadas pelo microscópio confocal *Operetta CLS High Content* de acordo com os parâmetros definidos

na seção 3.3.2.4. Para avaliar a capacidade de formação de biofilme na presença dos bacteriófagos, a intensidade de fluorescência das imagens foi analisada, a partir da quantidade de células aderidas à superfície da placa. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando como controle tampão SM sem bacteriófagos.

Para avaliação por MEV espécimes de tubo endotraqueal foram posicionados no fundo da placa, e o cocultivo de *P. aeruginosa* com os bacteriófagos seguiu da mesma maneira descrita acima. Após 2, 8, 24 e 48 h os espécimes foram removidos, fixados, desidratados e analisados em microscópio eletrônico de varredura, conforme descrito na seção 3.3.2.3.

3.5.1.2 Produção de piocianina

Para quantificação da produção de piocianina, seguiu-se o método descrito por Tan et al. (2018). Inicialmente, 10^6 UFC/mL de *P. aeruginosa* foram cultivadas em 1,5 mL de caldo de produção de piocianina [2% de peptona (Sigma–Aldrich); 1% K_2SO_4 (Sigma–Aldrich); 0,3% $MgCl_2$ (Sigma–Aldrich)], em placas de cultura de 24 poços, na presença de 6×10^6 UFP/mL dos bacteriófagos. Amostras controles foram cultivadas com tampão SM sem bacteriófagos. A quantificação da produção de piocianina foi realizada após a extração do pigmento do sobrenadante das culturas. Após 2, 8, 24 e 48 h de cultivo, alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 12000 g por 15 minutos, em temperatura ambiente. A seguir, 500 μ L do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo e, em seguida, adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio. As amostras foram agitadas, vigorosamente, durante 30 segundos, com auxílio de um agitador de tubos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 g por 10 minutos, à temperatura ambiente, para separação das fases. A fase orgânica, com o pigmento verde (Figura 14A), foi transferida para outro microtubo e adicionada de 500 μ L de HCl a 0,2 M (Dinâmica Química Contemporânea LTDA., Indaiatuba, SP, Brasil), que realizou a mudança de cor da solução de verde para rosa (Figura 14B). A mistura foi agitada vigorosamente por 30 segundos e, após, submetida à centrifugação 4000 g por 5 minutos para separação das fases. Alíquota de 100 μ L da fase aquosa foi transferida para microplacas de 96 poços, e a leitura de absorbância foi realizada a 520 nm, com auxílio de um leitor de microplacas (Thermo Scientific). A média das alterações colorimétricas foi registrada. A concentração de piocianina em microgramas, produzida por mililitro do meio de cultura, foi calculada

multiplicando-se o valor da absorbância a 520 nm por 17,072 (coeficiente de extinção molar), segundo Essar et al. (1990).

Figura 14: Quantificação da produção de piocianina. A) Extração do pigmento com clorofórmio; B) Mudança de cor da solução após a adição de HCl.

3.5.1.3 Produção de proteases

Para quantificação da produção de proteases, 10^6 UFC/mL de *P. aeruginosa* foram cultivadas em 1,5 mL de TBS, em placas de cultura de 24 poços, na presença de 6×10^6 UFP/mL dos bacteriófagos. Amostras controles foram cultivadas com tampão SM sem bacteriófagos. A quantificação das proteases foi realizada por meio do *kit* fluorimétrico *EnzChek® Protease Assay* (Molecular Probes). Após 2, 8, 24 e 48 h de cultivo, alíquotas de 1 mL das suspensões foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 12000 g por 5 minutos, a 4°C. Alíquota de 100 µL do sobrenadante foi transferida para placa de cultura celular de 96 poços preta de fundo transparente (Thermo Scientific). A cada poço foram adicionados 100 µL da solução caseína diluída, previamente preparada a partir de 200 µL da solução de caseína estoque (1,0 mg/mL) e 19,8 mL do tampão de digestão (proporção de 1:20). A placa foi incubada em temperatura ambiente e protegida da luz durante 2 horas. Durante o período de incubação ocorre hidrólise catalisada por protease liberando peptídeos marcados com o corante BODIPY FL. Dessa maneira, a quantidade de fluorescência é proporcional à atividade da protease. Para leitura da fluorescência foi utilizado um leitor de microplacas (BioTek Instruments) com excitação de 485 nm e emissão em 538 nm. Como controle positivo foram utilizadas curvas padrão com diferentes concentrações de tripsina.

3.5.1.4 Expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão de genes relacionados ao mecanismo de *quorum sensing* (*lasI*), produção de proteases (*lasB*), síntese de polissacarídeos extracelulares (*pslA*) e piocianina (*phzH*) foi realizada por PCR quantitativo (*quantitative PCR* – qPCR) em parceria institucional com a Profa. Dra. Débora Cristina Coraça-Huber, coordenadora do *Biofilm–Infection Laboratory* na *Medical University of Innsbruck*, Áustria.

Para preparo das culturas, 10^6 UFC/mL de *P. aeruginosa* foram cultivadas em 5 mL de TBS, em placas de cultura de 6 poços, na presença de 6×10^6 UFP/mL dos bacteriófagos. Amostras controles foram cultivadas com tampão SM sem bacteriófagos. Após 2, 8, 24 e 48 h de cultivo, todo o volume presente no poço de cultura foi transferido para tubos de ensaio livres de DNase e RNase (Kasvi) e centrifugado a 7000 g, a 4°C durante 5 minutos. Ao *pellet* celular foi acrescentado 1 mL de Trizol (Sigma–Aldrich), seguindo sucessivas pipetagens e homogeneização da suspensão com um homogeneizador de tecidos (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, EUA) durante 20 segundos. O processo de homogeneização foi repetido 3 vezes, com intervalos de 2 minutos entre cada ciclo. Nesse período as amostras foram mantidas em gelo. Após homogeneização, foram adicionados 300 µL de clorofórmio (Sigma–Aldrich), e a mistura foi centrifugada a 12000 g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e o RNA foi precipitado com álcool isopropílico (Sigma–Aldrich) e novamente centrifugado. O RNA foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol a 75% (Sigma–Aldrich) e seco ao ar. Para qualificação e quantificação do RNA isolado, as amostras foram ressuspensas em 20 µL de água ultrapura tratada com pirocarbonato de dietila (DEPC) (Sigma–Aldrich) e avaliadas em espectrofotômetro, com leituras a 230, 260 e 280 nm. Os cDNAs totais foram sintetizados a partir de 1 µg de RNA total, utilizando o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação foi realizada em um termociclador (Amplitem, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

O processo de análise da expressão gênica envolveu algumas etapas de padronização, as quais são importantes para a confiabilidade do resultado. Primeiramente, a concentração ideal dos *primers* para a reação de qPCR foi avaliada. Reações contendo diferentes concentrações de *primers* (25 µM, 20 µM, 15 µM, 10 µM e 5 µM) foram conduzidas em triplicata. Para todos os *primers* foi selecionada a concentração de 10 µM, uma vez que essa concentração produziu elevados valores de fluorescência, sem a formação de dímeros. Além disso, diluições decimais seriadas de 1:10 a 1:1000 de cDNA foram

aplicadas para indicar a eficiência da qPCR. Foi verificado que as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referência estavam entre 90% e 104%. A ausência de dímeros foi avaliada por meio da ausência de picos intermediários na curva de dissociação.

Para quantificação da expressão gênica, 10 μ L de *IQ SYBR Green Supermix* (BioRad, Hercules, CA, EUA), 7 μ L de água livre de nucleases, 1 μ L de *primer forward* (Sigma–Aldrich), 1 μ L de *primer reverse* (Sigma–Aldrich) e 1 μ L de cDNA, totalizando 20 μ L, foram pipetados em uma microplaca de 96 poços (Thermo Scientific) (Figura 15A) específica para o sistema *Piko Real Real-time PCR* (Thermo Scientific) (Figura 15B). Como controle negativo, foram utilizadas reações sem cDNA. As reações foram realizadas da seguinte forma: um ciclo a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto, com uma análise da curva de dissociação (*melting curve*) com temperatura crescente de 65°C a 95°C e incrementos de 0,5°C a cada 5 segundos. As reações de qPCR foram realizadas em triplicata, e os valores do ciclo de detecção (*threshold cycle*) foram definidos como automáticos. As reações foram realizadas em triplicata em quatro amostras diferentes.

Figura 15: Reação de qPCR para avaliação da expressão de genes de virulência. A) Placa de PCR; B) Sistema *Piko Real Real-time PCR*.

As sequências iniciadoras (*primers*) e o tamanho do fragmento de cada gene avaliado são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências iniciadoras e tamanho dos fragmentos de amplificação dos genes envolvidos em *quorum sensing* e produção de elastase e piocianina.

Gene	Primer	Tamanho amplificação (pb)
<i>lasI</i>	GGCTGGGACGTTAGTGTCAT (<i>Forward</i>) AAAACCTGGGCTTCAGGAGT (<i>Reverse</i>)	104
<i>pslA</i>	TCCCTACCTCAGCAGCAAGCTGGT (<i>Forward</i>) CGGATGTCGTGGTTGCGTACCAGGTAT (<i>Reverse</i>)	198
<i>lasB</i>	AGACCGAGAATGACAAAGTGGA (<i>Forward</i>) GGTAGGAGACGTTGTAGACCAGTTG (<i>Reverse</i>)	81
<i>phzH</i>	TGCGCGAGTTCAGCCACCTG (<i>Forward</i>) TCCGGGACATAGTCGGCGCA (<i>Reverse</i>)	214
<i>rpsL</i> Constitutivo	GCAACTATCAACCAGCTGGTG (<i>Forward</i>) GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG (<i>Reverse</i>)	231

O método de quantificação relativa foi utilizado para comparar os resultados de qPCR. A média do ciclo de amplificação para cada gene alvo foi normalizada pela média do ciclo de amplificação do gene de referência amplificada a partir da amostra correspondente (ΔC_q). Os valores de $\Delta\Delta C_q$ foram calculados com base na diferença dos níveis de expressão das culturas com e sem bacteriófagos para cada ponto de tempo. Alterações na expressão gênica na presença dos bacteriófagos após 2, 8, 24 e 48 h de cultivo foram expressas por $2^{-\Delta\Delta C_q}$, estimando quantas vezes a expressão foi maior ou menor que o grupo sem bacteriófagos.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados oriundos da etapa 1 do projeto de pesquisa foram analisados mediante uma abordagem descritiva baseada em medida de tendência central e de dispersão (média e desvio padrão).

A partir da etapa 2, todas as variáveis referentes à densidade óptica, contagem de UFC/cm², absorbância, área recoberta por biofilme após o tratamento com os bacteriófagos, contagem de UFP/cm², quantidade de células aderidas, emissão de fluorescência e expressão gênica relativa foram categorizadas como quantitativas contínuas.

Foram consideradas as seguintes variáveis e fatores de variação:

- Efeito do pH sobre a estabilidade dos bacteriófagos (n = 9), em dois fatores de variação: bacteriófagos e pH (pH 3; pH 5; pH 7; pH 9; pH 11);
- Efeito da temperatura sobre a estabilidade dos bacteriófagos (n = 9), em dois fatores de variação: bacteriófagos e temperatura (37°C; 42°C; 50°C; 60°C; 70°C; 80°C);

- Atividade antibacteriana sobre células planctônicas ($n = 9$), em dois fatores de variação: bacteriófagos e as 15 diferentes cepas de *P. aeruginosa*;
- Atividade antibiofilme sobre biofilmes maduros ($n = 9$), em dois fatores de variação: bacteriófagos e as 15 diferentes cepas de *P. aeruginosa*;
- Influência dos bacteriófagos sobre o crescimento de biofilme “*in situ*” em tubos endotraqueais revestidos ($n = 3$), em dois fatores de variação: presença dos bacteriófagos na superfície do tubo e as 3 diferentes cepas de *P. aeruginosa*;
- Influência dos bacteriófagos sobre os fatores de virulência de *P. aeruginosa* ($n = 4$) com um fator de variação: cocultivo com os bacteriófagos.

Os dados foram avaliados quanto à adesão ou não à curva normal, pelo teste de Shapiro–Wilk, bem como a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. A área recoberta por biofilme após o tratamento com os bacteriófagos e a atividade antibiofilme de tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos apresentaram distribuição não normal e foram analisadas em um Modelo Linear Generalizado seguido pelo teste t. As variáveis relativas à influência dos bacteriófagos sobre os fatores de virulência de *P. aeruginosa* apresentaram distribuição não normal e foram analisadas pelo teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn. Todas as demais variáveis apresentaram distribuição normal e variância homogênea, e foram, portanto, analisadas por meio de ANOVA dois fatores seguido do teste de Tukey. Todas as múltiplas comparações foram realizadas com ajuste de Bonferroni.

Todos os testes estatísticos foram realizados por meio do *software* IBM SPSS 21.0 (IBM Corp., SPSS *Statistics for Windows*, Versão 21.0, Armonk, NY, EUA), seguindo um nível de significância de 0,05.

4. Resultados

4.1 PRIMEIRA ETAPA

4.1.1 Isolamento, propagação e purificação de bacteriófagos

Somente as coletas 2, 8, 9, 10 e 11 foram positivas para bacteriófagos contra *P. aeruginosa* ATCC 27853. Todas as amostras positivas foram também avaliadas quanto à capacidade de infecção do painel de *P. aeruginosa* composto por cepas multirresistentes (ATCC MP-23™). As cinco amostras foram capazes de infectar quatro das sete amostras que compõem o painel. Dessa maneira, a proposta inicial de selecionar bacteriófagos com capacidade de infectar *P. aeruginosa* resistente a diversas classes de antibióticos foi alcançada.

Foram coletadas cinco placas de lise, individuais, para cada amostra positiva, o que totalizou 25 placas de lise isoladas, propagadas e purificadas. A princípio, o nome de cada amostra foi definido como o número da coleta e o número da placa de lise, respectivamente. A figura 16 apresenta as características das placas de lise dos bacteriófagos isolados da coleta 2. O título dos bacteriófagos variou de 10^7 a 10^{10} UFP/mL. A Tabela 2 apresenta o título (UFP/mL) dos 25 bacteriófagos expandidos após 7 passagens consecutivas.

Figura 16: Placas de lise dos bacteriófagos isolados da coleta 2. A) Bacteriófago_2.1; B) Bacteriófago_2.2; C) Bacteriófago_2.3; D) Bacteriófago_2.4; E) Bacteriófago_2.5.

Tabela 2: Local de coleta e título, expresso em Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/mL) dos 25 bacteriófagos isolados.

Bacteriófago	Local de coleta	Título (UFP/mL)
1: Bacteriófago 2.1	<i>Coleta 2</i> Estação de Tratamento de Esgotos Ribeirão Preto / SP – Ambient Serviços Ambientais de Ribeirão Preto S/A	$1,40 \times 10^8$
2: Bacteriófago 2.2		$5,40 \times 10^7$
3: Bacteriófago 2.3		$7,60 \times 10^8$
4: Bacteriófago 2.4		$3,10 \times 10^{10}$
5: Bacteriófago 2.5		$9,70 \times 10^9$
6: Bacteriófago 8.1	<i>Coleta 8</i> Córrego Ribeirão Preto – Ribeirão Preto / SP	$1,20 \times 10^8$
7: Bacteriófago 8.2		$2,00 \times 10^8$
8: Bacteriófago 8.3		$1,68 \times 10^9$
9: Bacteriófago 8.4		$6,46 \times 10^9$
10: Bacteriófago 8.5		$3,19 \times 10^9$
11: Bacteriófago 9.1	<i>Coleta 9</i> Córrego dos Campos – Ribeirão Preto / SP	$2,40 \times 10^9$
12: Bacteriófago 9.2		$4,00 \times 10^7$
13: Bacteriófago 9.3		$3,00 \times 10^8$
14: Bacteriófago 9.4		$7,20 \times 10^8$
15: Bacteriófago 9.5		$1,00 \times 10^9$
16: Bacteriófago 10.1	<i>Coleta 10</i> Estação de Tratamento de Esgotos de Araxá / MG – ETE COPASA	$1,40 \times 10^8$
17: Bacteriófago 10.2		$1,20 \times 10^9$
18: Bacteriófago 10.3		$4,20 \times 10^8$
19: Bacteriófago 10.4		$5,20 \times 10^8$
20: Bacteriófago 10.5		$8,90 \times 10^9$
21: Bacteriófago 11.1	<i>Coleta 11</i> Estação de Tratamento de Esgotos de Araxá / MG – ETE COPASA	$3,25 \times 10^8$
22: Bacteriófago 11.2		$4,78 \times 10^8$
23: Bacteriófago 11.3		$1,2 \times 10^8$
24: Bacteriófago 11.4		$1,00 \times 10^9$
25: Bacteriófago 11.5		$9,20 \times 10^8$

4.1.2 Caracterização genômica dos bacteriófagos

A extração do material genético dos 25 bacteriófagos apresentou rendimento suficiente para todas as etapas da caracterização genômica. A Tabela 3 apresenta a concentração de DNA obtida após quantificação em espectrofotômetro a 260 nm, bem como a razão da leitura em 260 nm pela leitura em 280 nm, indicativa de contaminação proteica. A figura 17 refere-se ao gel de agarose obtido após a extração do material genético das 25 amostras.

Tabela 3: Concentração (ng/ μ L) e razão 260/280 nm do material genético dos bacteriófagos.

	Amostra	Concentração ng/ μ L	Razão 260/280
1	Bacteriófago 2.1	159,2	1,7
2	Bacteriófago 2.2	68,6	1,6
3	Bacteriófago 2.3	64,5	1,7
4	Bacteriófago 2.4	88,5	1,5
5	Bacteriófago 2.5	91,4	1,5
6	Bacteriófago 8.1	19,1	1,7
7	Bacteriófago 8.2	205,3	1,6
8	Bacteriófago 8.3	62,9	1,6
9	Bacteriófago 8.4	75,7	1,7
10	Bacteriófago 8.5	53,4	1,9
11	Bacteriófago 9.1	93,5	1,8
12	Bacteriófago 9.2	56,1	1,7
13	Bacteriófago 9.3	83,8	1,6
14	Bacteriófago 9.4	191,8	1,8
15	Bacteriófago 9.5	397,2	1,7
16	Bacteriófago 10.1	54,6	1,8
17	Bacteriófago 10.2	143,6	1,7
18	Bacteriófago 10.3	91,5	1,9
19	Bacteriófago 10.4	41,9	2,0
20	Bacteriófago 10.5	200,1	1,8
21	Bacteriófago 11.1	102,7	1,7
22	Bacteriófago 11.2	89,7	1,6
23	Bacteriófago 11.3	134,3	1,3
24	Bacteriófago 11.4	193,0	1,6
25	Bacteriófago 11.5	14,0	1,9

Figura 17: Amostras do material genético dos bacteriófagos 1 a 25 em gel de agarose, após extração.

Todos os vírus isolados apresentaram ácido desoxirribonucleico (DNA) como constituinte do material genético. Essa característica já era esperada, uma vez que a literatura mostra que 96% de todos os bacteriófagos já reportados apresentam cadeia dupla de DNA (dsDNA) como material genético constituinte (MELO; SILLANKORVA; AZEREDO, 2012). A figura 18 refere-se ao gel de agarose após tratamento com DNase.

Figura 18: Amostras de material genético dos bacteriófagos 1 a 25 em gel de agarose, após tratamento com DNase.

A amplificação do gene 16S do rRNA de *P. aeruginosa*, por PCR convencional, mostrou que não havia DNA bacteriano contaminante, nas amostras de DNA viral, após a extração do material genético (Figura 19). Foi utilizado como controle positivo para a PCR o DNA da linhagem de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Figura 19: Amplificação do gene 16S do rRNA de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.1.3 Sequenciamento do material genético dos bacteriófagos e análises de bioinformática

O sequenciamento na plataforma *Illumina MiSeq* foi realizado em 151 ciclos, produzindo 157 Mbp e cobertura de 100×. O *score* de qualidade > Q30 englobou 95% das amostras no sequenciamento. Devido à quantidade de amostras e volume de dados gerados, as sequências das amostras foram, inicialmente, comparadas entre si pela ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Para as etapas adicionais do projeto de pesquisa foram selecionados os 5 bacteriófagos mais distintos entre si. Foram selecionados: bacteriófago 2.1, bacteriófago 2.2, bacteriófago 2.3, bacteriófago 10.3 e bacteriófago 11.5.

A análise genômica dos 5 bacteriófagos selecionados revelou que eles são vírus de DNA de fita dupla, pertencente à ordem Caudovirales e família Myoviridae. Após essa definição, o nome de bacteriófago 2.1, bacteriófago 2.2, bacteriófago 2.3, bacteriófago 10.3 e bacteriófago 11.5, inicialmente atribuído a cada amostra, foi alterado seguindo regras internacionais para nomenclatura dos vírus. Após a alteração, os 5 bacteriófagos foram chamados de: vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3, vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25, respectivamente. A sequência completa do genoma de cada bacteriófago foi depositada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob os números de acesso MT491204 – MT491208.

O genoma do bacteriófago vB_PaeM_USP_1 consiste em 65.918 pb de dsDNA com um conteúdo de guanina/citosina (GC) de 55,58%. A análise de todas as regiões CDSs resultou na predição de 87 genes. O tamanho dos genes variou de 141 a 3108 pb, ocupando 90% do genoma do vírus.

O genoma do bacteriófago vB_PaeM_USP_2 consiste em 65.606 pb de dsDNA com um conteúdo de GC de 55,45%. A análise de todas as regiões CDSs resultou na predição de 86 genes. O tamanho dos genes variou de 141 a 3108 pb, ocupando 90,5% do genoma do vírus.

O genoma do bacteriófago vB_PaeM_USP_3 consiste em 65.567 pb de dsDNA com um conteúdo de GC de 55,52%. A análise de todas as regiões CDSs resultou na predição de 89 genes. O tamanho dos genes variou de 123 a 3111 pb, ocupando 91% do genoma do vírus.

O genoma do bacteriófago vB_PaeM_USP_18 consiste em 63.030 pb de dsDNA com um conteúdo de GC de 63,71%. A análise de todas as regiões CDSs resultou na predição de 65 genes. O tamanho dos genes variou de 123 a 14044 pb, ocupando 94% do genoma do vírus.

O genoma do bacteriófago vB_PaeM_USP_25 consiste em 62.537 pb de dsDNA com um conteúdo de GC de 63,6%. A análise de todas as regiões CDSs resultou na predição de 66 genes. O tamanho dos genes variou de 129 a 14700 pb, ocupando 94% do genoma do vírus.

Não foram encontrados genes candidatos à codificação de tRNAs. Comparando o genoma das 5 amostras entre si, foram definidos dois subgrupos diferentes de bacteriófagos. O primeiro, composto por vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3, apresenta tamanhos de genoma semelhantes (aproximadamente 65 Kb), conteúdo de GC (aproximadamente 55,5%), alta identidade de nucleotídeos (94,6%) e homologia proteica (compartilhando 83 proteínas homólogas) com aproximadamente 62% das proteínas com função desconhecida (Figura 20A). Apesar da semelhança, apresentam algumas diferenças no início (0 – 5Kb) e no final de seu genoma (53 Kb – final) (Figura 20B). Seus genomas compartilham alta identidade nucleotídica com outros bacteriófagos de *P. aeruginosa* membros do gênero *Pbunavirus*, dentre eles os vírus Pa193, Epa22, vB_PaeM_PAO1_Ab27 e BrSP1 com identidades acima de 96% e coberturas de até 98%.

Figura 20: Comparação dos genomas dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3. A) Representação do genoma (Preto: proteínas hipotéticas; Verde: proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA; Azul: proteínas envolvidas no empacotamento e morfogênese do DNA; Vermelho: proteínas envolvidas na lise celular). A linha azul representa o conteúdo de GC (%). B) Diferenças do genoma dos bacteriófagos.

O segundo subgroupo, composto por vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25, possui uma identidade de nucleotídeos de 97,1% e compartilha 65 proteínas homólogas, das quais 74% não têm função atribuída (Figura 21A). Uma homologia ligeiramente mais baixa é observada nas regiões genômicas 3 Kb – 4.5 Kb, 12.5 Kb – 14 Kb e principalmente entre 39 Kb – 46.5 Kb (Figura 21B). A baixa similaridade com genomas de outros bacteriófagos depositados no NCBI não permite agrupar esses bacteriófagos com nenhum gênero ou subfamília conhecida.

Figura 21: Comparação dos genomas dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25. A) Representação do genoma (Preto: proteínas hipotéticas; Verde: proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA; Azul: proteínas envolvidas no empacotamento e morfogênese do DNA; Vermelho: proteínas envolvidas na lise celular). A linha azul representa o conteúdo de GC (%). B) Diferenças do genoma dos bacteriófagos.

As propriedades genômicas gerais dos cinco bacteriófagos estão apresentadas na Tabela 4. A análise do genoma revelou que os 5 bacteriófagos são potencialmente virulentos, pois não codificam para nenhuma proteína conhecida associada à lisogenia. Além disso, não foram identificadas proteínas tóxicas ou associadas à virulência, revelando que os bacteriófagos isolados são potencialmente seguros para fins terapêuticos.

Tabela 4: Características genômicas dos bacteriófagos isolados.

Bacteriófago	Número de acesso do genoma completo	Tamanho do genoma (bp)	GC%	CDSs	Proteínas desconhecidas	Gênero
vB_PaeM_USP_1	MT491204	65.918	55,6	87	54	<i>Pbunavirus</i>
vB_PaeM_USP_2	MT491205	65.606	55,5	86	53	<i>Pbunavirus</i>
vB_PaeM_USP_3	MT491206	65.567	55,5	89	56	<i>Pbunavirus</i>
vB_PaeM_USP_18	MT491207	63.030	63,7	65	48	Desconhecido
vB_PaeM_USP_25	MT491208	62.537	63,6	66	49	Desconhecido

4.1.4 Caracterização morfológica microscópica

Os 5 bacteriófagos foram capazes de formar placas claras, com limites bem definidos com tamanho variando de 0,8 a 2,4 mm. Observou-se que nenhum dos bacteriófagos produziu halo duplo, e não foi possível diferenciar as placas de lise entre os diferentes bacteriófagos isolados (Figura 22A I–V). A análise morfológica confirmou que os vírus são pertencentes à ordem Caudovirales. Todos os 5 diferentes bacteriófagos apresentam uma cabeça isométrica de cerca de 60 nm de comprimento e uma cauda de cerca de 140 nm de comprimento e 15 nm de espessura (Figura 22B I–V). A figura 22C I–V apresenta as principais diferenças entre os vírus.

Figura 22: Caracterização dos bacteriófagos isolados. AI – AV) Placas de lise; BI – BV) Fotomicrografias eletrônica de transmissão após coloração com acetato de uranila (2%). Barra de escala = 100 nm. CI – CV) Características morfológicas das placas de lise e dos vírus.

vB_PaeM_USP_1			<p>Características das placas de lise C-I</p> <p>Placas de lise com bordas definidas Tamanho das placas de lise: 0,8 – 1,8 mm</p> <p>Morfologia do bacteriófago Formato da cabeça: Isométrica Comprimento da cabeça: 58 ± 3 nm Comprimento da cauda: 140 ± 8 nm Espessura da cauda: 13 ± 1 nm</p>
vB_PaeM_USP_2			<p>Características das placas de lise C-II</p> <p>Placas de lise com bordas definidas Tamanho das placas de lise: 0,8 – 1,9 mm</p> <p>Morfologia do bacteriófago Formato da cabeça: Isométrica Comprimento da cabeça: 55 ± 4 nm Comprimento da cauda: 142 ± 6 nm Espessura da cauda: 14 ± 2 nm</p>
vB_PaeM_USP_3			<p>Características das placas de lise C-III</p> <p>Placas de lise com bordas definidas Tamanho das placas de lise: 0,8 – 2,0 mm</p> <p>Morfologia do bacteriófago Formato da cabeça: Isométrica Comprimento da cabeça: 54 ± 3 nm Comprimento da cauda: 132 ± 14 nm Espessura da cauda: 12 ± 2 nm</p>
vB_PaeM_USP_18			<p>Características das placas de lise C-IV</p> <p>Placas de lise com bordas definidas Tamanho das placas de lise: 0,8 – 2,1 mm</p> <p>Morfologia do bacteriófago Formato da cabeça: Isométrica Comprimento da cabeça: 66 ± 6 nm Comprimento da cauda: 136 ± 12 nm Espessura da cauda: 19 ± 2 nm</p>
vB_PaeM_USP_25			<p>Características das placas de lise C-V</p> <p>Placas de lise com bordas definidas Tamanho das placas de lise: 0,9 – 2,4 mm</p> <p>Morfologia do bacteriófago Formato da cabeça: Isométrica Comprimento da cabeça: 54 ± 7 nm Comprimento da cauda: 141 ± 10 nm Espessura da cauda: 17 ± 2 nm</p>

4.1.5 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade dos bacteriófagos

Ao avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade dos bacteriófagos, foi verificado que os valores extremos (pH 3 e pH 11) causaram uma redução no crescimento dos vírus ($p < 0,05$), após duas horas de exposição. O pH neutro (7,0) e pequenas variações do potencial hidrogeniônico (pH 5,0 e pH 9,0) não causaram alterações no crescimento (Figura 23A). Os bacteriófagos vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3 foram os mais resistentes à variação do pH. A média e desvio padrão ($\log_{10}$ UFP/mL) para cada vírus, após exposição aos diferentes valores de pH, são apresentados no apêndice A.

A respeito do efeito da temperatura sobre a estabilidade dos bacteriófagos, evidenciou-se uma redução no crescimento quando os vírus foram expostos às temperaturas de 70°C e 80°C, por um período de duas horas. A redução do crescimento foi gradual até atingir ausência de crescimento para os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3 na temperatura de 80°C (Figura 23B). O bacteriófago vB_PaeM_USP_25 foi o mais resistente à variação da temperatura. O apêndice B apresenta a média e desvio padrão ($\log_{10}$ UFP/mL) para cada vírus após exposição às diferentes temperaturas.

Figura 23: Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a estabilidade dos bacteriófagos.

4.1.6 Avaliação da especificidade de hospedeiros e atividade lítica dos bacteriófagos

No total, 37 cepas foram investigadas quanto à suscetibilidade à infecção pelos bacteriófagos. Foi observado que a infecção é restrita ao gênero *Pseudomonas*, uma vez que as espécies *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis* não sofreram lise após cultivo com os vírus. Todos os 5 bacteriófagos foram capazes de infectar 69,7% ($n = 23$) das amostras de *P. aeruginosa*, as

quais foram isoladas a partir de diferentes locais de infecção. Dez cepas positivas para infecção pelos bacteriófagos foram consideradas como multirresistentes. Nas cepas susceptíveis à infecção foram observadas zonas claras sem crescimento, denominadas placas de lise, após o cultivo das cepas com os bacteriófagos (Figura 24A). Os bacteriófagos não apresentaram atividade lítica sobre 29,4% ($n = 10$) das cepas de *P. aeruginosa*, observada por meio da ausência de placas de lise (Figura 24B). O espectro lítico dos 5 bacteriófagos é apresentado na Tabela 5.

Figura 24: Atividade lítica dos bacteriófagos. A) Presença de placas de lise em cultura de *P. aeruginosa*; B) Ausência de placas de lise.

Tabela 5: Espectro lítico dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3, vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25.

Isolados Clínicos e Cepas ATCC	Fonte de isolamento	Perfil de susceptibilidade aos antibióticos	Bacteriófagos				
			vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25
Sa_ATCC 6538			–	–	–	–	–
Ec_ATCC 25927			–	–	–	–	–
Ef_ATCC 29212			–	–	–	–	–
Pa_ATCC 27853	Sangue	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_ATCC 2108	Escarro	Resistente a: AMK, CFZ, CTX, GEN, IMP, TGC	+	+	+	+	+
Pa_ATCC 2109	Escarro	Resistente a: AMK, CFZ, TGC	–	–	–	–	–
Pa_ATCC 2110	Escarro	Resistente a: AMP, CFZ, CTX, FOX, NIT, TGC, SXT	+	+	+	+	+
Pa_ATCC 2111	Escarro	Resistente a: AMC, AMP, CFZ, CPD, CRO, CTX, CXM, FOX, NIT, TET, TGC, SXT	–	–	–	–	–
Pa_ATCC 2112	Escarro	Resistente a: AMC, AMP, CFZ, CPD, CRO, CTX, CXM, FOX, NIT, TET, TGC, SXT	+	+	+	+	+
Pa_ATCC 2113	Escarro	Resistente a: AMP, AMC, CFZ, CTX, NIT, SAM, SXT	+	+	+	+	+
Pa_ATCC 2114	Escarro	Resistente a: AMP, AMC, CFZ, CTX, NIT, SAM, TZP, SXT	–	–	–	–	–
Pa_Ba_3	Biofilme de Prótese total	Sensível a todos os antibióticos testados	–	–	–	–	–
Pa_Ba_129	Biofilme de Prótese total	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Ba_130	Biofilme de Prótese total	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Ba_164	Biofilme de Prótese total	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Ba_168	Biofilme de Prótese total	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Ba_169	Biofilme de Prótese total	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Ba_286	Biofilme de Prótese total	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Fe_39	Saliva	Sensível a todos os antibióticos testados	–	–	–	–	–
Pa_Mi_1	Sangue	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Mi_2	Escarro	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Mi_3	Urina	Resistente a: CIP, GEN, IMP, LVX	+	+	+	+	+
Pa_Mi_4	Urina	Sensível a todos os antibióticos testados	–	–	–	–	–
Pa_Mi_5	Escarro	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Mi_6	Urina	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Mi_7	Escarro	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Trac_3	Secreção traqueal	Sensível a todos os antibióticos testados	–	–	–	–	–
Pa_Trac_4	Secreção traqueal	Sensível a todos os antibióticos testados	–	–	–	–	–
Pa_Trac_5	Secreção traqueal	Resistente a: AMK, FEP, CIP, GEN, IMP, LVX, MEM	–	–	–	–	–
Pa_Trac_14	Secreção traqueal	Resistente a: AMK, CIP, IMP, LVX, MEM	+	+	+	+	+
Pa_Trac_20	Secreção traqueal	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Trac_22	Secreção traqueal	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Trac_23	Secreção traqueal	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Trac_27	Secreção traqueal	Resistente a: AMK, CIP, GEN, IMP, LVX, MEM	+	+	+	+	+
Pa_Trac_31	Secreção traqueal	Sensível a todos os antibióticos testados	–	–	–	–	–
Pa_Ren_1	Saliva	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+
Pa_Gus_B2	Sangue	Sensível a todos os antibióticos testados	+	+	+	+	+

AMC: Amoxicilina-ácido clavulânico; AMK: Amicacina; AMP: Ampicilina; CFZ: Cefazolina; CIP: Ciprofloxacina; CPD: Cefpodoxima; CRO: Ceftriaxona; CTX: Cefotaxima; CXM: Cefuroxima; FEP: Cefepima; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IMP: Imipenem; LVX: Levofloxacina; MEM: Meropenem; NIT: Nitrofurantoina; SAM: Ampicilina-sulbactam; SXT: Trimetoprim-sulfametoxazol; TET: Tetraciclina; TGC: Tigeciclina; TZP: Piperacilina-tazobactam. +: Indica presença de placa de lise; –: Indica ausência de placa de lise.

4.1.7 Curva de crescimento dos bacteriófagos

Todos os bacteriófagos apresentaram um curto período de latência. Após 5 minutos de contato, foi detectada infecção de *P. aeruginosa*, confirmada por meio de lise das bactérias com clorofórmio. Decorridos de 25 a 30 minutos do início da infecção, verificou-se o aumento exponencial do número de vírus. O *burst size* ocorreu por volta de 50 minutos de incubação, quando foi observado uma estabilização da produção de bacteriófagos (Figura 25). A quantidade de vírus produzidos / célula bacteriana infectada, no *burst size*, variou de 22,70 a 46,60. Os valores correspondentes à taxa de infecção no tempo “zero”, tempo do *burst size* e bacteriófagos livres no tempo de crescimento exponencial, são apresentados na Tabela 6.

Figura 25: Curva de crescimento dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3, vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25.

Tabela 6: Número de *P. aeruginosa* infectadas, no tempo “zero”, tempo do *burst size* (minutos) e bacteriófagos livres no tempo de crescimento exponencial (UFP/mL).

Bacteriófago	<i>P. aeruginosa</i> infectadas no tempo “zero”	Período de latência	Bacteriófagos livres no <i>burst size</i> (Bacteriófagos/célula)
vB_PaeM_USP_1	0,80 × 10 ⁶ *	25 minutos	23 × 10 ⁶ (28,75)
vB_PaeM_USP_2	0,30 × 10 ⁶ *	30 minutos	14 × 10 ⁶ (46,60)
vB_PaeM_USP_3	0,18 × 10 ⁶ *	30 minutos	5 × 10 ⁶ (27,77)
vB_PaeM_USP_18	2,20 × 10 ⁶ *	30 minutos	50 × 10 ⁶ (22,70)
vB_PaeM_USP_25	1,40 × 10 ⁶ *	30 minutos	49 × 10 ⁶ (35,00)

* O número de *P. aeruginosa* infectadas foi calculado a partir do número de UFP/mL, segundo distribuição de Poisson.

4.2.8 Eficiência de plaqueamento

A EOP foi determinada para as 23 cepas de *P. aeruginosa* positivas para a atividade lítica dos bacteriófagos. A EOP foi definida como alta, baixa e ineficiente de acordo com uma taxa de infecção de > 1 , $0,1$ a 1 e $< 0,1\%$, respectivamente, e está apresentada na Tabela 7. As EOP dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1 (Alta: 13; Insuficiente: 6; Baixa: 4), vB_PaeM_USP_2 (Alta: 14; Insuficiente: 6; Baixa: 3) e vB_PaeM_USP_3 (Alta: 13; Insuficiente: 7; Baixa: 3) foram maiores do que os bacteriófagos vB_PaeM_USP_18 (Alta: 8; Insuficiente: 11; Baixa: 4) e vB_PaeM_USP_25 (Alta: 6; Insuficiente: 11; Baixa: 6). Os dois últimos vírus tiveram EOP baixa ou ineficiente para todas as cepas multirresistentes. Embora, durante a investigação da especificidade de hospedeiros, os bacteriófagos tenham lisado as mesmas cepas, os resultados ineficientes de EOP indicam que os halos observados anteriormente podem referir-se ao fenômeno “*lysis from without*”.

Tabela 7: Eficiência de plaqueamento das 24 cepas de *P. aeruginosa* positivas para infecção com os bacteriófagos.

Isolados Clínicos ATCC	Bacteriófagos				
	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25
Pa_ATCC 2108*	Alta	Alta	Alta	Ineficiente	Ineficiente
Pa_ATCC 2110*	Baixa	Alta	Alta	Baixa	Baixa
Pa_ATCC 2112*	Alta	Alta	Alta	Baixa	Baixa
Pa_ATCC 2113*	Alta	Alta	Baixa	Ineficiente	Ineficiente
Pa_Ba_129	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente
Pa_Ba_130	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente
Pa_Ba_164	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Pa_Ba_168	Baixa	Alta	Alta	Alta	Alta
Pa_Ba_169	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Pa_Ba_286	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente
Pa_Mi_1	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
Pa_Mi_2	Alta	Baixa	Alta	Alta	Baixa
Pa_Mi_3*	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente
Pa_Mi_5	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente
Pa_Mi_6	Alta	Baixa	Baixa	Alta	Alta
Pa_Mi_7	Baixa	Alta	Alta	Alta	Baixa
Pa_Trac_14*	Alta	Alta	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente
Pa_Trac_20	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Pa_Trac_22	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente	Ineficiente
Pa_Trac_23	Alta	Alta	Alta	Baixa	Baixa
Pa_Trac_27*	Alta	Alta	Alta	Ineficiente	Ineficiente
Pa_Ren_1	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Pa_Gus_B2	Alta	Alta	Alta	Ineficiente	Ineficiente

* Cepas Multirresistentes. A característica de multirresistência foi definida como não suscetibilidade adquirida a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

4.2 SEGUNDA ETAPA

4.2.1 Atividade antibacteriana sobre células planctônicas

Baseado nos valores mais elevados de EOP, foram selecionadas 10 amostras clínicas (Pa_Mi_1, Pa_Mi_2, Pa_Mi_6, Pa_Mi_7, Pa_Ba_164, Pa_Ba_168, Pa_Ba_169, Pa_Trac_20, Pa_Trac_23 e Pa_Ren_1) e as linhagens de *P. aeruginosa* ATCC (27853, 2108, 2110, 2112 e 2113), totalizando 15 cepas, para a condução dos ensaios referentes à atividade dos bacteriófagos contra células planctônicas. A leitura da densidade óptica, a 600 nm, após 2, 4, 6, 8 e 24 h de incubação das cepas com os vírus indicou que todos os bacteriófagos foram capazes de alterar o crescimento das bactérias na forma planctônica ($p < 0,05$).

Comparando-se os valores médios da densidade óptica dos grupos tratados com os bacteriófagos em relação ao controle (sem tratamento), observou-se redução do crescimento bacteriano, até 8 h de incubação, em 12 das 15 cepas (Pa_Mi_1, Pa_Mi_2, Pa_Mi_6, Pa_Mi_7, Pa_Ba_164, Pa_Ba_168, Pa_Ba_169, Pa_Trac_20, Pa_Trac_23, Pa_Ren_1, Pa_ATCC 27853, Pa_ATCC 2113) ($p < 0,05$). A redução do crescimento foi acima de 60% após 6 e 8 h de incubação.

Analisando a redução do crescimento após 24 h de incubação, das 12 cepas com redução inicial, apenas 2 cepas (Pa_Mi_1 e Pa_Mi_2) mantiveram redução de 45% nos valores de densidade óptica para todos os bacteriófagos ($p < 0,05$). Outras 5 cepas apresentaram redução para diferentes combinações de bacteriófagos ($p < 0,05$), sendo: 1 cepa (Pa_Ren_1) com redução do crescimento para os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1 e vB_PaeM_USP_2; 3 cepas (Pa_Ba_164, Pa_Ba_168 e Pa_Ba_169) com redução do crescimento para os bacteriófagos vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3, vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25 e 1 cepa (Pa_Mi_6) com redução do crescimento para os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3 e vB_PaeM_USP_18. Cinco cepas, com redução inicial (Pa_Mi_7, Pa_Trac_20, Pa_Trac_23, Pa_ATCC 27853 14, Pa_ATCC 2113), não apresentaram redução do crescimento após 24 h de cultivo. A cepa Pa_ATCC 2112 apresentou redução do crescimento após 6, 8 e 24 h para os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3 ($p < 0,05$), sendo os bacteriófagos vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25 inefetivos em todos os tempos avaliados. Nenhum dos bacteriófagos alterou o crescimento das cepas Pa_ATCC 2108 e Pa_ATCC 2110, as quais foram caracterizadas como cepas multirresistentes.

Comparando-se as cepas entre si, diante dos maiores valores de média, nos 5 tempos de avaliação do crescimento na presença dos bacteriófagos, as cepas Pa_Mi_6, Pa_Ba_168,

Pa_Trac_20 e Pa_ATCC 2108 foram classificadas como aquelas mais resistentes à infecção pelos vírus. Comparando-se os bacteriófagos entre si, diante dos menores valores de média, nos 5 tempos de avaliação do crescimento das 15 cepas, os vírus vB_PaeM_USP_1 e vB_PaeM_USP_3 foram aqueles que promoveram maior redução do crescimento.

A figura 26 ilustra os valores da densidade óptica das 15 diferentes cepas, após 2, 4, 6, 8 e 24 horas de cultivo na presença dos 5 diferentes bacteriófagos e grupo controle. Os valores individuais de média e desvio padrão para cada cepa e tempo de incubação são apresentados nos apêndices C, D, E, F e G.

Figura 26: Densidade óptica após 2, 4, 6, 8 e 24 horas de cultivo de *P. aeruginosa* na presença dos bacteriófagos.

4.2.2 Atividade antibiofilme sobre biofilmes maduros

A atividade dos 5 bacteriófagos foi avaliada contra 15 cepas formadoras de biofilmes maduros (48 h de crescimento), que foram selecionadas em decorrência da eficiência de plaqueamento dos vírus. Comparando-se os valores médios de UFC/cm² dos grupos tratados, em relação ao controle (sem tratamento), observou-se redução do número de UFC/cm² em 12 cepas diferentes de *P. aeruginosa* ($p < 0,05$) para todos os bacteriófagos. Embora a cepa Pa_Trac_20 tenha reduzido 5,2 vezes ($\log_{10}\text{UFC/cm}^2 = 0,52$) o número de UFC/cm² após o tratamento com o vB_PaeM_USP_3, a diferença não foi estatisticamente significativa. No entanto, essa cepa apresentou redução do número de UFC/cm² para os demais bacteriófagos. O mesmo foi observado para a cepa Pa_Ren_1, na qual ocorreu uma redução de 5,7 ($\log_{10}\text{UFC/cm}^2 = 0,57$), 4,6 ($\log_{10}\text{UFC/cm}^2 = 0,46$) e 2,1 ($\log_{10}\text{UFC/cm}^2 = 0,21$) após o tratamento com os bacteriófagos vB_PaeM_USP_2, vB_PaeM_USP_3 e vB_PaeM_USP_18, respectivamente, porém a diferença não foi estatisticamente significativa. Nessa cepa houve redução do número de UFC/cm² somente após o tratamento com os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1 e vB_PaeM_USP_25. Apenas o biofilme formado pela cepa Pa_ATCC 2108, considerada multirresistente, não apresentou redução do crescimento após tratamento com os 5 diferentes bacteriófagos.

Comparando-se as cepas entre si, os maiores valores de média de UFC/cm² foram observados para as cepas Pa_Ba_168, Pa_Ba_169, Pa_ATCC 27853 e Pa_ATCC 2108. Comparando-se os bacteriófagos entre si, poucas diferenças foram encontradas. O bacteriófago vB_PaeM_USP_2 causou maior redução do número de UFC/cm² no biofilme formado por Pa_Mi_2 e Pa_ATCC 2112. O bacteriófago vB_PaeM_USP_18 causou maior redução do número de UFC/mL no biofilme formado por Pa_ATCC 2108. Esse resultado indica que os bacteriófagos vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_18 tiveram maior ação sobre as cepas multirresistentes. O bacteriófago vB_PaeM_USP_25 causou maior redução do número de UFC/cm² no biofilme formado por Pa_Ren_1 e Pa_ATCC 27853.

Com relação aos valores de absorbância, para avaliação da atividade respiratória (XTT), os valores médios dos grupos tratados com bacteriófagos, em relação ao controle (sem tratamento), foram menores em 11 das 15 cepas ($p < 0,05$). Dentre elas, as cepas Pa_Mi_7, Pa_Ba_164, Pa_Ba_168, Pa_ATCC 2110 e Pa_ATCC 2113 apresentaram menores valores de absorbância para todos os bacteriófagos. Vale ressaltar que as cepas Pa_ATCC 2110 e Pa_ATCC 2113 são consideradas multirresistentes. A cepa Pa_Mi_2 apresentou valor de absorbância semelhante ao controle, após tratamento com o bacteriófago vB_PaeM_USP_18, no entanto, houve redução dos valores de absorbância após o tratamento com os demais bacteriófagos. A

cepa Pa_Mi_3 apresentou menor valor de absorvância após o tratamento com os bacteriófagos vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25. A cepa Pa_Trac_20 apresentou menor valor de absorvância após o tratamento com os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_3 e vB_PaeM_USP_25. A cepa Pa_Trac_23 apresentou menor valor de absorvância após o tratamento com os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3. As cepas Pa_ATCC 2108 e Pa_ATCC 2113 apresentaram menor valor de absorvância após o tratamento com os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_25. As cepas Pa_Mi_1, Pa_Ba_169, Pa_Ren_1 e Pa_ATCC 27853 não apresentaram diferenças nos valores de absorvância.

Comparando-se as cepas entre si, os maiores valores de média de absorvância foram observados para as cepas Pa_Mi_6 e Pa_Trac_23. Comparando-se os bacteriófagos entre si, os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_25 causaram a maior redução nos valores de absorvância.

A figura 27 ilustra os valores de UFC/cm² e absorvância após o tratamento com os bacteriófagos. Os valores de média e desvio padrão para ambas as variáveis, após o tratamento dos biofilmes com os 5 diferentes bacteriófagos e grupo controle, são apresentados nos apêndices H e I, respectivamente.

Figura 27: Viabilidade ($\log_{10}$ UFC/cm²) e atividade respiratória (absorvância 492 nm) de diferentes isolados de *P. aeruginosa* após o tratamento com os bacteriófagos.

As micrografias obtidas por MEV mostraram uma densa camada de bactérias associadas ao controle (Figura 28A). Por outro lado, após a exposição aos bacteriófagos, foi possível observar uma notável redução do biofilme além de detritos celulares (Figura 28 B–F).

Figura 28: Micrografia eletrônica de varredura após tratamento do biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 27853 com os bacteriófagos. A) Controle; B) vB_PaeM_USP_1; C) vB_PaeM_USP_2; D) vB_PaeM_USP_3; E) vB_PaeM_USP_18; F) vB_PaeM_USP_25. Barra de escala = 10 μ m.

A avaliação da área recoberta por biofilmes indicou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com bacteriófagos e o grupo controle. As cepas Pa_Ba_164, Pa_ATCC 2112 e Pa_ATCC 2113 apresentaram redução significativa após o tratamento com os cinco diferentes bacteriófagos. A cepa Pa_ATCC 2108 apresentou redução significativa após o tratamento com os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_3 e vB_PaeM_USP_25. Embora tenha sido observada redução evidente na taxa de biofilme remanescente das cepas Pa_Mi_2, Pa_Ba_168, Pa_Ba_169 e Pa_ATCC 2110, a diferença com o grupo controle não foi estatisticamente significativa.

Comparando-se as cepas entre si, foi possível observar uma grande redução da taxa de biofilme remanescente para as cepas multirresistentes. Comparando-se os bacteriófagos entre si, não foram observadas diferenças significativas entre os 5 diferentes vírus (Figura 29). Imagens de microscopia de fluorescência são apresentadas na figura 30, ilustrando o grupo controle e a ação dos bacteriófagos na cepa Pa_Mi_1.

Os valores de mediana e intervalo de confiança para cada cepa, após o tratamento dos biofilmes com os 5 diferentes bacteriófagos e grupo controle, são apresentados no apêndice J.

Figura 29: Biofilme remanescente (μm^2) de diferentes isolados de *P. aeruginosa* após o tratamento com os bacteriófagos. ^{ab} Letras iguais indicam semelhança estatística.

Figura 30: Imagens de microscopia de fluorescência após o tratamento do biofilme da cepa Pa_Mi_1 com os bacteriófagos. A) Controle; B) vB_PaeM_USP_1; C) vB_PaeM_USP_2; D) vB_PaeM_USP_3; E) vB_PaeM_USP_18; F) vB_PaeM_USP_25. Barra de escala = 50 μ m.

4.3 TERCEIRA ETAPA

4.3.1 Atividade antibiofilme de tubos endotraqueais revestidos com bacteriófagos

O crescimento do biofilme na superfície dos tubos não revestidos (controle) foi similar entre as três cepas (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 2110 e *P. aeruginosa* ATCC 2112). No entanto, a taxa de crescimento do biofilme na superfície dos tubos revestidos com o coquetel de bacteriófagos foi diferente entre as cepas, o que indica que a ação dos bacteriófagos foi dependente da cepa (Apêndice K).

Comparando os valores de UFC/cm² dos tubos controle e revestidos, observou-se que a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 31) teve uma redução significativa da carga microbiana em tubos revestidos com coquetel de bacteriófagos após 24 h (1,8 log; $p < 0,001$) e 120 h (0,9 log; $p = 0,035$) de cultivo. A carga microbiana após 48 h, 72 h e 96 h de cultivo indicou uma leve redução do biofilme em tubos revestidos com coquetel de bacteriófagos (variando de 0,1 a 0,6 log), no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa. Em relação à *P. aeruginosa* ATCC 2110, uma redução significativa da carga microbiana, nos tubos revestidos com o coquetel de bacteriófagos, foi observada apenas após 48 h (1 log; $p = 0,004$) de cultivo (Figura 32) em comparação ao controle. Por outro lado, o crescimento do biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 2112, em tubos revestidos com o coquetel de bacteriófagos, foi estatisticamente inferior ao controle

(variando de 1,1 a 1,8 log) durante todo o período de cultivo (24 h: $p < 0,001$; 48 h: $p = 0,001$; 72 h: $p < 0,001$; 96 h: $p < 0,001$; 120 h: $p = 0,001$; 144 h: $p < 0,001$; 168 h: $p < 0,001$) (Figura 33).

Com relação à atividade metabólica, o revestimento dos tubos endotraqueais com o coquetel de bacteriófagos não promoveu mudanças substanciais na resposta do biofilme. De maneira geral, os valores de absorbância foram mais baixos nos estágios iniciais e maiores nos estágios finais do período de cultivo (Apêndice L). Em comparação com o controle, a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 apresentou maior e menor atividade metabólica em tubos revestidos com coquetel de bacteriófagos após 72 h e 168 h de cultivo, respectivamente (Figura 31). A cepa *P. aeruginosa* ATCC 2110 exibiu menor atividade metabólica em tubos revestidos com coquetel de bacteriófagos após 72 h de cultivo em comparação com tubos não revestidos (Figura 32). Nenhuma diferença foi observada no biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 2112 (Figura 33).

Figura 31: Unidades Formadoras de Colônias – $\log_{10}$ UFC/cm² (Eixo y esquerda) e atividade metabólica –absorbância 492 nm (Eixo y direita) do biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 27853 formado em tubos endotraqueais controle e revestidos com bacteriófagos. *Diferença estatisticamente significativa.

Figura 32: Unidades Formadoras de Colônias – $\log_{10}$ UFC/cm² (Eixo y esquerda) e atividade metabólica—absorbância 492 nm (Eixo y direita) do biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 2110 formado em tubos endotraqueais controle e revestidos com bacteriófagos. *Diferença estatisticamente significativa.

Figura 33: Unidades Formadoras de Colônias – $\log_{10}$ UFC/cm² (Eixo y esquerda) e atividade metabólica—absorbância 492 nm (Eixo y direita) do biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 2112 formado em tubos endotraqueais controle e revestidos com bacteriófagos. *Diferença estatisticamente significativa.

As imagens representativas do biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 2112, obtidas por MEV, em todos os tempos de avaliação da formação de biofilme são apresentadas na figura 34. Os biofilmes formados na superfície de tubos endotraqueais revestidos com coquetel de bacteriófagos apresentam-se morfologicamente distintos daqueles formados nos tubos controle. De maneira geral, uma maior concentração de células foi observada cobrindo a superfície do tubo controle, enquanto estruturas aglomeradas puderam ser observadas nos tubos revestidos com o coquetel de bacteriófagos. Nos tubos controle, o biofilme cresceu como uma camada homogênea, enquanto nos tubos revestidos o maior número de células foi observado nos agregados. Além disso, nos tubos de controle, foi observado que uma matriz de SPE cobriu amplamente toda a camada de biofilme. Já nos tubos revestidos com o coquetel de bacteriófagos, a matriz de SPE foi detectada cobrindo apenas os agregados, enquanto nas áreas circundantes menos quantidade de matriz e bactérias isoladas puderam ser observadas durante todo o tempo de cultivo.

Figura 34: Micrografias eletrônicas de varredura representativas de tubos não revestidos (Controle) e revestidos com o coquetel de bacteriófagos, após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de formação de biofilmes por *P. aeruginosa*. Barra de escala = 10 µm.

A presença do coquetel de bacteriófagos mostrou uma tendência de aumento ao longo do tempo na superfície do tubo endotraqueal. No início da cultura (0 h), o título dos bacteriófagos foi log 3 que aumentou para log 6 em 24 h e log 8 em 48 h. Após 48 h até 168 h, a concentração de bacteriófagos permaneceu constante, sem variações entre as cepas. A redução da formação de biofilme não teve relação com o aumento do número de bacteriófagos (Figura 35).

Figura 35: Redução da formação de biofilme – $\log_{10}$ UFC/cm² (Eixo y esquerda) e presença do coquetel de bacteriófagos na superfície do tubo – $\log_{10}$ UFP/cm² (Eixo y direita) após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de cultivo. A) *P. aeruginosa* ATCC 27853; B), *P. aeruginosa* ATCC 2110; C) *P. aeruginosa* ATCC 2112.

4.4 QUARTA ETAPA

4.4.1 Influência dos bacteriófagos sobre os fatores de virulência de *P. aeruginosa*

A avaliação da formação de biofilme, produção de piocianina, proteases e expressão dos genes de virulência, pela cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, foi testada após 2, 8, 24 e 48 h de cultivo na presença dos bacteriófagos.

Os bacteriófagos promoveram mudanças nas taxas de crescimento do biofilme de *P.*

aeruginosa. No entanto, essas mudanças foram mais nítidas até 8 horas de incubação, período no qual todos os bacteriófagos reduziram a formação de biofilme (Figura 36). Após 24 e 48 h, os bacteriófagos vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_25 apresentaram maior capacidade de inibição da formação de biofilme. As taxas de crescimento e resultados das comparações estatísticas após 2, 8, 24 e 48 h de cultivo na ausência e presença dos bacteriófagos estão apresentados no apêndice M.

Figura 36: Capacidade de formação de biofilme (Intensidade de fluorescência – Pixels) de *P. aeruginosa* após 2 (A), 8 (B), 24 (C) e 48 h (D) de cocultivo com os bacteriófagos. ^{ab} Letras iguais indicam semelhança estatística.

Imagens de microscopia de fluorescência representativas da ação dos bacteriófagos após 2, 8, 24 e 48 h de cocultivo são apresentadas na figura 37.

Figura 37: Imagens de fluorescência do biofilme formado por *P. aeruginosa* após cocultivo com os bacteriófagos. A) vB_PaeM_USP_1; B) vB_PaeM_USP_2; C) vB_PaeM_USP_3; D) vB_PaeM_USP_18; E) vB_PaeM_USP_25; F) Controle. I) 2 h; II) 8 h; III) 24 h; IV) 48 h. Barra de escala = 50 μ m.

Imagens representativas de MEV do biofilme formado por *P. aeruginosa* após cocultivo na ausência e presença dos bacteriófagos são apresentadas na figura 38. Conforme já descrito anteriormente, a redução da formação de biofilme foi mais evidente nas fases iniciais do cultivo. Após 24 e 48 h de cultivo, o crescimento do biofilme parece ser semelhante tanto no controle

quanto nos grupos com bacteriófagos. Além disso, após 8 h de cocultivo na presença dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3, observou-se filimentação da morfologia bacteriana e presença de detritos celulares (Figura 38 AII, BII, CII).

Figura 38: Microscopia eletrônica de varredura do biofilme formado por *P. aeruginosa* após cocultivo com os bacteriófagos. A) vB_PaeM_USP_1; B) vB_PaeM_USP_2; C) vB_PaeM_USP_3; D) vB_PaeM_USP_18; E) vB_PaeM_USP_25; F) Controle. I) 2 h; II) 8 h; III) 24 h; IV) 48 h. Barra de escala = 10 µm. Setas amarelas indicam o fenômeno de filimentação.

Avaliando-se os valores médios de absorbância dos grupos cultivados na presença e ausência de bacteriófagos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na produção de piocianina, em todos os tempos de cultivo (Figura 39). A concentração de piocianina, bem como os resultados das comparações estatísticas após 2, 8, 24 e 48 h de cultivo na ausência e presença dos bacteriófagos, está apresentada no apêndice N.

Figura 39: Produção de piocianina ($\mu\text{g/mL}$) por *P. aeruginosa* ATCC 27853, após 2, 8, 24 e 48 h de cocultivo com os bacteriófagos. ^{ab} Letras iguais indicam semelhança estatística.

Com relação à produção de proteases, o mesmo comportamento, observado para a variável piocianina, foi notado. Comparando-se os grupos entre si, não houve alteração da presença de proteases extracelulares após o cocultivo de *P. aeruginosa* com os bacteriófagos (Figura 40). A presença de proteases extracelulares, bem como os resultados das comparações estatísticas após 2, 8, 24 e 48 h de cultivo na ausência e presença dos bacteriófagos, está apresentada no apêndice O.

Figura 40: Produção de proteases extracelulares por *P. aeruginosa* ATCC 27853, após 2, 8, 24 e 48h de cocultivo com os bacteriófagos. ^{ab} Letras iguais indicam semelhança estatística.

O método Cq comparativo foi usado para comparar os resultados qPCR. Esse método foi considerado aceitável, uma vez que as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referência estavam entre 90% e 104%. Para avaliação da expressão dos genes *lasI*, *pslA*, *lasB* e *phzH* por PCR em tempo real, foram comparadas as diferenças dos níveis de expressão ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) das culturas com e sem bacteriófagos para cada ponto de tempo.

De modo geral, foram observadas maiores alterações na expressão dos genes após 2 e 48 h de cocultivo. O aumento na expressão de *lasI*, *pslA*, *lasB* e *phzH* foi mais recorrente na presença dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_18. Não foi observada redução da expressão gênica em todos os períodos avaliados.

Em comparação ao grupo controle, a expressão do gene *lasI* foi maior na presença dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_2 ($p = 0,001$) e vB_PaeM_USP_18 ($p = 0,021$), após 2 h de cocultivo. Não houve diferenças na expressão de *lasI* após 8 e 24 h de cocultivo. Porém, após 48

h de cultura na presença dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1 ($p = 0,001$) e vB_PaeM_USP_18 ($p = 0,021$), a expressão de *lasI* foi novamente maior (Figura 41).

Não houve alterações na expressão de *pslA* após 2, 8 e 24 h de cocultivo em comparação com o grupo controle. No entanto, após 48 h de cocultivo na presença dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1 ($p = 0,001$), vB_PaeM_USP_3 ($p = 0,021$) e vB_PaeM_USP_18 ($p = 0,042$), a expressão de *pslA* foi maior (Figura 41).

Em comparação ao grupo controle, a expressão do gene *lasB* foi maior na presença dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_2 ($p = 0,021$) e vB_PaeM_USP_18 ($p = 0,001$), após 2 h de cocultivo. O aumento da expressão também foi observado na presença do bacteriófago vB_PaeM_USP_2 após 8 h de incubação ($p = 0,020$). Não houve diferenças na expressão de *lasB* após 24 h de cocultura. Porém, após 48 h, a expressão de *lasB* na presença do bacteriófago vB_PaeM_USP_1 ($p = 0,025$) foi maior (Figura 42).

Em relação à expressão do gene *phzH*, foi observado aumento da expressão gênica, na presença dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_2 ($p = 0,038$), vB_PaeM_USP_18 ($p = 0,001$) e vB_PaeM_USP_25 ($p = 0,024$), após 2 h de cocultivo. Após 8 h de incubação, apenas o bacteriófago vB_PaeM_USP_2 promoveu aumento significativo na expressão do gene ($p = 0,029$). Não houve diferenças na expressão de *phzH* após 24 h de cultura. No entanto, após 48 h de cocultivo na presença dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1 ($p = 0,002$) e vB_PaeM_USP_3 ($p = 0,040$), a expressão de *phzH* foi maior (Figura 42).

Figura 41: Níveis de expressão dos genes *lasI* e *pslA* ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) por PCR em tempo real, da cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, após 2, 8, 24 e 48h de cocultivo com os bacteriófagos. O valor de p refere-se à comparação entre as culturas controle e com bacteriófagos.

Figura 42: Níveis de expressão dos genes *lasB* e *phzH* ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) por PCR em tempo real, da cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, após 2, 8, 24 e 48h de cocultivo com os bacteriófagos. O valor de p refere-se à comparação entre as culturas controle e com bacteriófagos.

4.5 Divulgação dos resultados

Foi elaborado material educacional e de divulgação da pesquisa científica na forma de vídeo (Apêndice P). Além disso, os resultados referentes à primeira, segunda e terceira etapa foram divulgados na forma de textos completos em periódicos nacionais e internacionais (Anexo B–D). Os resultados referentes à quarta etapa ainda não foram publicados, mas encontram-se em avaliação pelo periódico *Microbial Pathogenesis* (Anexo E).

5. *Discussão*

5.1 PRIMEIRA ETAPA

A primeira etapa deste estudo compreendeu o isolamento e caracterização de cinco bacteriófagos a partir de amostras de esgoto doméstico. A relevância do presente estudo envolve a urgência em investigar novas estratégias terapêuticas para o enfrentamento de biofilmes multirresistentes de *P. aeruginosa*. Esse patógeno é comumente associado a todas as IRAS atualmente diagnosticadas, as quais apresentam altos níveis de mortalidade (PALAVUTITOTAI et al., 2018; ZHAO et al., 2020). Além disso, o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* está associado a desafios terapêuticos, uma vez que tem sido relatada uma elevada taxa de resistência desse patógeno aos tradicionais antibióticos (PALAVUTITOTAI et al., 2018). A OMS chama a atenção para a perigosa resistência aos antibióticos ou a era pós-antibiótica, em que infecções simples podem mais uma vez ser letais (WHO, 2014). Por outro lado, o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos não acontece com a mesma velocidade que as bactérias adquirem mecanismos de resistência (PRESTINACI; PEZZOTTI; PANTOSTI, 2015).

Hyman (2019) reforçou que os fagos podem ser encontrados em diferentes ecossistemas, localizados onde quer que seus hospedeiros estejam presentes, desempenhando um papel significativo na densidade de bactérias. As águas residuais, em geral, contêm uma variedade de bactérias patogênicas coexistindo proximamente (PANDEY et al., 2014). Diante disso, o esgoto doméstico pode ser uma fonte relevante para o isolamento de bacteriófagos líticos. De acordo com resultados prósperos que a literatura tem apresentado (SYNNOTT et al., 2009; MELO et al., 2014; TOPKA et al., 2019), no presente estudo, foi possível isolar com sucesso cinco novos bacteriófagos líticos a partir do esgoto doméstico.

A maioria dos bacteriófagos já caracterizados é caudada (HATFULL; HENDRIX, 2011). Aqui, através da análise morfológica e genômica, há evidências de que todos os cinco bacteriófagos apresentam a mesma característica, pertencentes à ordem Caudovirales e à família Myoviridae. Além disso, o sequenciamento do genoma revelou que os fagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3 estão mais relacionados ao bacteriófago Epa22 (~96% de identidade de nucleotídeos). O conteúdo citosina/guanina (CG) (~55.5%), bem como o comprimento do genoma, foram semelhantes aos de outros *Pbunavirus* recentemente descritos (de MELO et al., 2019; YUAN et al., 2019). Com relação aos bacteriófagos vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25, somente 20% de seus genomas compartilharam identidade com outros bacteriófagos já descritos. Essa baixa identidade com outros genomas conhecidos não permitiu agrupar esses dois bacteriófagos com nenhum gênero ou subfamília conhecida. A incapacidade

de agrupar esses dois genomas sugere que eles pertencem a um novo gênero de bacteriófagos. A análise de bioinformática permitiu ainda identificar o gene da endolisina em todos os bacteriófagos. Normalmente, essa enzima está associada com degradação da parede celular bacteriana, conferindo capacidade lítica aos bacteriófagos (WU et al., 2019).

Embora a função de algumas regiões codificadoras tenham sido determinadas com sucesso, um total de ~75% das proteínas codificadas pelos genomas dos bacteriófagos foi hipotética. Esse fato é uma questão recorrente nos estudos envolvendo bacteriófagos (GUO et al., 2019). Diante disso, reitera-se que novas pesquisas devem focar no isolamento, caracterização e determinação de função para essas proteínas, a fim de direcionar a utilização biotecnológica de novos produtos no controle de infecções e biofilmes.

A análise da curva de crescimento revelou que o período de latência foi semelhante para os 5 bacteriófagos (cerca de 30 minutos). A progênie por célula infectada variou de 22,70 a 46,60 partículas fágicas. Com relação ao período de latência, resultados semelhantes foram relatados por Guo et al. (2019) e Yuan et al. (2019). No entanto, foi observado uma menor produção de bacteriófagos/célula bacteriana infectada em comparação com estudos anteriores, os quais identificaram progênies variando de 98 a 134 partículas fágicas por célula bacteriana infectada (GUO et al., 2019; YUAN et al., 2019). Essa redução pode ser explicada pela alteração nas taxas de crescimento das bactérias. Nabergoj, Modic e Podgornik (2018) evidenciaram que o aumento exponencial do número de bacteriófagos aumenta linearmente com o aumento da taxa de crescimento de bactérias. Além disso, a adsorção e o período de latência diminuem quando as bactérias apresentam elevadas taxas crescimento.

A infectividade dos bacteriófagos permaneceu estável na faixa de pH variando de 5 a 9 e na faixa de temperatura variando de 37°C a 60°C. Embora o pH e a temperatura não sofram variações bruscas nos sistemas fisiológicos, compreender esse aspecto é importante para manter a viabilidade e a infectividade dos bacteriófagos. Uma vez que novos agentes antimicrobianos devem ser investigados, a grande tolerância ao pH e temperatura indica uma ampla faixa de trabalhabilidade para pesquisar e aplicar bacteriófagos ou produtos oriundos deles em diferentes modelos de infecção. Por exemplo, a pele se torna mais alcalina pela colonização bacteriana, e o pH da ferida é diferente daquele observado na pele saudável (SCHNEIDER et al., 2007). Além disso, deve-se considerar que os bacteriófagos poderiam ser aplicados *in vivo* por via gástrica o que demandaria elevada resistência à variação de pH (ALESHKIN et al., 2016).

A atividade lítica dos bacteriófagos foi testada contra 37 cepas (33 *P. aeruginosa* e 4 espécies diferentes de bactérias). Os resultados revelaram que todos os bacteriófagos lisaram

eficientemente 69,7% das cepas de *P. aeruginosa*, incluindo cepas multirresistentes a diferentes antibióticos. A lise de *P. aeruginosa* multirresistente indica que os bacteriófagos isolados nesse trabalho, ou produtos deles derivados, poderiam potencialmente ser aplicados como novas propostas terapêuticas no controle de biofilmes em dispositivos médico-hospitalares. As taxas líticas observadas nesse estudo são maiores que aquelas observadas para outros *Pbunavirus*. de Melo et al. (2019) relataram uma taxa de lise de 51,4% de um novo bacteriófago isolado de animais domésticos. De fato, para aplicação de bacteriófagos na terapia fágica *in vitro* e *in vivo* é desejável que os vírus apresentem um amplo espectro lítico, bem como especificidade de ação. Destaca-se ainda, que os vírus devem apresentar exclusivamente um ciclo de vida lítico, a fim de evitar o risco de potencial transmissão horizontal de genes de virulência para as bactérias (CANCHAYA et al., 2003).

De acordo com critérios propostos por Melo et al. (2014) os bacteriófagos apresentaram EOP ineficiente apenas contra seis cepas. Além disso, o teste de EOP indicou uma variação considerável de baixa a alta entre as cepas suscetíveis. Essa variação pode ser explicada pelo processo de adsorção, que pode divergir em diferentes cepas, de acordo com a expressão de moléculas na membrana celular bacteriana (UCHIYAMA et al., 2016). A localização, o volume e a densidade dos receptores de superfície podem ter afetado a adsorção dos bacteriófagos (RAKHUBA et al., 2010). Considerando a variação mencionada nas moléculas de adsorção, a aplicação de um coquetel de bacteriófagos, que retenha mecanismos de adsorção distintos, é importante para manter a infectividade dos bacteriófagos (FORTI et al., 2018). Além do processo de reconhecimento e adsorção, sistemas bem conhecidos de resistência bacteriana, contra a infecção por bacteriófagos, podem ter levado a baixos valores de EOP. A literatura tem apontado que muitos mecanismos antivirais podem ser empregados pela célula hospedeira para evitar a infecção de bacteriófagos, como nucleases de restrição e ativação do sistema CRISPR (SEED, 2015).

Interessantemente, os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3 apresentaram vantagem sobre os bacteriófagos vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25 na infecção das cepas de *P. aeruginosa*. Além disso, os bacteriófagos vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25 apresentaram EOP baixa e ineficiente para todas as cepas multirresistentes. Embora um comportamento lítico tenha sido anteriormente observado para esses bacteriófagos, a EOP ineficiente pode representar uma incapacidade no processo de adsorção por meio das interações bacteriófago-hospedeiro. Embora as interações entre fagos e seus hospedeiros não sejam totalmente compreendidas, Rakhuba et al. (2010) discutiram que a

variação na composição estrutural do antígeno-O, um componente dos lipopolissacarídeos em bactérias gram-negativas, tem papel importante no espectro lítico dos bacteriófagos. Em vista disso, pode-se sugerir que os bacteriófagos vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25 reconhecem diferentes moléculas de superfície para adsorção. Considerando que existe uma variação no reconhecimento das moléculas de superfície no processo de adsorção dos vírus, a aplicação de um coquetel de bacteriófagos, que retenha mecanismos de adsorção distintos, já foi discutida por Forti et al. (2018). Nesse estudo, os autores demonstraram que a ação de um coquetel de bacteriófagos foi considerada superior, em comparação aos vírus individuais, na eliminação de biofilmes *in vitro* e no tratamento de infecção respiratória aguda em camundongos e bacteremia em *Galleria mellonella*.

Em conclusão, esta etapa demonstrou êxito no isolamento e caracterização de 5 novos bacteriófagos. Os vírus recém-descritos possuem amplo espectro lítico, sendo capazes de infectar diferentes cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*. As etapas sequenciais visam vencer os desafios associados ao biofilme e a resistência bacteriana e a potencial aplicabilidade dos bacteriófagos em um dispositivo antibiofilme para enfrentamento da pneumonia associada à ventilação mecânica. O ineditismo dos bacteriófagos descritos contribui para o avanço da ciência no que tange à bioprospecção de agentes antimicrobianos para o enfrentamento de biofilmes em dispositivos odonto-médico-hospitalares e, por conseguinte, o risco de desenvolvimento de IRAS.

5.2 SEGUNDA ETAPA

À bactéria *P. aeruginosa* está relacionada uma capacidade inerente de desenvolver resistência aos antibióticos, formar densos biofilmes e secretar diferentes fatores de virulência (BOUCHER et al., 2009; MORADALI; GHODS; REHM, 2017). Por conseguinte, nesta etapa, verificou-se as atividades antibacteriana e antibiofilme dos bacteriófagos recentemente isolados no controle de *P. aeruginosa*. Com base nos resultados obtidos, a hipótese nula foi rejeitada, pois houve diferença no crescimento de bactérias em forma planctônica, viabilidade e atividade metabólica do biofilme.

Avaliando a eficácia dos cinco bacteriófagos recém isolados, na redução do crescimento de *P. aeruginosa* na forma planctônica, foi observada uma redução significativa em até 8 h de cocultivo, para quase todas as cepas investigadas. No entanto, após 24 horas de cocultivo, apenas 3 cepas apresentaram taxas de crescimento inferiores em relação ao controle. Duas cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes não apresentaram redução da taxa de crescimento em

nenhum dos tempos avaliados. Melo et al. (2014) usando uma MOI de 0,05 demonstraram redução na densidade óptica das células planctônicas em 83% dos isolados clínicos após 24 horas de infecção. A literatura tem reportado que existem muitos mecanismos antivirais, os quais podem ser empregados pela célula hospedeira para evitar infecções por bacteriófagos. Esses mecanismos podem resultar no surgimento de bactérias insensíveis à infecção fágica através do bloqueio de receptores fágicos, produção de matriz extracelular, produção de inibidores competitivos, inibição ou degradação do ácido nucleico e mecanismos abortivos da infecção (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; SEED, 2015). Supõe-se que algumas cepas de *P. aeruginosa* ativaram tais mecanismos de resistência, o que explicaria a ausência de atividade antibacteriana após 24 h de incubação.

A atividade lítica dos bacteriófagos foi relevante para o controle do biofilme na superfície do tubo endotraqueal. Embora nenhuma depolimerase tenha sido identificada nos genomas dos bacteriófagos, a ação antibiofilme pode estar relacionada à penetração dos vírus em camadas mais profundas do biofilme por meio da degradação da matriz polissacarídica (LIN; KOSKELLA; LIN, 2017). Em concordância com os resultados desse estudo, Guo et al. (2019) demonstraram que dois novos bacteriófagos utilizados em baixa concentração (MOI: 0,01) tiveram bom desempenho tanto na prevenção da formação de biofilme quanto na erradicação de biofilmes pré-formados. Os resultados dos índices de biofilme e da atividade metabólica após o tratamento com os bacteriófagos indicam que os bacteriófagos, ou produtos deles derivados, poderiam ser aplicados no futuro como uma ferramenta de biocontrole contra *P. aeruginosa* multirresistente na superfície de tubos endotraqueais. Apoiando esse argumento, a literatura tem apresentado que bacteriófagos ou atividade sinérgica entre proteínas líticas isoladas de bacteriófagos e antibióticos constituem estratégias promissoras contra o biofilme de *P. aeruginosa* multirresistente (AL-WRAFY et al., 2019; ADNAN et al., 2020).

Foi observada redução do crescimento planctônico e importante atividade antibiofilme após o tratamento com os bacteriófagos, sendo os resultados amplamente coincidentes nos ensaios de densidade óptica, UFC/cm² e XTT. As pequenas diferenças, detectadas entre as cepas, podem estar relacionadas aos métodos de análise empregados. A avaliação do crescimento planctônico foi realizada por leitura da densidade óptica, enquanto a atividade antibiofilme foi avaliada por contagens de UFC/cm². Além disso, outros ensaios envolvendo a avaliação da atividade metabólica e a taxa de biofilme residual, após a ação dos bacteriófagos, foram analisados por metabolização do sal de tetrazólio e por microscopia de fluorescência, respectivamente. Embora esses ensaios tenham sido considerados úteis para uma avaliação

quantitativa e visualização da estrutura espacial do biofilme, divergências nos resultados podem ocorrer devido à presença de células dormentes, penetração do laser, absorção do corante na biomassa e autofluorescência (AZEREDO et al., 2017; MAGANA et al., 2018). Reduzida coincidência entre a taxa de biofilme residual e demais ensaios para avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme foi constatada. A coloração LIVE / DEAD compreende dois tipos de colorações fluorescentes, que diferem na capacidade de penetrar em células bacterianas viáveis e não viáveis (AZEREDO et al., 2017). Aqui, as áreas recobertas por biofilme foram calculadas de acordo com a fluorescência total das imagens. Sabe-se que a concentração celular nos biofilmes pode se distribuir de forma diferente de acordo com a espessura da estrutura. À vista disso, especula-se que as imagens obtidas não detalharam perfeitamente a densidade do biofilme, o que em partes poderia explicar a discordância dos resultados.

Apesar de notória atividade antibiofilme, áreas cobertas por biofilme remanescente foram observadas após o tratamento com os bacteriófagos. Tal resultado pode ser explicado pela presença de mecanismos antivirais que resultam em bactérias insensíveis à infecção pelos bacteriófagos. Tais mecanismos envolvem o bloqueio de receptores de adsorção, produção de matriz extracelular, produção de inibidores competitivos, prevenção da entrada e/ou do DNA dos bacteriófagos, ativação do sistema CRISPR / cas e mecanismos de infecção abortivos (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; SEED, 2015). Além das estratégias de prevenção da infecção, aspectos relativos ao fenótipo mucóide e a incapacidade de eliminação dos biofilmes utilizando uma única dose e tempo de tratamento têm sido relatados como obstáculos ao sucesso da terapia fágica (SCANLAN; BUCKLING, 2012; HENRIKSEN et al., 2019). De acordo com Abedon (2016), a eliminação de biofilmes usando bacteriófagos pode exigir longos períodos de tratamento, bem como dosagem repetida. Ademais, é importante ressaltar que a penetração, difusão e propagação de bacteriófagos dentro de biofilmes pode ser comprometida pela estrutura da matriz extracelular e heterogeneidade fisiológica das células (ABEDON, 2016; FERRIOL-GONZÁLEZ; DOMINGO-CALAP, 2020).

É conhecido que o tratamento sistêmico com antibióticos não inibe totalmente o desenvolvimento de biofilme na superfície dos tubos endotraqueais (FERNÁNDEZ-BARAT et al., 2012). Portanto, a administração direta de abordagens não antibióticas, como agentes antimicrobianos (GUILLON et al., 2018) e bacteriófagos parece ser uma opção adequada para o combate a biofilmes persistentes. De fato, bacteriófagos podem ser potencialmente aplicados no biofilme do tubo endotraqueal de duas maneiras, como agente terapêutico e profilático. Tubos revestidos com bacteriófago podem ser usados para inibir a aderência de bactérias,

enquanto a aplicação direta pode ser útil na redução da carga microbiana. Aleshkin et al. (2016) relataram a administração intragástrica de um coquetel de bacteriófagos em pacientes em ventilação mecânica visando o tratamento de infecções agudas por patógenos nosocomiais. Os autores demonstraram uma redução importante na contagem de bactérias após a fagoterapia, indicando-a como uma alternativa aos antibióticos para o tratamento de infecções associadas à saúde.

Diante da capacidade dos novos bacteriófagos líticos de reduzir a carga microbiana de biofilmes associados ao tubo endotraqueal *in vitro*, vários aspectos devem ser levados em consideração antes da transferência da terapia fágica para a prática clínica. Como o dispositivo não está em contato direto com tecidos vascularizados, as possíveis vias de administração de bacteriófagos devem ser discutidas. Além disso, em ambientes clínicos, é altamente improvável que os tubos endotraqueais sejam continuamente expostos aos bacteriófagos, conforme demonstrado neste estudo *in vitro*. Assim, sugere-se que a fagoterapia poderia ser aplicada durante a aspiração endotraqueal, conforme recomendado para pacientes ventilados. A instilação de bacteriófagos durante a aspiração de secreções pulmonares poderia favorecer sua aplicação direta (GUILLON et al., 2018). A inalação de formulações em aerossol contendo antibióticos e bacteriófagos é outra potencial via de administração.

A literatura tem mostrado que os bacteriófagos caudados atingem o processo de lise através da enzima endolisina e proteína holina (LATKA et al., 2017). Em virtude da resistência aos antibióticos, tem surgido um interesse crescente em relação às endolisinas codificadas por bacteriófagos como novos agentes antimicrobianos (FERNANDEZ-RUIZ; COUTINHO; RODRIGUEZ-VALERA, 2018). Além disso, a potencial aplicação de bacteriófagos recombinantes ou produtos derivados dos vírus abrem novas perspectivas para o enfrentamento de biofilmes de *P. aeruginosa* multirresistentes. No entanto, atenção especial deve ser dada ao desenvolvimento do processo de resistência à infecção pelos bacteriófagos. Em vista disso, considera-se necessário avaliar o fenótipo de mutantes insensíveis à infecção pelos bacteriófagos após longa exposição aos vírus. Além disso, deve-se considerar que os biofilmes *in vivo* são diferentes daqueles *in vitro* avaliados no presente estudo, provavelmente pela presença de fluidos corporais, células hospedeiras e diferentes interações entre os micro-organismos. À luz dos pressupostos acima mencionados, investigações futuras devem ser conduzidas considerando modelos mistos de biofilme e ação sinérgica dos bacteriófagos e antibioticoterapia.

Os bacteriófagos isolados no presente estudo são inéditos, foram eficientes no controle do crescimento de *P. aeruginosa* e promoveram a ruptura do biofilme na superfície dos tubos endotraqueais, incluindo cepas multirresistentes. Assim, eles podem ser considerados bons candidatos para estudos terapêuticos e pesquisa de formulações biotecnológicas a partir de produtos deles derivados. Todavia, mais pesquisas são necessárias para se determinar a concentração adequada e as possíveis combinações dos diferentes bacteriófagos. A aplicação de coquetéis de bacteriófagos deve ser investigada, buscando-se uma maior redução das taxas de biofilme na superfície do tubo endotraqueal. Além disso, foi avaliado apenas um tempo e uma concentração dos bacteriófagos no tratamento dos biofilmes. Talvez, uma atividade lítica maior possa ser evidenciada, avaliando-se diferentes tempos de infecção.

Em conclusão, esta etapa demonstrou que os bacteriófagos recém-descritos foram capazes de reduzir a concentração de *P. aeruginosa* nas formas planctônicas e de biofilme. Analisando todos os resultados em conjunto, os bacteriófagos vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_18 apresentaram ação antibiofilme satisfatória, considerando principalmente as cepas multirresistentes. Assim, estudos adicionais devem considerar a aplicação de um coquetel de bacteriófagos ou diferentes concentrações dos vírus, a fim de manter a infectividade e controlar a resistência bacteriana. Além disso, pesquisas futuras devem investigar a potencial aplicação das endolisinas codificadas por esses bacteriófagos como alternativa à administração direta do vírus.

5.3 TERCEIRA ETAPA

Os biofilmes associados aos tubos endotraqueais são preocupações notáveis no desenvolvimento da PAV. Como a antibioticoterapia não é suficiente para eliminar biofilmes na superfície dos dispositivos médicos (FERNÁNDEZ-BARAT et al., 2012), a terapia com bacteriófagos oferece uma alternativa plausível na redução da colonização bacteriana na superfície dos tubos endotraqueais. Dessa maneira, esta etapa avaliou se a presença de bacteriófagos nas paredes dos tubos endotraqueais poderia alterar a aderência de *P. aeruginosa* e consequentemente alterar a formação de biofilmes. Com base nos resultados obtidos, a hipótese nula foi rejeitada, pois houve diferenças no crescimento do biofilme, atividade metabólica e aspecto do biofilme formado em fluxo contínuo.

Depois de avaliar a ação isolada de cada vírus recém-descrito, um coquetel composto pelos bacteriófagos vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_18 foi investigado como uma estratégia adicional para controle da formação de biofilme na superfície de tubos endotraqueais.

Para a condução desta etapa, partiu-se do pressuposto que o revestimento da superfície do tubo, usando diferentes bacteriófagos, impediria a colonização bacteriana, considerando que esses dois vírus apresentam EOP diferentes e, portanto, potencialmente se ligam a diferentes receptores para adsorção (CHAN; ABEDON; LOC-CARRILLO, 2013).

Esforços têm sido feitos para propor métodos para revestimento de dispositivos médicos com bacteriófagos (CADEMARTIRI et al., 2010; MILO et al., 2017; LEPPÄNEN; MAASILTA; SUNDBERG, 2019). Em cateteres urológicos, o revestimento da superfície com bacteriófagos é geralmente obtido por adsorção física (HOSSEINIDOUST; VAN DE VEM; TUFENKJI, 2011; MELO et al., 2016) e conjugação de hidrogel (FU et al., 2010; LEHMAN; DONLAN, 2015; MILO et al., 2017). Os tubos endotraqueais utilizados no presente estudo são compostos por policloreto de vinila (PVC) reforçado, e a literatura não descreve a imobilização de bacteriófagos em superfícies de PVC ou em outros dispositivos destinados à ventilação mecânica. Nesse sentido, a adsorção física de 1×10^7 UFP/cm² foi utilizada, visando a criação de uma superfície antimicrobiana. Após 24 h, a quantidade de bacteriófagos imobilizados na superfície do tubo foi de 1×10^3 UFP/cm². De fato, a adsorção física não promoveu uma grande imobilização de bacteriófagos na superfície do tubo endotraqueal. Supõe-se que o efeito antibiofilme limitado, observado nos tubos revestidos com coquetel, foi possivelmente devido à reduzida aderência dos bacteriófagos. Acredita-se que maximizando a densidade dos bacteriófagos na superfície do tubo endotraqueal, uma capacidade aprimorada de controlar o crescimento de *P. aeruginosa* seja alcançada. Embora a adsorção física compreenda um método simples e de baixo custo para imobilização de bacteriófagos, a baixa cobertura parece não ter sido adequada para produzir um amplo efeito antibiofilme. Nesse sentido, diferentes estudos têm sido propostos visando o desenvolvimento de superfícies funcionalizadas para imobilizar bacteriófagos de forma mais eficiente. Por exemplo, Wang, Sauvageau e Elias (2016) exibiram que na superfície de poli-hidroxialcanoato tratada com plasma favorece a imobilização do bacteriófago T4 em relação à superfície não tratada. Portanto, estratégias envolvendo a expressão de peptídeos de ligação a plástico e/ou diferentes tecnologias para ligar bacteriófagos em superfícies de PVC devem ser realizadas para garantir um alto título na superfície de tubos endotraqueais.

Embora um alto título inicial não tenha sido imobilizado na superfície do tubo na presença de cepas bacterianas, uma concentração crescente foi observada após 48 h de tratamento. O aumento do título confirmou a capacidade dos bacteriófagos de se replicarem e compensar a baixa dose inicial (NILSSON, 2019). Além disso, a concentração inicial de

1×10^3 UFP/cm² foi capaz de produzir diferenças na colonização bacteriana. De acordo com os valores de UFC/cm², em cada ponto de tempo específico, as cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *P. aeruginosa* ATCC 2112 mostraram redução evidente do crescimento do biofilme em tubos revestidos com o coquetel de bacteriófagos, principalmente, nos estágios iniciais da formação do biofilme. Esse resultado pode estar relacionado ao estágio de crescimento do biofilme e à quantidade de matriz extracelular. A literatura tem mostrado que a ineficiência na penetração de bacteriófagos, em biofilmes maduros, é um fato importante que afeta a tolerância à terapia fágica (ABEDON, 2016). A redução inicial no crescimento do biofilme pode ser correlacionada tanto ao aumento exponencial dos bacteriófagos quanto à uma camada menos densa de matriz extracelular. Após 48 h, o título constante dos bacteriófagos apoia a ideia de que a matriz extracelular mais espessa poderia ter impedido a adsorção dos vírus. Por outro lado, comportamento semelhante não foi observado pela cepa *P. aeruginosa* ATCC 2112, que apresentou redução do crescimento do biofilme durante todo o cultivo. Essa resposta distinta pode ser associada à atividade metabólica da cepa. Em comparação com as cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *P. aeruginosa* ATCC 2110, o ensaio XTT revelou altos valores de absorbância para *P. aeruginosa* ATCC 2112. Como os fagos requerem hospedeiros metabolicamente ativos para replicar (PEARL et al., 2008), o coquetel de bacteriófagos poderia ter infectado mais eficazmente essa cepa. Em geral, a menor atividade metabólica foi observada para *P. aeruginosa* ATCC 2110, que apresentou redução no crescimento do biofilme apenas em 48 h. Juntos, esses resultados sugerem que *P. aeruginosa* ATCC 2110 exibe mecanismos antivirais que resultam em um fenótipo insensível à infecção (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; SEED, 2015; MACIEJEWSKA; OLSZAK; DRULIS-KAWA, 2018, HENRIKSEN et al., 2019).

O meio de cultura escarro sintético (SCFM2), utilizado no crescimento do biofilme em fluxo contínuo, promove a formação de agregados de *P. aeruginosa* com tamanhos semelhantes aos observados no tecido pulmonar com fibrose cística humana (DARCH et al., 2017). Aqui, no entanto, os tubos endotraqueais revestidos e não revestidos apresentaram diferenças quanto à distribuição de agregados. Foram hipotetizadas duas razões diferentes para explicar a formação de agregados por *P. aeruginosa*. No primeiro, em tubos revestidos, a formação de grandes agregados bacterianos, observados em imagens de MEV, poderia ser um mecanismo de proteção contra os bacteriófagos, pois se tornou mais evidente em biofilmes maduros quando a concentração dos vírus atingiu o título mais alto. Essa hipótese é suportada por Bru e colaboradores (2019) que relataram que a infecção por bacteriófagos induz a secreção de

moléculas de detecção de *quorum sensing* no ambiente circundante. Estruturas semelhantes às observadas aqui também foram relatadas por Henriksen et al. (2019) que as classificou como uma estratégia de defesa à infecção pelos bacteriófagos. De acordo com os autores, a exposição contínua aos bacteriófagos afetou a estrutura do biofilme, estimulando a formação de biofilme altamente estruturado e espacialmente heterogêneo. O reconhecimento de tais moléculas poderia ter promovido a alteração morfológica. Em segundo lugar, especulou-se que a presença dos agregados pode ter sido causada não pelo crescimento excessivo, ou reorganização de bactérias em algumas regiões, mas pela lise das células pelo coquetel de bacteriófagos, causando buracos no biofilme.

Os resultados da inibição do crescimento das cepas *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 2110 e *P. aeruginosa* ATCC 2112 não trouxeram fortes evidências sobre o comportamento diferente da infecção por bacteriófagos em cepas sensíveis e resistentes a antibióticos. Os bacteriófagos demonstraram capacidade de infectar tanto *P. aeruginosa* sensível quanto multirresistente. Loc-Carrillo e Abedon (2011) apontaram que os mecanismos de resistência aos antibióticos não afetam a infecção por bacteriófagos. Os resultados aqui apresentados corroboram a afirmação do autor e indicam que a terapia fágica pode ser aplicada como um método auxiliar no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

A relevância da presente etapa destaca a necessidade urgente de investigar novas alternativas terapêuticas para controlar biofilmes formados por *P. aeruginosa* na superfície de tubos endotraqueais. A intubação através de um tubo endotraqueal por um período maior ou igual a 8 dias representa um fator de risco para ocorrência de PAV (DE SOUZA et al., 2014). Aqui, foi demonstrado que a terapia fágica pode reduzir a carga bacteriana na superfície de tubos endotraqueais e, portanto, contribuir para reduzir os episódios de PAV. No entanto, tendo em vista os títulos discrepantes aplicados na segunda etapa e nesta etapa, não foi possível determinar se os bacteriófagos seriam mais eficientes no tratamento ou como inibidores da formação de biofilmes por *P. aeruginosa*. De fato, os desafios e limitações da terapia com bacteriófagos são evidentes, e a literatura científica relata que o uso terapêutico ou profilático depende da área de aplicação. Por exemplo, na indústria de alimentos, a administração profilática de bacteriófagos representa uma solução sustentável promissora para controlar bactérias patogênicas e reduzir o uso massivo de antibióticos. Nesse campo, os bacteriófagos são usados principalmente durante a produção de alimentos, sanitização e preservação (POŁASKA E SOKOŁOWSKA, 2019). Tanto para o tratamento de infecções em animais como em humanos, o uso terapêutico de bacteriófagos e enzimas codificadas pelos vírus, sozinhos ou

em combinação com antibióticos, têm despertado interesse crescente contra bactérias multirresistentes, e diferentes vias de administração e dosagem têm sido sugeridas (MELO et al., 2020).

Mediante as características de um biofilme maduro, tais como presença de células em diferentes estágios metabólicos e presença da matriz de SPE (ARAÚJO; LEMOS; SIMÕES, 2012; FLEMMING et al., 2016b), considera-se que a imobilização de um alto título de bacteriófagos ou enzimas codificadas pelo vírus, nas superfícies de dispositivos médicos e implantes, pode reduzir a colonização de forma mais eficaz em comparação à remoção de biofilmes. Assim, algumas questões permaneceram abertas e devem ser abordadas em estudos futuros. Modelos experimentais de pneumonia associada à ventilação mecânica e avaliação pré-clínica seriam úteis para esclarecer se a remoção / inibição do biofilme promovida pelo coquetel de bacteriófagos poderia prevenir ou reduzir a gravidade da PAV. Além disso, as enzimas recombinantes codificadas pelos bacteriófagos poderiam ser aplicadas diretamente à superfície do tubo como uma alternativa ao uso direto dos bacteriófagos.

O presente estudo é pioneiro na compreensão do crescimento de biofilme em tubos endotraqueais revestidos por bacteriófagos. A redução observada mostra um resultado favorável, mas insuficiente, sugerindo que o coquetel de bacteriófagos pode ser aplicado não como uma alternativa terapêutica, mas como estratégia complementar para o controle de biofilmes na superfície do tubo. Uma vez que uma baixa quantidade de bacteriófagos adsorvidos causou mudanças significativas no tratamento, com aumento do método de imobilização, resultados ainda melhores são esperados. Além disso, atenção especial deve ser dada ao desenvolvimento potencial de mecanismos de resistência à infecção pelos bacteriófagos, uma vez que ao longo do tempo a terapia fágica favorece o desenvolvimento de fenótipos insensíveis aos bacteriófagos.

5.4 QUARTA ETAPA

Além da atividade antibacteriana e antibiofilme, avaliou-se também se o crescimento celular controlado por meio dos bacteriófagos líticos poderia atuar como um mecanismo de seleção favorecendo o desenvolvimento de *P. aeruginosa* com expressão aumentada de fatores de virulência. Com base nos resultados, a hipótese nula também foi rejeitada, uma vez que houve diferenças nas taxas de crescimento e morfologia do biofilme e expressão gênica após o cocultivo de *P. aeruginosa* com os bacteriófagos.

Uma vez que a ocorrência de bactérias insensíveis à infecção por bacteriófagos tem sido amplamente relatada (LABRIE; SAMSON; MOINEAU, 2010; SEED, 2015; MACIEJEWSKA; OLSZAK; DRULIS-KAWA, 2018; HENRIKSEN et al., 2019), esta etapa avaliou a resposta ao estresse, medida como alteração de fatores de virulência de *P. aeruginosa* durante infecção pelos bacteriófagos recém descritos. De acordo com Bru et al. (2019) a infecção de *P. aeruginosa* por bacteriófagos estimula uma defesa imune adaptativa que inibe a motilidade. Além disso, os autores sugeriram que a infecção induz a secreção de moléculas sinalizadoras no ambiente circundante, que repele as cepas não infectadas que se aproximam. A literatura tem relacionado alguns mecanismos de defesa à infecção por bacteriófagos com a sinalização por *quorum sensing*, o que pode ser um importante determinante das interações fago-hospedeiro (HOYLAND-KROGHSBO; MAERKED AHL; SVENNINGSEN, 2013). Já foi relatado que na presença de moléculas de sinalização por *quorum sensing*, a bactéria *E. coli* reduz significativamente o número do receptor de bacteriófago LamB para prevenir a adsorção dos vírus (HOYLAND-KROGHSBO; MAERKED AHL; SVENNINGSEN, 2013). Da mesma forma, em *Vibrio cholerae*, foi demonstrado que as moléculas de sinalização por *quorum sensing* protegem as bactérias contra o ataque de bacteriófagos líticos, regulando negativamente receptores para adsorção (HOQUE et al., 2016). Similarmente, em estudos envolvendo *P. aeruginosa*, foi estabelecido que a sinalização por *quorum sensing* diminui a infecção por bacteriófagos líticos (QIN et al., 2016).

Os resultados do presente estudo indicaram que todos os bacteriófagos foram capazes de reduzir eficientemente as taxas de formação de biofilme por *P. aeruginosa* em até 8 h de cocultura, em comparação ao controle. A ineficácia após 24 horas de cultura pode ser explicada pela emergência de variantes resistentes à infecção pelos bacteriófagos. Esse resultado é corroborado pelos achados de Forti et al. (2018). Os autores afirmaram que os mutantes resistentes à infecção cresceram a uma densidade alta após 24 h de incubação. Além disso, Henriksen et al. (2019) demonstraram que o tratamento com bacteriófagos nos estágios iniciais de formação biofilme reduziu significativamente o biovolume de *P. aeruginosa*. No entanto, depois de repetidas aplicações foi observado um aumento significativo no biovolume dos biofilmes.

Uma alteração morfológica, resultando na formação de células alongadas, foi observada após 8 h de cocultura com os bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3. Todavia, essa característica não foi observada nas avaliações anteriores e posteriores. Essa alteração fenotípica é chamada de filamentação e é caracterizada por uma

alteração ou falta de septação durante o crescimento celular como estratégia de sobrevivência da bactéria (JUSTICE et al., 2008; RIZZO; DE PLANO; FRANCO, 2020). A filamentação ocorre em ambientes estressantes, e existem muitas evidências de que a alteração morfológica favorece a sinergia bacteriófago-antibiótico (KIM et al., 2018; TAGLIAFERRI; JANSEN; HORZ, 2019). Segundo Ragunathan e Vanderpool (2019), os profagos retêm genes de função desconhecida que podem ser importantes para regular o metabolismo bacteriano, a divisão celular e a suscetibilidade à infecção por bacteriófagos. Por exemplo, a expressão de inibidores codificados por profago *CbtA/CbeA*, *Kil* e *DicB/DicF* foi associada à transição para a morfologia filamentosa em hospedeiro bacteriano (RIZZO; DE PLANO; FRANCO, 2020). Diante do exposto, duas hipóteses diferentes foram sugeridas para explicar a filamentação de *P. aeruginosa*. Na primeira, após 8 h de cocultivo os bacteriófagos poderiam ter induzido uma transformação espontânea, replicando-se lisogenicamente, o que em termos também explicaria o aumento das taxas de crescimento do biofilme após 24 h de incubação. Além disso, especulou-se se bacteriocinas teriam sido produzidas durante a propagação ou armazenamento dos bacteriófagos, o que afetou a morfologia das bactérias. Kim et al. (2018) descreveram que a filamentação é considerada um fator preditivo para montagem prolongada de bacteriófagos e retardo da lise. Os autores indicaram que o retardo da lise é devido à disponibilidade limitada de holinas intracelulares para agregar e formar poros na membrana do hospedeiro, o que também poderia explicar o aumento no crescimento do biofilme após 8 h de cocultura.

Está bem estabelecido que a síntese de piocianina é regulada pelo sistema de comunicação por *quorum sensing*. A piocianina, uma das principais fenazinas, é um importante fator de virulência produzida por *P. aeruginosa* e tem papel essencial na formação de biofilme (DONG et al., 2020) e na infecção aguda e crônica (RADA; LETO, 2013). Além disso, a piocianina está associada à liberação de DNA extracelular, o qual promove mudanças na viscosidade do biofilme, acelerando as interações físico-químicas da matriz do biofilme e facilitando a agregação das células (JENNINGS et al., 2015; DAS et al., 2015). No presente estudo, a infecção por bacteriófagos não promoveu resposta celular significativa em termos de produção de piocianina. Observou-se apenas que a produção de piocianina foi maior com o tempo de cultivo e aumento da densidade celular. Esse resultado é apoiado por Fuqua, Parsek e Greenberg (2001) que demonstraram que a piocianina é produzida em fase estacionária, é dependente da densidade celular e regulada por moléculas sinalizadoras que modulam a expressão de genes de virulência. Ao contrário, Hosseinidoust, Van de Ven e Tufenkji (2013)

revelaram aumento na produção de piocianina por *P. aeruginosa* resistente à infecção por bacteriófagos.

As proteases extracelulares estão relacionadas a danos aos tecidos do hospedeiro e contribuem para a virulência *in vivo* e o crescimento de *P. aeruginosa* (SANDRI et al., 2018). As proteases secretadas por *P. aeruginosa* incluem elastase A (LasA), elastase B (LasB), protease alcalina (AP), protease IV (PIV), protease pequena de *Pseudomonas* (PASP), protease grande A (LepA), MucD e aminopeptidase (PAAP) (GALDINO et al., 2017). Um aumento na secreção de proteases por *P. aeruginosa* resistente à infecção por bacteriófagos foi relatado anteriormente (HOSSEINIDOUST; VAN DE VEN; TUFENKJI, 2013). Entretanto, no presente estudo a presença de bacteriófagos não alterou a secreção de proteases. Esse resultado indica que a infecção de *P. aeruginosa* pelos bacteriófagos avaliados não afetou esse fator de virulência.

Os fatores de virulência desempenham um papel importante na colonização bacteriana, sobrevivência e capacidade de invasão tecidual e dependem de um grande número de fatores extracelulares associados às células (SARKISOVA et al., 2005). No entanto, o impacto da infecção por bacteriófagos líticos na expressão de genes relacionados à virulência do hospedeiro ao longo do tempo é escassamente discutido. De modo geral, os resultados obtidos nesta etapa indicam que a infecção de *P. aeruginosa* pelos bacteriófagos promoveu elevada expressão de genes relacionados à virulência no início (2 h) e na fase estacionária da cultura (48 h). Nas fases iniciais da cultura, pode-se sugerir que os bacteriófagos oferecem uma limitação inicial ao crescimento celular, a qual levou a *P. aeruginosa* a ativar genes relacionados à virulência. Durante a fase estacionária, os bacteriófagos não parecem oferecer limitação ao crescimento do biofilme, e os mecanismos dependentes da densidade celular podem ter influenciado a expressão de genes relacionados ao mecanismo de *quorum sensing* (*lasI*, *phzH*), síntese de polissacarídeos extracelulares (*pslA*) e degradação de componentes do sistema imunológico inato (*lasB*). Consistente com a regulação positiva na fase estacionária, Ravantti et al. (2008) demonstraram que as mudanças nos perfis de transcrição das bactérias após a infecção por bacteriófagos tornaram-se mais pronunciadas no momento em que as células atingiram a fase estacionária.

Ao avaliar os genes relacionados ao mecanismo de *quorum sensing*, observou-se um nível de expressão semelhante para *lasI* e *phzH*. Embora não tenha sido investigado o sistema *lasI-lasR* completo, a regulação positiva de *lasI* é o evento decisivo para a ativação da via completa (MORADALI et al., 2017). Foi observada uma regulação positiva no início e na fase

estacionária da cultura, e nenhuma mudança significativa foi observada após 8 e 24 horas de cultivo. Os genes envolvidos no sistema de comunicação por *quorum sensing* foram avaliados considerando que nenhum estudo na literatura avaliou se a infecção por bacteriófago poderia influenciar o nível de transcrição desses genes ao longo do tempo de infecção. Destaca-se a importância dos achados aqui descritos, uma vez que a regulação positiva observada principalmente após 8 e 48 h de cocultivo demonstram que os bacteriófagos promoveram uma resposta biológica significativa pela *P. aeruginosa*. De acordo com esses resultados, estudos futuros devem ser realizados no intuito de investigar as vias de sinalização envolvidas na sinalização por *quorum sensing*.

O locus *psl* está fortemente associado à capacidade de formação de biofilme em cepas de *P. aeruginosa*, por facilitar as interações entre as células e aumentar a reticulação e a elasticidade da matriz (MA et al., 2009). Uma vez que as bactérias podem coordenar a expressão de seus fatores de virulência em resposta adaptativa às alterações ambientais (THOMAS; WIGNESHWERARAJ, 2014), o nível de expressão do gene *pslA* foi investigado como uma tentativa de esclarecer se *P. aeruginosa* poderia aumentar a capacidade de formação de biofilme após a infecção pelos bacteriófagos. Todavia, no presente estudo foi observado que a infecção pelos bacteriófagos não promoveu aumento na capacidade de formação de biofilme nos estágios iniciais do crescimento da bactéria.

Embora não tenham sido observadas diferenças quanto à secreção de proteases, foi registrada expressão elevada do gene *lasB*. Estudos prévios também indicaram um aumento no nível de transcrição de *lasB* por *P. aeruginosa* resistente à infecção por bacteriófagos (HOSSEINIDOUST; VAN DE VEM; TUFENKJI, 2013). Na verdade, é difícil generalizar a secreção de proteases extracelulares com base na transcrição de um único gene. A análise completa do transcriptoma, após a infecção por bacteriófagos, poderia explicar a secreção de diferentes fatores de virulência (HOSSEINIDOUST; VAN DE VEM; TUFENKJI, 2013).

O gene *phzH* atua convertendo o ácido fenazina-1-carboxílico em fenazina na via sintética da piocianina (SUN et al., 2016). Correlacionando a produção de piocianina com a expressão do gene *phzH*, observou-se correspondência nos resultados após 48 h de incubação. Os níveis de transcrição de *phzH* geralmente foram aumentados em culturas em fase estacionária de crescimento.

A avaliação dos fatores de virulência de *P. aeruginosa*, após a infecção pelos bacteriófagos, nas condições experimentais testadas, indicou alterações significativas na morfologia e na expressão gênica. Embora esses achados sejam preliminares e as vias de

sinalização completas devam ser investigadas, para apoiar conclusões mais claras, os resultados destacam a necessidade de uma investigação extensiva a respeito da aplicação de bacteriófagos para o controle de infecções *in vivo*. Apesar de todos os avanços na pesquisa envolvendo bacteriófagos, estudos futuros compreendendo a análise completa do transcriptoma devem ser realizados para detalhar as vias específicas que são ativadas em resposta à infecção pelos bacteriófagos, a fim de esclarecer os mecanismos pelos quais a infecção por bacteriófagos altera a expressão de diferentes genes relacionados a fatores de virulência. A expressão de fatores de virulência pode ter um papel significativo no surgimento de cepas resistentes à infecção por bacteriófagos, comprometendo a eficácia da fagoterapia e a patogênese da infecção. Como uma forma alternativa à direta aplicação de bacteriófagos, as endolisinas codificadas pelos vírus, cujo mecanismo de ação não está vinculado à adsorção ou resposta antiviral, é um campo amplo para investigação de novos agentes antimicrobianos para prevenir ou controlar biofilme em dispositivos médico-hospitalares.

Em conclusão, esta etapa demonstrou que os bacteriófagos recém-descritos alteraram o crescimento de *P. aeruginosa* por até 8 h de cultivo. No entanto, eles promoveram a filamentação da bactéria após 8 h de cultivo e promoveram o aumento da expressão de genes relacionados à virulência principalmente após 2 e 48 h de infecção. Esses achados sugerem que os bacteriófagos líticos podem, potencialmente, aumentar a virulência de *P. aeruginosa*. No entanto, as investigações envolvendo terapia fágica, cepas insensíveis à infecção por bacteriófagos e fatores de virulência relacionados à infecção ainda estão em andamento, e o estudo atual foi limitado por não examinar vias completas de sinalização envolvidas na infecção fágica. Apesar disso, acredita-se que esses resultados podem ser um ponto de partida para elucidar essa questão em estudos futuros.

6. Conclusão

Considerando as condições experimentais do presente estudo e de acordo com a metodologia empregada conclui-se que:

- Foi possível isolar, purificar e caracterizar cinco novos bacteriófagos, pertencentes à ordem Caudovirales e família Myoviridae, a partir de amostras de esgoto doméstico.
- Os bacteriófagos recém isolados exibiram um amplo espectro lítico e foram capazes de infectar 69,7% das cepas de *P. aeruginosa*, incluindo cepas multirresistentes.
- Todos os bacteriófagos foram capazes de reduzir o crescimento de *P. aeruginosa* na forma planctônica. Além disso, os bacteriófagos reduziram a carga microbiana, a atividade metabólica e a área recoberta por biofilmes, quando aplicados à biofilmes maduros na superfície de tubos endotraqueais.
- O coquetel composto pelos bacteriófagos vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_18 foi capaz de adsorver na superfície de tubos endotraqueais, alcançando uma cobertura inicial de 1×10^3 UFP/mL.
- Em condições de crescimento em fluxo contínuo, tubos endotraqueais recobertos com o coquetel de bacteriófagos apresentaram alteração na colonização e formação de biofilme por *P. aeruginosa*.
- Em condições de cocultivo, os bacteriófagos promoveram mudanças no crescimento do biofilme apenas até 8 horas de incubação, e a presença dos bacteriófagos vB_PaeM_USP_1, vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3 promoveu filamentação da morfologia bacteriana. Nenhum dos bacteriófagos alterou a produção de pirocianina e proteases extracelulares.
- Houve aumento do nível de expressão de genes relacionados ao mecanismo de *quorum sensing* e virulência, principalmente, após 2 e 48 h de cocultivo.

7. Referências ¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT NBR 6023:2018 (Informação e documentação: referências: elaboração)].

- ABEDON, S. T. Bacteriophage exploitation of bacterial biofilms: phage preference for less mature targets? **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 3, p. fnv246, 2016.
- ADNAN, M. et al. Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. **Biologicals**, v. 63, p. 89–96, 2020.
- AGARWAL, A. et al. Removal of biofilms by intermittent low-intensity ultrasonication triggered bursting of microbubbles. **Biofouling**, v. 30, n. 3, p. 359–365, 2014.
- AN, T. W. et al. The immune-enhancing effect of the *Cronobacter sakazakii* ES2 phage results in the activation of nuclear factor B and dendritic cell maturation via the activation of IL-12p40 in the mouse bone marrow. **Immunology Letters**, v. 157, n. 1, p.1–8, 2014.
- AL-WRAFY F. et al. Identification and characterization of phage protein and its activity against two strains of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. e13487, 2019.
- ALESHKIN, A. V. et al. Phagebiotics in treatment and prophylaxis of healthcare-associated infections. **Bacteriophage**, v. 6, n. 4, p. e1251379, 2016.
- ARAÚJO, P.; LEMOS, M.; SIMÕES, M. Controlo químico de biofilmes industriais. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes: Na saúde, no ambiente, na indústria**. Publindústria, 2012. p. 267–275.
- AZEREDO, J.; SUTHERLAND, I. W. The use of phages for the removal of infectious biofilms. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 261–266, 2008.
- AZEREDO, J. et al. Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 313–351, 2017.
- AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. A matriz dos biofilmes: o truque para sobreviver nas mais hostis condições ambientais. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes: Na saúde, no ambiente, na indústria**. Publindústria, 2012. p. 23–26.
- BAO J. et al. Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 771–774, 2020.
- BARBIER, F. et al. Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 19, n. 3, p. 216–228, 2013.
- BARROS, J. A. R. et al. Encapsulated bacteriophages in alginate-nanohydroxyapatite hydrogel as a novel delivery system to prevent orthopedic implant-associated infections. **Nanomedicine**, v. 24, p. e102145, 2020.
- BASU, S. et al. An In vivo Wound Model Utilizing Bacteriophage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Ostomy Wound Management**, v. 61, n. 8, p. 16–23, 2015.

- BERRA, L. et al. Endotracheal tubes coated with antiseptics decrease bacterial colonization of the ventilator circuits, lungs, and endotracheal tube. **Anesthesiology**, v. 100, n. 6, p. 1446–1456, 2004.
- BOEV, C.; KISS, E. Hospital-Acquired Infections: Current Trends and Prevention. **Critical care nursing clinics of North America**, v. 29, n. 1, p. 51–65, 2017.
- BONEZ, P. C. et al. Anti-biofilm activity of A22 ((S-3,4-dichlorobenzyl) isothioureahydrochloride) against *Pseudomonas aeruginosa*: Influence on biofilm formation, motility and bioadhesion. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 6–13, 2017.
- BORYSOWSKI, J. et al. A3R Phage and *Staphylococcus aureus* Lysate Do Not Induce Neutrophil Degranulation. **Viruses**, v. 9, n. 2, p. e36, 2017.
- BOUCHER, H. W. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! an update from the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Disease**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2009.
- BREITBART, M. Marine viruses: truth or dare. **Annual review of marine science**, v. 4, p. 425–48, 2012.
- BRU, J. L. et al. PQS Produced by the *Pseudomonas aeruginosa* Stress Response Repels Swarms Away from Bacteriophage and Antibiotics. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 23, p. e00383-19, 2019.
- BUDAYANTI, N. S. et al. Identification and Distribution of Pathogens in a Major Tertiary Hospital of Indonesia. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 395, 2020.
- CADEMARTIRI, R. et al. Immobilization of bacteriophages on modified silica particles. **Biomaterials**, v. 31, v. 7, p. 1904–1910, 2010.
- CAFLISCH, K. M.; SUH G. A.; PATEL, R. Biological Challenges of Phage Therapy and Proposed Solutions: A Literature Review. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 12, p. 1011–1041, 2019.
- CAFORA, M. et al. Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model. **Scientific Reports**, v. 9, p. e1527, 2019.
- CANCHAYA, C. et al. Phage as agents of lateral gene transfer. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 417–424, 2003.
- CARSON, L.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 447–455, 2010.
- CEGELSKI, L. et al. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 12, p. 913–919, 2009.
- CERCA, N. et al. Farnesol induces cell detachment from established *S. epidermidis* biofilms. **Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 5, p. 255–258, 2013.

- CHAN, B. K.; ABEDON, S. T.; LOC-CARRILLO, C. Phage cocktails and the future of phage therapy. **Future Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 769–783, 2013.
- CHAN, B. K. et al. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Evolution, medicine, and public health**, v. 8, n. 1, p. 60–66, 2018.
- CHANG, C. Y. Surface Sensing for Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers Microbiology**, v. 8, p. e2671, 2018.
- CHAUDHRY, W. N. et al. Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Plos one**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2017.
- CHENG, W. et al. Incorporation of bacteriophages in polycaprolactone/collagen fibers for antibacterial hemostatic dual-function. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 106, n. 7, p. 2588–2595, 2018.
- CIEPLIK, F. et al. Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria – Is There Cause for Concern? **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. -, p. 587, 2019.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI document M100-S29. 29th ed. Wayne, 2019.
- CONLON, B. P.; ROWE, S. E.; LEWIS, K. Persister cells in biofilm associated infections. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 831, p. 1–9, 2015.
- CUI, Z. et al. Characterization and complete genome of the virulent *Myoviridae* phage JD007 active against a variety of *Staphylococcus aureus* isolates from different hospitals in Shanghai, China. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2017.
- CURTIN, J. J.; DONLAN, R. M. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1268–1275, 2006.
- DA SILVA, W. J. et al. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. **Brazilian Dental Journal**, v. 19, n. 4, p. 364–369, 2008.
- DABROWSKA, K. et al. Bacteriophage penetration in vertebrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 7–13, 2005.
- DARCH, S. E. et al. Phage Inhibit Pathogen Dissemination by Targeting Bacterial Migrants in a Chronic Infection Model. **mBio**, v. 8, n. 2, p. e00240-17, 2017.
- DAS, T. et al. Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58299, 2013.
- de MELO, A. C. C. et al. Characterization of a bacteriophage with broad host range against strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from domestic animals. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 134, p. 1–15, 2019.

- DONG, L. et al. Mechanism of pyocyanin abolishment caused by mvaT mvaU double knockout in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 57–67, 2020.
- DUFOUR, N. et al. Phage therapy of pneumonia is not associated with an over stimulation of the inflammatory response compared to antibiotic treatment in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 8, p. e00379–19, 2019.
- ESSAR, D. W. et al. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 2, p. 884–900, 1990.
- FABIJAN, A. P. et al. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. **Nature Microbiology**, v. 5, p. 465–472, 2020.
- FAZELI, H. et al. *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospital means, and personnel's specimens. **Journal of Research in Medical Science**, v. 17, n. 4, p. 332–337, 2012.
- FERNÁNDEZ-BARAT, L. et al. Linezolid limits burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilm of tracheal tubes. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 8, p. 2385–2389. 2012.
- FERNANDEZ-RUIZ, I.; COUTINHO, F. H.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Thousands of Novel Endolysins Discovered in Uncultured Phage Genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. e1033, 2008.
- FERRIOL-GONZÁLEZ, C.; DOMINGO-CALAP, P. Phages for Biofilm Removal. **Antibiotics**, v. 9, n. 5, p. 268, 2020.
- FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016a.
- FLEMMING, H. C. EPS - Then and Now. **Microorganisms**, v. 4, p.e41, 2016b.
- FONG, S. A. et al. Safety and efficacy of a bacteriophage cocktail in an in vivo model of *Pseudomonas aeruginosa* sinusitis. **Translational Research**, v. 206, p. 41–56, 2019.
- FORTI, F. et al. Design of a Broad-Range Bacteriophage Cocktail That Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms and Treats Acute Infections in Two Animal Models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. e02573-17, 2018.
- FRANÇA, A.; CERCA, N. Biofilmes de *Staphylococcus* em dispositivos médicos. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes: Na saúde, no ambiente, na indústria**. Publindústria, 2012. p. 37–43.
- FU, W. L. et al. Bacteriophage Cocktail for the Prevention of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* on Catheters in an In Vitro Model System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 397–404, 2010.

- FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. **Annual Review of Genetics**, v. 35, p. 439–468, 2001.
- FUMES, A. C. et al. Effect of aPDT on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* present in the dental biofilm: Systematic review. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 363–366, 2018.
- GALDINO, A. C. M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host. In: CHAKRABORTI S., DHALLA N. **Pathophysiological Aspects of Proteases**. Singapore, Springer, 2017.
- GANESH, A. et al. The Effect of Addition of an EPS Degrading Enzyme with and without Detergent to 2% Chlorhexidine on Disruption of *Enterococcus faecalis* Biofilm: A Confocal Laser Scanning Microscopic Study. **Journal of clinical and diagnostic research**, n. 9, v.11, p. ZC61-5, 2015.
- GAO, G.Z. et al. The biocompatibility and biofilm resistance of implant coatings based on hydrophilic polymer brushes conjugated with antimicrobial peptides. **Biomaterials**, v. 32, n. 16, p. 3899–3909, 2011.
- GIL-PEROTIN, S. et al. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. **Critical Care**, v. 16, n. 3, p. R93, 2012.
- GÓRSKI, A. et al. Phage as a modulator of immune responses: Practical implications for phage therapy. **Advances in Virus Research**, v. 83, p. 41–71, 2012.
- GUILLON, A. et al. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Present in Endotracheal Tubes by Poly-L-Lysine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 11, p. e00564-18, 2018.
- GUO, M. et al. A Novel Antimicrobial Endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 293, 2017.
- GUTIERREZ, D. et al. Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 15, 2016.
- HAAS, C. F. et al. Endotracheal Tubes: Old and New. **Respiratory Care**, v. 59, n. 6, p. 933–952, 2014.
- HATFULL, G. F.; HENDRIX, R. W. Bacteriophages and their genomes. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 4, p. :298–303, 2011.
- HENRIKSEN, K. et al. *P. aeruginosa* Flow-Cell Biofilms Are Enhanced by Repeated Phage Treatments but Can Be Eradicated by Phage-Ciprofloxacin Combination. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 2, p. ftz011, 2019.
- HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. Prevalência de biofilmes nosocomiais em Portugal e no Brasil. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes: Na saúde, no ambiente, na indústria**. Publindústria, 2012. p.227–236.

HOQUE, M. M. et al. Quorum regulated resistance of *Vibrio cholerae* against environmental bacteriophages. **Scientific Reports**, v. 6, p. 37956, 2016.

HOSSEINIDOUST, Z.; VAN DE VEN, T. G. M.; TUFENKJI, N. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence as a Result of Phage Predation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 6110–6116, 2013.

HOYLAND-KROGHSBO, N. M.; MAERKEDAH, R. B.; SVENNINGSEN, S. L. A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. **mBio**, v. 4, n. 1, p. e00362, 2013.

HYMAN, P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 35, 2019.

JAULT, P. et al. Efficacy and Tolerability of a Cocktail of Bacteriophages to Treat Burn Wounds Infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): A Randomised, Controlled, Double-Blind Phase 1/2 Trial. **Lancet Infectious Disease**, v. 19, n. 1, p. 35–45, 2019.

JENNES S. et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury-a case report. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 1–3, 2017.

JENNINGS, L. K. et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PNAS USA**, v. 112, n. 23, p. 11353–8, 2015.

JUSTICE, S. S. et al. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. **Nature Review in Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 162–168, 2008.

International Society for Viruses of Microorganisms. Resources. Disponível em: <http://www.isvm.org/resources.html>. Acesso em: 22/06/2020.

KAABI, S. A. G.; MUSAFER, H. K. An experimental mouse model for phage therapy of bacterial pathogens causing bacteremia. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, n. -, p. e103770, 2019.

KALIA, M. et al. Effect of Cinnamon Oil on Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135495, 2015.

KAUR, S.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Bacteriophage Mediated Killing of *Staphylococcus aureus* *In Vitro* on Orthopaedic K Wires in Presence of Linezolid Prevents Implant Colonization. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. e90411, 2014.

KESEL, S. et al. Carbohydrate Coating Reduces Adhesion of Biofilm-Forming *Bacillus subtilis* to Gold Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 19, p. 5911–5917, 2014.

KHAL, A. E. **Isolamento e caracterização genômica de bacteriófagos quanto ao seu potencial de uso terapêutico em infecções causadas por enterobactérias**. Belo Horizonte, 2016. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2016.

- KIM, M. et al. Phage-Antibiotic Synergy via Delayed Lysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 22, p. e02085-18, 2018.
- KIM, S. et al. Antimicrobial Activity of LysSS, a Novel Phage Endolysin, Against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 32–39, 2020.
- KURABI, A. et al. Optimisation of peptides that actively cross the tympanic membrane by random amino acid extension: a phage display study. **Journal of drug targeting**, v. 26, n. 2, p.127–134, 2018.
- LABRIE, S. J.; SAMSON, J. E.; MOINEAU, S. Bacteriophage resistance mechanisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 317–327, 2010.
- LATKA, A. et al. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 8, p. 3103–3119, 2017.
- LEHMAN, S. M.; DONLAN, R. M. Bacteriophage-Mediated Control of a Two-Species Biofilm Formed by Microorganisms Causing Catheter-Associated Urinary Tract Infections in an In Vitro Urinary Catheter Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1127–1137, 2015.
- LEPPÄNEN, M.; MAASILTA, I. J.; SUNDBERG, L. R. Antibacterial efficiency of surface-immobilized *Flavobacterium*-infecting bacteriophage. **ACS Applied Bio Materials**, v. 2, n. 11, p. 4720–4727, 2019.
- LESSA, F. C. R. et al. Toxicity of Chlorhexidine on Odontoblast-Like Cells. **Journal of Applied Oral Science**, v. 18, p. 50–58, 2010.
- LIAO, K. S. et al. Bacteriophages are synergistic with bacterial interference for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 6, p. 1530–1539, 2012.
- LIN, D. M.; KOSKELLA, B.; LIN, H. C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, n. 3, p. 162–173, 2017.
- LIN, L. B. et al. Isolation and characterization of an extremely long tail *Thermus* bacteriophage from Tengchong hot springs in China. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 452–456, 2010.
- LOC-CARRILLO, C.; ABEDON, S. T. Pros and cons of phage therapy. **Bacteriophage**, v. 1, n. 2, p. 111–114, 2011.
- LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Review in Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19–31, 2018.

LOPES, S. et al. Biofilm formation methods. In: PEREIRA, M. O. et al. **Clinical Biofilms: current concepts and advanced techniques**. University of Minho, Centre of biological engineering, 2014. p. 95–127.

LUNGREN, M. P. et al. Bacteriophage K Antimicrobial-Lock Technique for Treatment of *Staphylococcus aureus* Central Venous Catheter-Related Infection: A Leporine Model Efficacy Analysis. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 25, n. 10, p. 1627–1632, 2014.

LUNGREN, M. P. et al. Bacteriophage K for reduction of *Staphylococcus aureus* biofilm on central venous catheter material. **Bacteriophage**, v. 3, n. 4, p. e26825, 2013.

LUO, J. et al. Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model. **PLoS One**, v.12, n. 4, p. e0176883, 2017.

MA, L. et al. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 3, p. e1000354, 2009.

MACIEJEWSKA, B.; OLSZAK, T.; DRULIS-KAWA, Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 6, p. 2563–2581, 2018.

MAGANA, M. et al. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 3, p. e00084-16, 2018.

MAGIORAKOS, A. P. et al. 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, 2012.

MAO, B. H. et al. Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2445, 2018

MELO, L. D. R. et al. Development of a Phage Cocktail to Control *Proteus mirabilis* Catheter-associated Urinary Tract Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1024, 2016.

MELO, L. D. R. et al. Isolation and characterization of a new *Staphylococcus epidermidis* broad-spectrum bacteriophage. **Journal of General Virology**, v. 95, n. PT2, p. 506–515, 2014.

MELO, L. D. R. et al. Characterization of a New *Staphylococcus aureus* Kayvirus Harboring a Lysin Active against Biofilms. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. e182, 2018.

MELO, L. D. R. et al. Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies. **Critical Review in Microbiology**, v. 46, n. 1, p.78–99, 2020.

MELO, L. D. R.; SILLANKORVA, S.; AZEREDO, J. Uso de bacteriófagos para o controlo de biofilmes. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes: Na saúde, no ambiente, na indústria**. Publindústria, 2012. p. 227–236.

- MELSEN, W. G. et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. **Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 8, p. 665–671, 2013.
- MIEDZYBRODZKI, R. et al. Clinical Aspects of Phage Therapy. In: LOBOCKA, M.; SZYBALSKI, W. T. (Ed.). **Advances in Virus Research**, Vol 83: Bacteriophages, Pt B. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, v. 83, 2012. p.73–121.
- MILENKOVIC, J. et al. Synergistic anti-biofouling effect of Ag-exchanged zeolite and D-Tyrosine on PVC composite against the clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. **Biofouling**, v. 30, n. 8, p. 965–973, 2014.
- MILO, S. et al. Prevention of encrustation and blockage of urinary catheters by *Proteus mirabilis* via pH-triggered release of bacteriophage. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 27, p. 5403–5411, 2017.
- MINGRONE, R. C. C. **Caracterização de bacteriófagos infectando isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* armazenados em uma coleção de cultura**. São Paulo: UNESP, 2011. 21 f. Trabalho conclusão de curso, curso de Biomedicina, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, São Paulo, 2011.
- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, n. -, p. e39, 2019.
- NABERGOJ, D.; MODIC, P.; PODGORNIK, A. Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. **Microbiologyopen**, v. 7, n. 2, p. e00558, 2018.
- NAIDU, M. et al. Characterization of bacteriophage communities and CRISPR profiles from dental plaque. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 175, 2014.
- NIKKHAHI, F. et al. Phage therapy: assessment of the efficacy of a bacteriophage isolated in the treatment of salmonellosis induced by *Salmonella enteritidis* in mice. **Gastroenterology and hepatology from bed to bench**, v. 10, n. 2, p.131–136, 2017.
- NILSSON, A. S. Pharmacological limitations of phage therapy. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 124, n. 4, p. 218–227, 2019.
- NSEIR, S. et al. Pathophysiology of airway colonization in critically ill COPD patient. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 4, p. 514–520, 2011.
- NZAKIZWANAYO, J. et al. Bacteriophage Can Prevent Encrustation and Blockage of Urinary Catheters by *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1530–1536, 2016.
- OECHSLIN, F. et al. Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 5, p. 703–712, 2017.

- OOI, M. L. et al. Safety and Tolerability of Bacteriophage Therapy for Chronic Rhinosinusitis Due to *Staphylococcus aureus*. **JAMA Otolaryngology- Head & Neck Surgery**, v. 145, n. 8, p. 723–729, 2019.
- PAISANO, A. F.; BOMBANA, A. C. Fagoterapia como alternativa no combate às infecções endodônticas. **Revista Gaúcha Odontologia**, v. 58, n. 2, p. 243–252, 2010.
- PALAVUTITOTAI, N. et al. Epidemiology and risk factors of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0193431, 2018.
- PANDEY, P. K. et al. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. **Amb Express**, v. 4, p. 51, 2014.
- PEARL, S. et al. Nongenetic individuality in the host–phage interaction. **PLOS Biology**, v. 6, n. 5, p. e120, 2008.
- PERCIVAL, S. L. et al. Health care associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. PT4, p. 323–334, 2015.
- PETERS, B. M. et al. Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 193–213, 2012.
- PIMENTEL, N. D. et al. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 1–8, 2014.
- PINTO, G. et al. The role of bacteriophages in periodontal health and disease. **Future Microbiology**, v. 11, n. 10, p.1359–1369, 2016.
- POŁASKA, M.; SOKOŁOWSKA, B. Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. **AIMS Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 324–346, 2019.
- PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 7, p. 309–318, 2015.
- PRIDE, D. T. et al. Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. **ISME Journal**, v. 6, n. 5, p. 915–926, 2012.
- PRIGENT, M. et al. A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara Desert. **Extremophiles**, v. 9, n. 4, p. 289–296, 2005.
- QIN, X. et al. Quorum sensing influences phage infection efficiency via affecting cell population and physiological state. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 2. p. 162–170, 2017.
- RADA, B.; LETO, T. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 73–81, 2013.

- RAGUNATHAN, P. T.; VANDERPOOL, C. K. Cryptic-Prophage-Encoded Small Protein DicB Protects *Escherichia coli* From Phage Infection by Inhibiting Inner Membrane Receptor Proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 23, p. e00475-19, 2019.
- RAKHUBA, D. V. et al. Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 145–155, 2010.
- RAVANTTI, J. J. et al. Global Transcriptional Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to Phage PRR1 Infection. **Journal of Virology**, v. 82, n. 5, p. 2324–2329, 2008.
- RIZZO, M. G.; DE PLANO, L. M.; FRANCO, D. Regulation of filamentation by bacteria and its impact on the productivity of compounds in biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 11, p. 4631–4642, 2020.
- ROACH, D. R. et al. Synergy between the host immune system and bacteriophage is essential for successful phage therapy against an acute respiratory pathogen. **Cell Host Microbe**, v. 22, n. 1, p. 38, 2017.
- ROSE, T. et al. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. **International Journal Burns Trauma**, v. 4, n. 2, p. 66–73, 2014.
- ROSENTHAL, V. D. et al. International nosocomial infection control consortium report, data summary of 50 countries for 2010–2015: device associated module. **American Journal Infection Control**, v. 44, n. 12, p. 1495–1504, 2016.
- RUSSOTTO, V. et al. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. **Journal of Intensive Care** v.3, p.1–8, 2015.
- SALWICZEK, M. et al. Emerging rules for effective antimicrobial coatings. Trends in **Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 82–90, 2014.
- SANDRI, A. et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* secreted virulence factors reduces lung inflammation in CF mice. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 1008–1018, 2018.
- SANTOS, S. B.; AZEREDO, J. Bacteriophage-Based Biotechnological Applications. **Viruses**, v. 11, n. 8, p. e737, 2019.
- SARKER, S. A. et al. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. **EBio Medicine**, v. 4, p. 124–137, 2016.
- SARKISOVA, S. et al. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 12, p. 4327–4337, 2005.
- SAWSTROM, C. et al. Bacteriophage in polar inland waters. **Extremophiles**, v. 12, n. 2, p. 167–175, 2008.

- SCANLAN P. D.; BUCKLING, A. Co-evolution with lytic phage selects for the mucoid phenotype of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **The ISME Journal**, v. 6, n. 6, p. 1148–1158, 2012.
- SCHNEIDER, G. et al. Kinetics of targeted phage rescue in a mouse model of systemic *Escherichia coli* K12018. **BioMed research international**, v. 2018, p. e7569645, 2018.
- SCHNEIDER, L. A. et al. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? **Archives of Dermatological Research**, v. 298, n. 9, 413–420, 2007.
- SEED, K. D. Battling Phages: How Bacteria Defend against Viral Attack. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004847, 2015.
- SEGALL, A. M.; ROACH, D. R.; STRATHDEE, S. A. Stronger together? Perspectives on phage-antibiotic synergy in clinical applications of phage therapy. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, n. -, p. 46–50, 2019.
- SERWER, P.; WRIGHT, E. T. Nanomedicine and Phage Capsids. **Viruses**, v. 10, n. 6, p. e307, 2018.
- SHARMA, S. et al. Bacteriophages and its applications: an overview. **Folia Microbiology (Praha)**, v. 62, n. 1, p. 17–55, 2017.
- SHARMA, S. K. et al. Drug Discovery of Antimicrobial Photosensitizers Using Animal Models. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 13, p. 1303–1319, 2011.
- SKARIYACHAN, S. et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. **Folia Microbiology (Praha)**, v. 63, n. 4, p. 413–432, 2018.
- SKRUPKY, L. P. et al. A comparison of ventilator-associated pneumonia rates as identified according to the National Healthcare Safety Network and American College of Chest Physicians criteria. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 1, p. 281–284, 2012.
- SOUZA, P. R. et al. Endotracheal tube biofilm and ventilator-associated pneumonia with mechanical ventilation. **Microscopy research and technique**, v. 77, n. 4, p. 305–312, 2014.
- SPECK, P.; SMITHYMAN, A. Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 3, p. fnv242, 2016.
- SPIPKER, T. et al. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2074–2079, 2004.
- SUAREZ, M. S. **Estudo da interação entre neutrófilos, células dendríticas humanas e *L. braziliensis***. Salvador: FIOCRUZ. 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado), Pós Graduação em Patologia Humana, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador 2015.
- SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 649–659, 2001.

- SUN, S. et al. Quorum Sensing Systems Differentially Regulate the Production of phenazine-1-carboxylic Acid in the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201. **Scientific Reports**, v. 6, p. e30352, 2016.
- SUTTLE, C. A. Viruses in the sea. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 356–361, 2005.
- SYNNOTT, A. J. et al. Isolation from Sewage Influent and Characterization of Novel *Staphylococcus aureus* Bacteriophages with Wide Host Ranges and Potent Lytic Capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 13, p. 4483–4490, 2009.
- TAN, Y. et al. Effects of ALA-PDT on biofilm structure, virulence factor secretion, and QS in *Pseudomonas aeruginosa*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 88–94, 2018.
- TAGLIAFERRI, T. L.; JANSEN, M.; HORZ, H. S. Fighting Pathogenic Bacteria on Two Fronts: Phages and Antibiotics as Combined Strategy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. -, p. e22, 2019.
- THOMAS, E. **Multiplicity of infection**. Encyclopedia of Genetics. Academic Press, 2001. p. 1258.
- THOMAS, M. S.; WIGNESHWERARAJ, S. Regulation of virulence gene expression. **Virulence**, v. 5, n. 8, p. 832–834, 2014.
- TOKMAJI, G. et al. Silver-coated endotracheal tubes for prevention of ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2015, n. 8, p. CD009201, 2015.
- TOPKA, G. et al. Characterization of Bacteriophage vB-EcoS-95, Isolated From Urban Sewage and Revealing Extremely Rapid Lytic Development. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. e3326, 2019.
- TREND, S. et al. The Potential of Phage Therapy in Cystic Fibrosis: Essential Human-Bacterial-Phage Interactions and Delivery Considerations for Use in *Pseudomonas aeruginosa*-Infected Airways. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 16, n. 6, p. 663–670, 2017.
- UCHIYAMA, J. et al. Analyses of Short-Term Antagonistic Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Phage KPP22 (Myoviridae Family, PB1-Like Virus Genus). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 15, p. 4482–4491, 2016.
- VAHEDI, A. et al. Isolation and identification of specific bacteriophage against enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and in vitro and in vivo characterization of bacteriophage. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 16, p. fny136, 2018.
- VAN HELVOORT, T. Bacteriological and physiological research styles in the early controversy on the nature of the bacteriophage phenomenon. **Medical History**, v. 36, n. 3, p. 243–270, 1992.

- VAN HOUTD, R.; MICHELIS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.
- VEGA, N. M.; GORE, J. Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. **Current Opinion in Microbiology**, v. 21, p. 28–34, 2014.
- WAND, F. et al. TSPphg Lysin from the Extremophilic Thermus Bacteriophage TSP4 as a Potential Antimicrobial Agent against Both Gram-Negative and Gram-Positive Pathogenic Bacteria. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. E192, 2020.
- WANG, C.; SAUVAGEAU, D.; ELIAS, A. Immobilization of Active Bacteriophages on Polyhydroxyalkanoate Surfaces. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 2, p. 1128–1138, 2016.
- WATERS, E. M. et al. Phage Therapy Is Highly Effective Against Chronic Lung Infections With *Pseudomonas aeruginosa*. **Thorax**, v. 72, n. 7, p. 666–667, 2017.
- WEI, S. et al. The Φ CPG1 chlamydiaphage can infect *Chlamydia trachomatis* and significantly reduce its infectivity. **Virus Research**, v. 267, p. 1–8, 2019.
- WILLIAMSON, K. E.; RADOSEVICH, M.; WOMMACK, K. E. Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3119–3125, 2005.
- World Health Organization (WHO). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Geneva, Switzerland: WHO; 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-listof-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em 25/07/2019.
- World Health Organization (WHO). WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health. Geneva, Switzerland: WHO; 2017. Disponível em: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>. Acesso em 03/09/2020.
- WU, M. L. et al. A novel phage PD-6A3, and its endolysin Ply6A3, with extended lytic activity against *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. e3302, 2019.
- WRIGHT, A. et al. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. **Clinical Otolaryngology**, v. 34, n. 4, p. 349–357, 2009.
- YANG, Y. et al. Antibacterial Activity of a Lytic Enzyme Encoded by *Pseudomonas aeruginosa* Double Stranded RNA Bacteriophage phiYY. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. e1778, 2018.
- YUAN, Y. Y. et al. Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 329–336, 2019.

ZHAO, X. et al. Epidemiological and clinical characteristics of healthcare-associated infection in elderly patients in a large Chinese tertiary hospital: a 3-year surveillance study. **BMC Infectious Disease**, v. 20, p. e121, 2020.

ZIMLICHMAN, E. et al. Health Care-Associated Infections A Meta-analysis of Costs and Financial Impact on the US Health Care System. **JAMA Internal Medicine**, v. 173, n. 22, p. 2039–2046, 2013.

Apêndices

Apêndice A: Valores de média e desvio padrão da contagem de bacteriófagos ($\log_{10}$ UFP/mL) após exposição a diferentes potenciais hidrogeniônicos.

pH	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25	Total (pH)
3	4,57 (0,27) ^{Aa}	6,31 (0,15) ^{Cb}	5,88 (0,46) ^{BCa}	4,96 (0,34) ^{Aa}	5,66 (0,52) ^{Bab}	5,47 (0,73)
5	5,27 (0,51) ^{Ab}	6,47 (0,78) ^{Cb}	6,36 (0,33) ^{BCab}	5,40 (0,29) ^{Aab}	5,76 (0,68) ^{ABabc}	5,85 (0,73)
7	5,37 (0,11) ^{Ab}	6,87 (0,13) ^{Db}	6,53 (0,20) ^{CDb}	5,83 (0,26) ^{ABb}	6,16 (0,43) ^{BCbc}	6,15 (0,58)
9	5,23 (0,15) ^{Ab}	6,74 (0,14) ^{Bb}	6,31 (0,47) ^{Bab}	5,50 (0,71) ^{Aab}	6,34 (0,34) ^{Bc}	6,03 (0,70)
11	4,16 (0,47) ^{Aa}	4,98 (0,95) ^{Ba}	5,88 (0,55) ^{Ca}	5,01 (0,34) ^{Ba}	5,42 (0,66) ^{BCa}	5,09 (0,83)
Total (Bacteriófago)	4,92 (0,58)	6,27 (0,87)	6,19 (0,48)	5,34 (0,52)	5,87 (0,62)	5,72 (0,81)

ANOVA dois fatores (pH e bacteriófago). ^{ABCDE} letras maiúsculas indicam comparações entre os bacteriófagos. ^{abcde} letras minúsculas indicam comparações entre diferentes valores de pH. Letras iguais indicam semelhança estatística.

Apêndice B: Valores de média e desvio padrão da contagem do número de bacteriófagos ($\log_{10}$ UFP/mL) após exposição a diferentes temperaturas.

Temperatura	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25	Total (Temperatura)
37°C	5,31 (0,14) ^{Ac}	6,79 (0,22) ^{Bc}	6,64 (0,19) ^{Bc}	6,17 (0,41) ^{Bc}	6,55 (0,14) ^{Bb}	6,29 (0,58)
42°C	5,26 (0,23) ^{Ac}	6,79 (0,18) ^{Cc}	6,65 (0,28) ^{BCc}	6,06 (0,18) ^{Bc}	6,55 (0,18) ^{BCb}	6,26 (0,60)
50°C	5,27 (0,23) ^{Ac}	6,74 (0,23) ^{Bc}	6,55 (0,43) ^{Bc}	5,54 (0,74) ^{Abc}	6,56 (0,10) ^{Bb}	6,13 (0,73)
60°C	4,95 (0,54) ^{Ac}	6,38 (0,52) ^{Cc}	6,06 (0,85) ^{BCc}	5,66 (0,55) ^{Bbc}	6,00 (0,73) ^{BCb}	5,81 (0,79)
70°C	3,93 (0,30) ^{Ab}	5,42 (0,22) ^{Bb}	4,92 (0,31) ^{Bb}	5,33 (0,16) ^{Bb}	6,10 (0,19) ^{Cb}	5,14 (0,76)
80°C	0,00 (-)	0,00 (-)	0,00 (-)	0,19 (0,57) ^{Aa}	0,94 (1,48) ^{Ba}	0,56 (1,15)
Total (Bacteriófago)	4,95 (0,61)	6,43 (0,60)	6,17 (0,80)	4,82 (2,16)	5,45 (2,15)	5,53 (1,64)

ANOVA dois fatores (temperatura e bacteriófago). ^{ABCDE} letras maiúsculas indicam comparações entre os bacteriófagos. ^{abcde} letras minúsculas indicam comparações entre diferentes temperaturas. Letras iguais indicam semelhança estatística.

Apêndice C: Valores de média e desvio padrão da densidade óptica (OD₆₀₀) de diferentes amostras clínicas / ATCC, após 2 horas de cultivo na presença dos 5 diferentes bacteriófagos.

Amostras Clínicas ATCC	Controle	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25	Total (Cepas – 2 h)
Pa_ATCC 27853	0,065 (0,009) ^{Bde}	0,049 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,049 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,002) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aab}	0,053 (0,007)
Pa_ATCC 2108*	0,054 (0,001) ^{Aabc}	0,053 (0,001) ^{Aa}	0,053 (0,001) ^{Aab}	0,053 (0,002) ^{Aa}	0,053 (0,001) ^{Aa}	0,053 (0,002) ^{Aabc}	0,053 (0,002)
Pa_ATCC 2110*	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,052 (0,001)
Pa_ATCC 2112*	0,052 (0,001) ^{Aab}	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aab}	0,052 (0,001)
Pa_ATCC 2113*	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,054 (0,009) ^{Aa}	0,051 (0,002) ^{Aa}	0,052 (0,004) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,052 (0,001) ^{Aabc}	0,052 (0,004)
Pa_Ba_164	0,070 (0,004) ^{Cef}	0,053 (0,002) ^{Aa}	0,058 (0,008) ^{ABabc}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,057 (0,007) ^{ABabc}	0,059 (0,009) ^{Bcd}	0,058 (0,008)
Pa_Ba_168	0,070 (0,007) ^{Cef}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,060 (0,011) ^{Bbc}	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,061 (0,014) ^{Bbc}	0,056 (0,008) ^{ABabcd}	0,058 (0,010)
Pa_Ba_169	0,060 (0,005) ^{Bbcd}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,053 (0,002) ^{Aab}	0,051 (0,003) ^{Aa}	0,054 (0,003) ^{ABab}	0,057 (0,008) ^{ABabcd}	0,054 (0,005)
Pa_Mi_1	0,061 (0,002) ^{Bcd}	0,053 (0,001) ^{Aa}	0,053 (0,001) ^{Aab}	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,053 (0,002) ^{Aa}	0,054 (0,004)
Pa_Mi_2	0,065 (0,003) ^{Bde}	0,056 (0,006) ^{Aa}	0,054 (0,003) ^{Aabc}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,053 (0,001) ^{Aa}	0,054 (0,002) ^{Aa}	0,056 (0,005)
Pa_Mi_6	0,063 (0,001) ^{Cde}	0,055 (0,006) ^{ABa}	0,054 (0,002) ^{ABabc}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,055 (0,005) ^{ABab}	0,059 (0,011) ^{BCbcd}	0,056 (0,007)
Pa_Mi_7	0,066 (0,002) ^{Bde}	0,052 (0,003) ^{Aa}	0,053 (0,002) ^{Aab}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,052 (0,003) ^{Aa}	0,054 (0,006)
Pa_Trac_20	0,074 (0,004) ^{Def}	0,056 (0,007) ^{ABa}	0,061 (0,008) ^{BCc}	0,055 (0,004) ^{Aa}	0,062 (0,008) ^{Cc}	0,063 (0,011) ^{Cc}	0,062 (0,009)
Pa_Trac_23	0,069 (0,005) ^{Bef}	0,053 (0,002) ^{Aa}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,053 (0,002) ^{Aabc}	0,055 (0,007)
Pa_Ren_1	0,060 (0,003) ^{Bcd}	0,053 (0,005) ^{Aa}	0,052 (0,003) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,052 (0,002) ^{Aabc}	0,053 (0,004)
Total (Bacteriófago)	0,062 (0,008)	0,053 (0,004)	0,054 (0,005)	0,052 (0,002)	0,054 (0,006)	0,054 (0,006)	

ANOVA com ajuste de Bonferroni, para dois fatores independentes (cepa e bacteriófago). ^{ABCD} letras maiúsculas indicam comparações entre bacteriófagos. ^{abcdef} letras minúsculas indicam comparações entre cepas. Letras iguais indicam semelhança estatística.

*Cepas Multirresistentes.

Apêndice D: Valores de média e desvio padrão da densidade óptica (OD₆₀₀) de diferentes amostras clínicas / ATCC, após 4 horas de cultivo na presença dos 5 diferentes bacteriófagos.

Amostras Clínicas ATCC	Controle	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25	Total (Cepas – 4 h)
Pa_ATCC 27853	0,098 (0,015) ^{Bde}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,050 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aab}	0,050 (0,002) ^{Aa}	0,050 (0,001) ^{Aa}	0,058 (0,019)
Pa_ATCC 2108*	0,075 (0,005) ^{Aab}	0,077 (0,002) ^{Adef}	0,075 (0,003) ^{Abcd}	0,076 (0,003) ^{Ad}	0,076 (0,004) ^{Acdef}	0,076 (0,003) ^{Acde}	0,076 (0,003)
Pa_ATCC 2110*	0,065 (0,004) ^{Aa}	0,055 (0,001) ^{Aab}	0,056 (0,003) ^{Aa}	0,052 (0,001) ^{Aab}	0,053 (0,001) ^{Aab}	0,053 (0,001) ^{Aab}	0,056 (0,005)
Pa_ATCC 2112*	0,109 (0,015) ^{Cefg}	0,076 (0,004) ^{Bcde}	0,082 (0,004) ^{Bcd}	0,048 (0,001) ^{Aa}	0,081 (0,006) ^{Bdef}	0,078 (0,005) ^{Bde}	0,079 (0,019)
Pa_ATCC 2113*	0,081 (0,010) ^{Aabc}	0,073 (0,014) ^{Acde}	0,080 (0,013) ^{Acd}	0,073 (0,012) ^{Acd}	0,067 (0,012) ^{Abcde}	0,076 (0,013) ^{Acde}	0,075 (0,013)
Pa_Ba_164	0,126 (0,020) ^{Dg}	0,094 (0,021) ^{Cfg}	0,084 (0,013) ^{BCd}	0,071 (0,007) ^{ABcd}	0,062 (0,005) ^{Aabc}	0,070 (0,008) ^{ABbcd}	0,085 (0,025)
Pa_Ba_168	0,121 (0,022) ^{Cfg}	0,096 (0,018) ^{Bg}	0,080 (0,015) ^{Acd}	0,073 (0,008) ^{Acd}	0,066 (0,006) ^{Aabcd}	0,076 (0,011) ^{Acde}	0,085 (0,023)
Pa_Ba_169	0,106 (0,025) ^{Def}	0,087 (0,012) ^{Cefg}	0,076 (0,013) ^{BCcd}	0,066 (0,006) ^{ABbcd}	0,061 (0,005) ^{Aabc}	0,067 (0,009) ^{ABabcd}	0,077 (0,020)
Pa_Mi_1	0,094 (0,006) ^{Bcde}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,051 (0,002) ^{Aab}	0,052 (0,002) ^{Aab}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,059 (0,016)
Pa_Mi_2	0,107 (0,011) ^{Bef}	0,065 (0,006) ^{Aabcd}	0,058 (0,002) ^{Aab}	0,056 (0,001) ^{Aabc}	0,051 (0,002) ^{Aab}	0,053 (0,002) ^{Aab}	0,065 (0,020)
Pa_Mi_6	0,122 (0,008) ^{Cfg}	0,065 (0,013) ^{Aabcd}	0,058 (0,005) ^{Aab}	0,067 (0,013) ^{Abcd}	0,071 (0,012) ^{ABcdef}	0,084 (0,022) ^{Bde}	0,078 (0,025)
Pa_Mi_7	0,110 (0,009) ^{Befg}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,052 (0,003) ^{Aa}	0,053 (0,002) ^{Aab}	0,051 (0,003) ^{Aab}	0,052 (0,003) ^{Aa}	0,062 (0,022)
Pa_Trac_20	0,107 (0,008) ^{Def}	0,071 (0,019) ^{Abcde}	0,066 (0,019) ^{Aabc}	0,072 (0,020) ^{ABcd}	0,086 (0,024) ^{BCf}	0,090 (0,029) ^{Ce}	0,082 (0,024)
Pa_Trac_23	0,116 (0,005) ^{Bfg}	0,059 (0,010) ^{Aabc}	0,059 (0,010) ^{Aab}	0,060 (0,010) ^{Aabcd}	0,059 (0,010) ^{Aabc}	0,060 (0,010) ^{Aabc}	0,069 (0,023)
Pa_Ren_1	0,084 (0,009) ^{Bbcd}	0,053 (0,003) ^{Aa}	0,050 (0,001) ^{Aa}	0,052 (0,001) ^{Aab}	0,050 (0,001) ^{Aab}	0,052 (0,001) ^{Aa}	0,057 (0,013)
Total	0,101 (0,022)	0,068 (0,018)	0,065 (0,015)	0,061 (0,012)	0,062 (0,014)	0,066 (0,017)	

(Bacteriófago)

ANOVA com ajuste de Bonferroni, para dois fatores independentes (cepa e bacteriófago). ^{ABCD} letras maiúsculas indicam comparações entre bacteriófagos. ^{abcdeg} letras minúsculas indicam comparações entre cepas. Letras iguais indicam semelhança estatística.

*Cepas Multirresistentes.

Apêndice E: Valores de média e desvio padrão da densidade óptica (OD₆₀₀) de diferentes amostras clínicas / ATCC, após 6 horas de cultivo na presença dos 5 diferentes bacteriófagos.

Amostras Clínicas ATCC	Controle	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25	Total (Cepas – 6 h)
Pa_ATCC 27853	0,186 (0,030) ^{Bcd}	0,049 (0,001) ^{Aa}	0,049 (0,001) ^{Aa}	0,049 (0,001) ^{Aab}	0,049 (0,002) ^{Aa}	0,049 (0,001) ^{Aa}	0,072 (0,053)
Pa_ATCC 2108*	0,104 (0,008) ^{Aa}	0,113 (0,003) ^{Ad}	0,104 (0,006) ^{Adef}	0,103 (0,005) ^{Ad}	0,103 (0,006) ^{Abc}	0,105 (0,004) ^{Abc}	0,105 (0,006)
Pa_ATCC 2110*	0,085 (0,007) ^{Aa}	0,058 (0,001) ^{Aabc}	0,065 (0,014) ^{Aabcd}	0,055 (0,001) ^{Aab}	0,056 (0,001) ^{Aa}	0,056 (0,002) ^{Aa}	0,063 (0,012)
Pa_ATCC 2112*	0,258 (0,047) ^{Cghi}	0,091 (0,007) ^{Bbcd}	0,092 (0,020) ^{Bbdef}	0,048 (0,001) ^{Aa}	0,071 (0,007) ^{ABab}	0,070 (0,007) ^{ABab}	0,105 (0,073)
Pa_ATCC 2113*	0,165 (0,012) ^{Bbc}	0,066 (0,008) ^{Aabc}	0,066 (0,005) ^{Aabcde}	0,078 (0,004) ^{Aabcd}	0,182 (0,010) ^{Bd}	0,189 (0,014) ^{Bd}	0,124 (0,056)
Pa_Ba_164	0,296 (0,021) ^{Dij}	0,195 (0,066) ^{Be}	0,106 (0,024) ^{Cef}	0,067 (0,004) ^{Aabcd}	0,055 (0,003) ^{Aa}	0,064 (0,007) ^{Aa}	0,130 (0,093)
Pa_Ba_168	0,267 (0,016) ^{Dhi}	0,188 (0,060) ^{Be}	0,118 (0,031) ^{Cf}	0,078 (0,008) ^{Aabcd}	0,062 (0,005) ^{Aa}	0,076 (0,013) ^{Aab}	0,131 (0,079)
Pa_Ba_169	0,245 (0,028) ^{Dfgh}	0,167 (0,048) ^{Ce}	0,098 (0,018) ^{Bcdef}	0,065 (0,006) ^{ABabcd}	0,057 (0,003) ^{Aa}	0,063 (0,007) ^{Aa}	0,116 (0,073)
Pa_Mi_1	0,208 (0,058) ^{Bdef}	0,053 (0,002) ^{Aab}	0,051 (0,002) ^{Aa}	0,052 (0,002) ^{Aab}	0,051 (0,002) ^{Aa}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,078 (0,063)
Pa_Mi_2	0,225 (0,028) ^{Bdefg}	0,073 (0,019) ^{Aabc}	0,057 (0,002) ^{Aab}	0,053 (0,001) ^{Aab}	0,051 (0,002) ^{Aa}	0,053 (0,002) ^{Aa}	0,085 (0,065)
Pa_Mi_6	0,323 (0,036) ^{Dj}	0,067 (0,016) ^{Aabc}	0,056 (0,005) ^{Aab}	0,089 (0,019) ^{ABbcd}	0,116 (0,009) ^{Bc}	0,169 (0,043) ^{Cde}	0,136 (0,095)
Pa_Mi_7	0,251 (0,084) ^{Bgh}	0,056 (0,007) ^{Aabc}	0,056 (0,008) ^{Aab}	0,057 (0,008) ^{Aabc}	0,056 (0,009) ^{Aa}	0,059 (0,013) ^{Aa}	0,089 (0,081)
Pa_Trac_20	0,159 (0,017) ^{Cb}	0,093 (0,048) ^{Acd}	0,092 (0,053) ^{Abcdef}	0,096 (0,057) ^{Acd}	0,124 (0,043) ^{ABc}	0,132 (0,054) ^{Bcd}	0,116 (0,051)
Pa_Trac_23	0,227 (0,046) ^{Befgh}	0,064 (0,010) ^{Aabc}	0,061 (0,008) ^{Aabc}	0,065 (0,010) ^{Aabcd}	0,063 (0,009) ^{Aa}	0,062 (0,009) ^{Aa}	0,090 (0,065)
Pa_Ren_1	0,204 (0,044) ^{Bcde}	0,054 (0,003) ^{Aabc}	0,051 (0,002) ^{Aa}	0,052 (0,001) ^{Aab}	0,050 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,002) ^{Aa}	0,077 (0,060)
Total (Bacteriófago)	0,213 (0,073)	0,092 (0,056)	0,075 (0,029)	0,067 (0,023)	0,076 (0,039)	0,083 (0,047)	

ANOVA com ajuste de Bonferroni, para dois fatores independentes (cepa e bacteriófago). ^{ABCD} letras maiúsculas indicam comparações entre bacteriófagos. ^{abcdefghi} letras minúsculas indicam comparações entre cepas. Letras iguais indicam semelhança estatística.

*Cepas Multirresistentes.

Apêndice F: Valores de média e desvio padrão da densidade óptica (OD₆₀₀) de diferentes amostras clínicas / ATCC, após 8 horas de cultivo na presença dos 5 diferentes bacteriófagos.

Amostras Clínicas ATCC	Controle	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25	Total (Cepas – 8 h)
Pa_ATCC 27853	0,217 (0,090) ^{Bb}	0,049 (0,001) ^{Aa}	0,049 (0,001) ^{Aa}	0,050 (0,001) ^{Aa}	0,051 (0,002) ^{Aa}	0,051 (0,002) ^{Aa}	0,078 (0,072)
Pa_ATCC 2108*	0,128 (0,008) ^{Aa}	0,135 (0,005) ^{Ab}	0,123 (0,004) ^{Acd}	0,122 (0,005) ^{Ac}	0,124 (0,006) ^{Abc}	0,124 (0,004) ^{Abc}	0,126 (0,007)
Pa_ATCC 2110*	0,113 (0,015) ^{Aa}	0,075 (0,002) ^{Aab}	0,084 (0,040) ^{Aabcd}	0,067 (0,004) ^{Aabc}	0,068 (0,005) ^{Aab}	0,068 (0,006) ^{Aab}	0,079 (0,024)
Pa_ATCC 2112*	0,292 (0,185) ^{Bcd}	0,059 (0,003) ^{Aa}	0,065 (0,006) ^{Aabc}	0,049 (0,001) ^{Aa}	0,058 (0,003) ^{Aab}	0,057 (0,003) ^{Aa}	0,097 (0,114)
Pa_ATCC 2113*	0,341 (0,019) ^{Bde}	0,055 (0,002) ^{Aa}	0,060 (0,004) ^{Aabc}	0,073 (0,007) ^{Aabc}	0,356 (0,022) ^{Bd}	0,354 (0,014) ^{Be}	0,206 (0,146)
Pa_Ba_164	0,349 (0,085) ^{Cde}	0,305 (0,035) ^{Cc}	0,111 (0,023) ^{Babcd}	0,060 (0,003) ^{ABabc}	0,053 (0,002) ^{Aa}	0,061 (0,008) ^{ABab}	0,156 (0,129)
Pa_Ba_168	0,351 (0,074) ^{Dde}	0,284 (0,025) ^{Cc}	0,135 (0,025) ^{Bd}	0,072 (0,008) ^{Aabc}	0,057 (0,004) ^{Aa}	0,071 (0,016) ^{Aab}	0,161 (0,120)
Pa_Ba_169	0,331 (0,090) ^{Ccd}	0,255 (0,032) ^{Bc}	0,103 (0,020) ^{Aabcd}	0,059 (0,004) ^{Aabc}	0,055 (0,003) ^{Aa}	0,059 (0,007) ^{Aab}	0,144 (0,117)
Pa_Mi_1	0,317 (0,034) ^{Bcd}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,051 (0,002) ^{Aab}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,052 (0,002) ^{Aa}	0,096 (0,101)
Pa_Mi_2	0,307 (0,054) ^{Bcd}	0,083 (0,027) ^{Aab}	0,058 (0,002) ^{Aabc}	0,056 (0,003) ^{Aab}	0,057 (0,004) ^{Aa}	0,057 (0,003) ^{Aa}	0,103 (0,096)
Pa_Mi_6	0,450 (0,115) ^{Df}	0,070 (0,014) ^{Aa}	0,058 (0,004) ^{Aabc}	0,096 (0,023) ^{Aabc}	0,152 (0,018) ^{Bc}	0,253 (0,044) ^{Cd}	0,180 (0,147)
Pa_Mi_7	0,327 (0,117) ^{Bcd}	0,076 (0,039) ^{Aab}	0,074 (0,035) ^{Aabcd}	0,074 (0,032) ^{Aabc}	0,069 (0,029) ^{Aab}	0,076 (0,036) ^{Aab}	0,116 (0,110)
Pa_Trac_20	0,172 (0,018) ^{Bab}	0,126 (0,058) ^{ABb}	0,115 (0,055) ^{Abcd}	0,120 (0,062) ^{ABbc}	0,155 (0,035) ^{ABc}	0,171 (0,055) ^{ABc}	0,143 (0,053)
Pa_Trac_23	0,404 (0,100) ^{Bef}	0,080 (0,022) ^{Aab}	0,079 (0,022) ^{Aacd}	0,087 (0,027) ^{Aabc}	0,081 (0,024) ^{Aab}	0,081 (0,024) ^{Aab}	0,135 (0,129)
Pa_Ren_1	0,274 (0,058) ^{Bc}	0,054 (0,004) ^{Aa}	0,053 (0,003) ^{Aab}	0,053 (0,003) ^{Aa}	0,051 (0,001) ^{Aa}	0,053 (0,003) ^{Aa}	0,090 (0,086)
Total	0,292 (0,123)	0,117 (0,089)	0,081 (0,036)	0,073 (0,030)	0,096 (0,079)	0,106 (0,088)	
(Bacteriófago)							

ANOVA com ajuste de Bonferroni, para dois fatores independentes (cepa e bacteriófago). ^{ABCD} letras maiúsculas indicam comparações entre bacteriófagos. ^{abcdef} letras minúsculas indicam comparações entre cepas. Letras iguais indicam semelhança estatística.

*Cepas Multirresistentes.

Apêndice G: Valores de média e desvio padrão da densidade óptica (OD₆₀₀) de diferentes amostras clínicas / ATCC, após 24 horas de cultivo na presença dos 5 diferentes bacteriófagos.

Amostras Clínicas ATCC	Controle	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25	Total (Cepas – 24 h)
Pa_ATCC 27853	0,508 (0,356) ^{Aabc}	0,565 (0,120) ^{Abcd}	0,485 (0,102) ^{Ab}	0,409 (0,112) ^{Aabc}	0,451 (0,099) ^{Aabc}	0,459 (0,137) ^{Aab}	0,480 (0,178)
Pa_ATCC 2108*	0,388 (0,069) ^{Aa}	0,432 (0,030) ^{Aab}	0,375 (0,042) ^{Ab}	0,312 (0,039) ^{Aab}	0,379 (0,024) ^{Aa}	0,362 (0,023) ^{Aa}	0,375 (0,053)
Pa_ATCC 2110*	0,828 (0,080) ^{Adef}	0,755 (0,051) ^{Ade}	0,792 (0,124) ^{Acde}	0,704 (0,063) ^{Aef}	0,714 (0,026) ^{Acde}	0,714 (0,039) ^{Abcde}	0,751 (0,082)
Pa_ATCC 2112*	0,630 (0,093) ^{Aabcd}	0,656 (0,116) ^{Abcd}	0,635 (0,120) ^{Aacde}	0,518 (0,121) ^{Abcde}	0,465 (0,178) ^{Aabc}	0,473 (0,171) ^{Aab}	0,563 (0,153)
Pa_ATCC 2113*	1,034 (0,036) ^{Bfgh}	0,172 (0,141) ^{Aa}	0,104 (0,037) ^{Aa}	0,161 (0,130) ^{Aa}	0,960 (0,208) ^{Befg}	0,971 (0,125) ^{Bef}	0,567 (0,443)
Pa_Ba_164	1,286 (0,066) ^{Chi}	1,091 (0,049) ^{Cf}	0,850 (0,166) ^{Bde}	0,612 (0,155) ^{Acde}	0,764 (0,165) ^{ABdef}	0,802 (0,206) ^{ABcde}	0,901 (0,265)
Pa_Ba_168	1,274 (0,071) ^{Cghi}	1,119 (0,079) ^{BCf}	0,981 (0,058) ^{Be}	0,512 (0,076) ^{Abcde}	0,624 (0,155) ^{Aabcd}	0,515 (0,058) ^{Aab}	0,837 (0,316)
Pa_Ba_169	1,185 (0,061) ^{Dghi}	1,049 (0,084) ^{Df}	0,853 (0,150) ^{BCde}	0,556 (0,174) ^{Abcde}	0,667 (0,146) ^{ABbcd}	0,553 (0,153) ^{Aabc}	0,810 (0,276)
Pa_Mi_1	1,015 (0,311) ^{Befg}	0,462 (0,156) ^{Ab}	0,447 (0,107) ^{Ab}	0,424 (0,101) ^{Aabc}	0,440 (0,085) ^{Aab}	0,366 (0,125) ^{Aa}	0,526 (0,273)
Pa_Mi_2	1,216 (0,076) ^{Bghi}	0,499 (0,081) ^{Abcd}	0,551 (0,099) ^{Abc}	0,576 (0,141) ^{Abcde}	0,608 (0,089) ^{Aabcd}	0,585 (0,099) ^{Aabcd}	0,672 (0,265)
Pa_Mi_6	1,298 (0,043) ^{Di}	0,929 (0,143) ^{Bef}	0,619 (0,154) ^{Abcd}	0,648 (0,298) ^{Acde}	0,999 (0,099) ^{BCfg}	1,216 (0,083) ^{Cf}	0,952 (0,300)
Pa_Mi_7	0,448 (0,133) ^{Aab}	0,490 (0,181) ^{Abc}	0,420 (0,177) ^{Ab}	0,454 (0,149) ^{Abcd}	0,471 (0,169) ^{Aabc}	0,567 (0,225) ^{Aabcd}	0,475 (0,173)
Pa_Trac_20	0,680 (0,248) ^{Abcd}	0,733 (0,159) ^{Acde}	0,802 (0,067) ^{Acde}	0,770 (0,098) ^{Ae}	0,628 (0,299) ^{Aabcd}	0,822 (0,076) ^{Ade}	0,739 (0,185)
Pa_Trac_23	0,876 (0,502) ^{Adef}	1,054 (0,132) ^{ABf}	0,957 (0,306) ^{ABe}	1,081 (0,236) ^{ABf}	1,103 (0,143) ^{Bg}	1,118 (0,059) ^{Bf}	1,031 (0,273)
Pa_Ren_1	0,758 (0,485) ^{Bcde}	0,476 (0,229) ^{Abc}	0,573 (0,117) ^{ABbc}	0,649 (0,212) ^{ABcde}	0,703 (0,092) ^{Bbcde}	0,586 (0,103) ^{ABabcd}	0,624 (0,253)
Total	0,895 (0,382)	0,699 (0,308)	0,630 (0,270)	0,559 (0,253)	0,665 (0,254)	0,674 (0,281)	
(Bacteriófago)							

ANOVA com ajuste de Bonferroni, para dois fatores independentes (cepa e bacteriófago). ^{ABCD} letras maiúsculas indicam comparações entre bacteriófagos. ^{abcdefghi} letras minúsculas indicam comparações entre cepas. Letras iguais indicam semelhança estatística.

*Cepas Multirresistentes.

Apêndice H: Valores de média e desvio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias ($\log_{10}$ UFC/cm²) de diferentes amostras clínicas / ATCC, após 24 h de ação dos 5 diferentes bacteriófagos sobre o biofilme.

Amostras Clínicas ATCC	Controle	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25	Total (Cepas – UFC/mL)
Pa_ATCC 27853	8,63 (0,90) ^{Cbcd}	7,46 (0,43) ^{ABcdef}	7,48 (0,54) ^{ABde}	7,79 (0,37) ^{Bc}	7,40 (0,33) ^{ABb}	7,02 (0,22) ^{Aabcd}	7,63 (0,70)
Pa_ATCC 2108*	7,72 (0,45) ^{Ba}	7,62 (0,17) ^{ABef}	7,36 (0,35) ^{ABbcde}	7,32 (0,28) ^{ABabc}	7,04 (0,22) ^{Aab}	7,59 (0,43) ^{ABde}	7,44 (0,39)
Pa_ATCC 2110*	8,26 (0,68) ^{Babcd}	6,92 (0,77) ^{Aabcde}	7,13 (0,59) ^{Aabcde}	6,96 (0,33) ^{Aab}	7,18 (0,45) ^{Aab}	6,84 (0,34) ^{Aabc}	7,21 (0,72)
Pa_ATCC 2112*	8,01 (0,58) ^{Cabc}	6,81 (0,34) ^{ABabc}	6,65 (0,35) ^{Aab}	7,33 (0,45) ^{Babc}	7,19 (0,42) ^{ABab}	7,30 (0,44) ^{Bbcde}	7,22 (0,61)
Pa_ATCC 2113*	8,22 (0,34) ^{Babcd}	6,89 (0,50) ^{Aabcd}	6,91 (0,33) ^{Aabcd}	7,15 (0,37) ^{Aabc}	6,98 (0,42) ^{Aab}	6,77 (0,39) ^{Aab}	7,15 (0,62)
Pa_Ba_164	8,55 (0,21) ^{Bbcd}	7,42 (0,42) ^{Abcdef}	7,42 (0,24) ^{Acde}	7,48 (0,52) ^{Abc}	7,47 (0,34) ^{Ab}	7,54 (0,63) ^{Acde}	7,65 (0,57)
Pa_Ba_168	8,70 (0,45) ^{Bcd}	7,59 (0,44) ^{Adef}	7,65 (0,34) ^{Ae}	7,59 (0,31) ^{Abc}	7,57 (0,31) ^{Ab}	7,85 (0,50) ^{Ae}	7,82 (0,56)
Pa_Ba_169	8,54 (0,62) ^{Bbcd}	7,67 (0,18) ^{Af}	7,68 (0,18) ^{Ae}	7,72 (0,37) ^{Ac}	7,56 (0,48) ^{Ab}	7,72 (0,27) ^{Ade}	7,81 (0,50)
Pa_Mi_1	8,19 (0,49) ^{Babcd}	7,13 (0,43) ^{Aabcdef}	7,12 (0,32) ^{Aabcde}	7,29 (0,33) ^{Aabc}	7,23 (0,67) ^{Aab}	6,85 (0,32) ^{Aabc}	7,30 (0,60)
Pa_Mi_2	8,75 (0,53) ^{Cd}	6,60 (0,42) ^{ABa}	6,41 (0,63) ^{Aa}	7,11 (0,48) ^{Babc}	6,91 (0,31) ^{ABab}	6,73 (0,55) ^{ABab}	7,08 (0,91)
Pa_Mi_6	8,09 (0,53) ^{Babcd}	6,97 (0,53) ^{Aabcdef}	7,20 (0,32) ^{Abcde}	7,30 (0,58) ^{Aabc}	7,21 (0,58) ^{Aab}	6,80 (0,21) ^{Aab}	7,26 (0,61)
Pa_Mi_7	7,75 (0,65) ^{Ba}	6,59 (0,39) ^{Aa}	6,88 (0,35) ^{Aabcd}	6,95 (0,29) ^{Aab}	6,64 (0,37) ^{Aa}	6,36 (0,35) ^{Aa}	6,86 (0,60)
Pa_Trac_20	7,95 (0,26) ^{Bab}	7,12 (0,27) ^{Aabcdef}	7,26 (0,46) ^{Abcde}	7,43 (0,48) ^{ABbc}	7,17 (0,48) ^{Aab}	7,03 (0,58) ^{Aabcd}	7,33 (0,52)
Pa_Trac_23	8,01 (0,33) ^{Babc}	6,70 (0,22) ^{Aab}	6,74 (0,44) ^{Aabc}	6,69 (0,33) ^{Aa}	7,12 (0,27) ^{Aab}	6,78 (0,35) ^{Aab}	7,01 (0,57)
Pa_Ren_1	7,70 (0,39) ^{Ca}	6,98 (0,53) ^{ABabcdef}	7,13 (0,43) ^{ABCabcde}	7,24 (0,40) ^{ABCabc}	7,49 (0,53) ^{BCb}	6,87 (0,27) ^{Aabc}	7,23 (0,51)
Total	8,20 (0,61)	7,10 (0,54)	7,13 (0,52)	7,29 (0,48)	7,21 (0,48)	7,07 (0,57)	

(Bacteriófago)

ANOVA com ajuste de Bonferroni, para dois fatores independentes (cepa e bacteriófago). ^{ABC} letras maiúsculas indicam comparações entre bacteriófagos. ^{abcdef} letras minúsculas indicam comparações entre cepas. Letras iguais indicam semelhança estatística.

*Cepas Multirresistentes.

Apêndice I: Valores de média e desvio da atividade respiratória (absorbância a 492 nm) de diferentes amostras clínicas / ATCC, após 24 h de ação dos 5 diferentes bacteriófagos sobre o biofilme.

Amostras Clínicas ATCC	Controle	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25	Total (Cepas – XTT)
Pa_ATCC 27853	0,44 (0,14) ^{Aabc}	0,40 (0,28) ^{Aab}	0,33 (0,09) ^{Aab}	0,51 (0,36) ^{Aa}	0,30 (0,11) ^{Aa}	0,29 (0,08) ^{Aab}	0,38 (0,21)
Pa_ATCC 2108*	0,47 (0,48) ^{Babc}	0,12 (0,09) ^{Aa}	0,08 (0,02) ^{Aab}	0,20 (0,17) ^{ABa}	0,24 (0,34) ^{ABa}	0,11 (0,05) ^{Aa}	0,20 (0,28)
Pa_ATCC 2110*	0,73 (0,29) ^{Bc}	0,09 (0,06) ^{Aa}	0,11 (0,05) ^{Aa}	0,19 (0,15) ^{Aa}	0,19 (0,18) ^{Aa}	0,22 (0,17) ^{Aab}	0,25 (0,27)
Pa_ATCC 2112*	0,59 (0,25) ^{Babc}	0,25 (0,12) ^{Aab}	0,20 (0,08) ^{Aab}	0,31 (0,14) ^{ABa}	0,33 (0,38) ^{ABa}	0,29 (0,11) ^{Aab}	0,33 (0,23)
Pa_ATCC 2113*	0,61 (0,28) ^{Babc}	0,21 (0,11) ^{Aab}	0,16 (0,07) ^{Aab}	0,23 (0,12) ^{Aa}	0,21 (0,21) ^{Aa}	0,25 (0,19) ^{Aab}	0,28 (0,23)
Pa_Ba_164	0,69 (0,25) ^{Bbc}	0,36 (0,13) ^{Aab}	0,37 (0,18) ^{Aab}	0,27 (0,05) ^{Aa}	0,25 (0,15) ^{Aa}	0,30 (0,15) ^{Aab}	0,37 (0,21)
Pa_Ba_168	0,65 (0,36) ^{Bbc}	0,33 (0,06) ^{Aab}	0,35 (0,13) ^{Aab}	0,26 (0,06) ^{Aa}	0,22 (0,06) ^{Aa}	0,23 (0,06) ^{Aab}	0,34 (0,21)
Pa_Ba_169	0,40 (0,21) ^{Aabc}	0,35 (0,11) ^{Aab}	0,40 (0,12) ^{Aab}	0,35 (0,16) ^{Aa}	0,22 (0,09) ^{Aa}	0,26 (0,13) ^{aAb}	0,33 (0,15)
Pa_Mi_1	0,27 (0,27) ^{Aa}	0,48 (0,38) ^{Ab}	0,27 (0,21) ^{Aab}	0,23 (0,17) ^{Aa}	0,19 (0,09) ^{Aa}	0,23 (0,11) ^{Aab}	0,28 (0,24)
Pa_Mi_2	0,67 (0,26) ^{Bbc}	0,31 (0,16) ^{Aab}	0,33 (0,12) ^{Aab}	0,28 (0,14) ^{Aa}	0,48 (0,40) ^{Ba}	0,32 (0,19) ^{Aab}	0,40 (0,26)
Pa_Mi_6	0,62 (0,33) ^{Cbc}	0,48 (0,28) ^{BCb}	0,36 (0,12) ^{ABCab}	0,40 (0,09) ^{ABCa}	0,29 (0,14) ^{ABa}	0,19 (0,10) ^{Aab}	0,39 (0,23)
Pa_Mi_7	0,56 (0,21) ^{Babc}	0,22 (0,13) ^{Aab}	0,25 (0,17) ^{Aab}	0,20 (0,12) ^{Aa}	0,21 (0,11) ^{Aa}	0,20 (0,09) ^{Aab}	0,27 (0,19)
Pa_Trac_20	0,59 (0,35) ^{Babc}	0,23 (0,11) ^{Aab}	0,30 (0,13) ^{ABab}	0,24 (0,19) ^{Aa}	0,36 (0,23) ^{ABa}	0,21 (0,19) ^{Aab}	0,32 (0,24)
Pa_Trac_23	0,70 (0,54) ^{Bbc}	0,29 (0,11) ^{Aab}	0,42 (0,27) ^{Ab}	0,25 (0,23) ^{Aa}	0,44 (0,30) ^{ABa}	0,46 (0,37) ^{ABb}	0,43 (0,35)
Pa_Ren_1	0,39 (0,21) ^{Aab}	0,25 (0,04) ^{Aab}	0,40 (0,15) ^{Aab}	0,32 (0,22) ^{Aa}	0,24 (0,10) ^{Aa}	0,32 (0,21) ^{Aab}	0,32 (0,17)
Total (Bacteriófago)	0,56 (0,32)	0,29 (0,20)	0,29 (0,17)	0,28 (0,18)	0,28 (0,23)	0,26 (0,18)	

ANOVA com ajuste de Bonferroni, para dois fatores independentes (cepa e bacteriófago). ^{ABC} letras maiúsculas indicam comparações entre bacteriófagos. ^{abc} letras minúsculas indicam comparações entre cepas. Letras iguais indicam semelhança estatística.

*Cepas Multirresistentes.

Apêndice J: Valores de mediana e intervalo de confiança do biofilme remanescente (μm^2) de diferentes amostras clínicas / ATCC, após 24 h de ação dos diferentes bacteriófagos sobre o biofilme.

Amostras	Controle	vB_PaeM_USP_1	vB_PaeM_USP_2	vB_PaeM_USP_3	vB_PaeM_USP_18	vB_PaeM_USP_25
Clínicas ATCC						
Pa_ATCC 27853	94,37 (−0,69; 224,19) ^{Aabcd}	65,75 (56,05; 74,60) ^{Aa}	81,15 (25,50; 134,38) ^{Aabc}	74,55 (58,31; 90,79) ^{Aab}	65,57 (38,67; 103,95) ^{Aabc}	70,14 (0,22; 152,94) ^{Aab}
Pa_ATCC 2108*	155,51 (41,01; 272,10) ^{Aa}	52,55 (−32,85; 176,04) ^{Ba}	66,95 (−121,08; 331,57) ^{Ab}	64,44 (−7,26; 154,39) ^{Bab}	118,52 (18,66; 218,39) ^{Aab}	36,58 (−56,18; 173,07) ^{Bab}
Pa_ATCC 2110*	58,38 (−33,45; 161,42) ^{Acd}	7,84 (5,41; 9,59) ^{Aa}	17,98 (3,39; 27,68) ^{Aac}	5,84 (2,88; 8,94) ^{Ab}	4,12 (−2,29; 14,37) ^{Ac}	4,08 (−0,44; 10,03) ^{Ab}
Pa_ATCC 2112*	145,24 (124,48; 169,17) ^{Aab}	5,53 (−1,85; 16,08) ^{Ba}	8,86 (−0,74; 16,43) ^{Bac}	7,53 (1,50; 14,76) ^{Bb}	6,16 (−17,70; 43,24) ^{Bc}	7,74 (6,27; 8,96) ^{Bb}
Pa_ATCC 2113*	91,50 (−85,23; 318,70) ^{Aabcd}	5,11 (−6,14; 22,41) ^{Ba}	6,80 (1,07; 11,31) ^{Bc}	4,88 (−34,26; 64,95) ^{Bab}	4,95 (−3,48; 14,55) ^{Bc}	3,69 (−23,64; 45,21) ^{Bb}
Pa_Mi_1	40,47 (21,60; 57,49) ^{Acd}	60,11 (51,87; 65,26) ^{Aa}	46,49 (29,72; 72,96) ^{Aabc}	39,79 (14,40; 72,74) ^{Aab}	50,05 (29,61; 67,26) ^{Aabc}	59,62 (26,42; 81,46) ^{Aab}
Pa_Mi_2	76,76 (34,60; 111,31) ^{Abcd}	27,65 (−13,68; 77,38) ^{Aa}	46,58 (25,27; 63,91) ^{Aabc}	73,59 (28,78; 101,60) ^{Aab}	39,37 (−6,53; 84,08) ^{Abc}	38,81 (−7,03; 92,35) ^{Aab}
Pa_Mi_6	54,78 (8,51; 112,09) ^{Acd}	27,20 (−10,11; 78,25) ^{Aa}	48,08 (27,52; 65,34) ^{Aabc}	45,76 (−1,61; 109,34) ^{Aab}	35,15 (−2,79; 92,85) ^{Aabc}	35,35 (2,63; 71,07) ^{Aab}
Pa_Mi_7	36,79 (11,91; 72,73) ^{Acd}	35,77 (−9,62; 66,13) ^{Aa}	41,16 (0,62; 72,68) ^{Aabc}	35,44 (27,14; 45,84) ^{Aab}	36,01 (16,48; 51,27) ^{Abc}	32,42 (29,32; 35,90) ^{Aab}
Pa_Ba_164	132,97 (99,23; 157,03) ^{Aabc}	38,94 (31,32; 50,65) ^{Ba}	21,76 (−3,19; 45,74) ^{Bac}	35,94 (27,23; 44,52) ^{Bab}	24,9 (−31,88; 94,57) ^{Bbc}	23,49 (−2,36; 52,47) ^{Bab}
Pa_Ba_168	83,34 (40,19; 112,66) ^{Abcd}	29,53 (19,33; 40,11) ^{Aa}	32,64 (14,95; 47,16) ^{Aabc}	30,01 (−12,71; 82,38) ^{Aab}	25,01 (12,25; 44,58) ^{Abc}	41,80 (5,05; 71,30) ^{Aab}
Pa_Ba_169	79,36 (60,64; 99,78) ^{Aabcd}	22,97 (−13,50; 76,35) ^{Aa}	28,94 (18,52; 37,30) ^{Aac}	32,19 (1,55; 69,01) ^{Aab}	26,60 (−15,60; 78,37) ^{Abc}	25,08 (2,85; 60,40) ^{Aab}
Pa_Trac_20	82,17 (45,13; 113,69) ^{Aabcd}	65,13 (5,95; 111,61) ^{Aa}	73,27 (10,94; 159,98) ^{Aab}	36,92 (−12,00; 108,94) ^{Aab}	56,87 (24,29; 79,24) ^{Aabc}	68,72 (58,65; 82,26) ^{Aab}
Pa_Trac_23	58,78 (33,43; 94,86) ^{Abcd}	51,90 (−3,40; 96,15) ^{Aa}	54,93 (43,60; 65,89) ^{Aabc}	28,29 (0,55; 57,10) ^{Aab}	39,36 (13,94; 66,02) ^{Aabc}	42,22 (12,32; 64,09) ^{Aab}
Pa_Ren_1	79,18 (−9,75; 214,39) ^{Aabcd}	82,19 (31,41; 114,27) ^{Aa}	89,49 (22,36; 133,13) ^{Aabc}	86,08 (47,86; 139,18) ^{Aa}	98,78 (84,58; 110,62) ^{Aab}	90,04 (80,97; 103,5) ^{Aa}

Modelo linear generalizado com ajuste de Bonferroni. ^{ABC} letras maiúsculas indicam comparações entre bacteriófagos. ^{abc} letras minúsculas indicam comparações entre cepas. Letras iguais indicam semelhança estatística.

*Cepas Multirresistentes.

Apêndice K: Valores de Unidades Formadoras de Colônias ($\log_{10}$ UFC/cm²) de diferentes cepas de *P. aeruginosa* após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de cultivo em fluxo contínuo, na superfície de tubos endotraqueais, na presença e ausência do coquetel de bacteriófagos.

Tempo de cultivo	Cepa	Grupos				p*	
		Tubos endotraqueais controle		Tubos endotraqueais recobertos com bacteriófagos			
		Média ± Desvio Padrão (Mediana)	Intervalo de confiança 95% (Mínimo – Máximo)	Média ± Desvio Padrão (Mediana)	Intervalo de confiança 95% (Mínimo – Máximo)		
24 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	6,47 ± 0,69 (6,75)	5,75; 7,19 (5,08 – 6,85)	4,67 ± 0,18 (4,75)	] < 0,001 [†] 0,001 [†] 0,006 [†]]	4,48; 4,87 (4,38 – 4,86)	< 0,001
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	6,33 ± 0,50 (6,21)	5,80; 6,87 (5,71 – 7,20)	6,54 ± 0,23 (6,56)		6,29; 6,79 (6,20 – 6,81)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	6,86 ± 0,20 (6,90)	6,65; 7,07 (6,61 – 7,09)	5,66 ± 0,51 (5,73)		5,13; 6,19 (4,90 – 6,20)	< 0,001
48 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	7,40 ± 0,47 (7,23)	6,91; 7,88 (6,86 – 8,14)	6,97 ± 0,93 (7,12)		5,99; 7,95 (5,16 – 7,72)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	8,14 ± 0,24 (8,15)	7,88; 8,39 (7,79 – 8,47)	7,14 ± 0,15 (7,16)		6,90; 7,31 (6,95 – 7,33)	0,004
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	7,69 ± 0,37 (7,68)	7,29; 8,08 (7,26 – 8,12)	6,58 ± 0,76 (6,59)		6,50; 6,66 (6,48 – 6,90)	0,001
72 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	7,64 ± 0,33 (7,72)	7,29; 7,98 (7,11 – 7,98)	7,05 ± 0,89 (6,83)	] < 0,001 [†] 0,017 [†] < 0,001 [†]]	6,12; 7,99 (5,88 – 8,26)	0,627
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	8,03 ± 0,41 (8,01)	7,60; 8,46 (7,45 – 8,70)	7,70 ± 0,39 (7,66)		7,29; 8,12 (7,24 – 8,37)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	7,37 ± 0,30 (7,42)	7,05; 7,68 (6,91 – 7,73)	6,12 ± 0,42 (6,25)		5,68; 6,65 (5,30 – 6,45)	< 0,001
96 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	7,66 ± 0,35 (7,68)	7,19; 7,92 (7,11 – 7,94)	7,56 ± 0,12 (7,46)	] < 0,001 [†] < 0,001 [†] < 0,001 [†]]	7,43; 7,68 (7,41 – 7,76)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	7,97 ± 0,13 (8,04)	7,84; 8,11 (7,80 – 8,08)	7,79 ± 0,30 (7,72)		7,47; 8,10 (7,48 – 8,31)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	7,68 ± 0,28 (7,67)	7,39; 7,97 (7,35 – 7,98)	6,19 ± 0,72 (6,51)		5,43; 6,95 (4,90 – 6,86)	< 0,001
120 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	7,97 ± 0,33 (8,01)	7,63; 8,32 (7,38 – 8,37)	7,13 ± 0,74 (6,91)	] 0,003 [†] < 0,001 [†] < 0,001 [†]]	6,35; 7,91 (6,29 – 8,12)	0,035
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	7,85 ± 0,42 (8,02)	7,41; 8,30 (7,12 – 8,21)	8,16 ± 0,26 (8,20)		7,89; 8,43 (7,72 – 8,46)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	7,82 ± 0,24 (7,79)	7,57; 8,08 (7,46 – 8,13)	6,70 ± 0,65 (6,48)		6,02; 7,38 (6,24 – 7,95)	0,001
144 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	7,46 ± 0,38 (7,61)	7,06; 7,86 (6,81 – 7,80)	7,11 ± 0,78 (7,36)	] 0,001 [†] 0,001 [†] 0,001 [†]]	6,29; 7,93 (5,56 – 7,78)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	7,77 ± 0,59 (7,87)	7,15; 8,40 (7,00 – 8,44)	7,65 ± 0,39 (7,58)		7,24; 8,07 (7,12 – 8,26)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	8,05 ± 0,50 (8,15)	7,53; 8,58 (7,45 – 8,73)	6,38 ± 0,55 (6,44)		5,80; 6,95 (5,75 – 7,07)	< 0,001
168 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	7,32 ± 0,57 (7,55)	6,72; 7,92 (6,48 – 7,82)	7,81 ± 0,40 (7,80)	] < 0,001 [†] < 0,001 [†] < 0,001 [†]]	7,39; 8,22 (7,18 – 8,39)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	7,56 ± 0,72 (7,72)	6,81; 8,31 (6,68 – 8,32)	8,13 ± 0,36 (8,19)		7,75; 8,52 (7,72 – 8,66)	0,706
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	8,00 ± 0,18 (7,99)	7,81; 8,20 (7,73 – 8,26)	6,22 ± 0,59 (6,17)		5,60; 6,84 (5,38 – 7,05)	< 0,001

Modelo linear generalizado, com ajuste de Bonferroni, para dois fatores independentes (cepa e bacteriófago). * Indica o valor p para comparações entre controle e coquetel de bacteriófagos. † Indica o valor p para comparações entre as cepas de *P. aeruginosa*.

Apêndice L: Valores de atividade respiratória (absorbância a 492 nm) de diferentes cepas de *P. aeruginosa* após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h de cultivo em fluxo contínuo, na superfície de tubos endotraqueais, na presença e ausência do coquetel de bacteriófagos.

Tempo de cultivo	Cepa	Grupos				p*	
		Tubos endotraqueais controle		Coquetel de bacteriófagos			
		Média ± Desvio Padrão (Mediana)	Intervalo de confiança 95% (Mínimo – Máximo))	Média ± Desvio Padrão (Mediana)	Intervalo de confiança 95% (Mínimo – Máximo)		
24 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	0,02 ± 0,02 (0,02)	0,00; 0,04 (0,00 – 0,05) 0,00; 0,02 (0,00 – 0,02) 0,03; 0,06 (0,03 – 0,07)	0,04 ± 0,01 (0,05)	< 0,001 [†]	0,03; 0,06 (0,02 – 0,06)	0,050
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	0,01 ± 0,01 (0,01)		0,00 ± 0,01 (0,00)		0,00; 0,01 (0,00 – 0,01)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	0,05 ± 0,02 (0,05)		0,07 ± 0,01 (0,07)		0,05; 0,08 (0,05 – 0,09)	0,096
48 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	0,09 ± 0,03 (0,08)	0,06; 0,12 (0,07 – 0,15) 0,04; 0,13 (0,04 – 0,16) 0,11; 0,19 (0,10 – 0,20)	0,09 ± 0,03 (0,10)	0,001 [†]	0,05; 0,12 (0,03 – 0,12)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	0,09 ± 0,04 (0,08)		0,04 ± 0,03 (0,03)		0,01; 0,08 (0,02 – 0,11)	0,394
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	0,15 ± 0,04 (0,16)		0,17 ± 0,02 (0,17)		0,15; 0,20 (0,15 – 0,21)	1,000
72 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	0,14 ± 0,01 (0,14)	0,13; 0,15 (0,13 – 0,15) 0,16; 0,22 (0,16 – 0,23) 0,16; 0,27 (0,17 – 0,31)	0,20 ± 0,04 (0,21)	< 0,001 [†]	0,16; 0,24 (0,14 – 0,25)	0,049
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	0,19 ± 0,03 (0,18)		0,11 ± 0,05 (0,09)		0,06; 0,16 (0,05 – 0,18)	0,004
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	0,21 ± 0,05 (0,19)		0,21 ± 0,02 (0,21)		0,19; 0,23 (0,19 – 0,24)	1,000
96 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	0,24 ± 0,06 (0,25)	0,18; 0,30 (0,13 – 0,30) 0,16; 0,25 (0,16 – 0,27) 0,25; 0,42 (0,20 – 0,43)	0,27 ± 0,10 (0,30)	0,001 [†]	0,17; 0,37 (0,10 – 0,36)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	0,21 ± 0,04 (0,20)		0,12 ± 0,05 (0,10)		0,07; 0,17 (0,08 – 0,20)	0,308
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	0,33 ± 0,08 (0,34)		0,27 ± 0,04 (0,27)		0,23; 0,31 (0,22 – 0,32)	1,000
120 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	0,27 ± 0,04 (0,26)	0,23; 0,31 (0,23 – 0,32) 0,24; 0,31 (0,24 – 0,33) 0,24; 0,38 (0,23 – 0,41)	0,21 ± 0,06 (0,22)	0,035 [†]	0,14; 0,27 (0,09 – 0,28)	0,664
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	0,28 ± 0,04 (0,27)		0,19 ± 0,06 (0,18)		0,13; 0,24 (0,12 – 0,28)	0,059
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	0,31 ± 0,07 (0,31)		0,30 ± 0,05 (0,31)		0,25; 0,35 (0,24 – 0,36)	1,000
144 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	0,23 ± 0,07 (0,25)	0,16; 0,30 (0,15 – 0,30) 0,18; 0,31 (0,16 – 0,32) 0,24; 0,33 (0,25 – 0,35)	0,20 ± 0,09 (0,18)	0,004 [†]	0,10; 0,29 (0,10 – 0,36)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	0,25 ± 0,07 (0,24)		0,23 ± 0,02 (0,24)		0,21; 0,25 (0,20 – 0,25)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	0,29 ± 0,04 (0,28)		0,24 ± 0,08 (0,26)		0,16; 0,32 (0,13 – 0,33)	1,000
168 h	<i>P. aeruginosa</i> 27853	0,33 ± 0,03 (0,33)	0,30; 0,37 (0,29 – 0,38) 0,23; 0,31 (0,22 – 0,32) 0,20; 0,45 (0,19 – 0,50)	0,19 ± 0,05 (0,20)	0,037 [†]	0,13; 0,25 (0,10 – 0,27)	0,004
	<i>P. aeruginosa</i> 2110	0,27 ± 0,03 (0,27)		0,29 ± 0,03 (0,30)		0,26; 0,32 (0,23 – 0,32)	1,000
	<i>P. aeruginosa</i> 2112	0,33 ± 0,12 (0,31)		0,31 ± 0,09 (0,30)		0,22; 0,40 (0,22 – 0,44)	1,000

Modelo linear generalizado, com ajuste de Bonferroni, para dois fatores independentes (cepa e bacteriófago). * Indica o valor p para comparações entre controle e coquetel de bacteriófagos. † Indica o valor p para comparações entre as cepas de *P. aeruginosa*.

Apêndice M: Taxas de crescimento de biofilme – Pixels ($\times 10^7$) da cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 após 2, 8, 24 e 48 h de cocultura com os cinco bacteriófagos diferentes.

Tempo de incubação	Grupos	$p^{\dagger}$				Média $\pm$ Desvio Padrão (Mediana)	Intervalo de confiança 95% (Mínimo – Máximo)
2 h	Controle	] 0,010*]	< 0,001 $^{\phi}$	< 0,001 §		0,33 $\pm$ 0,21 (0,27)	0,24; 0,43 (0,09 – 0,83)
	vB_PaeM_USP_1					0,15 $\pm$ 0,21 (0,09)	0,06; 0,25 (0,02 – 0,75)
	vB_PaeM_USP_2					0,11 $\pm$ 0,13 (0,03)	0,05; 0,17 (0,01 – 0,48)
	vB_PaeM_USP_3					0,23 $\pm$ 0,18 (0,13)	0,14; 0,31 (0,09 – 0,60)
	vB_PaeM_USP_18					0,24 $\pm$ 0,21 (0,23)	0,14; 0,33 (0,01 – 0,76)
	vB_PaeM_USP_25					0,09 $\pm$ 0,16 (0,03)	0,02; 0,17 (0,02 – 0,68)
8 h	Controle	] < 0,001*]	< 0,001 $^{\phi}$	0,001 $^{\approx}$	] 0,015 ‡]	2,50 $\pm$ 0,54 (2,29)	2,26; 2,75 (1,76 – 3,42)
	vB_PaeM_USP_1					0,99 $\pm$ 0,78 (0,78)	0,63; 1,35 (0,10 – 2,42)
	vB_PaeM_USP_2					0,90 $\pm$ 0,52 (0,70)	0,66; 1,14 (0,20 – 1,73)
	vB_PaeM_USP_3					1,36 $\pm$ 0,68 (1,24)	1,03; 1,68 (0,42 – 2,56)
	vB_PaeM_USP_18					1,48 $\pm$ 0,81 (1,28)	1,11; 1,85 (0,41 – 2,68)
	vB_PaeM_USP_25					1,04 $\pm$ 0,53 (0,81)	0,79; 1,28 (0,25 – 1,86)
24 h	Controle	] < 0,001 $^{\infty}$]	< 0,001 $^{\phi}$	< 0,001 $^{\phi}$	] 0,025 $^{\diamond}$]	4,34 $\pm$ 2,82 (3,13)	3,05; 5,62 (1,65 – 9,99)
	vB_PaeM_USP_1					3,57 $\pm$ 1,29 (3,34)	2,99; 4,16 (2,24 – 6,01)
	vB_PaeM_USP_2					1,84 $\pm$ 0,28 (1,92)	1,71; 1,97 (1,35 – 2,27)
	vB_PaeM_USP_3					2,64 $\pm$ 0,70 (2,61)	2,30; 2,98 (1,81 – 3,69)
	vB_PaeM_USP_18					3,02 $\pm$ 0,58 (2,99)	2,75; 3,28 (2,15 – 4,24)
	vB_PaeM_USP_25					2,32 $\pm$ 0,27 (2,32)	2,20; 2,44 (1,76 – 2,80)
48 h	Controle	] 0,007 $^{\#}$]	< 0,001 $^{\&}$	0,010 $^{\diamond}$		4,14 $\pm$ 2,70 (3,35)	2,91; 5,37 (1,02 – 8,75)
	vB_PaeM_USP_1					4,61 $\pm$ 1,19 (4,51)	4,07; 5,15 (3,03 – 6,52)
	vB_PaeM_USP_2					3,99 $\pm$ 1,38 (3,90)	3,36; 4,62 (2,00 – 6,68)
	vB_PaeM_USP_3					4,93 $\pm$ 0,80 (5,14)	4,54; 5,32 (3,31 – 6,21)
	vB_PaeM_USP_18					4,63 $\pm$ 1,34 (5,12)	4,02; 5,24 (2,43 – 6,54)
	vB_PaeM_USP_25					3,19 $\pm$ 0,91 (2,91)	2,78; 3,61 (1,88 – 5,04)

† Kruskal–Wallis seguido do pós teste de Dunn com ajuste de Bonferroni.

* Comparação entre Controle e vB_PaeM_USP_1. $^{\phi}$ Comparação entre Controle e vB_PaeM_USP_2. $^{\approx}$ Comparação entre Controle e vB_PaeM_USP_3. ‡ Comparação entre Controle e vB_PaeM_USP_18. § Comparação entre Controle e vB_PaeM_USP_25. $^{\infty}$ Comparação entre vB_PaeM_USP_1 e vB_PaeM_USP_2. $^{\circ}$ Comparação entre vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_3. $^{\delta}$ Comparação entre vB_PaeM_USP_2 e vB_PaeM_USP_18. $^{\diamond}$ Comparação entre vB_PaeM_USP_1 e vB_PaeM_USP_25.

$^{\#}$ Comparação entre vB_PaeM_USP_18 e vB_PaeM_USP_25. $^{\&}$ Comparação entre vB_PaeM_USP_3 e vB_PaeM_USP_25.

Apêndice N: Concentração de piocianina ($\mu\text{g/mL}$) ($\times 10^{-4}$) secretada por *P. aeruginosa* ATCC 27853 após 2, 8, 24 e 48 h de cocultura com os cinco bacteriófagos diferentes.

Tempo de incubação	Grupos	Média $\pm$ Desvio Padrão (Mediana)	Intervalo de confiança 95% (Mínimo – Máximo)	p [†]
2 h	Controle	0,25 $\pm$ 0,54 (0,00)	−0,17; 0,66 (0,00 – 1,57)	0,649
	vB_PaeM_USP_1	0,26 $\pm$ 0,47 (0,00)	−0,11; 0,62 (−0,03 – 1,07)	
	vB_PaeM_USP_2	1,49 $\pm$ 2,06 (0,00)	−0,09; 3,07 (−0,03 – 5,07)	
	vB_PaeM_USP_3	0,37 $\pm$ 0,59 (0,00)	−0,09; 0,82 (0,00 – 1,57)	
	vB_PaeM_USP_18	1,35 $\pm$ 2,17 (0,00)	−0,32; 3,02 (−0,23 – 4,87)	
	vB_PaeM_USP_25	1,31 $\pm$ 2,91 (0,00)	−0,92; 3,55 (−0,23 – 8,77)	
8 h	Controle	0,13 $\pm$ 0,34 (0,00)	−0,12; 0,39 (−0,10 – 1,00)	0,123
	vB_PaeM_USP_1	1,61 $\pm$ 2,12 (0,50)	−0,02; 3,24 (0,00 – 5,70)	
	vB_PaeM_USP_2	0,53 $\pm$ 1,02 (0,00)	−0,25; 1,32 (−0,50 – 2,30)	
	vB_PaeM_USP_3	0,39 $\pm$ 1,07 (0,00)	−0,43; 1,21 (−0,30 – 3,20)	
	vB_PaeM_USP_18	0,50 $\pm$ 0,58 (0,60)	0,06; 0,94 (−0,30 – 1,30)	
	vB_PaeM_USP_25	0,63 $\pm$ 0,91 (0,30)	−0,13; 1,38 (−0,20 – 2,10)	
24 h	Controle	0,06 $\pm$ 0,35 (0,00)	−0,20; 0,33 (−0,37 – 0,93)	0,101
	vB_PaeM_USP_1	0,16 $\pm$ 0,27 (0,00)	−0,06; 0,37 (0,00 – 0,63)	
	vB_PaeM_USP_2	1,15 $\pm$ 1,69 (0,33)	−0,15; 2,45 (0,00 – 5,08)	
	vB_PaeM_USP_3	2,07 $\pm$ 3,65 (0,00)	−0,74; 4,88 (−0,37 – 10,53)	
	vB_PaeM_USP_18	0,80 $\pm$ 2,53 (0,00)	−1,15; 2,74 (−0,37 – 7,53)	
	vB_PaeM_USP_25	2,42 $\pm$ 7,22 (0,00)	−2,75; 7,58 (0,00 – 22,93)	
48 h	Controle	40,67 $\pm$ 25,92 (29,03)	20,74; 60,59 (21,23 – 103,03)	0,228
	vB_PaeM_USP_1	30,49 $\pm$ 22,42 (24,73)	13,25; 47,72 (15,93 – 88,83)	
	vB_PaeM_USP_2	29,10 $\pm$ 7,66 (29,33)	23,21; 34,99 (19,23 – 40,43)	
	vB_PaeM_USP_3	37,47 $\pm$ 15,27 (40,63)	25,73; 49,20 (17,33 – 67,53)	
	vB_PaeM_USP_18	30,90 $\pm$ 11,36 (30,73)	22,17; 39,63 (12,43 – 49,43)	
	vB_PaeM_USP_25	23,86 $\pm$ 8,52 (25,43)	17,31; 30,40 (8,93 – 37,13)	

† Kruskal–Wallis seguido do pós teste de Dunn com ajuste de Bonferroni.

Apêndice O: Proteases extracelulares ($\times 10^4$) secretada por *P. aeruginosa* ATCC 27853 após 2, 8, 24 e 48 h de cocultura com os cinco bacteriófagos diferentes.

Tempo de incubação	Grupos	Média $\pm$ Desvio Padrão (Mediana)	Intervalo de confiança 95% (Mínimo – Máximo)	p [†]
2 h	Controle	3,81 $\pm$ 0,05 (3,81)	3,77; 3,85 (3,73 – 3,90)	1,000
	vB_PaeM_USP_1	3,68 $\pm$ 0,10 (3,71)	3,60; 3,76 (3,51 – 3,79)	
	vB_PaeM_USP_2	3,67 $\pm$ 0,06 (3,67)	3,63; 3,72 (3,59 – 3,78)	
	vB_PaeM_USP_3	3,55 $\pm$ 0,05 (3,56)	3,51; 3,58 (3,48 – 3,62)	
	vB_PaeM_USP_18	3,66 $\pm$ 0,06 (3,66)	3,61; 3,71 (3,56 – 3,75)	
	vB_PaeM_USP_25	3,73 $\pm$ 0,06 (3,73)	3,68; 3,77 (3,62 – 3,80)	
8 h	Controle	4,18 $\pm$ 0,10 (4,16)	4,11; 4,26 (4,04 – 4,31)	1,000
	vB_PaeM_USP_1	3,81 $\pm$ 0,07 (3,81)	3,76; 3,86 (3,68 – 3,90)	
	vB_PaeM_USP_2	3,99 $\pm$ 0,13 (3,94)	3,89; 4,09 (3,85 – 4,16)	
	vB_PaeM_USP_3	3,95 $\pm$ 0,10 (3,96)	3,88; 4,03 (3,81 – 4,13)	
	vB_PaeM_USP_18	4,00 $\pm$ 0,10 (4,00)	3,92; 4,07 (3,88 – 4,18)	
	vB_PaeM_USP_25	3,97 $\pm$ 0,07 (3,94)	3,91; 4,02 (3,87 – 4,07)	
24 h	Controle	8,61 $\pm$ 0,97 (8,62)	7,87; 9,35 (7,45 – 10,43)	1,000
	vB_PaeM_USP_1	6,96 $\pm$ 0,43 (6,81)	6,63; 7,30 (6,49 – 7,69)	
	vB_PaeM_USP_2	7,32 $\pm$ 0,52 (7,42)	6,92; 7,73 (6,39 – 8,01)	
	vB_PaeM_USP_3	6,99 $\pm$ 0,30 (7,07)	6,77; 7,22 (6,55 – 7,50)	
	vB_PaeM_USP_18	7,02 $\pm$ 0,73 (7,14)	6,45; 7,58 (5,28 – 7,84)	
	vB_PaeM_USP_25	7,31 $\pm$ 0,49 (7,18)	6,93; 7,69 (6,72 – 8,29)	
48 h	Controle	15,18 $\pm$ 5,85 (13,03)	10,68; 19,67 (7,61 – 24,47)	1,000
	vB_PaeM_USP_1	18,92 $\pm$ 7,99 (23,24)	12,78; 25,06 (8,11 – 27,53)	
	vB_PaeM_USP_2	17,55 $\pm$ 7,27 (19,85)	11,96; 23,14 (7,19 – 27,77)	
	vB_PaeM_USP_3	18,51 $\pm$ 8,16 (23,23)	12,24; 24,78 (5,81 – 25,62)	
	vB_PaeM_USP_18	17,67 $\pm$ 6,17 (20,59)	12,93; 22,41 (7,95 – 24,86)	
	vB_PaeM_USP_25	17,45 $\pm$ 6,14 (20,59)	12,74; 22,17 (7,95 – 24,86)	

† Kruskal–Wallis seguido do pós teste de Dunn com ajuste de Bonferroni.

Apêndice P: Material educacional e de divulgação da pesquisa científica na forma de vídeo. Para acessá-lo escanear o código a seguir:

Anexos

Anexo A: Cadastro do projeto de pesquisa junto ao SisGen.

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AD5DDB2

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	AD5DDB2
Usuário:	Evandro Watanabe
CPF/CNPJ:	221.222.858-93
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa
Espécie	
Bacteriófagos	
Título da Atividade:	Isolamento de bacteriófagos com potencial atividades antibacteriana e antibiofilme
Equipe	
Evandro Watanabe	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Viviane de Cássia Oliveira	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Parceiras Nacionais	
63.025.530/0027-43 / Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto	

Data do Cadastro:	07/03/2019 12:09:37
Situação do Cadastro:	Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 18:07 de 13/06/2019.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo B: Artigo científico publicado: OLIVEIRA, V. C. et al. Bacteriophage Isolation from Denture Biofilm. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*, v. 3, n. 2, p. 34–38, 2017.

Bacteriophage Isolation from Denture Biofilm

Isolamento de bacteriófagos a partir do biofilme de dentaduras.

Aislamiento de bacteriófagos del biopelícula de dentaduras postiza.

Viviane de Cássia Oliveira¹, Carolina Noronha Ferraz de Arruda², Rachel Maciel Monteiro¹, Cláudia Helena Lovato da Silva², Helena de Freitas Oliveira Paranhos², Evandro Watanabe²

1. Graduate Program in Fundamental Nursing, University of São Paulo at Ribeirão Preto College of Nursing, Ribeirão Preto-SP, Brazil
2. Department of Dental Materials and Prosthodontics, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil

ABSTRACT

Objective: this research evaluated if it is possible to isolate bacteriophages from dentures biofilm, and use it as an emergent way to control biofilm growing. **Method:** biofilm samples were collected from sixteen maxillary complete dentures in an aseptic zone by brushing their internal surfaces using a soft toothbrush. The biofilm suspensions obtained were added to standard strains (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and the presence of lysis was evaluated. **Results:** bacteriophages were not isolated from the denture samples. **Conclusion:** this study presented an opportunity to invest in a new method to detect bacteriophages from mature biofilms of complete dentures.

Descriptors: Denture, biofilm, bacteriophage.

RESUMO

Objetivo: este estudo avaliou se é possível isolar bacteriófagos a partir do biofilme de dentaduras e utilizá-los como uma ferramenta emergente no controle de biofilmes. **Método:** as amostras de biofilme foram coletadas de dezesseis próteses totais maxilares, em zona asséptica, escovando as superfícies internas de cada prótese com auxílio de uma escova de dente macia. As suspensões obtidas foram cultivadas junto a cepas padrão (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e a presença de áreas de lise foi avaliada. **Resultados:** nenhum bacteriófago foi isolado das amostras de biofilme das dentaduras. **Conclusão:** este estudo apresentou a oportunidade de investir em novos métodos para detectar bacteriófagos em biofilmes de dentaduras.

Descritores: Denture, biofilm, bacteriophage.

RESUMÉN

Objetivo: este estudio evaluó si es posible aislar bacteriófagos a partir del biopelícula de dentaduras y utilizarlos como una herramienta emergente en el control de biopelículas. **Método:** las muestras de biofilm fueron recolectadas de dieciséis prótesis totales maxilares, en zona aseptica, cepillando las superficies internas de cada prótesis con ayuda de un cepillo de dientes suave. Las suspensiones obtenidas fueron cultivadas junto a cepas estándar (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y la presencia de áreas de lisis fue evaluada. **Resultados:** ningún bacteriófago fue aislado de las muestras de biofilm de las dentaduras. **Conclusión:** este estudio presentó la oportunidad de invertir en nuevos métodos para detectar bacteriófagos en biopelículas maduras de dentaduras.

Descriptores: Dentadura postiza, Biopelícula, bacteriófago.

Como citar este artigo:

Oliveira VC, Arruda CNF, Monteiro RM, Silva CHL, Paranhos HFO, Watanabe E. Bacteriophage Isolation from Denture Biofilm. *Rev Pre Infec e Saúde*[Internet].2017;3(2):34-38. Available from: <http://www.ojs.ufpi.br/index.php/nupcis/article/view/5848>

Anexo C: Artigo científico publicado: OLIVEIRA, V. C. et al. Identification and Characterization of New Bacteriophages to Control Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on Endotracheal Tubes. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p:580779, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580779>

ORIGINAL RESEARCH
published: 06 October 2020
doi: 10.3389/fmicb.2020.580779

Identification and Characterization of New Bacteriophages to Control Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on Endotracheal Tubes

Viviane C. Oliveira^{1,2}, Felipe L. Bim¹, Rachel M. Monteiro¹, Ana Paula Macedo², Emerson S. Santos³, Cláudia H. Silva-Lovato², Helena F. O. Paranhos², Luis D. R. Melo⁴, Silvio B. Santos⁴ and Evandro Watanabe^{1,5*}

¹ Human Exposome and Infectious Diseases Network, School of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ² Department of Dental Materials and Prostheses, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ³ Department of Clinical Toxicological and Bromatologic Analysis, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ⁴ Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal, ⁵ Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Jian Li,
Monash University, Australia

Reviewed by:

Oana Ciotu,
University of Copenhagen, Denmark
Yoon Kyung (Rachel) Chang,
The University of Sydney, Australia

*Correspondence:

Evandro Watanabe
evandro.watanabe@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received:

24 July 2020

Accepted:

08 September 2020

Published:

06 October 2020

Citation:

Oliveira VC, Bim FL, Monteiro RM,
Macedo AP, Santos ES,
Silva-Lovato CH, Paranhos HFO,
Melo LDR, Santos SB and
Watanabe E (2020) Identification
and Characterization of New
Bacteriophages to Control
Multidrug-Resistant *Pseudomonas
aeruginosa* Biofilm on Endotracheal
Tubes. *Front. Microbiol.* 11:580779.
doi: 10.3389/fmicb.2020.580779

Studies involving antimicrobial-coated endotracheal tubes are scarce, and new approaches to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on these devices should be investigated. In this study, five new *P. aeruginosa* bacteriophages from domestic sewage were isolated. All of them belong to the order Caudovirales, Myoviridae family. They are pH and heat stable and produce 27 to 46 particles after a latent period of 30 min at 37°C. Their dsDNA genome (ranging from ~62 to ~65 kb) encodes 65 to 89 different putative proteins. They exhibit a broad lytic spectrum and infect 69.7% of the *P. aeruginosa* strains tested. All the bacteriophages were able to reduce the growth of *P. aeruginosa* strains in planktonic form. The bacteriophages were also able to reduce the biofilm viability rates and the metabolic activity of *P. aeruginosa* strains in a model of biofilms associated with endotracheal tubes. In addition, scanning electron microscopy micrographs showed disrupted biofilms and cell debris after treatment of bacteriophages, revealing remarkable biofilm reduction. The lytic activity on multidrug-resistant *P. aeruginosa* biofilm indicates that the isolated bacteriophages might be considered as good candidates for therapeutic studies and for the application of bacteriophage-encoded products.

Keywords: bacteriophage, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, multidrug resistance, phage therapy

INTRODUCTION

Mechanical ventilation through an endotracheal or tracheostomy tube is a supportive intervention to critically ill patients and represents a risk factor for the occurrence of ventilator-associated pneumonia (VAP; Haas et al., 2014). VAP is the most common healthcare-associated infection in critically ill patients, involves high financial costs, and has negative prognosis (Barbier et al., 2013;

Anexo D: Artigo científico publicado: OLIVEIRA, V. C. et al. Bacteriophage cocktail-mediated inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on endotracheal tube surface. **Antibiotics**, v. 10, p:78, 2021. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010078>

antibiotics

Article

Bacteriophage Cocktail-Mediated Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on Endotracheal Tube Surface

Viviane C. Oliveira ^{1,2} , Ana P. Macedo ², Luis D. R. Melo ³ , Silvio B. Santos ³ , Paula R. S. Hermann ^{1,4}, Cláudia H. Silva-Lovato ², Helena E. O. Paranhos ², Denise Andrade ¹ and Evandro Watanabe ^{1,5,*}

¹ Human Exposome and Infectious Diseases Network—HEID, School of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Bandeirantes Avenue 3900, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-904, Brazil; vivianecasista@usp.br (V.C.O.); paularogina@unb.br (P.R.S.H.); dandrade@corp.usp.br (D.A.)

² Department of Dental Materials and Prostheses, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Café Avenue S/N, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-904, Brazil; anapaula@forp.usp.br (A.P.M.); chl@forp.usp.br (C.H.S.-L.); helanpar@forp.usp.br (H.E.O.P.)

³ Centre of Biological Engineering—CEB, University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal; lmelo@deb.uminho.pt (L.D.R.M.); stlviosantos@deb.uminho.pt (S.B.S.)

⁴ Department of Nursing, University of Brasília, Distrito Federal, Brasília 72220-275, Brazil

⁵ Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Café Avenue S/N, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-904, Brazil

* Correspondence: ewatanabe@forp.usp.br; Tel.: +55-16-3315-4078

Citation: Oliveira, V.C.; Macedo, A.P.; Melo, L.D.R.; Santos, S.B.; Hermann, P.R.S.; Silva-Lovato, C.H.; Paranhos, H.E.O.; Andrade, D.; Watanabe, E. Bacteriophage Cocktail-Mediated Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on Endotracheal Tube Surface. *Antibiotics* **2021**, *10*, 78. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010078>

Received: 1 December 2020

Accepted: 12 January 2021

Published: 15 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Although different strategies to control biofilm formation on endotracheal tubes have been proposed, there are scarce scientific data on applying phages for both removing and preventing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on the device surface. Here, the anti-biofilm capacity of five bacteriophages was evaluated by a high content screening assay. We observed that biofilms were significantly reduced after phage treatment, especially in multidrug-resistant strains. Considering the anti-biofilm screens, two phages were selected as cocktail components, and the cocktail's ability to prevent colonization of the endotracheal tube surface was tested in a dynamic biofilm model. Phage-coated tubes were challenged with different *P. aeruginosa* strains. The biofilm growth was monitored from 24 to 168 h by colony forming unit counting, metabolic activity assessment, and biofilm morphology observation. The phage cocktail promoted differences of bacterial colonization; nonetheless, the action was strain dependent. Phage cocktail coating did not promote substantial changes in metabolic activity. Scanning electron microscopy revealed a higher concentration of biofilm cells in control, while tower-like structures could be observed on phage cocktail-coated tubes. These results demonstrate that with the development of new coating strategies, phage therapy has potential in controlling the endotracheal tube-associated biofilm.

Keywords: bacteriophage; biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; endotracheal tube

1. Introduction

Ventilator-associated pneumonia (VAP) is a serious concern in critically ill patients occurring within the 48 h period following endotracheal intubation. The current COVID-19 pandemic is a predisposing factor for VAP, since it often requires mechanical ventilation, thus increasing the incidence and relevance of this infection [1]. VAP frequently involves high morbidity and excessive healthcare costs, and its incidence increases with the duration of ventilation [2–4]. The role of the endotracheal tube-associated biofilms in VAP etiology has been largely discussed. Commonly, biofilms on the device surface appear rapidly after intubation, promote a global covering of the internal side, and remain attached even after suctioning [2,5]. These biofilms represent a persistent source of pathogenic bacteria that can invade the lower airways, colonizing the lungs and causing VAP [6].

Strategies for biofilm growth inhibition on the endotracheal tube (ET) surface involve mainly suction systems [7], mucus shavers [8], and antimicrobial coatings [9–12]. Regarding

Anexo E: Artigo científico submetido ao periódico Microbial Pathogenesis em 24/11/2020.

Assessment of virulence mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* after bacteriophage infection

Viviane de Cássia Oliveira ^{a,b}, Stephan Steixner ^c, Cássio do Nascimento ^b, Valéria Oliveira Pagnano ^b, Cláudia Helena Silva-Lovato ^b, Helena de Freitas Oliveira Paranhos ^b, Doris Wilflingseder ^d, Débora Coraça-Huber ^c, Evandro Watanabe ^{a,e,*}

^a Human Exposome and Infectious Diseases Network – HEID, College of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^b Department of Dental Materials and Prosthesis, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

^c Research Laboratory for Biofilms and Implant Associated Infections (BIOFILM LAB), Department of Orthopedic Surgery, Experimental Orthopedics, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria.

^d Division of Hygiene and Medical Microbiology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria.

^e Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

***CORRESPONDING AUTHOR**

Prof. Evandro Watanabe

E-mail: ewatanabe@forp.usp.br